

INSTYTUT MEDYCYNY DOŚWIADCZALNEJ I KLINICZNEJ
IM. MIROŚŁAWA MOSSAKOWSKIEGO
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

ZAKŁAD NEUROBIOLOGII NAPRAWCZEJ

INGA MARKIEWICZ

MOLEKULARNE ASPEKTY INTERAKCJI NEURALNYCH KOMÓREK
MACIERZYSTYCH LUDZKIEJ KRWI PĘPOWINOWEJ Z KOMÓRKAMI
MÓZGU GRYZONI W PROCESIE NEUROGENEZY *IN VITRO* I *IN VIVO*



LS 298

H4250

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Barbary Łukomskiej

WARSZAWA 2008

<http://rcin.org.pl>

Wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały częściowo opublikowane w następujących pracach:

Jurga M, **Markiewicz A**, Sarnowska A, Habich H, Kozłowska H, Lukomska B, Bużańska L, Domańska – Janik K: Neurogenic potential of human umbilical cord blood - neural-like stem cells depends on their previous long-term culture conditions. *J Neurosc Res*, 2006;83:627-637

Markiewicz I, Lukomska B: The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp* 2006;66(4):343-358

Markiewicz I, Sypecka J, Domanska-Janik K, Wyszomirski T, Lukomska B: Cellular environment determinates differentiation of human umbilical cord blood-derived neural progenitors *in vitro*. *Cell Proliferat* (wysłane do publikacji)

Badania, których wyniki przedstawiono w niniejszej rozprawie doktorskiej były częściowo finansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego promotorskiego nr 1309/P01/2006/31

Serdeczne podziękowania składam promotorowi mojej pracy doktorskiej Prof. dr hab. Barbarze Łukomskiej za opiekę naukową i cenne konsultacje, nie tylko przy redagowaniu rozprawy, ale też w trakcie całych studiów doktoranckich. Szczególnie dziękując za wyrozumiałość i pomoc w godzeniu życia rodzinnego z pracą.

*Chciałabym szczególnie podziękować
Pani Prof. dr hab. Krystynie Domańskiej-Janik za stworzenie
doskonałych warunków do pracy i pogłębiania wiedzy*

*Pragnę podziękować dr Hani Kozłowskiej za wspólnie
spędzone godziny przy mikroskopie konfokalnym
oraz nieocenioną pomoc w trudnej analizie zdjęć*

*Szczególne podziękowania składam również
Panu dr Tomaszowi Wyszomirskiemu
za wyjątkowo cierpliwe wprowadzenie mnie
w zawiliły świat statystyki*

*Bardzo dziękuję też koleżankom i kolegom oraz wszystkim
współpracownikom z Zakładu Neurobiologii Naprawczej
za przyjaźń, wsparcie i stworzenie atmosfery, dzięki której
praca jednocześnie była przyjemnością*

Inga

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	5
SKRÓTY UŻYWANE W PRACY	7
I. PRZEGLĄD LITERATURY	10
I.1. Neurogeneza w ośrodkowym układzie nerwowym u osobników dorosłych	10
I.1.1. Struktura niszy neuralnych komórek macierzystych	10
I.1.1.1. Nisze neuralnych komórek macierzystych w mózgu u gryzoni	11
I.1.1.2. Nisze neuralnych komórek macierzystych w mózgu u ludzi.....	13
I.1.2. Neuralne komórki macierzyste	15
I.1.3. Komórki niszy w OUN i ich funkcje w procesie neurogenezy	16
I.1.3.1. Astrocyty	16
I.1.3.2. Komórki mikrogleju	17
I.1.3.3. Neurony	18
I.1.3.4. Komórki śródbłonna naczyń.....	19
I.1.3.5. Komórki wyściółki komór.....	20
I.1.3.6. Oligodendrocyty	20
I.1.4. Czynniki regulujące proces neurogenezy	21
I.1.5. Proces neurogenezy w schorzeniach OUN	24
I.1.5.1. Neurogeneza w chorobach neurodegeneracyjnych	25
I.1.5.2. Neurogeneza w procesach zapalnych OUN.....	26
I.1.5.2.1. Czynniki zapalne a proces neurogenezy.....	27
I.2. Transplantacje komórek macierzystych w celu repopulacji uszkodzonych struktur OUN ...	30
I.2.1. Źródła komórek macierzystych.....	30
I.2.2. Transplantacje komórek ludzkiej krwi pępowinowej w eksperymentalnych modelach uszkodzeń OUN.....	32
I.2.3. Transplantacje komórek u ludzi ze schorzeniami OUN	34
I.2.3.1. Przeszczepy komórek w chorobie Parkinsona	34
I.2.3.2. Przeszczepy komórek w chorobie Huntingtona.....	35
I.2.3.3. Przeszczepy komórek w chorobie Alzheimera	36
I.2.3.4. Przeszczepy komórek w stwardnieniu rozsianym	36
I.2.3.5. Przeszczepy komórek w stwardnieniu zanikowym bocznym	37
I.2.3.6. Przeszczepy komórek u chorych po udarze	37
I.2.3.7. Przeszczepy komórek w urazach rdzenia kręgowego.....	38
II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	40
III. MATERIAŁ	41
IV. METODY BADAŃ	42
IV.1. Hodowla komórek linii HUCB-NSC	42
IV.2. Znakowanie HUCB-NSC barwnikiem fluorescencyjnym CMFDA	42
IV.3. Izolacja i otrzymywanie jednorodnej hodowli astrocytów mózgu szczura	43
IV.4. Izolacja i otrzymywanie jednorodnej hodowli komórek mikrogleju mózgu szczura	43
IV.5. Izolacja i otrzymywanie jednorodnej hodowli neuronów mózgu szczura.....	44
IV.6. Hodowla komórek śródbłonna.....	44
IV.7. Współhodowle HUCB-NSC w obecności astrocytów, komórek mikrogleju, neuronów mózgu szczura oraz komórek śródbłonna myszy (t-End)	45
IV.8. Stymulacja astrocytów i komórek mikrogleju LPS i TMT	45
IV.9. Współhodowle HUCB-NSC w obecności astrocytów i komórek mikrogleju stymulowanych LPS i TMT.....	45
IV.10. Badania immunocytochemiczne	46

IV.11. Ocena immunoenzymatyczna cytokin	47
IV.12. Pomiar tlenu azotu - metoda Griessa	47
IV.13. Przygotowanie komórek HUCB-NSC do procedury przeszczepiania	48
IV.14. Przeszczepienie HUCB-NSC do strefy okołokomorowej (SVZ) osesków szczura	48
IV.15. Pobieranie mózgow od szczurów po przeszczepie komórek HUCB-NSC	49
IV.16. Badania immunohistochemiczne	50
IV.17. Wizualizacja mikroskopowa	50
IV.18. Analiza statystyczna	51
V. WYNIKI BADAŃ	56
V.1 Charakterystyka komórek linii HUCB-NSC hodowanych in vitro	56
V.1.1. Obraz morfologiczny HUCB-NSC	56
V.1.2. Obecność poszczególnych fenotypów neuralnych w pełnej populacji HUCB-NSC	56
V.2. Współhodowle HUCB-NSC i astrocytów izolowanych z mózgu osesków szczura	58
V.2.1. Morfologiczna i fenotypowa charakterystyka hodowli astrocytów mózgu szczura	58
V.2.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności astrocytów izolowanych z mózgu osesków szczura	60
V.3. Współhodowle HUCB-NSC i komórek mikrogleju izolowanych z mózgu osesków szczura	62
V.3.1. Morfologiczna i fenotypowa charakterystyka hodowli komórek mikrogleju mózgu szczura	62
V.3.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności komórek mikrogleju izolowanych z mózgu osesków szczura	64
V.4. Współhodowle HUCB-NSC i neuronów izolowanych z mózgu osesków szczura	67
V.4.1. Morfologiczna i fenotypowa charakterystyka hodowli neuronów mózgu szczura	67
V.3.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności neuronów izolowanych z mózgu osesków szczura	69
V.5. Współhodowle HUCB-NSC i komórek śródbłonka ustalonej linii t-END	71
V.5.1. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności komórek śródbłonka	71
V.6. Proliferacja HUCB-NSC w różnych warunkach ich hodowli	74
V.7. Współhodowle HUCB-NSC i astrocytów stymulowanych LPS lub TMT	75
V.7.1. Zmiany morfologiczne astrocytów w odpowiedzi na aktywację LPS lub TMT	75
V.7.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności astrocytów stymulowanych LPS i TMT	76
V.8. Współhodowle HUCB-NSC i komórek mikrogleju stymulowanych LPS i TMT	79
V.8.1. Zmiany morfologiczne komórek mikrogleju w odpowiedzi na aktywację LPS i TMT	79
V.8.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności komórek mikrogleju stymulowanych LPS lub TMT	80
V.8.3. Żywotność i ocena morfologiczna HUCB-NSC współhodowanych z astrocytami i komórkami mikrogleju po ich stymulacji LPS i TMT	83
V.9. Poziom wybranych cytokin pro-zapalnych w nadsączach z hodowli astrocytów i komórek mikrogleju aktywowanych LPS i TMT	85
V.10. Stężenie tlenu azotu w nadsączach z hodowli astrocytów i komórek mikrogleju aktywowanych LPS i TMT	85
V.11. Identyfikacja HUCB-NSC po ich transplantacji do mózgu osesków szczura	86
VI. Dyskusja wyników	90
VII. Podsumowanie i wnioski	105
VIII. Piśmiennictwo	106
IX. Streszczenie	127

SKRÓTY UŻYWANE W PRACY

AAS	- zestaw antybiotyków i preparatów przeciwgrzybiczych do hodowli komórkowych (ang. Antibiotic Antimycotic Solution)
ACh	- acetylocholina (ang. AcetyloCholine)
AD	- choroba Alzheimera (ang. Alzheimer Disease)
AIF	- czynnik indukujący apoptozę (ang. Apoptosis Inducing Factor)
ALS	- stwardnienie zanikowe boczne (ang. Amyotrophic Lateral Sclerosis)
ATF-2	- czynnik transkrypcyjny (ang. Activating Transforming Factor - 2)
AraC	- arabinozyd cytozyny (ang. Cytosine Arabinofuranoside)
BBB	- bariera krew-mózg (ang. Brain Blood Barrier)
BDNF	- czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego (ang. Brain Derived Neurotrophic Factor)
bFGF	- zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Basic Fibroblast Growth Factor)
bHLH	- rodzina czynników transkrypcyjnych (ang. basic Helix-Loop-Helix)
BMP	- czynnik wzrostowy kości (ang. Bone Morphogenic Protein)
BrdU	- BromodeoksyUrydyna (ang. BromodeoxyUridine)
B27	- suplement pożywki w hodowlach bezsurowicznych
CA	- (<i>Cornu Ammonis</i>) Róg Ammona
cAMP	- cykliczny AMP, drugorzędowy przekaźnik sygnału (ang. cyclic AdenozynoMono Phosphoran)
CD34	- białko powierzchniowe występujące na hematopoetycznych komórkach macierzystych (ang. Cell Determinant 34)
CD45	- białko powierzchniowe występujące na wszystkich komórkach hematopoetycznych (ang. Cell Determinant 45)
CMFDA	- fluorescencyjny znacznik komórkowy (ang. 5-ChloroMethyl-Fluorescein-DiAcetate)
CNTF	- rzęskowy czynnik neurotroficzny (ang. Ciliary Neurotrophic Factor)
CREB	- białko wiążące cAMP (ang. cAMP response element binding protein)
DA	- dopamina (ang. DopAmine)
DG	- zakręt zębaty hipokampa (ang. Dentate Gyrus)
DMEM/F12	- pożywka hodowlana (ang. Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium)
DMSO	- dimetylo sulfotlenek (ang. Dimethyl Sulfoxide)
DNaza	- deoksyrybonuleaza
ED1	- przeciwciało rozpoznające białko występujące w komórkach makrofagów/komórkach mikrogleju szczura
EGF	- naskórkowy czynnik wzrostu (ang. Epithelial Growth Factor)
EGFP	- zielone białko fluorescencyjne (ang. Enhanced Green Fluorescent Protein)
EKM	- embrionalne komórki macierzyste (ang. Embrionic Stem Cells)
eNOS	- forma endotelialna syntazy tlenu azotu (ang. endothelial Nitric Oxide Synthase)
FBS	- bydlęca surowica płodowa (ang. Fetal Bovine Serum)
FGF	- czynnik wzrostu fibroblastów (ang. Fibroblast Growth Factor)
FoxA1	- czynnik transkrypcyjny z rodziny tzw. białek fork head/winged helix charakterystyczny dla progenitorów endodermalnych (ang. forkhead box A1)
GABA	- kwas γ -aminomasłowy (ang. Gamma-AminoButyric Acid)
GAPDH	- dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa (ang. Glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase)
GC	- cyklaza guanylowa (ang. Guanylate Cyclase)
GDF-11	- endogenny inhibitor neurogenezy (ang. Growth and Differentiation Factor)
GDNF	- czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego (ang. Glia cell line Derived Neurotrophic Factor)
GFAP	- glejowe kwaśne białko włókienkowe (ang. Glial Fibrillary Acidic Protein)
HBSS	- roztwór soli Hanks'a (ang. Hank's Balanced Salt Solution)
Hes-1	- czynnik transkrypcyjny z rodziny białek bHLH, działający hamująco na proces neurogenezy (ang. Hairy and enhancer of split - 1)
HUCB	- ludzka krew pępowinowa (ang. Human Umbilical Cord Blood)

HUCB-NSC	- linia ludzkich neuralnych komórek macierzystych wyprowadzona z krwi pępowinowej (ang. Human Umbilical Cord Blood derived Neural-like Stem Cell)
HuNu	- specyficzne przeciwciało skierowane przeciwko białkom jądrowym komórek ludzkich (ang. Human Nuclei)
IFNγ	- interferon γ
IGF-1	- insulinopodobny czynnik wzrostowy 1 (ang. insulin like growth factor – 1)
IL	- interleukina
IMDM	- pożywka hodowlana (ang. Iscove's Modified Dulbecco's Medium)
iNOS	- indukowana forma syntazy tlenu azotu (ang. inducible Nitric Oxide Synthase)
ITS	- suplement pożywki hodowlanej zawierający insulinę, transferynę i selenian (ang. Insulin, Transferin Selenium)
Kaspaza-3	- białko z rodziny proteaz biorące udział w końcowej fazie programowanej śmierci komórki
Ki67	- białko obecne w jądrach komórek mitotycznych
KM	- Komórka Macierzysta
L-dopa	- L-3,4-dihydroksyfenyloalanina, prekursor dopaminy
LIF	- czynnik hamujący białaczek (ang. Leukemia Inhibitory Factor)
LPS	- (ang. Lipopolisaccharide) lipopolisacharyd
LV	- komora boczna (ang. Lateral Ventricle)
MAP2	- białko stabilizujące mikrotubule (ang. Microtubule Associated Protein 2)
MAPK/Erk	- ścieżka sygnałowa kinaz MAPK i Erk
MCAO	- zwierzęcy model udaru mózgu, powstający w następstwie zamknięcia tętnicy środkowej mózgu (ang. Middle Cerebral Artery Occlusion stroke model)
MS11	- gen kodujący białko musashi (ang. Musashi homolog 1)
NB	- pożywka hodowlana do hodowli neuronów (ang. NeuroBasal)
NCM	- medium znad hodowli neuronów (ang. Neuronal Conditioned Medium)
NEDA	- N-(1-naftyl)etylenodiamina (ang. N-(1-naphtyl)ethylenediamine)
Nestyna	- białko włókienkowe obecne w progenitorach neuroektodermalnych
NeuN	- białko jądrowe specyficzne dla dojrzałych neuronów (ang. Neuronal Nuclei Antygen)
NeuroD1	- czynnik transkrypcyjny z rodziny białek bHLH (ang. Neurogenic Differentiation 1)
Neurogenezyzna 1	- białko z rodziny białek Noggin
NF200	- białko neurofilamentów o masie molekularnej 200kDa (ang. 200 kDa Neurofilament protein)
NG2	- proteoglikan siarczanu chondroityny
NGF	- czynnik wzrostu nerwów (ang. Nerve Growth Factor)
Ngn1	- neurogenina, czynnik transkrypcyjny z rodziny białek bHLH (ang. Neurogenin 1)
NGS	- surowica krwi kozy (ang. Normal Goat Serum)
NKM	- Neuralna Komórka Macierzysta
NMDA	- kwas N-metylo-D-asparaginowy (ang. N-methyl-D-aspartic acid)
nNOS	- forma neuronalna syntazy tlenu azotu
NO	- tlenek azotu (ang. Nitric Oxide)
NOD/SCID	- myszy transgeniczne z defektem immunologicznym (ang. Non-Obese Diabetic Severe Combined Immunodeficient)
Notch	- receptor transbłonowy ligandów Delta/Jagged/Serrate
NSE	- neuron-specyficzna enolaza (ang. Neuronal Specific Enolase)
NT	- neurotrofina (ang. NeuroTrophin)
NuMa	- białko charakterystyczne dla macierzy jądrowej komórek ludzkich (ang. Nuclear Mitotic Apparatus Protein)
OB	- opuszka węchowa (ang. Olfactory Bulb)
Oct3/4	- czynnik transkrypcyjny charakterystyczny dla pluripotentnych komórek macierzystych (ang. Octamer-binding transcription factor-3/4)
Onkostatyna M	- cytokina produkowana przez aktywowane limfocyty T (ang. oncostatin M)
OPC	- komórki progenitorowe oligodendrocytów (ang. Oligodendrocyte Prekursor Cells)

OR	- stosunek szans obliczany metodami statystycznymi (ang. Odds Ratio)
OTX1	- czynnik transkrypcyjny występujący w progenitorach neuralnych (ang. Orthodenticle homolog 1)
OUN	- Ośrodkowy Układ Nerwowy
O4	- białko charakterystyczne dla oligodendrocytów
PAS	- domena białkowa zlokalizowana na N-końcu łańcucha polipeptydowego (ang. Per-Arnt-Sim)
PCNA	- endogenny jądrowy antygen komórek proliferujących (ang. Proliferating Cell Nuclear Antygen)
PD	- choroba Parkinsona (ang. Parkinson Disease)
PDGF	- płytkowy czynnik wzrostu (ang. Platelet Derived Growth Factor)
PEDF	- czynnik pochodzący z nabłonka barwnikowego siatkówki (ang. Pigment Epithelial Differentiation Factor)
pEGFP/N1	- plazmid z wbudowanym genem markerowym <i>EGFP</i>
PFA	- paraformaldehid (ang. ParaFormAldehyde)
PI3/Act	- ścieżka sygnałowa zależna od aktywnej kinazy PI3/Act
PSA-NCAM	- białko charakterystyczne dla niedojrzałych, migrujących neuroblastów (ang. PolySiAlylated Neural Adhesion Molekule)
PTX	- pentoksyfilina
RA	- kwas retinowy (ang. all-trans Retinoic Acid)
Rex1	- czynnik transkrypcyjny typu „zinc finger” (ang. RNA exonuclease 1)
RMS	- donosowy strumień migracji (ang. Rostral Migratory Stream)
RNaza	- rybonukleaza
SA	- sulfanilamid
S100β	- białko cytoplazmatyczne występujące na dojrzałych astrocytach (ang. S100 calcium binding protein B)
SCI	- uszkodzenie rdzenia kręgowego (ang. Spinal Cord Injury)
SGZ	- strefa podziarnista hipokampa (region zakrętu zębatego wzdłuż wewnętrznej granicy komórek ziarnistych) (ang. SubGranular Zone)
Shh	- czynnik transkrypcyjny w komórkach progenitorowych (ang. Sonic hedgehog)
SKM	- Somatyczne Komórki Macierzyste
Slit	- glikoproteina wspomagająca migrację komórek prekursorowych neuronów i wzrost aksonów
Sox2	- czynnik transkrypcyjny (ang. <i>SRY</i> (sex determining region Y)-box 2) charakterystyczny dla pluripotentnych i neuralnych komórek macierzystych
SVZ	- strefa okołokomorowa mózgu (ang. Subventricular Zone)
TBE	- bufor (ang. Tris Borate EDTA)
t-End	- linia komórek pochodzących ze śródbłonka naczyń włosowatych myszy
T-gene	- czynnik transkrypcyjny charakterystyczny dla progenitorowych komórek mezodermalnych (ang. T, brachyury homolog)
TGF- β	- transformujący czynnik wzrostu β (ang. Transforming growth factor β)
TH	- hydroxylaza tyrozynowa (ang. Tyrosine Hydroxylase) enzym typowy dla komórek katecholaminoergicznych
TMT	- trimetylocyna (ang. TriMethylTin)
TNF-α	- czynnik martwicy nowotworu α (ang. Tumor Necrosis Factor α)
TUJ1	- przeciwciało skierowane przeciwko β tubulinie III obecnej w neuronach
VEGF	- czynnik wzrostu śródbłonka naczyń (ang. Vascular Endothelial Growth Factor)
vWF	- czynnik von Willebrand'a - marker komórek śródbłonka (ang. von Willebrand Factor)
Wnt	- ścieżka sygnałowa kontrolująca neurogenezę zachodzącą w niszach KM
β-Tubulina III	- białko mikrotubularne, marker neuronów
5-HT	- serotonina (5-HydroxyTryptamine)

I. PRZEGLĄD LITERATURY

I.1. Neurogeneza w ośrodkowym układzie nerwowym u osobników dorosłych

Przez wiele lat istniał pogląd, iż proces neurogenezy ma miejsce jedynie w życiu płodowym, a zniszczone struktury układu nerwowego u osobników dorosłych nie podlegają regeneracji. W latach dwudziestych ubiegłego stulecia pojawiły się pierwsze doniesienia o obecności mitotycznie aktywnych komórek w mózgu (Ramon y Cajal, 1928). Ale dopiero w latach 60-tych XX wieku wraz z rozwojem autoradiografii możliwa była identyfikacja dzielących się komórek w określonych obszarach mózgu gryzoni i śledzenie losu nowopowstałych komórek nerwowych (Altman i Das, 1964; Altman, 1969). Sporadyczne doniesienia o strefach neurogennych w mózgu dorosłych ssaków i ptaków pojawiały się w latach 1970-1990 (Kaplan i Hinds, 1977; Goldman i Nottebohm, 1983; Stanfield i Trice, 1988). W roku 1992 Reynolds i Weiss wyizolowali multipotencjalne neuralne komórki macierzyste (NKM) z prądkowia dorosłych myszy stawiając hipotezę, że komórki macierzyste występują w dojrzałym ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i mają zdolność tworzenia nowych neuronów i komórek glejowych (Reynolds i Weiss, 1992). Wraz z rozwojem metod opartych na zastosowaniu BrdU (5-bromo 2-deoxyuridine) i immunocytochemii, Kuhn i wsp. potwierdzili wcześniejsze wyniki badań, iż BrdU-pozytywne komórki, obecne w hipokampie dorosłych gryzoni mają charakter neuronalny (Kuhn i wsp., 1996). Pełna akceptacja występowania neurogenezy u osobników dorosłych miała jednak miejsce dopiero kilka lat temu (Gross, 2000; Gage, 2000; Doetsch, 2003).

Aktywny proces neurogenezy w mózgu dojrzałych ssaków ma miejsce w dwóch strukturach mózgu: strefie okołokomorowej SVZ (ang. subventricular zone) i strefie podziarnistej hipokampa SGZ (ang. subgranular zone). Progenitory neuralne występują również w innych rejonach OUN tj. segment CA1 hipokampa, kora nowa, prądkowie, ciało migdałowe, ściana III i IV komory, przegroda przezroczysta czy rdzeń kręgowy (Emsley i wsp., 2005; Taupin, 2006). Jakkolwiek udział tych komórek progenitorowych w procesach powstawania nowych neuronów wzbudza wiele kontrowersji i do końca nie został potwierdzony.

I.1.1. Struktura niszy neuralnych komórek macierzystych

Progenitory neuralne nie są beładnie rozmieszczone w OUN, lecz występują w strukturach noszących nazwę niszy. Te wyspecjalizowane miejsca tworzą mikrośrodowisko odgrywające istotną rolę w stymulacji i regulacji aktywnej neurogenezy (Alvarez Buylla i Lim,

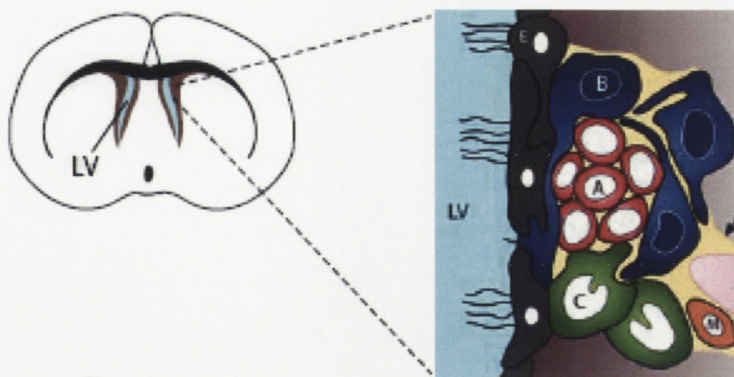
2004; Ming i Song, 2005). Koncepcja niszy dla komórek macierzystych została zaproponowana w roku 1978 przez Schofielda, a opisana po raz pierwszy przez Xie i Sprading w roku 2000 (Schofield, 1978; Xie i Sprading, 2000). Podczas gdy nisze komórek macierzystych występujące w szpiku kostnym, jelicie, wątrobie czy skórze zostały dobrze scharakteryzowane, nisze neuralnych komórek macierzystych nie do końca są poznane.

Obecnie przyjmuje się, iż sześć głównych typów komórek tworzy nisze neuralne w mózgu u dorosłych osobników: komórki śródbłonna, komórki wyściółki, astrocyty, komórki mikrogleju, neuralne komórki macierzyste i dojrzałe neurony (Jordan i wsp., 2007; Ihrie i Alvarez Buylla, 2008). Ponadto białka macierzy zewnątrzkomórkowej stanowią rusztowanie i biorą udział w aranżacji układu poszczególnych składników niszy, a także w prezentacji czynników neurotroficznymi. Nisze neuralne stanowią dynamiczne ośrodki funkcjonalne, które mogą ulegać modyfikacji w odpowiedzi na czynniki fizjologiczne lub patologiczne (Grote i Hannan, 2007; Martino i Pluchino, 2007; Pluchino i Martino, 2008).

1.1.1.1. Nisze neuralnych komórek macierzystych w mózgu u gryzoni

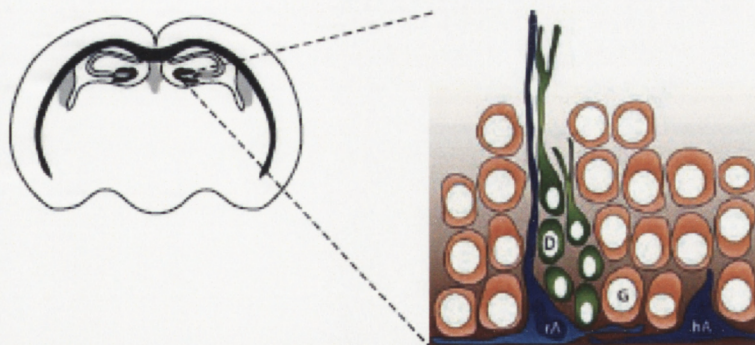
Neuralne komórki macierzyste zgromadzone są u dorosłych gryzoni w dwóch rejonach: strefie okołokomorowej (SVZ) wzdłuż ścian komór bocznych i strefie podziarnistej (SGZ) pomiędzy wnęką i warstwą ziarnistą zakrętu zębatego hipokampa.

SVZ zawiera największą liczbę mitotycznie aktywnych komórek w dojrzałym mózgu. Komórki występujące w tym rejonie, zostały dokładnie scharakteryzowane w badaniach immunocytochemicznych i elekronmikroskopowych (Gage, 2002; Doetsch, 2003; Ihrie i Alvarez Buylla, 2008). SVZ zawiera wolno proliferujące neuralne komórki macierzyste o charakterze astrocytarnym, wykazujące ekspresję GFAP i Nestyny (typ B). Komórki te przekształcają się w aktywnie dzielące się komórki (typ C), z których powstają niedojrzałe neuroblasty (typ A). Neuroblasty, dzieląc się migrują w postaci widocznych łańcuchów tunelami utworzonymi przez wypustki astrocytów w kierunku opuszki węchowej. W części przednio-grzbietowej SVZ łańcuchy neuroblastów zagęszczają się, tworząc donosowy strumień migracji (RMS) (ang. rostral migratory stream) (Lois i Alvarez Buylla, 1994; Ghashgaei i wsp., 2007). Droga migracji nowopowstałych komórek jest stosunkowo długa i wynosi w mózgu myszy kilkanaście milimetrów. W opuszce węchowej neuroblasty różnicują się w interneurony. Ostatnie badanie wykazały, że progenitory komórek układu nerwowego SVZ są zdolne różnicować się także w oligodendrocyty (Menn i wsp., 2006). Ściana komór bocznych przylegająca do SVZ jest u gryzoni pokryta urzęsionymi komórkami wyściółki komór mózgu (typ E). Neuralne komórki macierzyste (typ B) mają kontakt ze światłem komory, co pozwala im na odbieranie sygnałów z płynu mózgowo-rdzeniowego (Fig.1).



Ryc.1. Struktura strefy okołokomorowej (SVZ) mózgu myszy. Panel lewy: przekrój poprzeczny mózgu, pokazuje lokalizację SVZ, przylegającą do komór bocznych (ang. lateral ventricle LV). Panel prawy przedstawia szczegółowe usytuowanie komórek różnego typu w obrębie SVZ: komórki A (kolor czerwony) - migrujące neuroblasty; komórki B (kolor niebieski) - neuralne komórki macierzyste o charakterze astrocytarnym; komórki C (kolor żółty) - progenitory neuralne; komórki E (kolor szary) - komórki wyściółki komór mózgu (wg Ihrie i wsp. 2008, zmodyfikowany).

Strefa podziarnista (SGZ) różni się od strefy SVZ umiejscowieniem w OUN. SGZ nie ma bezpośredniego kontaktu z komorami bocznymi i płynem mózgowo-rdzeniowym, znajduje się pomiędzy wnęką a warstwą komórek ziarnistych w hipokampie. Podobnie jak w SVZ, progenitory neuralne w SGZ mają charakter astrocytarny (GFAP⁺, Nestyna⁺). Są to komórki z długimi promienistymi wypustkami (typ rA), określane jako progenitory typu I lub nazywane astrocytami promienistymi (Seri i wsp., 2001; Filippov i wsp., 2003). Promieniste astrocyty proliferują i w efekcie powstają komórki nazywane progenitorami typu II (typ D), które tworzą zwarte agregaty umiejscowione pomiędzy wypustkami astrocytów promienistych (Ming i Song, 2005). SGZ zawiera także horyzontalnie ukierunkowane astrocyty pozbawione długich wypustek promienistych (typ hA). Jak dotychczas, nie wiadomo czy te astrocyty mogą spełniać rolę prekursorów neuralnych. W odróżnieniu od komórek powstających w SVZ, droga migracji komórek neuralnych w SGZ jest bardzo krótka. Progenitory typu D migrują do warstwy komórek ziarnistych przekształcając się w neurony ziarniste (Seri i wsp., 2004) (Fig.2). Nowo powstałe neurony ziarniste wykazują markery dojrzałych neuronów tj. neuronu-specyficzna enolaza (NSE) (ang. neuronal specific enolase), kalbindyna, receptor NMDA i białko NeuN (Kuhn i wsp., 1996). W ciągu kilku dni wytwarzają aksony i neuryty, wykazując właściwości elektrofizjologiczne (van Praag i wsp., 2002). Proces synaptogenezy widoczny jest 2-4 tygodnie później (Liedo i wsp., 2006). Dotychczas nie wykazano jednoznacznej możliwości powstawania astrocytów czy oligodendrocytów z komórek macierzystych rezydujących w SGZ (unipolarność NKM).

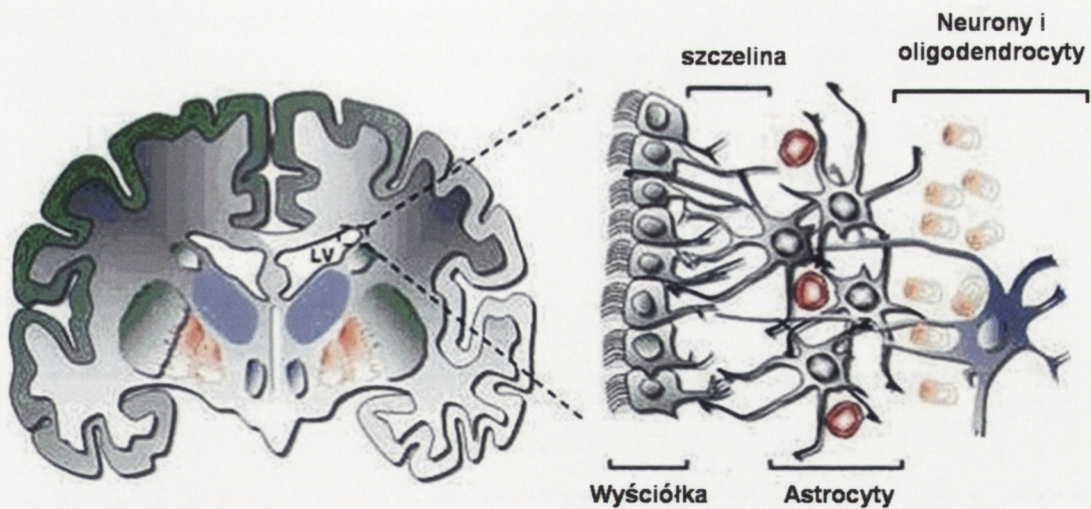


Ryc.2. Struktura strefy podziarnistej (SGZ) myszy. Panel lewy: przekrój poprzeczny mózgu pokazuje lokalizację strefy SGZ pomiędzy wnęką i warstwą ziarnistą zakrętu zębatego hipokampa. Panel prawy przedstawia szczegółowe usytuowanie komórek różnego typu w obrębie SGZ: komórki rA (kolor niebieski) - astrocyty promieniste; komórki hA (kolor granatowy) - horyzontalnie ukierunkowane astrocyty; komórki D (kolor zielony) - progenitory neuralne; komórki G (kolor pomarańczowy) - neurony ziarniste hipokampa (wg Ihrie i wsp. 2008, zmodyfikowany).

1.1.1.2. Nisze neuralnych komórek macierzystych w mózgu u ludzi

Istnienie neurogenezy w dorosłym mózgu u ludzi jako pierwszy opisał w roku 1998 Eriksson. Autor wykazał obecność dzielących się komórek w zakręcie zębatym hipokampa, potwierdził jednocześnie ekspresję markerów neuralnych w próbkach tkanki nerwowej pobranej z mózgu podczas autopsji (Eriksson i wsp., 1998). Obecność progenitorów neuralnych potwierdzono, badając fragmenty mózgu izolowane od pacjentów podczas operacji neurochirurgicznych (Johansson i wsp., 1999; Nunes i wsp., 2003). Preparaty biopsyjne ścian komór bocznych pacjentów w wieku 19-68 lat uwiarygodniły istnienie struktury gęsto upakowanych komórek w SVZ (Sanai i wsp., 2004). Komórki te o cechach astrocytów (GFAP⁺), tworzą wstęgę oddzieloną od wyściółki komór przestrzeni. Wypustki astrocytów wypełniają tę przestrzeń sięgając aż do komórek wyściółki a niektóre z nich mają bezpośredni kontakt ze światłem komory.

Cytoarchitektura niszy neuralnych komórek macierzystych w obrębie SVZ u ludzi składa się z czterech warstw. Pierwszą warstwę stanowią komórki wyściółki (ang. ependymal cell layer), drugą - stanowi przestrzeń pozbawiona komórek wypełniona wypustkami astrocytów (ang. hypocellular gap). Tuż za nią znajduje się warstwa progenitorów o charakterze astrocytarnym i migrujących neuroblastów (ang. astrocytic ribbon). Ostatnim elementem niszy, jest warstwa przejściowa (ang. transitional zone), którą tworzą oligodendrocyty oraz dojrzałe neurony (Arias Carrion i wsp., 2007) (Ryc.3).



Ryc.3 Struktura strefy okołokomorowej (SVZ) mózgu człowieka. Panel lewy: przekrój poprzeczny mózgu, pokazuje lokalizację SVZ, przylegającej do komór bocznych (ang. lateral ventricle LV). Panel prawy przedstawia szczegółowo usytuowanie komórek różnego typu w obrębie SVZ, z zaznaczeniem wzajemnych korelacji przestrzennych poszczególnych komórek (wg Arias–Carrión i wsp. 2007, zmodyfikowany).

Badania Sanai i wsp. wykazały, że w wśród astrocytów SVZ widoczne są komórki o aktywności mitotycznej, o czym świadczy obecność markera Ki67 (Sanai i wsp., 2004). Dowodzi to aktywnego procesu neurogenezy w dojrzałym mózgu u ludzi. Do niedawna nie było wiadomo, jaki jest los nowopowstałych w SVZ neuronów u ludzi. Brak było dowodów na istnienie szlaków migracji tych komórek. W roku 2007, Curtis i wsp. opublikowali wyniki swoich badań, które dowodzą obecności, podobnie jak u gryzoni, donosowej drogi migracji (RMS) biegnącej od komory bocznej w rejonie jądra ogoniastego do pasma węchowego znajdującego się przy podstawie przodomózgowia. W obrębie RMS widoczne były komórki wykazujące jądrowy znacznik proliferacji PCNA (ang. proliferating cell nuclear antigen). Komórki te wykazywały ekspresję PSA-NCAM – markera migrujących progenitorów neuronalnych. Obecność PSA-NCAM stwierdzono również w komórkach obecnych w SVZ. Niektóre z tych komórek wykazywały kolokalizację PSA-NCAM i β -Tubuliny III, markera niedojrzałych neuronów. Obecność takich komórek stwierdzono zarówno w SVZ jak i RMS. Natomiast u pacjentów, którym podano BrdU wśród komórek BrdU⁺ w opuszce węchowej obserwowano jednoczesną ekspresję NeuN – markera dojrzałych neuronów. Droga migracji nowopowstałych komórek do opuszki węchowej wynosi u ludzi kilkanaście centymetrów (Curtis i wsp., 2007).

SVZ u ludzi jest najbogatszym źródłem progenitorów neuronalnych, choć według niektórych autorów, nowe neurony powstają cyklicznie przez cały okres życia również w SGZ.

I.1.2. Neuralne komórki macierzyste

Progenitory neuralne w SVZ i SGZ wykazują ekspresję Nestyny i kwaśnego białka włóknikowego GFAP (ang. glial fibrillary acidic protein) – marker astrocytów. Ponadto badania ultrastrukturalne w mikroskopie elektronowym uwidocznily obecność filamentów pośrednich ułożonych w wiązki, oraz licznych wypustek penetrujących pomiędzy sąsiednie komórki i tworzących kompleksy typu szczelinowych połączeń komórkowych, typowe dla astrocytów (Seri i wsp., 2001).

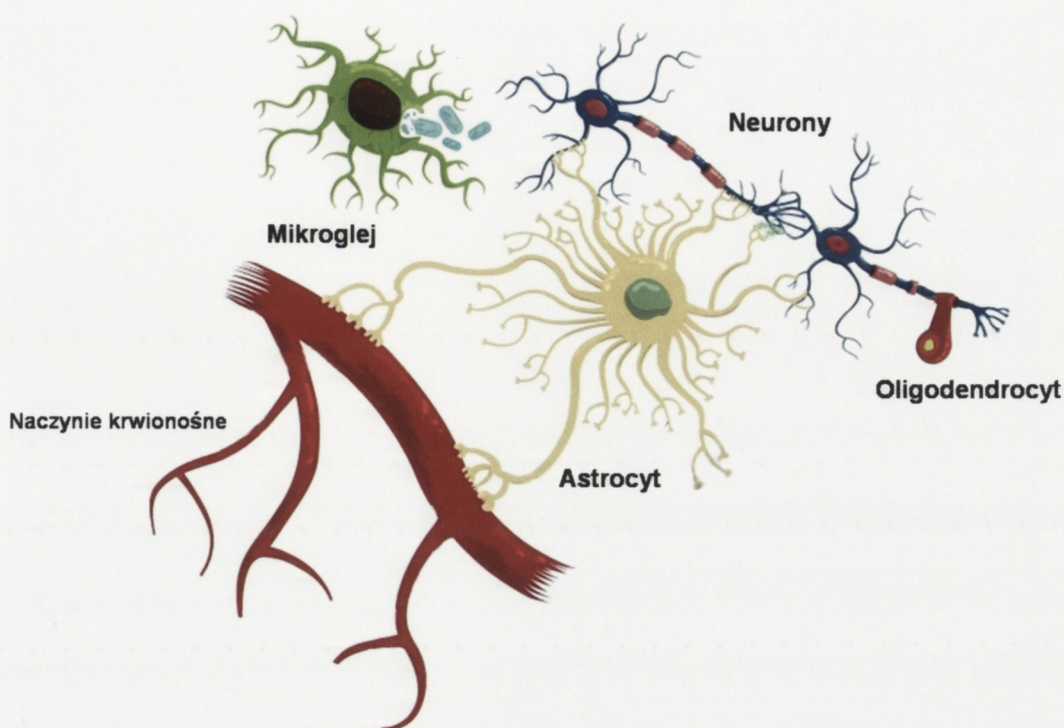
Nie wiadomo czy komórki obecne w SVZ i SGZ funkcjonując jako progenitory neuralne tracą niektóre cechy typowych astrocytów. Niektórzy autorzy sugerują, iż komórki te posiadają niewielką liczbę wypustek, są mniejsze od typowych astrocytów, o niższej gęstości elektronowej, przez co widoczne są w mikroskopie elektronowym jako komórki o jaśniejszej cytoplazmie (Alvarez-Buylla i Garcia Verdugo, 2001; Garcia i wsp., 2004). Większość z tych komórek wykazuje markery proliferacji. Wydaje się, że neuralne komórki macierzyste w dojrzałym mózgu są kolejnym ogniwem w rozwoju komórek neuroektodermalnych (GFAP⁻) poprzez komórki gleju promienistego (GFAP⁺), aż do astrocytów zarodkowych GFAP⁺ (Merkle i Alvarez-Buylla, 2006).

Pojedyncze astrocyty izolowane z SVZ zarówno gryzoni jak i ludzi tworzyły *in vitro* neurosfery – struktury typowe dla neuralnych komórek macierzystych i wykazywały charakter multipotencjalny, różnicując się w neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Laywell i wsp., 2000; Sanai i wsp., 2004). W warunkach hodowli, tworzyły kolonie zachowujące czasową zdolność do samoodnowy (Reynolds i Rietze, 2005).

Szereg badań wykazało, że astrocyty SVZ i SGZ funkcjonują jako prekursorzy neuralne *in vivo*. Izolowane z tych rejonów i wstrzyknięte myszom, poddanym wcześniej działaniu leków antymitotycznych hamujących proliferację komórek endogennych, powodowały powstawanie komórek neuralnych (Doetsch i wsp., 1999). Podobnie, obserwacje myszy transgenicznnych pozbawionych komórek GFAP⁺ ujawnily gwałtowny spadek liczby proliferujących komórek w SVZ, co skutkowało obniżeniem liczby neuroblastów i nowopowstałych dojrzałych neuronów (Morshead i wsp., 2003).

Wyniki badań *in vivo* i *in vitro* świadczą o tym, że komórki GFAP⁺ w SVZ i SGZ są odpowiedzialne za proces neurogenezy i spełniają rolę progenitorów neuralnych. Mikrośrodowisko, w którym się znajdują wywiera istotny wpływ na te komórki. Elementy nisz neuralnych regulują stopień proliferacji, migracji i różnicowania neuralnych komórek macierzystych. Oddziaływanie i relacje poszczególnych komórek zapewniają odpowiedni poziom czynników odpowiedzialnych za prawidłową neurogenezę.

I.1.3. Komórki niszy w OUN i ich funkcje w procesie neurogenezy



Ryc.4 Typy dojrzałych komórek neuralnych, których zależności i współdziałanie odgrywa istotną rolę w funkcjonowaniu niszy i procesie neurogenezy

I.1.3.1. Astrocyty

Astrocyty tradycyjnie uważane za komórki podporowe, obecnie wiadomo, że spełniają istotną rolę funkcjonalną w dojrzałym mózgu, w tym w procesie neurogenezy (Ma i wsp., 2005).

Nie wszystkie astrocyty w aktywnych strefach neurogennych wykazują właściwości neuralnych komórek macierzystych. Większość z nich stanowi komórki niszy, które oddziałują na progenitory neuralne i decydują o ich losie.

Astrocyty izolowane z hipokampa dorosłych osobników stymulują w warunkach *in vitro* proliferację i różnicowanie NKM w kierunku neuronalnym (Song i wsp., 2002). Ujawnienie udziału astrocytów w regulacji wczesnych etapów neurogenezy było pewnego rodzaju zaskoczeniem z uwagi na to, iż w rozwoju embrionalnym tworzenie dojrzałych neuronów ma miejsce przed pojawieniem się astrocytów (Temple, 2001). Mechanizm tego procesu nie do końca został wyjaśniony. Wiadomo, że astrocyty wykazują ekspresję czynników tj. FGF-2 (ang. fibroblast growth factor), Wnt, Notch, Neurogenezynę-1, BMP (ang. bone morphogenic protein), GABA (ang. γ -aminobutyric acid). FGF-2 jest silnym mitogenem używanym w namnażaniu somatycznych NKM w hodowli. Białka Wnt odgrywają dużą rolę w regulacji innych komórek macierzystych *in vivo*. Wykazano, że astrocyty

hipokampa ekspresjonują Wnt3. Zwiększona ekspresja tego białka prowadzi do wzrostu proliferacji i jednocześnie szybkiego różnicowania nowopowstałych prekursorów neuralnych, zaś blokowanie przekazywania sygnału poprzez Wnt, skutkuje zahamowaniem tworzenia neuronów zarówno *in vitro* jak i *in vivo* (Lie i wsp., 2005). Podobnie białka z grupy Noggin np. neurogenezyna-1 powodują różnicowanie somatycznych NKM w neurony. Neurogenezyna-1 hamuje przekształcanie progenitorów neuralnych w komórki glijowe manifestując swój antagonizm w stosunku do BMP (Ueki i wsp., 2003).

Astrocyty odgrywają także istotną rolę w migracji nowopowstałych neuroblastów. W RMS tworzą tunel, poprzez który prekursorzy neuralne migrują z SVZ do opuszki węchowej. Oprócz wytworzenia fizycznej bariery dla migrujących neuroblastów, angażując transportery GABA modulują działanie tego aminokwasu. Wiadomo, bowiem iż migrujące prekursorzy neuralne uwalniają GABA i powodują aktywację receptorów GABA_A, co spowalnia ich migrację (Bolteus i Bordey, 2004). W SGZ niedojrzałe neurony mają do pokonania krótki dystans w obrębie warstwy ziarnistej. Migrują wzdłuż wypustek promienistych astrocytów podobnie jak ma to miejsce podczas rozwoju embrionalnego. Badania *in vitro* wykazały, że astrocyty w rejonie hipokampa wspomagają także synaptogenezę nowopowstałych neuronów (Song i wsp., 2002).

1.1.3.2. Komórki mikrogleju

Udział komórek mikrogleju w modulacji neurogenezy jest stosunkowo mało poznany. Wyniki poszczególnych badań są niejednoznaczne, w wielu przypadkach sprzeczne. Wykazano promujący jak też hamujący efekt komórek mikrogleju na neurogenezę (Walton i wsp., 2006; Ziv i wsp., 2006; Cacci i wsp., 2008). Wydaje się, że różne działanie mikrogleju w stosunku do NKM zależy od stopnia jego aktywacji, rodzaju czynnika stymulującego i zmian w mikrośrodowisku. Ostre procesy zapalne zmniejszają przeżycie NKM i hamują ich różnicowanie w kierunku neuronalnym stymulując powstanie komórek glijowych (Monje i wsp., 2003; Cacci i wsp., 2005). Podczas gdy przewlekłe procesy zapalne promują dojrzewanie zarówno neuronów jak i astrocytów (Battista i wsp., 2006; Butovsky i wsp., 2006).

Aktywacja komórek mikrogleju wydaje się być dynamicznym i kompleksowym procesem. Efekt tego działania może być uwarunkowany przewagą cytokin pro- lub przeciwzapalnych, co potwierdzono stosując specyficzne przeciwciała neutralizujące (Battista i wsp., 2006; Nakanishi i wsp., 2007). Cytokiny tj. IL-1, IL-6, LIF (ang. leukemia inhibitory factor), uwalniane przez aktywowane komórki mikrogleju mogą ułatwiać różnicowanie NKM w kierunku astrocytów. Wykazano, że cytokiny należące do grupy IL-6 i BMP (ang. bone morphogenic protein) ukierunkowują różnicowanie NKM w procesie

astrogenezy (Taga i Fakuda, 2005). W badaniach *in vitro* IL-6 i LIF uwalniane z komórek mikrogleju, zwiększały liczbę powstałych z NKM astrocytów (Nakanishi i wsp., 2007).

W odróżnieniu od ostrych procesów zapalnych, aktywacji komórek mikrogleju w przewlekłych stanach zapalnych towarzyszył wzrost IL-4, IL-10 i TGF β (ang. transforming growth factor) z jednoczesnym promowaniem efektu neurogenego (Battista i wsp., 2006; Butovsky i wsp., 2006; Cacci i wsp., 2008). Wydaje się, że stymulowany przez przewlekłe procesy zapalne mikroglej, może tworzyć środowisko ułatwiające różnicowanie NKM w neurony. Z badań *in vitro* wynika, iż bezpośredni kontakt komórek mikrogleju i progenitorów neuralnych, nie jest konieczny do wywołania efektu neurogenego. Nadsącze z hodowli mikrogleju pochodzącego z różnych rejonów mózgu, promowały powstanie dojrzałych neuronów z NKM izolowanych z SVZ osesków gryzoni w takim samym stopniu jak bezpośrednio współhodowle tych komórek (Morgan i wsp., 2004; Walton i wsp., 2006). Świadczy to o udziale czynników humoralnych uwalnianych przez komórki mikrogleju, które wpływają na los NKM. Brak jest dotąd pełnej identyfikacji tych czynników.

1.1.3.3. Neurony

Niewiele wiadomo na temat udziału samych neuronów w regulacji neurogenezy. Najnowsze badania wykazały, że w procesie tym istnieje mechanizm zwrotny. Negatywnymi regulatorami proliferacji NKM mogą być neuroblasty, gdyż eliminacja ich z SVZ stymuluje podziały progenitorów neuralnych (Doetsch i wsp., 1999). Molekularny mechanizm regulacji nie do końca został wyjaśniony. Wśród potencjalnych neurotransmiterów, prominentnym kandydatem wydaje się kwas γ -amino-masłowy (GABA). W badaniach *in vitro* wykazano, że GABA przyspiesza różnicowanie komórek progenitorowych. Liu i wsp. wykazali *in vivo* wczesną ekspresję receptorów GABA_A na powierzchni NKM. Aktywacja tych receptorów jest związana z wydzielaniem GABA przez neuroblasty w SVZ, co powoduje zahamowanie proliferacji NKM utrzymując równowagę między namnażaniem i mobilizacją progenitorów neuralnych (Liu X i wsp., 2005). Podobnie dojrzałe neurony ograniczają powstawanie nowych komórek nerwowych. Aktywacja receptorów NMDA na neuroblastach poprzez glutaminian uwalniany z dojrzałych neuronów, reguluje przeżycie i synaptogenezę podczas procesu powstawania i dojrzewania prekursorów neuralnych w SGZ (Tashiro i wsp., 2006; Ge i wsp., 2007). Blokowanie receptorów NMDA powoduje wzrost proliferacji prekursorów neuralnych. Dojrzałe neurony w nabłonku węchowym generują sygnały, które hamują proliferację progenitorów neuralnych. Wu i wsp. zidentyfikowali czynnik GDF-11 (ang. growth and differentiation factor) pełniący funkcję endogennego inhibitora neurogenezy (Wu i wsp., 2003). GDF-11, znany także pod nazwą BMP-11, należy do rodziny TGF- β i odgrywa znaczącą rolę w modulacji procesu różnicowania neuronalnego (Ge i wsp., 2005). Autorzy

wykazali, że GDF-11 tworzy kowalencyjny kompleks, który aktywowany przez metaloproteazy, stymuluje dojrzewanie neuroblastów. Wyniki najnowszych badań postulują, iż również inne neurotransmitery np. dopamina, serotonina, acetylocholina mają wpływ na powstawanie, migrację, różnicowanie, integrację z istniejącą siecią i przeżyciem nowych neuroblastów w SVZ i SGZ. Dopamina stymuluje endogenną neurogenezę w SVZ poprzez aktywację D2-podobnych receptorów na powierzchni progenitorów neuralnych (Borta i Höglinger, 2007). Badania Kotani i wsp. wykazały, że układ cholinergiczny odgrywa istotną rolę w procesie neurogenezy, wpływając na przeżycie nowo powstałych komórek nerwowych (Kotani i wsp., 2006). Wydaje się, że mechanizm tego oddziaływania związany jest z przekazywaniem sygnału przez CREB występujący na progenitorach neuralnych SGZ.

1.1.3.4. Komórki śródbłonna naczyń

W mózgu osobników dorosłych, komórki śródbłonna wyściełają wewnętrzną ścianę naczyń krwionośnych, stanowiąc główny komponent bariery krew mózg BBB (ang. blood-brain-barrier). Bariera ta, utworzona przez przylegające do siebie komórki, pozwala na regulację transportu cząsteczek do wewnątrz i na zewnątrz do otaczającej tkanki nerwowej. Pierwsze doniesienia o udziale komórek śródbłonna w procesie neurogenezy pojawiły się w roku 1999. Leventhal i wsp. wykazali, że współhodowle fragmentów SVZ dorosłych szczurów z komórkami śródbłonna, skutkują powstaniem dużo większej liczby neuronów w porównaniu z kontrolą (Leventhal i wsp., 1999). W badaniach *in vivo*, zaobserwowano skupiska dzielących się NKM w SVZ i SGZ, zgromadzone w sąsiedztwie naczyń włosowatych (Palmer i wsp., 2000). Obecność komórek śródbłonna w hodowli powodowała stymulację procesów samoodnowy NKM z jednoczesnym zahamowaniem ich różnicowania (Shen i wsp., 2004).

Wykazano szereg czynników uwalnianych przez komórki śródbłonna, które mogą regulować neurogenezę tj. Notch, PEDF (ang. pigment epithelial differentiation factor), BMP. Notch powoduje utrzymanie komórek macierzystych w stanie niezróżnicowanym. Wiadomo, że komórki śródbłonna uwalniają ligandy aktywujące przekazywanie sygnałów do wnętrza NKM, w które zaangażowane jest białko Notch (Shen i wsp., 2004). Okazało się, że komórki śródbłonna naczyń krwionośnych w SVZ ekspresjonują PEDF, który promuje samoodnawianie somatycznych neuralnych komórek macierzystych *in vivo* (Ramirez-Castillejo i wsp., 2006). Ostatnio potwierdzono obecność specyficznego receptora dla PEDF (Pnpla2) na NKM *in vivo* (Notari i wsp., 2006).

1.1.3.5. Komórki wyściółki komór

Komórki wyściółki są wyspecjalizowanymi komórkami leżącymi w obrębie komór mózgu. Komórki te tworzą barierę pomiędzy płynem mózgowo-rdzeniowym i tkanką nerwową. Usytuowane w niszy w pobliżu progenitorów neuralnych komórki wyściółki modułują ich zachowanie poprzez uwalnianie czynników np. Noggin, który jest antagonistą BMP i wykazuje silną ekspresję w komórkach wyściółki komór. Natomiast NKM syntetyzują BMP i posiadają na swojej powierzchni specyficzne dlań receptory, wskazujące na możliwość oddziaływania autokrynnego. Badania Lim i wsp. ujawniły, że Noggin zwiększa neurogenezę NKM izolowanych z SVZ zarówno w hodowli jak i po ich przeszczepieniu do stref nie neurogennych (Lim i wsp., 2000).

Komórki wyściółki komór odgrywają również istotną rolę w ukierunkowaniu migracji neuroblastów w RMS. Wydaje się, że istotnym czynnikiem jest tu Slit, którego obecność stwierdzono w przegrodzie przezroczystej i splocie naczyńiówkowym komory czwartej (Wu i wsp., 1999). Jak dotąd jednak, autorom nie udało się ustalić, w jaki sposób Slit jest prezentowany poprzez ścianę komory bocznej migrującym neuroblastom.

1.1.3.6. Oligodendrocyty

Oligodendrocyty działają na neurogenezę wielokierunkowo. Na wcześniejszym etapie tego procesu przedłużają przeżycie i przyspieszają różnicowanie NKM w neurony (Fields i Stevens-Graham, 2002; Göritz i wsp., 2007). Mają zdolność wytwarzania czynników troficznych tj. BDNF, GDNF, które wspomagają przeżywalność neuronów i ich prawidłowe funkcjonowanie (Dougherty i wsp. 2000). Działanie to wykazują głównie dojrzałe oligodendrocyty. Wpływ progenitorów oligodendrocytów (ang. Oligodendrocyte Precursor Cells - OPC) na neurogenezę jest znacznie mniejszy, co świadczy o tym, że potencjał troficzny oligodendrocytów wzrasta wraz z ich dojrzewaniem. Zarówno dojrzałe oligodendrocyty jak i komórki OPC, poprzez aktywujące ścieżki sygnałowe (PI3/Akt, MAPK/ERK), mogą produkować czynniki promujące przeżycie neuronów np. IGF-1 oraz tworzenie i wzrost aksonów (Wilkins i wsp. 2003).

Oligodendrocyty są także odpowiedzialne za akumulację neurofilamentów w aksonach, a poprzez produkcję mieliny zwiększają ich stabilność (Kinrade i Hidalgo, 2004; Simons i Trajkovic, 2006).

I. 1.4. Czynniki regulujące proces neurogenezy

Czynniki uwalniane wewnątrz niszy wywierają wpływ na proliferację i różnicowanie NKM w SVZ i SGZ. Szereg ligandów wykazujących efekt mitogenny lub morfogeny tj. FGF-2, IGF-1, EGF, VEGF, PDGF działa na progenitory neuralne, ich prekursorzy lub neuroblasty. Odpowiednio, zidentyfikowane zostały specyficzne receptory dla tych czynników na powierzchni poszczególnych typów komórek w SVZ. Receptory dla FGF i PDGF są ekspresjonowane na komórkach typu B, podczas gdy receptory dla EGF występują na prekursorach neuralnych typu C (Doetsch i wsp., 2002; Zheng i wsp., 2004).

Czynnik wzrostu fibroblastów, FGF (ang. fibroblast growth factor) stymuluje proliferację i różnicowanie NKM. Podanie FGF-2 myszy, zwiększa liczbę nowo powstałych neuronów w SGZ. Domózgowe wstrzyknięcie FGF-2 u starszych gryzoni przywraca normalny poziom neurogenezy obniżony z racji wieku (Jin i wsp., 2003; Yoshimura i wsp., 2003). Wykazano, że FGF-2 promuje proliferację i różnicowanie NKM w neurony, w eksperymentalnym modelu choroby Huntingтона u myszy. Wzrostowi liczby nowo powstałych progenitorów neuralnych, towarzyszyła migracja do prążkowiec i przekształcenie komórek w fenotypy dopaminergiczne, o czym świadczyła obecność dopaminy (Jin i wsp., 2005).

Molekularny mechanizm indukcji neurogenezy przez FGF-2, jak dotąd nie został wyjaśniony. Wydaje się, że proliferacyjny efekt działania FGF-2 związany jest z przekazywaniem sygnału MAP/ERK, podobnie jak w przypadku Neurotrofyny-3 i BDNF, zaangażowanych w promowanie neurogenezy (Jiang i wsp., 1998). Badania Pieper i wsp. postulują, że aktywacja białkowej domeny czynnika transkrypcyjnego PAS (Npas-3) jest odpowiedzialna za efekt neurogeny FGF-2 (Pieper i wsp., 2005). Myszy homozygotyczne pozbawione genu Npas-3, nie mają receptora dla FGF w hipokampie i wykazują niski poziom neurogenezy. Oprócz bezpośredniego działania FGF-2 na neurogenezę, wykazano także jego działanie pośrednie. FGF-2 powoduje wzrost receptorów dla IGF-1 na powierzchni progenitorów neuralnych, przez co zwiększa efekt mitogenny IGF-1 (Drago i wsp., 1991).

Insulino-podobny czynnik wzrostu, IGF-1 (ang. insulin-like growth factor) indukuje neurogenezę zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Podanie podskórne IGF-1 u szczurów pozbawionych przysadki (z niskim poziomem krążącego IGF), zwiększa proliferację progenitorów neuralnych w SGZ w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (Aberg i wsp., 2000). Podobny efekt działania IGF-1 opisano u normalnych szczurów i ptaków śpiewających (Jiang i wsp., 1998; Trejo i wsp., 2001). Wpływ IGF-1 na proliferację, różnicowanie i przeżycie nowych neuronów zależy od drogi podania. Wstrzyknięcie IGF-1 do komory bocznej mózgu szczurów, powodowało silną stymulację proliferacji progenitorów neuralnych w SGZ, ale nie oddziaływało na różnicowanie neuronów (Lichtenwalner i wsp.,

2001). Badania Trejo i wsp. wykazały, że IGF-1 jest niezbędnym komponentem stymulacji procesu neurogenezy podczas wysiłku fizycznego (Trejo i wsp., 2001).

Innym czynnikiem zaangażowanym w proces neurogenezy, jest nabłonkowy czynnik wzrostu EGF (ang. epidermal growth factor). Podanie EGF do komory bocznej mózgu szczura powoduje znaczący wzrost proliferacji prekursorów neuralnych typu C w SVZ (Doetsch i wsp., 2002). Komórki izolowane z SVZ szczurów po iniekcji EGF, tworzą w hodowli długo odnawiające się neurosfery, co jest dowodem na to, iż EGF stymuluje podziały symetryczne NKM, zapewniając ich samoodnowę również *in vitro*. Ten promocyjny efekt działania EGF związany jest z obecnością receptorów dla EGF, zarówno na komórkach typu B jak i typu C w SVZ. Ekspresja receptorów EGF-R na progenitorach i prekursorach neuralnych po podaniu EGF jest świadectwem ich aktywacji, pomimo iż potencjał proliferacyjny tych komórek w efekcie stymulacji EGF, różni się z uwagi na różne predyspozycje fizjologiczne (komórki typu B dzielą się wolniej niż ich prekursorzy neuralne typu C).

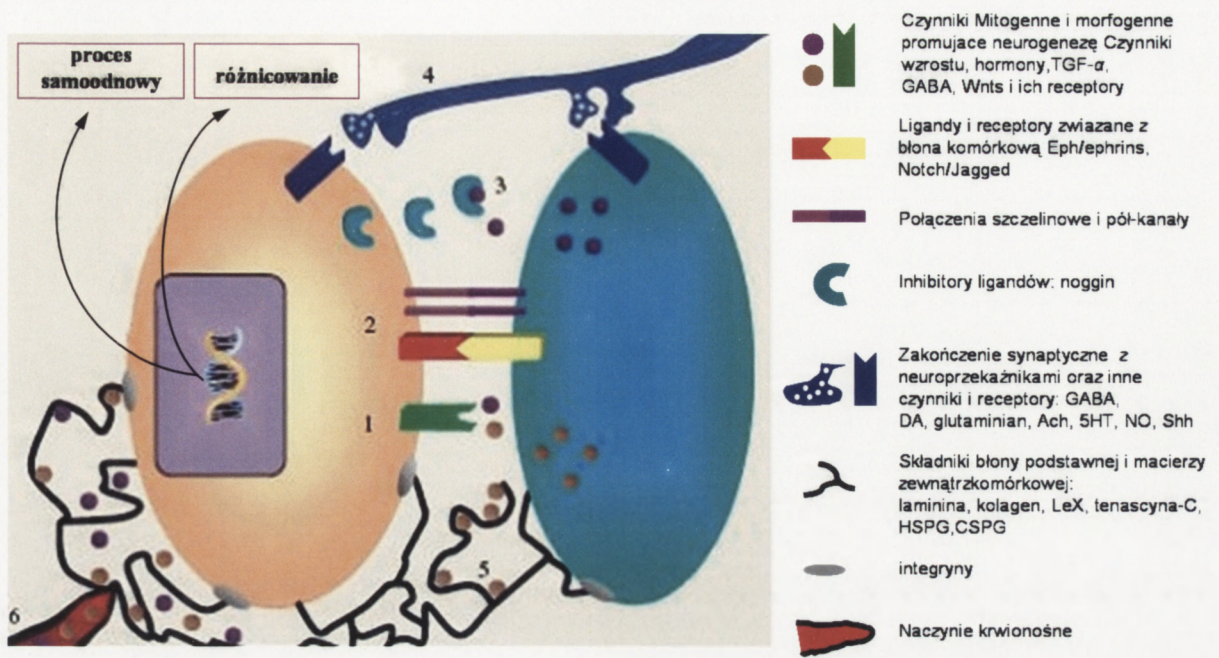
Czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, VEGF (ang. vascular endothelial growth factor) wykazuje działanie zarówno angiogenne jak i neurogenne. Obie izoformy: VEGF-A i VEGF-B mają pozytywny wpływ na neurogenezę (Jin i wsp., 2002; Sun i wsp., 2006). U myszy pozbawionych genu VEGF-B obserwuje się zmniejszoną proliferację komórek w strefach neurogennych, której poziom zwiększa się po podaniu VEGF-B. Transfer genu VEGF u dorosłych szczurów powodował zwiększenie neurogenezy wraz z poprawą zachowania się zwierząt ocenianą w testach poznawczych (Cao i wsp., 2004). Blokowanie działania VEGF poprzez wstrzykiwanie antagonisty receptora VEGF (flt-1) powodowało obniżenie neurogenezy u myszy (Fabel i wsp., 2003). Wydaje się, że VEGF wywołuje podwójny efekt neurogenny, działając pośrednio poprzez modulację sieci naczyń krwionośnych w SVZ i SGZ, co ułatwia transport endogennych neurotrofin i bezpośrednio na progenitory neuralne w niszy. Podanie VEGF do komory bocznej mózgu u dorosłych szczurów obniżało apoptozę komórek w SVZ, co świadczy o pozytywnym działaniu VEGF na przeżycie nowo powstałych neuronów. Ostatnie wyniki badań wykazały, że działanie VEGF może być różne w zależności od dawki czynnika. Podawanie wysokich dawek VEGF dorosłym myszom, powodowało obniżenie ekspresji specyficznych receptorów: flt-1 i flk-1, w SVZ z jednoczesnym wzrostem proliferacji i różnicowania progenitorów neuralnych. Niskie dawki VEGF zwiększały poziom ekspresji VEGF-R1 i VEGF-R2, nie wpływając na neurogenezę (Meng i wsp., 2006).

Zainteresowanie płytkowym czynnikiem wzrostu, PDGF (ang. platelet derived growth factor) jako czynnikiem neurogennym zrodziło się niedawno. Jacksson i wsp. opisali w SVZ obecność receptora dla PDGF (PDGF-R α) na komórkach typu B, które wyizolowane z mózgu i hodowane w warunkach *in vitro* różnicowały się w neurony i oligodendrocyty (Jacksson i wsp., 2006). Iniekcja PDGF dorosłym zwierzętom powodowała hyperproliferację

i tworzenie progenitorów neuralnych. Co ciekawe, po zaprzestaniu podawania PDGF obserwowano zmniejszenie liczby nowo powstałych komórek i wzrost ich różnicowania w oligodendrocyty. Wydaje się, że PDGF może mieć wpływ na utrzymywanie równowagi pomiędzy wytwarzaniem neuroblastów i prekursorów oligodendrocytów z NKM w SVZ. Nie wiadomo, czy progenitory neuralne wykazujące receptory PDGF-R α , stanowią pulę komórek multipotencjalnych, zdolnych do różnicowania się zarówno w neurony jak i oligodendrocyty, czy w obrębie komórek PDGF-R α ⁺ w SVZ istnieją dwie populacje NKM o charakterze unipotencjalnym.

Wśród substancji neurotropowych promujących neurogenezę i wzrost przeżycia nowo powstałych komórek, na uwagę zasługuje czynnik wzrostu pochodzący z mózgu, BDNF (ang. brain derived neurotrophic factor). Pozytywny efekt neurogeny BDNF wykazano zarówno podczas rozwoju OUN jak i u dorosłych zwierząt. BDNF wykazuje synergistyczne działanie z innymi czynnikami neurotropowymi tj. FGF-2, serotonina, NO ułatwiając różnicowanie prekursorów neuralnych. Hodowla komórek izolowanych z SVZ, fragmentów mózgu pacjentów, w obecności FGF-2, a następnie BDNF powodowała wzrost przeżycia neuronów w porównaniu z hodowlą z dodatkiem jednego z tych czynników (Goldman, 1998). Serotonina działając poprzez receptory 5-HT związanymi z produkcją cAMP i aktywacją CREB (ang. cAMP response element binding protein) ma wpływ na poziom BDNF poprzez zwiększenie transkrypcji genu. W przypadku NO jego parakrynnie działanie wspomaga BDNF - zależne ukierunkowanie prekursorów neuralnych z fazy proliferacji do różnicowania (Cheng i wsp., 2003).

Funkcje kontrolne proliferacji progenitorów neuralnych spełniają białka wzrostowe kości, BMPs (ang. bone morphogenic proteins) i ich receptory obecne na komórkach w SVZ. Podczas gdy aktywacja cząsteczek sygnalizacyjnych BMP, w przypadku komórek prekursorowych promuje ich różnicowanie, obecność BMP i Noggin (antagonisty BMP) w SVZ, powoduje zachowanie równowagi pomiędzy różnicowaniem prekursorów neuralnych w neurony i komórki głojowe (Lim i Alvarez-Buylla, 1999). W zakręcie zębatym hipokampa, kontrolę nad proliferacją neuroblastów i ich różnicowaniem w neurony spełniają białka Wnt (Lie i wsp., 2005). Wyniki ostatnich badań postulują udział Notch i Sonic hedgehog (Shh) w proliferacji i wyborze kierunku różnicowania progenitorów neuralnych w SVZ i SGZ (Ahn i Joyner, 2005; Androutsellis-Theotakis i wsp., 2006). NKM w SVZ ekspresjonują Notch i specyficzne dla niego receptory (Notch-1R). Aktywacja tej drogi przekazywania sygnałów, determinuje liczbę progenitorów neuralnych i zwiększa ich przeżycie poprzez regulację Shh, który ma właściwości mitogenne (Androutsellis-Theotakis i wsp., 2006).



Ryc.5. Kontrola nKM w obrębie niszy w SVZ i SGZ jest regulowana przez: **(1)** czynniki tj. EGF, FGF, TGF- α , VEGF, PEDF, hormony, BMPs, ATP, Wnts i GABA, oraz ich receptory, **(2)** oddziaływania komórka-komórka oraz komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, za pośrednictwem ligandów i ich receptorów tj. Eph/efryny i Notch/Jagged przez połączenia szczelinowe i półkanały, **(3)** blokowanie ligandów (noggin), **(4)** neuroprzebieżniki i inne czynniki uwalniane w obrębie synapsy tj. GABA, dopamina (DA), glutaminian, acetylocholina (ACh), serotonina (5HT), NO i Shh, **(5)** wychwyty i prezentację na błonie podstawnej czynników wzrostu, białek macierzy zewnątrzkomórkowej, tj. laminina, kolagen-1, tenascyna-C, LeX, siarczyn heparanu, siarczyn chondroityny, proteoglikany, **(6)** współdziałanie komórek śródbłonna i naczyń krwionośnych. Komórki tworzące nisze komórek macierzystych (kolor zielony), neurony (wypustki aksonów – kolor niebieski), komórki śródbłonna i naczynia krwionośne (kolor czerwony) i wiele innych komórek, spełnia funkcje podporowe dla neuralnych komórek macierzystych, biorąc udział w wyborze kierunku różnicowania NKM, podobnie jak elementy strukturalne tj. błona podstawna czy fraktony. Elementy te współdziałając ze sobą lub też w sposób niezależny, biorą udział w promocji samoodnowy i różnicowania NKM (wg Riguelme i wsp. 2008 zmodyfikowany).

I.1.5. Proces neurogenezy w schorzeniach OUN

W niektórych schorzeniach OUN obserwuje się zmiany procesu neurogenezy. Liczne doniesienia literatury wykazały, wzrost lub obniżenie proliferacji komórek w SVZ w wielu chorobach neurodegeneracyjnych, wynikające prawdopodobnie z różnic w patofizjologii tych jednostek. Ponadto, uszkodzenie struktur w obszarach nie neurogennych, powoduje wtórną stymulację proliferacji lokalnych NKM i różnicowanie ich prekursorów w kierunku neuronalnym (Arvidsson i wsp., 2002; Emsley i wsp., 2005). W modelach eksperymentalnych uszkodzeń OUN, proces neurogenezy obserwowano również w nie neurogennych rejonach hipokampa i w prążkowie. Wzrost proliferacji komórek progenitorowych w SVZ i SGZ oraz kompensacyjną neurogenezę w obszarze zmian stwierdzono w chorobach neurodegeneracyjnych i w stanach zapalnych OUN. Zrozumienie mechanizmów rekrutacji

endogennych NKM w odpowiedzi na czynniki patologiczne pozwoliłoby w przyszłości sterować procesem neurogenezy w ramach terapii neuroregeneracyjnej.

1.1.5.1. Neurogeneza w chorobach neurodegeneracyjnych

Choroba Parkinsona wiąże się z degeneracją neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej. Utrata tych neuronów powoduje spadek dopaminy w prążkowie, co stwarza zaburzenia w przekazywaniu sygnałów do kory zaangażowanej w regulację funkcji motorycznych. Chorobie Parkinsona towarzyszy spadek neurogenezy. Eksperymentalnie wywołane zahamowanie syntezy dopaminy u gryzoni poprzez iniekcję 6-OHDA do mózgu zwierząt, skutkowało zmniejszeniem proliferacji komórek w strefach neurogennych (Höglinger i wsp., 2004). Obniżoną aktywność mitotyczną progenitorów neuralnych w SVZ, SGZ i opuszce węchowej stwierdzono także w mózgach pacjentów analizowanych *post mortem*. Badania eksperymentalne wskazywały jednak na możliwość istnienia mechanizmów reperacyjnych w strefach zmian wywołanych chorobą Parkinsona (Zhao i wsp., 2003). Pomimo, iż wielu autorów opisywało obecność neuralnych komórek prekursorowych w istocie czarnej, nie wydaje się, aby struktura ta była miejscem aktywnej neurogenezy w chorobie Parkinsona. Natomiast, niektóre z prekursorów obecnych w SVZ różnicowały się w neurony TH⁺ (ang. Tyrosine Hydroxylase). W SVZ u szczurów poddanych uszkodzeniu istoty czarnej, obserwowano również uwolnienie dopaminy, co świadczy o tym, że prekursorzy neuralne zmieniają swój program rozwoju różnicując się w dojrzałe neurony dopaminergiczne (Arias-Carrion i wsp., 2006). Obserwacje te dowodzą, że dopamina jest jednym z czynników regulujących poziom neurogenezy w mózgu dorosłych zwierząt i ludzi. Spadek proliferacji prekursorów neuralnych w strefach neurogennych w chorobie Parkinsona wydaje się być związany z ubytkiem dopaminy (Arias-Carrion i wsp., 2007).

W chorobie Alzheimera dochodzi do postępującego uszkodzenia w obszarach mózgu odpowiedzialnych za funkcje poznawcze tj. kora nowa i hipokamp. W modelach eksperymentalnych choroby Alzheimera u myszy stwierdzono obniżenie neurogenezy w hipokampie (Donovan i wsp., 2006). Nowopowstałe w SGZ neuroblasty wykazywały zmiany w procesie dojrzewania, czemu towarzyszyło upośledzenie zdolności uczenia się u zwierząt eksperymentalnych. Wydaje się, iż szereg czynników towarzyszących chorobie Alzheimera ma wpływ na neurogenezę. Wykazano, że amyloid β może bezpośrednio oddziaływać na NKM redukując ich proliferację i różnicowanie (Haughey i wsp., 2002). Jakkolwiek udział amyloidu β w negatywnej regulacji neurogenezy *in vivo* pozostaje kontrowersyjny. Badania przeprowadzone *post mortem* u pacjentów z chorobą Alzheimera, ujawniły wzrost neurogenezy w hipokampie, co sugeruje zaangażowanie innych czynników regulujących ten proces (Jin i wsp., 2005).

W chorobie Huntingtona stwierdza się degenerację neuronów GABA-ergicznym prążkowie i kory mózgowej. Badania mózgow pacjentów z chorobą Huntingtona wykazały wzrost proliferacji komórek w SVZ (Curtis i wsp., 2007). Podobne obserwacje dotyczyły analizy mózgu gryzoni w eksperymentalnym modelu choroby Huntingtona po podaniu kwasu chinolowego. W przypadku zwiększonej proliferacji progenitorów neuralnych obserwowano selektywne obniżenie liczby neuronów GABA-ergicznym w prążkowie u szczurów, związane prawdopodobnie ze śmiercią nowopowstających komórek nerwowych (Tattersfield i wsp., 2004). Wydaje się, że słabe przeżycie neuronów spowodowane jest negatywnym oddziaływaniem mikrośrodowiska, w którym komórki są zlokalizowane, niż dysfunkcją prekursorów neuralnych *per se*. Świadczy o tym wysoki poziom transkrypcyjnego czynnika aktywacji ATF-2 (ang. Activating Transforming Factor), w proliferujących progenitorach neuralnych w SVZ u ludzi z chorobą Huntingtona (Pearson i wsp., 2005). Niekorzystny efekt mikrośrodowiska może być wywołany zmniejszoną ilością neurotrofin w mózgu. U myszy transgenicznym wykazujących objawy choroby Huntingtona, stwierdzono deficyt BDNF w prążkowie i hipokampie (Spires i wsp., 2004).

Wzrost neurogenezy towarzyszy także niedokrwieniu mózgu, spowodowanym zaburzeniami dopływu krwi. Degeneracja komórek nerwowych w strefie ogniska niedokrwienia powoduje stymulację neurogenezy w SVZ i SGZ. Według najnowszych badań grupy Lindvall proces ten trwa do 4 miesięcy po urazie (Iosif i wsp., 2008). Prekursory neuralne z rejonów neurogennym migrują do strefy niedokrwienia w prążkowie i korze mózgowej i różnicują się w dojrzałe neurony (Yamashita i wsp., 2006). Badania eksperymentalne wykazały, iż wzbogacone środowisko i ćwiczenia fizyczne zwiększają proces neurogenezy po niedokrwieniu. Wydaje się, że ten pozytywny efekt związany jest ze wzrostem neurotrofin i czynników wzrostowych t.j. FGF-2, EGF, BDNF, GDNF (ang. glial cell line-derived neurotrophic factor), TNF- α (ang. tumor necrosis factor), BMP (Grote i Hannan, 2007).

1. 1.5.2. Neurogeneza w procesach zapalnych OUN

Procesy zapalne OUN, które towarzyszą chorobom neurodegeneracyjnym i uszkodzeniom mózgu i rdzenia kręgowego, mają wpływ na neurogenezę poprzez mediatory zapalne związane z napływem makrofagów i limfocytów jak i aktywacją astrocytów i komórek mikrogleju (Markiewicz i Łukomska, 2006). W zależności od schorzenia i fazy procesu zapalnego wpływ ten może być pozytywny, promujący regenerację uszkodzonych komórek nerwowych poprzez produkcję neurotrofin i czynników wzrostowych lub negatywny hamujący wzrost i migrację nowo powstałych komórek.

1.1.5.2.1. Czynniki zapalne a proces neurogenezy

Wśród mediatorów zapalnych determinujących los progenitorów neuralnych istotną rolę odgrywają cytokiny. Podczas gdy poziom cytokin w zdrowym mózgu jest bardzo niski, obserwuje się jego znaczny wzrost w stanach patologicznych. Receptory dla cytokin w OUN są wyrażone konstytutywnie lub indukowane w wyniku uszkodzeń w neuronach, astrocytach, komórkach mikrogleju i oligodendrocytach. Efekt działania cytokin w procesie neurogenezy jest kompleksowy i zależy od przewagi czynników o charakterze neurotoksycznym lub neuroprotekcijnym.

IL-1 β należąca wraz z IL-1 α , IL-1ra oraz IL-18 do rodziny cytokin IL-1 spełnia najistotniejszą rolę w procesach neuropatologicznych. Powoduje aktywację komórek glejowych i produkcję innych cytokin. Z badań *in vivo* i *in vitro* wynika, że IL-1 β stymuluje uwolnienie czynników neurotoksycznych t.j. NO, α -antychymotrypsyna, ale jednocześnie indukuje ekspresję NGF, który działa neuroprotekcynie (Viviani i Marinovich, 2005). Bezpośrednie działanie IL-1 β powoduje śmierć neuronów, jakkolwiek nie dotyczy to normalnych, zdrowych komórek, ale neuronów uszkodzonych wcześniej przez proces patologiczny, co sugeruje współdziałanie innych czynników. Najnowsze badania wykazały również udział IL-1 β w procesach regeneracji OUN. IL-1 β stymuluje ekspresję genów czynników troficznych związanych z proliferacją i przeżyciem neuronów m.in. CNTF, NGF. U myszy pozbawionych IL-1 β , brak jest ekspresji CNTF po uszkodzeniu mózgu a podanie egzogennej IL-1 β powoduje indukcję CNTF i NGF, w astrocytach (Jon Jon *wsp.*, 2005). IL-1 α , podobnie jak IL-1 β stymuluje wzrost neurogenezy, co wykazano *in vitro* w hodowlach mezenchymalnych komórek macierzystych izolowanych ze szpiku kostnego, które pod wpływem działania IL-1 α ekspresjonowały geny neuralne i różnicowały się w dojrzałe neurony (Greco i Rameshwar, 2007). W odróżnieniu od IL-1 β i IL-1 α , należąca do tej samej rodziny cytokin IL-1, IL-18 dodana do hodowli prekursorów neuralnych, obniża liczbę komórek β -III-Tub⁺, hamując różnicowanie w kierunku neuronów lub powodując ich eliminację (Liu YP i *wsp.*, 2005).

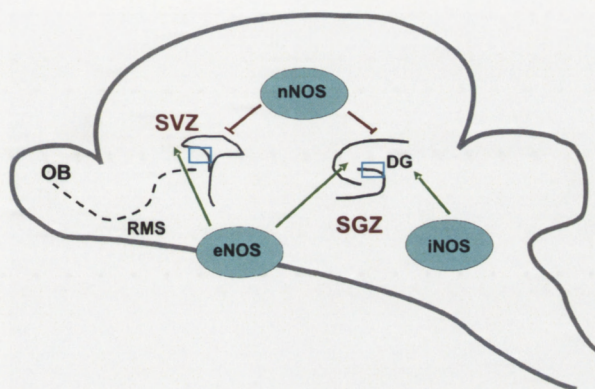
W wyniku aktywacji IL-1 β wzrasta poziom IL-6, która podobnie jak IL-1 β wykazuje dwoisty efekt działania w obrębie OUN. Różnice w aktywności IL-6 mogą wynikać z tego, że transdukcja sygnału ma miejsce poprzez receptor gp130, zaangażowany również w przekazywaniu sygnałów przez inne czynniki tj. CNTF, LIF, IL-11 a efekt końcowy jest odpowiedzią wynikającą z kompleksowej aktywacji różnych genów. Wykazano, że IL-6 promuje przeżycie neuronów i wzrost neurytów, działając na receptor, który jest wspólny dla innych ligandów zwiększających liczbę nowo powstałych neuronów. Jakkolwiek podczas rozwoju OUN, cytokiny z rodziny IL-6 wywierają negatywny efekt na neurogenezę ułatwiając różnicowanie progenitorów neuralnych w komórki glejowe. Ponadto, podczas rozwoju OUN,

IL-6 może hamować proces neurogenezy podobnie jak ma to miejsce podczas uszkodzenia mózgu w następstwie wysokich dawek radioterapii, kiedy uwalniana IL-6 hamuje regenerację neuronów (Monje i wsp., 2003). Długotrwały wzrost IL-6 towarzyszący przewlekłym procesom zapalnym wywołuje efekt neurotoksyczny, natomiast w ostrych stanach zapalnych wzrost IL-6 wywiera działanie neuroprotektcyjne (Viviani i Marinovich, 2005). Wydaje się, że IL-6 wykazuje swoje działanie pozytywne lub negatywne w regulacji neurogenezy poprzez różne mechanizmy w zależności od stanu fizjologicznego organizmu czy obecności innych cytokin zapalnych, które działają synergistycznie lub antagonistycznie. W skład rodziny IL-6 wchodzi także inne cytokiny tj. IL-11, CNTF, LIF, onkostatyna M. Wyniki badań wielu autorów wykazały, że IL-6, IL-11, LIF i CNTF powodują różnicowanie prekursorów neuralnych w astrocyty, jednocześnie hamując ich dojrzewanie w kierunku neuronów (Taga i Fukuda, 2005).

TNF- α jest kolejną cytokiną zaangażowaną w procesy neuroregeneracji. Jakkolwiek podobnie jak w przypadku IL-1 β jej obecność w normalnym zdrowym OUN jest kontrowersyjna, wszystkie komórki mózgu syntetyzują i uwalniają TNF- α w wyniku uszkodzenia. TNF- α wykazuje działanie neurotoksyczne. Aktywacja receptora TNF- α RI powoduje apoptozę neuronów *in vitro* (Viviani i Marinovich, 2005). Podanie pentoksyfiliny (PTX), inhibitora TNF- α blokuje zahamowanie różnicowania progenitorów neuralnych w komórki β TubIII⁺ (Liu YP i wsp., 2005). Wykazano, że dodanie TNF- α do hodowli progenitorów neuralnych izolowanych z mózgu płodów zmniejsza liczbę neuronów dopaminergicznych (Ling i wsp., 1998). TNF- α może wywierać także efekt neuroprotektyjny. W badaniach *in vitro* wykazano, że TNF- α stymuluje różnicowanie progenitorów neuralnych i odróżnicowanych komórek neuroblastoma neuroblastoma w kierunku neuronalnym (Liu YP i wsp., 2005). Nieznany jest mechanizm odpowiedzialny za dwoistość oddziaływania TNF- α , być może jest to związane z miejscem uszkodzenia OUN, stopniem i czasem trwania procesu, ilością produkowanego TNF- α czy obecnością innych czynników w mikrośrodkowisku.

Aktywowane w wyniku uszkodzenia OUN komórki glejowe produkują oprócz cytokin czynniki, które fizjologicznie mogą spełniać pozytywne funkcje, ale w stanach patologicznych manifestują swój niekorzystny wpływ. Tlenek azotu (NO) syntetyzowany w komórkach śródbłonna, astrocytach i komórkach mikrogleju odgrywa istotną rolę w uwalnianiu neuroprzekazników, przekazywaniu sygnałów, procesach pamięci. Zmiany w produkcji NO związane z procesami patologicznymi mogą mieć szkodliwe działanie na komórki OUN. Alternatywnie, fizjologiczny poziom NO uwalnianego w wyniku działania śródbłonkowej formy syntazy jest korzystny ułatwiają przepływ krwi w obszarze niedokrwienia. Tlenek azotu ma działanie angiogenne aktywując VEGF i stymulując tworzenie nowych naczyń (Lo, 2008). Wyniki badań dotyczące neurogennego efektu NO są kontrowersyjne. Niektórzy autorzy

wykazują pozytywną rolę NO w stymulacji proliferacji i różnicowania progenitorów neuralnych, podczas gdy inni opisują hamujący wpływ NO na powstawanie neuronów (Cheng, 2003; Moreno-Lopez, 2004). Cardenas i wsp (2005) postulują, że regulacja procesu neurogenezy przez NO zależy od rodzaju syntezy (Ryc.6), produkującej tlenek azotu. NO syntetyzowany przez nNOS (forma neuronalna syntazy) hamuje proliferację komórek w SVZ i opuszce węchowej zaś NO wytwarzany przy udziale eNOS (forma śródbłonkowa syntazy) lub iNOS (forma indukowana syntazy) w strefach neurogennych w modelu ogniskowego niedokrwienia mózgu aktywuje proces neurogenezy (Zhu i wsp., 2003; Cardenas i wsp., 2005.)



Ryc.6. Regulacja neurogenezy przez NO. Symbole: ↓ oznaczają działanie stymulujące, a ⊥ działanie hamujące NO, syntetyzowanego przez różne izoformy syntaz tlenku azotu, na proces neurogenezy (wg Cardenas i wsp.2005, zmodyfikowany)

W procesach zapalnych towarzyszących często uszkodzeniu i chorobom neurodegeneracyjnym OUN, syntezie cytokin pro-zapalnych, towarzyszy pojawienie się cytokin przeciwzapalnych tj. TGF- β , IL-10. Cytokiny te oprócz modulacji odpowiedzi zapalnej kontrolują proliferację i migrację komórek, w tym także komórek nerwowych.

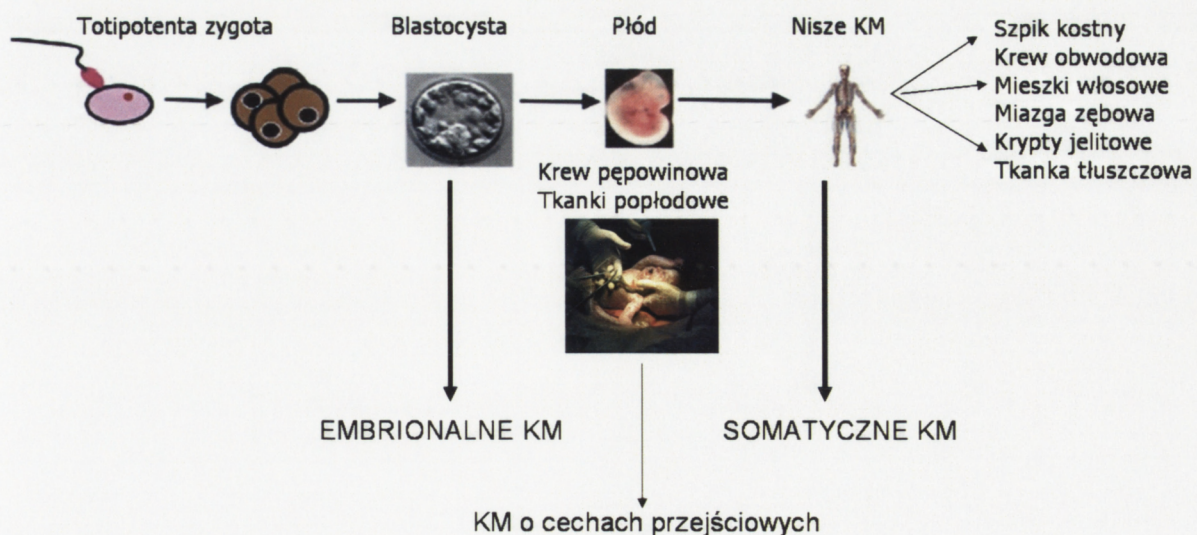
Rodzina cytokin TGF- β składa się z 30 czynników wykazujących plejotropowe działanie podczas rozwoju organizmu i w dojrzałych tkankach. Wśród cytokin TGF- β dominującą rolę w neuroregeneracji odgrywa TGF- β 1. Niski poziom TGF- β 1 w zdrowym OUN obserwowany głównie w splocie naczyniówkowym, oponach, astrocytach i komórkach mikrogleju zwiększa się bardzo szybko podczas procesów patologicznych (Wachs i wsp., 2006). TGF- β 1 odgrywa istotną rolę w przeżyciu nowo powstałych neuronów, reguluje ich różnicowanie i integrację z innymi komórkami (Unsicker i Strelau, 2000). Podany domózgowo lub dodany do hodowli somatycznych neuralnych komórek macierzystych lub ich progenitorów, powoduje długotrwałe zahamowanie proliferacji i ograniczenie neurogenezy. Jakkolwiek, obserwowany *in vitro* efekt zatrzymania cyklu komórkowego w fazie G0/G1 przez TGF- β 1 nie wpływa na potencjał neuralnych komórek macierzystych do samoodnowy i różnicowania. Podobnie, podanie TGF- β 1 *in vivo* nie zmienia procesu dojrzewania nowo powstałych komórek w neurony, astrocyty czy oligodendrocyty (Wachs i

wsp., 2006). Brak TGF- β 1 lub delecja receptora TGF- β R2 u myszy powoduje zmniejszone przeżycie nowo powstałych neuronów (Frugier i wsp., 2005). Zwiększenie ekspresji TGF- β 1 u myszy transgenicznnych działa neuroprotekcynie w przypadku ostrych lub przewlekłych uszkodzeń OUN prawdopodobnie w związku ze stymulacją działania czynników neurotroficznnych tj. NGF, BDNF, NT-3, NT-4. W badaniach *in vitro* wykazano również bezpośrednie działanie anty-apoptotyczne TGF- β 1 w stosunku do progenitorów neuralnych, neuronów i astrocytów. W komórkach tych obserwowano obniżenie ekspresji Bax i wyptywu cytochromu C z jednoczesnym wzrostem ekspresji Bcl-2 i Bcl-xl i zahamowaniem aktywacji kaspazy-3 (Park i wsp., 2008). Wyniki badań wielu autorów wskazują na kompleksowy efekt działania TGF- β 1 w OUN. Z uwagi na obecność receptorów TGF- β na neuronach i komórkach glejowych, neuroprotekcja czy neurodegeneracja może być wynikiem działania obu typów tych komórek. Działanie TGF- β 1 na komórki OUN jest odmienne niż innych reprezentantów tej rodziny cytokin np. BMP-2, który hamuje proces neurogenezy, promując różnicowanie progenitorów neuralnych, izolowanych z mózgu płodów myszy, w kierunku astrocytów (Nakashima i Taga, 2002). Autorzy wykazali, że zmniejszenie liczby neuronów po dodaniu BMP-2 do hodowli komórek neuroektodermalnych nie wynikało ze specyficznej eliminacji tych komórek, ale dotyczyło zmiany ich kierunku różnicowania w komórki S100 β ⁺.

I.2. Transplantacje komórek macierzystych w celu repopulacji uszkodzonych struktur OUN

I.2.1. Źródła komórek macierzystych

Komórki macierzyste występujące na poszczególnych etapach rozwoju ontogenetycznego charakteryzują się różnym potencjałem do różnicowania (Ryc.7).



Ryc.7 Źródła komórek macierzystych otrzymywanych na różnych etapach rozwoju ontogenetycznego

Zapłodniona komórka jajowa (zygota) jest totipotencjalną komórką macierzystą zdolną do wytworzenia wszystkich komórek organizmu. Komórki pochodzące z blastocysty i zgrupowane w węźle zarodkowym mają cechy pluripotencjalnych komórek macierzystych różnicujących się we wszystkie, poza rozrodczymi, komórki tkanek i narządów.

Otrzymanie i długotrwała hodowla ludzkich komórek embrionalnych (EKM) skupiła uwagę środowisk medycznych w aspekcie wspomagania regeneracji nieodwracalnie uszkodzonych komórek (Thomson i wsp., 1998). Jednak te same cechy tzn. Nielimitowana proliferacja i różnokierunkowość różnicowania, które stanowią o atrakcyjności EKM, niosą ze sobą również duże zagrożenie nowotworowe (Domańska-Janik 2004; Kelly i wsp., 2004; Hayashi i wsp., 2006). W przypadku przeszczepiania EKM w modelach eksperymentalnych ich różnicowanie wymykało się spod kontroli, a u znacznej liczby zwierząt obserwowano tworzenie potworniaków (Erdö i wsp., 2003). Ponadto linie EKM ustalonych linii używane w wielu ośrodkach badawczych ujawniły aberracje chromosomalne wskazując, że transformacje spowodowane niestabilnością genomu tych komórek zachodzą także w sposób niekontrolowany *in vitro* (Humpherys i wsp., 2001; Andrews, 2004). Ograniczenia etyczno-prawne w pozyskiwaniu EKM sprawiły, iż zaczęto poszukiwać alternatywnych źródeł KM. Prawie jednocześnie z technologią otrzymywania embrionalnych KM pojawiły się doniesienia o możliwościach uzyskania szerokiego wachlarza ukierunkowanych tkankowo somatycznych komórek macierzystych (SKM). Ostatnio okazało się, że SKM podobnie, jak EKM wykazują ekspresję genów typowych dla pluripotencjalności (Habich i wsp. 2006).

Źródłem SKM z dojrzałych organizmów jest szpik kostny i krew pępowinowa, a także, choć w mniejszym stopniu mobilizowana farmakologicznie krew obwodowa, mieszki włosowe, miazga zębów, krypty jelitowe, tkanka tłuszczowa. Komórki macierzyste z krwi pępowinowej zyskują w ostatnich kilku latach coraz więcej zwolenników z uwagi na to, że są łatwo dostępne, mniej dojrzałe, posiadają większy potencjał proliferacyjny i dłuższy czas przeżycia, a ponadto wykazują niższą immunogenność po przeszczepie (Lindvall i wsp., 2004). Wynika to prawdopodobnie z tego, iż krew pępowinową można zaliczyć do tkanek leżących na pograniczu okresu płodowego i dojrzałości tkankowej.

Od ponad 20 lat prowadzone są badania w poszukiwaniu źródeł prekursorów neuralnych. Trudność izolacji tych komórek z mózgu osób dorosłych możliwa jedynie podczas operacji neurochirurgicznych lub z materiału sekcyjnego, podobnie jak ograniczona ich ekspresja *in vitro* oraz kontrowersje etyczno-prawne w pozyskiwaniu płodowych neuralnych komórek macierzystych (NKM) sprawiły, że zaczęto poszukiwać ich poza OUN. Okazało się, że potencjalnym, nie kontrowersyjnym źródłem NKM może być szpik kostny, krew pępowinowa, tkanki popłodowe, krew obwodowa, skóra czy tkanka tłuszczowa (Bużanska i wsp., 2002; Hermann i wsp., 2004; de Coppi i wsp., 2007; Kim i wsp., 2007; Metcalfe i Ferguson, 2008). Selekcja tych komórek i hodowla w określonych warunkach

pozwała na ich różnicowanie w trzy podstawowe typy komórek neuralnych: neurony, astrocyty i oligodendrocyty. W warunkach *in vitro*, somatyczne NKM izolowane z wyżej wymienionych źródeł i przeszczepiane w stanach patologicznych OUN u zwierząt, wykazują potencjał regeneracyjny (Kozłowska i wsp., 2007; Low i wsp., 2008; Rehni i wsp., 2008). Jednak ciągle nierozwiązanym problemem jest istota mechanizmu działania tych przeszczepów oraz potwierdzenie repopulacji zniszczonej tkanki przez integrujące się z nią egzogenne NKM.

I.2.2. Transplantacje komórek ludzkiej krwi pępowinowej w eksperymentalnych modelach uszkodzeń OUN

Krew pępowinowa zawiera hemopoetyczne i mezenchymalne komórki macierzyste oraz prekursorzy śródbłonka naczyń. Dotychczas nie wiadomo, które z tych komórek poprawiają deficyty neuralne obserwowane w modelach eksperymentalnych po podaniu krwi pępowinowej. Badania prowadzone w naszym zespole ujawniły pozytywne działanie jednojądrzastych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej, pozbawionych hemopoetycznych komórek macierzystych, po ich przeszczepieniu do tętnicy szyjnej u szczurów poddanych cytotoksycznemu uszkodzeniu mózgu po zastosowaniu inhibitora pompy Na/K - ouabainy. Zwierzęta te wykazywały poprawę upośledzonych w wyniku uszkodzenia mózgu czynności ruchowych i poznawczych podczas 4 tygodni obserwacji. Podobne wyniki badań uzyskali inni autorzy podając dożylnie lub dootrzewnowo pełną populację komórek krwi pępowinowej u szczurów wykazujących deficyty neuralne w eksperymentalnym modelu udaru w następstwie zamknięcia tętnicy środkowej mózgu (ang. Middle Cerebral Artery Occlusion - MCAO) (Willing i wsp., 2003; Vendrame i wsp., 2004; Xiao i wsp., 2005; Newcomb i wsp., 2006; Meier i wsp., 2006). Poprawę stanu funkcjonalnego obserwowano u zwierząt z uszkodzeniem mózgu lub rdzenia kręgowego po przeszczepie komórek ludzkiej krwi pępowinowej (Lu i wsp., 2002; Saporta i wsp., 2003; Ereniev i wsp., 2005; Nan i wsp., 2005). Korzystny efekt terapeutyczny przeszczepiania komórek krwi pępowinowej był opisywany w modelach chorób neurodegeneracyjnych. Podanie komórek krwi pępowinowej myszom transgenicznym w eksperymentalnym modelu ALS (ang. amyotrophic lateral sclerosis) spowalniało rozwój choroby wydłużając czas przeżycia zwierząt (Ende i wsp., 2000; Garbuzova-Davies i wsp., 2003).

Mechanizm pozytywnego działania systemowego podawania komórek krwi pępowinowej w chorobach i urazach OUN u zwierząt nie został jak dotąd wyjaśniony. Obserwowana w badaniach eksperymentalnych poprawa funkcji motorycznych u zwierząt poddanych niedokrwieniu mózgu i infuzji krwi pępowinowej sugeruje, iż przeszczepione

komórki migrują do miejsca uszkodzenia i biorą udział w regeneracji zniszczonych struktur nerwowych. Jednak po podaniu dożylnym progenitorów neuralnych izolowanych ze szpiku lub krwi pępowinowej ludzi, autorzy prac nie wykazali ich obecności w mózgu gryzoni lub stwierdzili tylko pojedyncze komórki widoczne w obszarze niedokrwienia lub wewnątrz naczyń krwionośnych (Vendrame i wsp., 2004; Nan i wsp., 2005; Nystedt i wsp., 2006). Nieznaczna liczba komórek ludzkich w mózgu zwierząt może być efektem odrzucenia przeszczepu z uwagi na niezgodność antygenów tkankowych. W przypadku ksenotransplantacji (przeszczep międzygatunkowy) reakcja przebiega gwałtownie i polega na eliminacji przeszczepionych komórek. Pomimo tego podanie komórek krwi pępowinowej zwierzętom z deficytami neuralnymi wskazuje na ich duży potencjał regeneracyjny. Wydaje się, że przeszczepione komórki wywierają pozytywny efekt troficzny lub metaboliczny na uszkodzoną tkankę nerwową poprzez wydzielane czynniki wzrostu i cytokiny. Wykazano, że komórki krwi pępowinowej mają zdolność produkcji NGF, BDNF, GDNF, NT3-5 (Fan i wsp., 2005). Wzrost poziomu tych czynników zaobserwowano także w mózgu zwierząt po dożylnym podaniu komórek ludzkiej krwi pępowinowej (Borlongan i wsp., 2004).

Zmiany ogniskowe, jakie towarzyszą urazom OUN wskazują na konieczność transplantacji komórek bezpośrednio w okolicę uszkodzenia. Podanie komórek selekcyjowanych z ludzkiej krwi pępowinowej do mózgu zdrowych zwierząt powoduje ograniczoną migrację i krótki czas przeżycia wynikające z ostrego odrzucenia przeszczepu (Walczak i wsp., 2004; Kögler i wsp., 2004; Pan i wsp., 2005; Kozłowska i wsp., 2007; Janowski i wsp., 2008). Do niedawna istniał pogląd, że mózg jest miejscem uprzywilejowanym immunologicznie umożliwiającym przedłużenie przeżycia przeszczepu. Obecnie wiadomo, że reakcje immunologiczne występujące w OUN mogą być porównywalne z obserwowanymi w innych narządach. Czas przeżycia przeszczepów ksenogenicznych u nowonarodzonych biorców z niewykształconym jeszcze układem immunologicznym jest dużo dłuższy w porównaniu ze zwierzętami dorosłymi. Komórki ludzkiej krwi pępowinowej przeszczepione do mózgu ośesków szczura przeżywały 4 tygodnie w tkance nerwowej biorcy bez stosowania immunosupresji (Zigova i wsp., 2002). Badania prowadzone w naszym zespole wykazały, że neuralne komórki ludzkiej krwi pępowinowej przeszczepione do strefy SVZ ośesków szczura są akceptowane w mózgu biorcy (bez widocznych cech odrzucenia) przez 6 tygodni (Kozłowska i wsp., 2005).

Z badań eksperymentalnych wynika, że w OUN gdzie obserwuje się aktywację astrocytów i komórek mikrogleju w następstwie wcześniejszego uszkodzenia lub procesu chorobowego, przeszczepione KM przeżywają dłużej niż w zdrowej tkance. Jest to prawdopodobnie spowodowane uwalnianiem czynników neurotroficznych przez komórki zapalne w tym rejonie. W naszych badaniach neuralne komórki macierzyste z krwi pępowinowej (HUCB-NSC) przeszczepione do mózgu szczurów z fotochemicznym

uszkodzeniem kory, aktywnie migrowały w kierunku lezji dłużej zachowując żywotność w porównaniu z komórkami HUCB-NSC przeszczepianymi do mózgu szczurów zdrowych (Kozłowska i wsp., 2007). Jednak po 2-4 tygodniach przeszczepione komórki były eliminowane. Podobne wyniki badań uzyskali inni autorzy przeszczepiając komórki izolowane z tkanki nerwowej płodów ludzkich lub EKM myszy do mózgu szczura po udarze. Reakcja zapalna towarzysząca uszkodzeniu mózgu (komórki ED1⁺, GFAP⁺) wydawała się być korzystna we wczesnym etapie po transplantacji. Niektóre z przeszczepionych komórek przeżywały, proliferowały i różnicowały się w kierunku neuronalnym, natomiast po 7 tygodniach obserwowano tylko pojedyncze komórki dawcy w otoczeniu aktywnych fagocytów gospodarza (Wennersten i wsp., 2006; Molcanyi i wsp., 2007).

I.2.3. Transplantacje komórek u ludzi ze schorzeniami OUN

Brak efektywnego leczenia farmakologicznego schorzeń OUN, w których dochodzi do utraty neuronów i zachęcające wyniki badań eksperymentalnych z zastosowaniem egzogennych komórek w celach naprawczych, zwróciły uwagę naukowców na możliwość wykorzystania komórek macierzystych, jako potencjalnego narzędzia terapeutycznego. W ostatnich dwudziestu latach prowadzone są badania kliniczne z zastosowaniem przeszczepów komórek w leczeniu chorób neurologicznych tj. choroba Parkinsona, choroba Huntingtona, choroba Alzheimera, stwardnienie rozsiane, stwardnienie zanikowe boczne, udar mózgu czy uraz mózgu lub rdzenia kręgowego.

I.2.3.1. Przeszczepy komórek w chorobie Parkinsona

Utrata neuronów dopaminergicznych istoty czarnej leżąca u podstaw choroby Parkinsona, skłania do poszukiwania egzogennych źródeł zawierających komórki produkujące dopaminę, w celu ich transplantacji. Dotychczas podejmowano próby kliniczne z zastosowaniem przeszczepów autologicznych (kłębki szyjne, rdzeń nadnerczy, neurony zwojów współczulnych) bądź przeszczepów allogenicznych i ksenogenicznych (neurony części brzusznej śródmózgowia płodów ludzi i świni) oraz wyselekcjonowanych komórek pochodzących z guzów nowotworowych hNT (Laguna-Goya i wsp., 2008).

Transplantacje komórek kłębków szyjnych, których komórki uwalniają dopaminę w odpowiedzi na hypoksję powodowały ograniczoną poprawę funkcjonalną u pacjentów z chorobą Parkinsona (Arjona i wsp., 2003). Jednak obawa przed działaniem tych komórek na inne autonomiczne objawy choroby sprawiły, iż nie są one powszechnie stosowane w klinice.

Domózgowe, autologiczne przeszczepy rdzenia nadnerczy wykazały niewielką poprawę funkcji motorycznych (Watts i wsp., 1997; López-Lozano i wsp., 1999). Znikomy i krótkotrwały efekt terapeutyczny, krótki czas przeżycia komórek dawcy w mózgu biorcy oraz duża śmiertelność pacjentów ograniczyła próby kliniczne z zastosowaniem tego źródła komórek.

Badania kliniczne z wykorzystaniem neuronów zwojów współczulnych w domózgowej transplantacji w chorobie Parkinsona są prowadzone od 15 lat. W 50% przypadków pozwoliło to na zmniejszenie dawek L-Dopa u pacjentów, nie obserwowano jednak poprawy funkcji ruchowych czy zmian napięcia mięśni (Itakura i wsp., 1997; Nakao i wsp., 2004).

Największą grupę chorych stanowią biorcy płodowych tkanek izolowanych z mózgu. Pierwsze próby kliniczne przeprowadzono w końcu lat osiemdziesiątych XX wieku (Lindvall i wsp., 1990). Przeszczepione do prądkowia fragmenty śródmózgowia płodów ludzkich zawierające neurony dopaminergiczne wykazywały pozytywny efekt terapeutyczny. Obserwowano długotrwałe przeżycie neuronów dawcy (ponad 10 lat), ich różnicowanie i wytworzenie postsynaptycznych połączeń z komórkami gospodarza, pomimo postępującej degeneracji własnych neuronów dopaminergicznych (Piccini i wsp., 1999). Efekty kliniczne były zróżnicowane z uwagi na różny wiek pacjentów, stadium choroby czy liczbę neuronów dopaminergicznych w przeszczepianej heterogennej populacji komórek izolowanej z mózgu płodów (Newman i Bakay, 2008). Potencjał terapeutyczny przeszczepianych komórek był dużo większy w przypadku wczesnych stadiów choroby Parkinsona, a także młodszych pacjentów, w wieku poniżej 60 lat (Olanow i wsp., 2003; Newman i Bakay, 2008). Ograniczona dostępność materiału do transplantacji i względy etyczno-prawne sprawiły, iż podjęto próby ksenogenicznego przeszczepiania komórek izolowanych ze śródmózgowia płodów świni (Deacon i wsp., 1997; Fink i wsp., 2000). Przeszczepy, pomimo stosowania immunosupresji zostały odrzucone bez możliwości sprawdzenia ich ewentualnego efektu terapeutycznego.

1.2.3.2. Przeszczepy komórek w chorobie Huntingtona

Próby kliniczne przeszczepiania tkanki nerwowej w przypadku choroby Huntingtona prowadzone w wielu ośrodkach dawały różne rezultaty (Hauser i wsp., 2002; Bachoud-Levi i wsp., 2006). Źródłem przeszczepu były neuroblasty prądkowia, izolowane z płodów ludzkich podawane obustronnie do jądra ogoniastego i skorupy. U części pacjentów stwierdzono metaboliczną aktywność przeszczepionych komórek dawcy oraz poprawę funkcji ruchowych i poznawczych (Bachoud-Levi i wsp., 2000). Badania autopsyjne mózgów chorych, którzy otrzymali przeszczep płodowej tkanki nerwowej 18-79 miesięcy wcześniej, wykazały

obecność żywych komórek dawcy, głównie neuronów zróżnicowanych, ale nie tworzących połączeń z komórkami gospodarza (Keene i wsp., 2007). Brak integracji pomiędzy neuronami dawcy i biorcy oraz progresja choroby Huntingtona świadczy o ograniczonej funkcji regeneracyjnej przeszczepianych komórek i poddaje w wątpliwość celowość takiego działania terapeutycznego. Przeszczepy ksenogeniczne tkanki nerwowej płodów świni wykonano u 12 pacjentów z chorobą Huntingtona (Fink i wsp., 2000) jednak wyniki długotrwałych obserwacji czy badań anatomopatologicznych nie zostały jak dotąd opublikowane.

1.2.3.3. Przeszczepy komórek w chorobie Alzheimera

Choroba Alzheimera (AD) charakteryzuje się m.i. utratą neuronów i połączeń synaptycznych układu cholinergicznego części podstawnej kresomózgowia, jądra migdałowatego, hipokampa i kory mózgowej. Obecnie stosowane leczenie z wykorzystaniem inhibitorów acetylcholinesterazy skutkuje tylko częściową i krótkotrwałą poprawą. Zmiany patologiczne będące wynikiem rozproszonego i postępującego uszkodzenia tkanki nerwowej mózgu pacjentów z AD stwarzają problematyczną sytuację dla stosowania repopulacyjnej terapii komórkowej. Wydaje się, iż wraz z progresją schorzenia mechanizmy odpowiedzialne za proliferację i różnicowanie przeszczepianych progenitorów neuralnych stają się niewydolne. Przeszczepiane komórki mogą być używane jako nośniki czynników troficznych tj. NGF, BDNF, które uwalniane po transplantacji opóźniają degenerację neuronów cholinergicznym (Lindvall i Kokaia, 2006). Próby kliniczne I fazy przeprowadzone w San Diego obejmowały 8 pacjentów z chorobą Alzheimera, którym przeszczepiono zmodyfikowane genetycznie (transfer genu NGF) autologiczne fibroblasty. U 6 chorych obserwowano nieznaczna poprawę funkcji poznawczych. Badania z zastosowaniem pozytonowej tomografii emisyjnej (CPET) wykazały u tych pacjentów zwiększoną zdolność do wychwytu 18-fluorodeoxyglukozy, co świadczy o zwiększonym metabolizmie neuronów. Analiza *post mortem* ujawniła wzrost neuronów, prawdopodobnie w odpowiedzi na egzogenny NGF (Tuszynski i wsp., 2005).

1.2.3.4. Przeszczepy komórek w stwardnieniu rozсіяnym

Stwardnienie rozсіяne (SM) jest chorobą demielinizacyjną OUN występującą zarówno u młodych jak i starszych osobników. Z uwagi na autoimmunologiczne podłoże tego schorzenia i udział autoreaktywnych limfocytów T w degeneracji istoty białej, zaproponowano w końcu lat dziewięćdziesiątych ubiegłego stulecia autologiczny przeszczep

hematopoetycznych komórek macierzystych izolowanych z krwi obwodowej (Fassas i wsp., 1997). Badania wieloośrodkowe prowadzone w latach 1998-2003, wykazały u 74% z 85 chorych ze stwardnieniem rozsianym, poddanych transplantacji autologicznych komórek macierzystych krwi, zahamowanie progresji schorzenia w okresie 3 lat od przeszczepu (Fassas i wsp., 2002; Nash i wsp., 2003). Dłuższy okres obserwacji (49-72 miesięcy) potwierdził spowolnienie rozwoju choroby u większości pacjentów (Saccardi i wsp., 2005; Su i wsp., 2006). Jednak z uwagi na różne formy kliniczne SM i złożone procedury immunoablacji interpretacja otrzymanych wyników powinna być ostrożna.

1.2.3.5. Przeszczepy komórek w stwardnieniu zanikowym bocznym

Stwardnienie zanikowe boczne (ALS) charakteryzuje się szybko postępującym zanikiem neuronów ruchowych w korze mózgowej, pniu mózgu i rdzeniu kręgowym. Najnowsze wyniki badań sugerują, iż to nie motoneurony a raczej środowisko, w którym się znajdują jest pierwotnym źródłem zmian patologicznych (Borchelt, 2006). Zniszczone komórki glejowe oddziałują na neurony ruchowe powodując ich degenerację. Potwierdzeniem tej hipotezy były badania u gryzoni w eksperymentalnym modelu ALS, którym przeszczepiano komórki jednojądrzaste szpiku kostnego. U niektórych zwierząt stwierdzono zahamowanie degeneracji neuronów i stymulację endogennych procesów naprawczych (Corti i wsp., 2004). Wyniki tych badań zachęciły do pierwszych prób klinicznych z zastosowaniem transplantacji autologicznych hemopoetycznych komórek macierzystych u chorych ze stwardnieniem zanikowym bocznym. Janson i wsp (2001) podali pacjentom podpajęczynówkowo populację komórek CD34⁺ izolowanych z krwi obwodowej. Po 6-12 miesiącach od przeszczepu nie obserwowano objawów ubocznych, brak było jednak poprawy (Janson i wsp., 2001). Próby podania chorym mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego do rdzenia kręgowego ujawniły spowolnienie obniżenia siły mięśni lub jej wzrost w pierwszych 3 miesiącach od transplantacji (Mazzini i wsp., 2003). Dłuższe obserwacje kliniczne (4 lata) wykazały przedłużenie przeżycia u niektórych pacjentów natomiast brak było wyraźnych efektów terapeutycznych (Mazzini i wsp., 2008).

1.2.3.6. Przeszczepy komórek u chorych po udarze

Zamknięcie naczyń tętniczych w mózgu powoduje niedokrwienie w ograniczonych rejonach OUN i degenerację różnych typów komórek. Eksperymentalne przeszczepianie komórek w celu repopulacji tych uszkodzeń, powodowało poprawę funkcji behawioralnych upośledzonych w następstwie udaru. Jedyne udokumentowane w literaturze naukowej próby

kliniczne przeprowadzono na Uniwersytetach Stanford i w Pittsburgu (Kondziolka i wsp., 2000; Kondziolka i Wechsler, 2008). Przeszczep stanowiły ludzkie embrionalne komórki nowotworowe (teratocarcinoma) ustalonej linii hNT, które można przyjąć za odpowiednik ukierunkowanych neuralnie embrionalnych komórek macierzystych, implantowane w okolicę udaru. Podczas 5 lat obserwacji stwierdzono poprawę funkcjonalną u 30% pacjentów, skorelowaną ze zwiększoną aktywnością metaboliczną w miejscu przeszczepu. Nie wiadomo czy efekt ten był związany z funkcją przeszczepionych komórek, czy też komórek zapalnych lub endogennych neuronów biorcy. Ograniczone próby kliniczne u 12 pacjentów przeprowadzono z wykorzystaniem komórek macierzystych izolowanych z mózgowi płodów ludzkich i świni, jednak efekty terapeutyczne tych przeszczepów nie są znane (Björklund i Lindvall, 2000).

1.2.3.7. Przeszczepy komórek w urazach rdzenia kręgowego

Uszkodzenie rdzenia kręgowego (SCI) powoduje utratę neuronów i komórek glejowych, a w efekcie zaburzenia funkcji ruchowych i czuciowych poniżej miejsca urazu. Kliniczne próby z wykorzystaniem transplantacji komórek macierzystych w celu rekonstrukcji uszkodzonego rdzenia kręgowego podejmowano w kilku klinikach uniwersyteckich. Podanie autologicznych komórek szpiku kostnego dożylnie u 9 chorych, wykazało nieznaczną poprawę stanu klinicznego, porównywalną ze spontanicznym powrotem funkcji po uszkodzeniu rdzenia kręgowego (Reier, 2004). Transplantacja mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego bezpośrednio do miejsca uszkodzenia dwóm pacjentom spowodowała częściowe odzyskanie utraconych funkcji ruchowych i czuciowych (Moviglia i wsp., 2006). Lima i wsp. (2006) zastosowali jako źródło komórek macierzystych autologiczne komórki nabłonka węchowego, które przeszczepione w 7 przypadkach u chorych z przewlekłym uszkodzeniem rdzenia kręgowego spowodowały poprawę funkcjonalną, aczkolwiek w różnym stopniu u poszczególnych osób. Transplantacje komórek izolowanych z opuszki węchowej płodów ludzkich wykonane w miejscu urazu u 171 pacjentów z SCI przez Huang i wsp. w Bering, nie dostarczyła jak dotąd żadnych informacji na temat terapeutycznego działania przeszczepionych komórek z uwagi na krótki czas obserwacji (Bareyre, 2008). Badania wielośrodkowe prowadzone z wykorzystaniem progenitorów neuralnych izolowanych z rdzenia kręgowego płodów ludzkich w terapii uszkodzeń OUN były ukierunkowane głównie na to, aby wykazać, czy procedura przeszczepiania komórek jest bezpieczna i czy może być stosowana w klinice (Bareyre, 2008). Opisano jak dotąd jeden przypadek zastosowania komórek macierzystych krwi pępowinowej u pacjenta z uszkodzeniem rdzenia kręgowego. Przeszczepione podpajęczynówkowo w okolicę uszkodzenia po 20 latach od urazu poprawiły kondycję chorego w ciągu 6 tygodni od

zabiegu. W badaniu MRI ujawniono cechy regeneracji tkanki nerwowej w okolicy wcześniejszego uszkodzenia (Kang i wsp., 2005).

Ostatnie dwie dekady przyniosły znaczny postęp w rozumieniu i poznaniu biologii somatycznych komórek macierzystych. Zdolność komórek izolowanych z krwi pępowinowej do samoodnowy i różnicowania w trzy typy komórek neuralnych, stwarza możliwość ich wykorzystania jako narzędzia terapeutycznego w schorzeniach neurologicznych. Jednak pomimo obiecujących wstępnych wyników badań eksperymentalnych próby zastosowania komórek macierzystych „nie wyszły” jak dotychczas poza fazę przedkliniczną. Zbyt wolny rozwój terapii komórkowej wynikają z niedostatecznej znajomości mechanizmów regulujących proliferację i ukierunkowane różnicowanie komórek macierzystych. Dodatkową trudnością jest konieczność prowadzenia badań w układach ksenogenicznych, co stwarza wysoce niekorzystne warunki immunologiczne i szybszą eliminację przeszczepionych komórek w organizmie biorcy. Rozwiązanie tych problemów, a także identyfikacja czynników, które determinują przeżycie, różnicowanie i dojrzewanie funkcjonalne egzogennych progenitorów neuralnych jest konieczne przed rozpoczęciem badań klinicznych.

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Od wielu lat trwają próby przywrócenia upośledzonych funkcji komórek nerwowych w schorzeniach neurologicznych. Urzeczywistnienie wizji terapii tych chorób przez wykorzystanie stale proliferujących i różnicujących się w komórki neuralne zarodkowych komórek macierzystych do tej pory nie wyszło poza fazę eksperymentalnych badań klinicznych. Również liczne próby zastosowania do tych celów somatycznych komórek macierzystych pozyskiwanych z dojrzałych tkanek przyniosły jedynie umiarkowane skutki kliniczne.

Zbyt wolny rozwój terapii komórkowej wynika z niedostatecznej znajomości mechanizmów regulujących proliferację i ukierunkowane różnicowanie neuralnych komórek macierzystych. Sytuację komplikuje fakt, że odpowiedź ludzkich komórek macierzystych na czynniki instruktywne środowiska jest wysoce nieswoista i trudna do ekstrapolacji z doświadczeń prowadzonych na komórkach gryzoni.

Powstaje pytanie czy i w jaki sposób można w warunkach eksperymentalnych wpływać na potencjał proliferacyjny, przeżycie, różnicowanie i integrację ludzkich neuralnych komórek macierzystych?

Przeprowadzona w naszym zespole selekcja komórek ludzkiej krwi pępowinowej pozwoliła nam na otrzymanie populacji zawierającej progenitory neuralne i wyprowadzenie unikalnej jak dotychczas stałej linii neuralnych komórek macierzystych (HUCB-NSC) wykazujących stabilność fenotypową i prawidłowy kariotyp. Dostępność ludzkich progenitorów neuralnych stwarza możliwość badania ich potencjału neuronalnego *in vitro* i *in vivo*.

Celem moich badań była analiza oddziaływań parakrynnych pomiędzy komórkami OUN gryzoni i neuralnymi komórkami macierzystymi ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC) przeprowadzona w oparciu o badania *in vitro* i *in vivo* t.j.:

- Ocena proliferacji i różnicowania HUCB-NSC hodowanych w obecności astrocytów, komórek mikrogleju, neuronów i komórek śródbłonna
- Identyfikację wybranych czynników uwalnianych przez astrocyty i komórki mikrogleju stymulowane LPS i TMT oraz fenotypów neuralnych powstałych z HUCB-NSC hodowanych w obecności aktywowanych komórek glejowych
- Ocena przeżycia, migracji, proliferacji i różnicowania HUCB-NSC w środowisku mózgu osesków szczura po ich transplantacji

III. MATERIAŁ

Przedmiotem badań są neuralne komórki macierzyste z ludzkiej krwi pępowinowej (ang. Human Umbilical Cord Blood-derived Neural-like Stem Cell – HUCB-NSC), stanowiące stabilną nietransformowaną linię komórek otrzymaną w naszym zespole (Bużańska i wsp. 2002). Komórki te pod wpływem odpowiednich warunków środowiska (obecność surowicy i stymulacja neuromorfogেনami) mogą różnicować się w komórki o charakterze neuronów, astrocytów i oligodendrocytów.

Materiałem wyjściowym do wyprowadzenia linii neuralnych komórek macierzystych była ludzka krew pępowinowa pobrana bezpośrednio po porodzie, za zgodą matki dziecka i komisji etycznej. Pierwszym etapem było uzyskanie frakcji komórek jednojądrzastych w gradiencie Fikolu, a następnie immunodeplecja, metodą sortowania magnetycznego (Milteney i Biotech), komórek macierzystych już ukierunkowanych hematopoetycznie o fenotypie CD34⁺. Pozostałe po izolacji komórki hodowano w gęstości 10⁶ komórek/ml podłoża IMDM (Gibco) +10%FBS (Gibco) przez 6 tygodni w warunkach standardowych (37°C, wilgotność 95%, 5% CO₂), zmieniając połowę pożywki raz w tygodniu. Otrzymana jednowarstwowo-rosnąca hodowla komórek była negatywna pod względem powierzchniowych markerów progenitorów hematopoetycznych (CD34⁻) i leukocyтарnych (CD45⁻). Dalsza selekcja polegała na zmianie warunków hodowli w kierunku stymulacji do podziału tych komórek, które są wrażliwe na czynnik wzrostowy EGF (ang. Epidermal Growth Factor). Wielostopniową selekcję klonogennych komórek nieprzylegających do podłoża i ich ekspansję przeprowadzono w pożywce DMEM (Gibco) +10% FBS (Gibco), wzbogaconej w EGF (Sigma) (Bużańska i wsp., 2005; Bużańska i wsp., 2006). Ustabilizowanie linii jako neuralnej linii komórek macierzystych nastąpiło po jej przejściowej hodowli w warunkach bez surowicy w obecności czynników wzrostowych EGF, bFGF (ang. basic Fibroblast Growth Factor) i LIF (ang. Leukemia Inhibitory Factor). W efekcie otrzymano heterogenną hodowlę komórek pływających w toni – niezróżnicowanych i przylegających do podłoża, wykazujących ekspresję wczesnych markerów neuralnych, o potencjale do różnicowania w trzy typy komórek nerwowych: neurony, astrocyty i oligodendrocyty (Bużańska i wsp., 2005; Bużańska i wsp., 2006). Komórki HUCB-NSC utrzymywane w ciągłej hodowli od ponad czterech lat wykazują prawidłowy kariotyp, utrzymują stałe tempo wzrostu i klonogenność. Przeszczepiane do myszy NOD/SCID (ang. Non-Obese Diabetic/Severely Combined ImmunoDeficient) nie tworzą guzów nowotworowych. Dostępność neuralnych komórek macierzystych w naszym laboratorium pozwoliła na stworzenie układu doświadczalnego do badania niektórych aspektów procesu neurogenezy jak i mechanizmów integracji NSC z ludzkiej krwi pępowinowej z tkanką nerwową *in vitro* i *in vivo*.

IV. METODY BADAŃ

IV.1. Hodowla komórek linii HUCB-NSC

Komórki HUCB-NSC hodowano w pożywce o składzie: DMEM/F12 (Gibco) z niską zawartością płodowej surowicy bydlęcej (2% FBS, Gibco), wzbogaconą insuliną, transferyną i selenem (ITS 1:100, Gibco) z dodatkiem antybiotyków (AAS 1:100, Sigma). Hodowlę prowadzono w inkubatorze zapewniającym warunki atmosferyczne określone jako standardowe (atmosfera powietrza z zawartością 5% CO₂, o wilgotności 95% i temperaturze 37°C). Komórki HUCB-NSC hodowane w takiej pożywce rosną w postaci dwóch frakcji: komórek pływających w toni (niezróżnicowanych) i przylegających do podłoża (częściowo zróżnicowanych ukierunkowanych progenitorów neuralnych).

Wymianę połowy objętości pożywki przeprowadzano dwa razy w tygodniu, pasażując komórki do nowych butelek hodowlanych tak, aby utrzymać stały poziom proliferacji. W tym celu przenoszono tylko komórki pływające i wysiewano je do butelek o pojemności 25 cm², w gęstości 5x10⁵ komórek/butelkę. Pożywkę uzupełniano do całkowitej objętości 5 ml. Komórki przyklejone do podłoża pasażowane były raz w miesiącu.

IV.2. Znakowanie HUCB-NSC barwnikiem fluorescencyjnym CMFDA

Komórki HUCB-NSC przeznaczone do badań (wspóhodowle z astrocytami, komórkami mikrogleju, neuronami, komórkami śródbłonna) znakowano znacznikiem fluorescencyjnym CMFDA (ang. *5-ChloroMethyl-Fluorescein-DiAcetate* (Molecular Probes), który po wnikięciu do wnętrza komórki lokalizuje się równomiernie w cytoplazmie. Do momentu odcięcia grup acylowych przez esterazy obecne w komórce barwnik CMFDA jest bezbarwny. Wzbudzenie świecenia barwnika, następuje światłem o długości fali 492 nm i wtedy CMFDA zaczyna emitować zielone światło o długości fali 517 nm. W celu znakowania komórki HUCB-NSC odwirowano z pożywki hodowlanej i zawieszono w gęstości 0,5-1x10⁶ komórek w 400µl świeżej pożywki uzupełnionej o 1µl zielonego barwnika fluorescencyjnego CMFDA (10mM) w DMSO (Sigma). Inkubację HUCB-NSC z barwnikiem CMFDA prowadzono w warunkach standardowych (5% CO₂, wilgotność 95%, temp. 37°C) przez 30 min., następnie komórki dwukrotnie przepłukano świeżą pożywką i inkubowano przez kolejne 30 min., w celu odplukania nadmiaru niezwiązanego barwnika.

IV.3. Izolacja i otrzymywanie jednorodnej hodowli astrocytów mózgu szczura

Do izolacji astrocytów wykorzystano mieszane neuralne hodowle pierwotne uzyskiwane z mózgu osesków szczurów szczepu Wistar tuż po ich urodzeniu (P0). Po 5 minutowej hipotermii na lodzie oseski szczurów dekapitowano, izolowano mózgowie, które poddawano mechanicznej dyspersji w płynie HBSS (Gibco) bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} , przy pomocy igieł o średnicy $22\mu\text{m}$. Otrzymaną zawieszynę komórek filtrowano (Millipore o średnicy $41\mu\text{m}$), wirowano w temp. 4°C przy szybkości 1000 rpm/min . przez 10 min. Uzyskane komórki liczono w komorze Bürkera w błękie trypanu i wysiewano do butelek hodowlanych o powierzchni 75 cm^2 pokrytych $0,1\text{mg/ml}$ poli-L-lizyną (Sigma) w koncentracji 2×10^5 komórek/ cm^2 . Hodowlę prowadzono w medium DMEM/F12+10% FBS.

Po dwóch tygodniach hodowli *in vitro*, izolowano homogenną populację astrocytów wg zmodyfikowanych przez nas metod McCarthy, Levison i de Vellis (McCarthy i de Vellis, 1980; Levison i McCarthy, 1991). Metoda ta wykorzystuje zróżnicowaną siłę adhezji poszczególnych typów komórek neuralnych. Butelki zawierające pierwotną hodowlę komórek neuralnych wytrząsano mechanicznie (wytrząsarka firmy GFL) w temperaturze 37°C przez noc, przy 225 rpm/min . Po wytrząsaniu przyklejone do dna komórki trypsynizowano ($0,25\%$ trypsyna (Gibco) w DMEM/F12) w temperaturze 37°C przez 2 min, osad odwirowano (4°C , 10 min, 1000 rpm/min), komórki liczono w komorze Bürkera i wysiewano do 24-wgłębnych szalek hodowlanych pokrytych poli L-lizyną w gęstości 1×10^5 komórek / cm^2 . Komórki hodowano, aż do uzyskania jednorodnego wzrostu na podłożu (około 7 dni), zmieniając pożywkę na świeżą, co dwa dni. Dalsze podziały komórkowe zahamowano poprzez dodanie do pożywki $20\mu\text{M}$ Ara-C (Sigma) w DMEM+10%FBS+AAS. Po trzech dniach wymieniono pożywkę na podstawową (DMEM+10%FBS+AAS) i hodowano komórki przez kolejne 24 godziny. Hodowlę badano pod kątem homogenności komórek ją tworzących. Do dalszych eksperymentów używano hodowle wzbogacone o ponad 93% astrocytów.

IV.4. Izolacja i otrzymywanie jednorodnej hodowli komórek mikrogleju mózgu szczura

Pierwszy etap izolacji i otrzymywania komórek mikrogleju był identyczny jak w przypadku astrocytów. Po 2 tygodniach butelki zawierające pierwotną hodowlę komórek neuralnych uzyskanych z mózgow osesków szczura wytrząsano mechanicznie w temperaturze 37°C przez 90 minut, przy szybkości obrotów 225 rpm/min . Oddzielano komórki pływające, które ponownie wysiewano w gęstości $1,5\text{--}2 \times 10^6$ komórek/ cm^2 do butelek hodowlanych pokrytych $0,1\text{mg/ml}$ poli-L-lizyną. Po 60 min. inkubacji komórki pływające odrzucano, a adherentne hodowano w DMEM+10%FBS+AAS, aż do uzyskania

konfluentności (około 7 dni), zmieniając pożywkę na świeżą, co 2 dni. Po tygodniu hodowli, butelki z komórkami wytrząsano delikatnie, ręcznie przez 2-3 minuty, zbierano frakcję komórek pływających w pożywce, a komórki przylegające, po trypsynizacji wysiewano ponownie do szalek 24-wgłębnych pokrytych poli-L-lizyną, uzyskując hodowlę wzbogaconą w komórki mikrogleju. Do dalszych eksperymentów używano hodowle wzbogacone o 93% komórek ED1⁺.

IV.5. Izolacja i otrzymywanie jednorodnej hodowli neuronów mózgu szczura

Neuronalne hodowle pierwotne uzyskiwano z mózgu osesków szczurów szczepu Wistar tuż po urodzeniu (P0) wg zmodyfikowanej metody izolacji neuronów (Dotti i wsp., 1988; Goslin i Banker, 1989; Brewer i wsp., 1993). Po 5 minutowej hipotermii na lodzie oseski szczurów dekapitowano i izolowano mózgowie. Wypreparowane hipokampy i korę mózgową dyspersjonowano mechanicznie w płynie HBSS (Gibco) bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ zawierającym bufor Hanks'a, a następnie inkubowano z 0,25% trypsyną (Gibco) w temperaturze 37°C przez 15 minut. Po kolejnej mechanicznej dyspersji, zawiesinę komórek inkubowano w mieszaninie hamującej działanie trypsyny: DNA-za (Roche), MgSO₄ (POCH), inhibitor trypsyny (Sigma) w HBSS (Gibco) w temperaturze pokojowej przez 3 minuty. Otrzymałą zawiesinę komórek ponownie dyspersjonowano, a po 5-10 minutach dekantacji zbierano nadsącz z nad osadu komórek, komórki wirowano (4°C, 1-2 min, 200rpm/min.) i zawieszano w pożywce NB (Gibco)+B27 (Gibco)+L-glutamina (Sigma)+AAS (Sigma). Komórki liczone w komorze Bürkera oceniając ich żywotność w błękiecie trypanu i wysiewano w gęstości 2-3x10⁵ komórek/cm² do szalek 24-dołkowych pokrytych poli-L-lizyną. Po 48 godzinach dodawano do hodowli 10µM Ara-C (Sigma) w NB+B27+L-glutamina+AAS, aby zahamować wzrost astrocytów. Po 2 dniach Ara-C odpłukiwano, a hodowlę komórek prowadzono w medium NB+B27+L-glutamina+AAS przez 7-10 dni, aż do uzyskania konfluentności. Neurony stanowiące ponad 85% komórek podłoża (TUJ1⁺) były wykorzystywane do dalszych badań.

IV.6. Hodowla komórek śródbłonna

Komórki transformowanej linii komórek śródbłonna izolowanych z naczyń włosowatych myszy (t-End), otrzymane z Zakładu Biologii Komórki Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, wysiewano do butelek hodowlanych o powierzchni 25 cm² i hodowano przez 7 dni, aż do uzyskania konfluentności. Komórki przesiewano w gęstości

2×10^5 komórek/cm² do szalek 24-wgłębnych i hodowano w pożywce DMEM/F12+10%FBS+AAS przez 5 dni do uzyskania jednorodnego wzrostu komórek adherentnych.

IV.7. Współhodowle HUCB-NSC w obecności astrocytów, komórek mikrogleju, neuronów mózgu szczura oraz komórek śródbłonna myszy (t-End)

Komórki linii HUCB-NSC wyznakowane CMFDA wysiewano w gęstości 2×10^4 komórek/cm² na konfluentną jednorodną hodowlę niestymulowanych astrocytów, komórek mikrogleju, neuronów i komórek śródbłonna. Przed wysianiem oceniano żywotność komórek przy zastosowaniu barwnika Trypan Blue (Sigma). Współhodowlę HUCB-NSC z komórkami podłoża prowadzono przez 7 dni w warunkach kontaktu bezpośredniego. Po 7 dniach, komórki przepłukiwano PBS (pH = 7,4; Gibco), utrwalano 4% roztworem paraformaldehydu (PFA; Sigma) w PBS (pH = 7,4), ponownie przepłukiwano 3-krotnie PBS+AAS, i wykonywano badania immunocytochemiczne w celu identyfikacji fenotypów neuralnych.

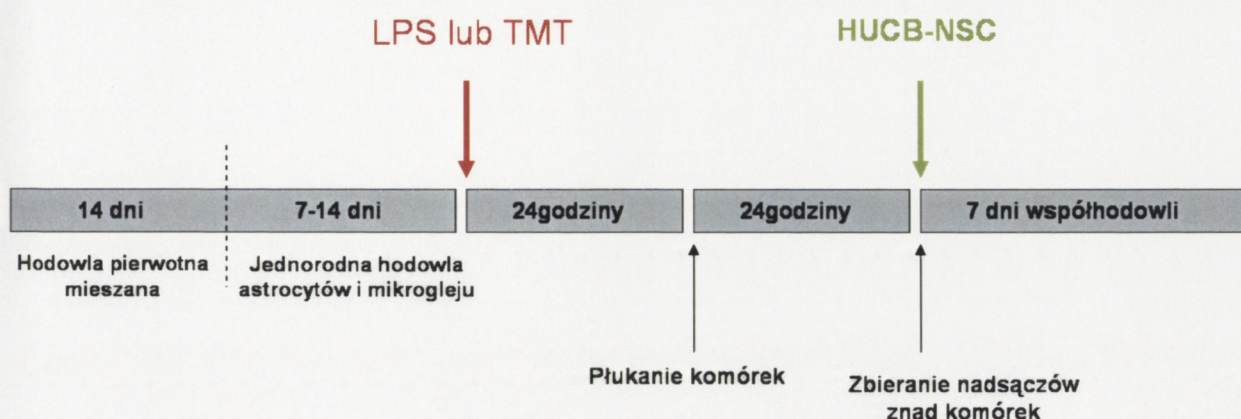
IV.8. Stymulacja astrocytów i komórek mikrogleju LPS i TMT

Do konfluentnej hodowli astrocytów i komórek mikrogleju dodawano lipopolisacharyd (LPS; Sigma) w stężeniu 0,1 µg/ml lub chlorek trimetylocyny (TMT; Sigma), w stężeniu 1 µM. Komórki w obecności LPS lub TMT hodowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a następnie medium stymulujące wymieniano na pożywkę standardową. Po kolejnych 24 godzinach, pożywkę z nad komórek zbierano do probówek i przechowywano w temperaturze -70°C w celu późniejszego wykorzystania do badań immunoenzymatycznych (Ryc.8).

IV.9. Współhodowle HUCB-NSC w obecności astrocytów i komórek mikrogleju stymulowanych LPS i TMT

Komórki linii HUCB-NSC wyznakowane CMFDA wysiewano w gęstości 2×10^4 komórek/cm² na konfluentną jednorodną hodowlę stymulowanych LPS i TMT astrocytów i komórek mikrogleju. Przed wysianiem oceniano żywotność komórek przy zastosowaniu barwnika Trypan Blue (Sigma). Współhodowlę HUCB-NSC z komórkami podłoża prowadzono przez 7 dni w warunkach kontaktu bezpośredniego. Po 7 dniach,

komórki przepłukiwano PBS (pH = 7,4; Gibco), utrwalano 4% roztworem PFA (Sigma) w PBS (pH =7,4), ponownie przepłukiwano 3-krotnie PBS+AAS, i wykonywano badania immunocytochemiczne w celu identyfikacji fenotypów neuralnych.



Ryc.8.Schemat doświadczenia stymulacji astrocytów i mikrogleju LPS i TMT

IV.10. Badania immunocytochemiczne

Immunodetekcja komórek miała za zadanie określenie homogenności hodowli komórek podłoża z wykorzystaniem znaczników neuronów (NF-200, TUJ-1, MAP-2), astrocytów (GFAP, S100 β), oligodendrocytów (O4), komórek mikrogleju (ED-1), komórek śródbłonna (czynnik von Willebrandt'a), a także stopnia proliferacji i zróżnicowania komórek linii HUCB-NSC hodowanych *in vitro* w obecności różnych komórek podłoża, w oparciu o identyfikację białek (Ki67, Nestyna, NF-200, TUJ-1, MAP-2, GFAP, S100 β , O4). W tym celu po utrwaleniu 4% PFA hodowle komórek poddawano procesowi permeabilizacji błon komórkowych 1% Triton X-100 (Sigma) w PBS, przez 15 min. w temperaturze 20°C. W kolejnym etapie, blokowano miejsca niespecyficznego wiązania odpowiednich przeciwciał, 5% surowicą krwi kozy (NGS;Gibco) w PBS (pH=7,4) w temperaturze pokojowej przez 60 minut. Jedynie w przypadku analizy obecności Nestyny w komórkach, do blokowania stosowano 5% roztwór albuminy (BSA; Sigma) w PBS (pH=7,4). W przypadku komórek mikrogleju dodatkowo inaktywowano endogenną peroksydazę poprzez inkubację hodowli komórek mikrogleju w mieszaninie 3% H₂O₂ w 10% metanolu. Po zastosowaniu odpowiednich specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych (Tabela 1) i inkubacji w temperaturze 4°C przez 16 godzin, stosowano odpowiednie przeciwciała drugorzędowe skoniugowane ze znacznikami fluorescencyjnymi (Tabela 2). Jądra komórek barwiono 5 μ M roztworem Hoechst 33258 (Sigma) w PBS (pH=7,4) w temperaturze pokojowej przez 20 min. Po odplukaniu niezwiązanego barwnika preparaty zamykano przy użyciu odczynnika Fluoromount-G (Southern Biotechnology Association), o właściwościach zapobiegających wygaszaniu

emitowanej fluorescencji. Jako kontrolę specyficzności przeprowadzonych badań immunocytochemicznych, zastosowano powyższą procedurę barwienia, z pominięciem przeciwciała pierwszorzędowego.

IV.11. Ocena immunoenzymatyczna cytokin

Poziom cytokin (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α) w nadsączu znad pierwotnych hodowli astrocytów lub komórek mikrogleju (niestymulowanych bądź stymulowanych LPS lub TMT) określano immunoenzymatycznie z użyciem komercyjnie dostępnych testów ELISA – Quantykin (R&D Systems). Metoda polega na pośredniej technice „sandwich” z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał skierowanych przeciwko badanym cytokinom, związanych z peroksydazą chrzanową. Po osiągnięciu stanu równowagi reakcji immunologicznej i odplukaniu niezwiązanych przeciwciał dodawano substrat (H₂O₂+ tetramethylbenzydyna) w celu uzyskania reakcji kolorymetrycznej. Intensywność barwy była proporcjonalna do stężenia badanych cytokin obecnych w próbkach badanych supernatantów z hodowli astrocytów i komórek mikrogleju. Testy przeprowadzono zgodnie z protokołami zalecanymi przez firmę R&D. Pomiary każdej badanej próbki wykonano w dwóch powtórzeniach. Pomiar gęstości optycznej produktów, polegającą na mierzeniu absorbancji wzbudzenia świecenia przy długości fali OD₄₅₀, w odniesieniu do absorbancji 570 nm, wykonano przy użyciu spektrofotometru (Ultrospec 2100pro, Amersham).

IV.12. Pomiar tlenku azotu - metoda Griessa

Poziom NO w nadsączu znad pierwotnych hodowli astrocytów i komórek mikrogleju (niestymulowanych bądź stymulowanych LPS lub TMT) określano metodą Griessa opartą na kolorymetrycznym pomiarze produktów będących wynikiem dwu-stopniowej reakcji. Pierwszą, jest reakcja NO w warunkach kwasowych z grupami aminowymi sulfanilamidu (SA) (Sigma) w wyniku, której powstaje jon diazoniowy, a ten wiążąc się w pozycji *para* do N-(1-naftylo)etylenodiaminy (NEDA) (Sigma), tworzy barwny produkt (N-1-naftylo-etylenodiaminę). Badając obecność NO, do 50 μ l każdej próbki zebranych supernatantów, dodano 50 μ l roztworu sulfanilamidu w roztworze 6M HCl i inkubowano przez 10 min. w temperaturze pokojowej, chroniąc od światła. Następnie do wszystkich prób odmierzone po 50 μ l roztworu NEDA rozpuszczonego w 95% etanolu i inkubowano kolejne 10 min. w temperaturze pokojowej chroniąc od światła. Pomiary każdej próbki wykonano w trzech powtórzeniach. Stężenie tlenku azotu (μ M) określano mierząc absorbancję badanych

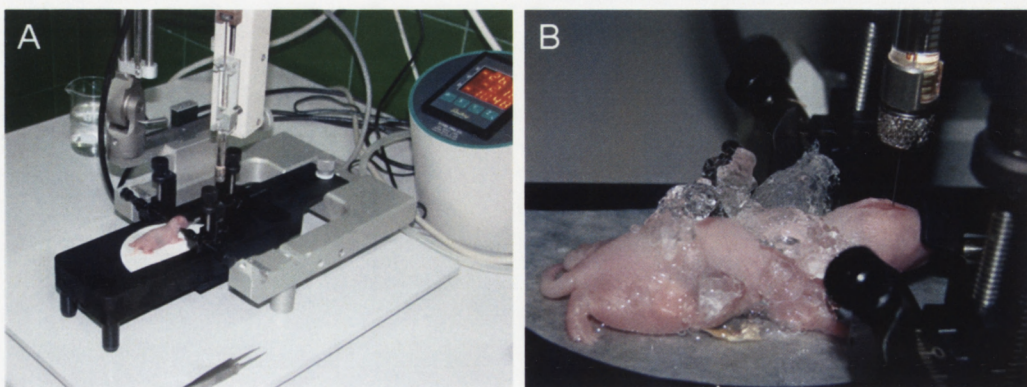
próbek przy długości fali $\lambda = 595\text{nm}$, przy użyciu spektrofotometru (Ultrospec 2100pro, Amersham).

IV.13. Przygotowanie komórek HUCB-NSC do procedury przeszczepiania

Hodowlę HUCB-NSC prowadzono w butelkach 25cm^2 w gęstości 5×10^4 komórek/ cm^2 w pożywce DMEM/F12+ITS+2%FBS+B27 w warunkach standardowych. Dwa dni przed transplantacją usuwano komórki pływające w toni, a do pozostających w butelce komórek adherentnych dodawano świeżą pożywkę DMEM/F12+ITS+2%FBS+B27. Po 24 godzinach hodowli, jeden dzień przed transplantacją komórki HUCB-NSC przenoszono do pożywki NB+B27+AAS. Do przeszczepu używano całej populacji komórek HUCB-NSC, zarówno adherentnych jak i pływających w toni. W dniu transplantacji komórki HUCB-NSC zbierano do 15-ml próbówki i zawieszano w $400\mu\text{l}$ pożywki DMEM/F12+ITS+2%FBS+B27. Komórki inkubowano w temp 37°C przez 30 min z 10mM barwnikiem przyżyciowym 5-chlorometyl-fluorescein-diacetate (CMFDA) rozpuszczonym w DMSO. HUCB-NSC wyznakowane CMFDA dwukrotnie przepłukiwano pożywką DMEM/F12+ITS+2%FBS+B27 w celu odplukania nadmiaru barwnika i DMSO, liczone w mikroskopie fluorescencyjnym Axiovert 25 i podawano w stężeniu $2 \times 10^4/2\mu\text{l}$ do strefy SVZ mózgów noworodków szczura (P0).

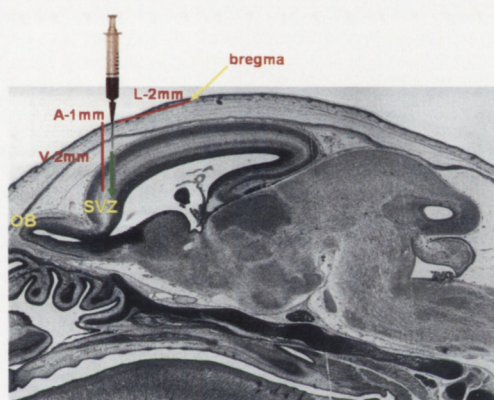
IV.14. Przeszczepienie HUCB-NSC do strefy okołokomorowej (SVZ) osesków szczura

W doświadczeniach użyto nowonarodzonych osesków szczurów szczepu Wistar (P0), które poddano głębokiej hipotermii, umieszczając zwierzęta na lodzie na 5 minut, a następnie przenosząc je do aparatu stereotaktycznego, wyposażonego w adapter dla małych gryzoni (Ryc.9).



Ryc.9 Zdjęcia przedstawiają oseski szczura umieszczone w aparacie stereotaktycznym, wyposażonym w adapter dla małych gryzoni (A). Podczas doświadczenia zwierzęta były podtrzymywane w głębokiej hipotermii przez obłożenie lodem (B).

Po nacięciu skóry głowy zwierzętom odstawiano kości czaszki, za pomocą igły iniekcyjnej 0,6 mm, wykonywano niewielki otwór po prawej stronie czaszki stosując odpowiednie koordynaty stereotaktyczne: A-1,0 i L-2,0. Punktami odniesienia w płaszczyźnie horyzontalnej były bregma i lambda. Przez otwór, wprowadzano igłę Hamiltona o długości 15mm (Gauge 33), osadzoną na 5 μ l strzykawce, na głębokość około 2mm (licząc od opony V-1,7-2) (Ryc.10). Zawiesinę 2x10⁴ komórek HUCB-NSC wyznakowanych CMFDA w objętości 2 μ l podawano do strefy okołokomorowej (SVZ), z prędkością 0,2 μ l/min., przy użyciu pompy mikroinfuzyjnej (Ryc.9). Po podaniu komórek i zszyciu skóry głowy oseskom szczura za pomocą igły tnącej o długości 12 mm, grubości $\frac{3}{8}$ koła i długości nici 6.0, przywracano prawidłową temperaturę ciała i ponownie umieszczano przy matce, gdzie przebywały do chwili zakończenia doświadczenia (1-28 dni).



Ryc.10 Schemat przedstawia koordynaty stereotaktyczne stosowane w procedurze przeszczepiania HUCB-NSC do strefy SVZ noworodka szczura.

IV.15. Pobieranie mózgów od szczurów po przeszczepie komórek HUCB-NSC

Zwierzęta z wszczepionymi komórkami HUCB-NSC wyznakowanymi CMFDA, usypiano na lodzie, dekapitowano i izolowano mózgi, które w dalszych etapach poddawano standardowej obróbce stosowanej w histologii i immunohistochemii. W tym celu mózgi szczurów utrwalano w 4% roztworze PFA w PBS (pH=7,4), w temperaturze 4°C przez 2 godziny, a następnie poddawano krioprotekcji w obecności 20% sacharozy (ICN Biomedicals) w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Tak przygotowane mózgi szczurów, zamrażano w suchym lodzie, owijano w folię aluminiową i przechowywano w temperaturze -70°C do momentu krojenia preparatów w kriostacie. Część mózgów bezpośrednio po wypreparowaniu, zamrożono jak wyżej (wg danych literaturowych polepsza to warunki immunoreakcji z wszczepionymi komórkami), z pominięciem utrwalania w PFA oraz krioprotekcji w sacharozie. Zamrożone mózgi zwierząt przenoszono do kriostatu, ogrzane do temperatury -20°C, krojono w płaszczyźnie strzałkowej lub czołowej uzyskując skrawki o

grubości 20 μm , które nanoszono na szkiełka podstawowe. Po wysuszeniu skrawki mózgu oceniano stosując metody histologiczne i immunohistochemiczne.

IV.16. Badania immunohistochemiczne

W celu identyfikacji i określenia fenotypu wszczepionych do mózgu osesków szczura komórek HUCB-NSC, a także prześledzenia ich migracji wykonano szereg reakcji immunohistochemicznych z wykorzystaniem panelu przeciwciał mono- i poliklonalnych. Jako znaczniki komórek ludzkich zastosowano specyficzne gatunkowo przeciwciała skierowane przeciwko białkom jądrowym (NuMA i HuNu). Niedojrzałe prekursorzy neuralne oceniano przy pomocy przeciwciała anty-Nestyna. Identyfikację zróżnicowanych przeszczepionych komórek neuralnych w mózgu szczura przeprowadzono stosując przeciwciała rozpoznające markery komórek neuronalnych (NF-200, TUJ-1, MAP-2), astrocytów (GFAP, S100 β), oligodendrocytów (O4, NG-2). Komórki proliferujące znakowano przeciwciałem Ki67 – markerem komórek aktywnych mitotycznie. Przed inkubacją z przeciwciałem pierwszorzędowym, zablokowano wiązania nieswoiste na komórkach i permeabilizowano błony komórkowe, używając mieszaniny 10% surowicy krwi kozy (Gibco) w 0,25% Triton X-100 (Sigma) w temperaturze 20°C przez 15 minut. Z poszczególnymi przeciwciałami monoklonalnymi (Tabela 1), skrawki mózgu inkubowano w temperaturze 4°C przez noc, z przeciwciałami poliklonalnymi w temperaturze 20°C przez 60 minut. Przeciwciała były przygotowane w opisanej powyżej mieszaninie blokującej. Wizualizację reakcji barwnej uzyskano stosując odpowiednie przeciwciała drugorzędowe, skoniugowane z fluorochromami, inkubując skrawki mózgu w temperaturze 20°C przez 60 minut, w ciemności (Tabela 2). Po odplukaniu przeciwciała II-rzędowego, wybarwiono jądra komórkowe, stosując 5 μM roztwór barwnika Hoechst 33258 (Sigma) w PBS (pH=7,4), w temperaturze 20°C przez 20 minut. Wybarwione preparaty skrawków mózgu zamykano przy użyciu odczynnika Fluoromount-G (Southern Biotechnology).

Reakcje kontrolne wykonano z pominięciem przeciwciała I-rzędowego, aby sprawdzić specyficzność przeprowadzonych reakcji barwnych.

IV.17. Wizualizacja mikroskopowa

Wyniki uzyskane w badaniach immunocytochemicznych oceniano w mikroskopie fluorescencyjnym Axiovert 25 (Carl Zeiss), poprzez wzbudzenie fluorescencji systemem filtrów, odcinających wybrane spektrum długości fali. Obraz rejestrowano przy użyciu kamer cyfrowych AxioCam MRm (Carl Zeiss), AxioCam MRc5 (Carl Zeiss) i kamery Videotronic

CCD4230 (SONY). Analizy zdjęć dokonano, używając analizatorów obrazu KS 300, KS RUN (Carl Zeiss) i Axiovision v. 4.5.

Wyniki badań immunohistochemicznych analizowano również w mikroskopie konfokalnym Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss), wyposażonym w lasery. Helowo-neonowy laser (546nm) posłużył do wzbudzenia TxRd, Alexa Fluor 546 i Cy3, natomiast laser argonowy (488nm) do wzbudzenia zielonego barwnika przyżyciowego CMFDA, którym znakowane były komórki HUCB-NSC, FITC, Alexa Fluor 488 i Cy2. Po rejestracji obrazu analizowano w mikroskopie konfokalnym z oprogramowaniem Zeiss LSM 510 v. 3.2. Kontrast i nasycenie barw oraz kadrowanie zdjęć przeprowadzono w programie Corel Draw v.1.1.

IV.18. Analiza statystyczna

Wśród 200 komórek żywych (barwiących się Hoechst 33258), zliczano w każdym dołku komórki prezentujące dany antygen. Jednorodność wyników w obrębie każdej trójki dołków została sprawdzona za pomocą testu chi-kwadrat (Zar 1999). Znaczne niejednorodności, (czyli duże różnice frakcji analizowanych komórek pomiędzy dołkami w obrębie trójki) wynikające zapewne z niedoskonałości procedury laboratoryjnej spowodowały konieczność eliminacji trójek dołków ze zbioru danych. Jako kryterium przyjęto w tym przypadku p -wartość w teście chi-kwadrat niższą niż 0.01 (zaakceptowane przypadki wykazywały wartość statystyki V Cramera zwykle poniżej 0.1). Po wyeliminowaniu przypadków niejednorodnych dla poszczególnych kombinacji doświadczalnych pozostało do dalszej analizy od 3 do 10 replikacji (Tabela 3).

Używając danych połączonych z trójek dołków sprawdzono z kolei niejednorodności pomiędzy poszczególnymi doświadczeniami. W wielu przypadkach okazały się one znaczne (zapewne ze względu na rozciągłość czasową całego doświadczenia i zmienność materiału), co wykluczało połączenie zliczeń ze wszystkich replikacji. W związku z tym każda replikacja kombinacji podłoże-marker dostarczyła jednego wyniku: procentu różnicowania dla wszystkich komórek w trzech dołkach. Ostateczna liczebność analizowanej próby była, więc równa liczbie replikacji, które pozostały po wyeliminowaniu niejednorodnych trójek dołków.

Efekt podłoża, jako średni procent różnicowania na danym podłożu, w porównaniu ze średnim procentem różnicowania w odpowiednich hodowlach kontrolnych, wyrażono ilościowo na dwa sposoby:

(1) Do celów prezentacji graficznej – jako przedział ufności dla odpowiedniej różnicy średnich procentów. Przyjęto współczynnik ufności $1-\alpha=0.95$. Przedziały ufności dla różnicy procentów znaleziono metodą Satterthwaite'a (Zar, 1999; SAS Institute Inc., 2007). Uzyskane wyniki porównano z przedziałami wyliczonymi metodami Dunnetta i Studenta (Proc ANOVA i TTEST; SAS Institute Inc., 2007); otrzymany obraz był bardzo podobny.

Przy różnicy średnich z prób wyliczonej jako d , przedział ufności dla różnicy średnich ma postać $(d-h, d+h)$, gdzie h oznacza połowę długości przedziału. Na wykresie słupkowym porównującym średnią doświadczalną i średnią kontrolną, przedłużenie krótszego ze słupków o h może prowadzić do jednej z dwu sytuacji: (i) po przedłużeniu słupek pozostaje krótszy – oznacza to wynik istotny na poziomie $\alpha=0.05$, a pozostała różnica wysokości odzwierciedla najmniejszą prawdopodobną różnicę średnich; (ii) po przedłużeniu słupek staje się dłuższy – oznacza to wynik nieistotny, nie jest możliwe określenie rzeczywistego kierunku różnicy średnich.

(2) Wobec znacznej rozpiętości procentów różnicowania w poszczególnych przypadkach właściwszą miarą efektu podłoża jest stosunek szans (ang. *odds ratio*, *OR*; Agresti 1990) różnicowania na podłożu i w warunkach kontrolnych. Wyliczono go jako $\frac{\bar{p}_D(1-\bar{p}_K)}{\bar{p}_K(1-\bar{p}_D)}$, gdzie \bar{p}_D i \bar{p}_K oznaczają odpowiednio średnie procenty w grupie doświadczalnej i kontrolnej. Przybliżone przedziały ufności dla *OR* znaleziono za pomocą percentylowej metody *bootstrap* (Manny, 1997). Rezultaty otrzymywane tą metodą bywają niepoprawne, zwłaszcza dla małych prób (Roff, 2006). Jej zachowanie w przypadku scenariuszy zbliżonych do występujących w analizowanym doświadczeniu zbadano, więc w osobnym studium Monte Carlo (Wyszomirski, niepubl.). Stwierdzono, że przy nominalnym poziomie ufności 99% rzeczywisty poziom ufności wynosi ok. 95%; dzięki temu możliwe było uzyskanie 95-procentowych przedziałów ufności dla *OR*.

Tam, gdzie to było możliwe (nie występowały wyraźne niejednorodności pomiędzy replikacjami), połączono dane z poszczególnych replikacji i wyznaczono przedziały ufności tradycyjną metodą (Agresti 1990; Proc FREQ, SAS Institute Inc. 2007). Otrzymane wyniki (nie zamieszczone w pracy) były bardzo zbliżone do uzyskanych metodą *bootstrap*.

Przeprowadzono dodatkowo analizę względnych tendencji komórek do różnicowania się w różnych kierunkach pod wpływem poszczególnych warunków. Gdy wpływ określonego podłoża (ew. podłoża + stymulatora) na różnicowanie się w kierunku *A* określony jest przez OR_A , zaś w kierunku *B* przez OR_B , stosunek OR_A/OR_B wyraża względną przewagę kierunku *A* nad kierunkiem *B*, niezależnie od bezwzględnych wartości *OR*, które mogą być małe lub duże. Dla uzyskania symetrycznej skali użyto logarytmów (dziesiętnych) takich stosunków *OR*, co jest równoważne wyliczeniu $\log(OR_A)-\log(OR_B)$. Wartości dodatnie wskazują na przewagę różnicowania w kierunku markera *A*, wartości ujemne – w kierunku markera *B*.

Dla znalezienia przedziałów ufności dla logarytmu stosunków *OR* również zastosowano percentylową metodę *bootstrap* (Manly 1997). Przyjęto nominalny współczynnik ufności 99%. Analogiczne do wyżej wspomnianego, studium Monte Carlo pokazało, że odpowiada mu rzeczywisty współczynnik ufności ok. 95%, toteż uzyskane przedziały określone są jako 95-procentowe.

TABELA 1. Przeciwciała pierwszorzędowe używane w badaniach immunocytochemicznych

PRZECIWCIAŁO GOSPODARZ	IZOTYP ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT NR KAT.
Monoklonalne anty- NuMa (Ab-2) (Mysz)	IgG1 1:50	Oncogene Nr kat.: NA09L
Monoklonalne anty- Human Nuclei (Mysz)	IgG1 1:20	Chemikon Nr kat.: MAB 1281
Monoklonalne anty- Human Mitochondria (Mysz)	IgG1 1:30	Santa Cruz Nr kat.: Sc-1187
Monoklonalne anty- Nestyna (Mysz)	IgG1 1:100	R&D Systems Nr kat.: MAB1259
Monoklonalne anty- NF200 (Mysz)	IgG1 1:400	Sigma Nr kat.: NO142
Monoklonalne anty- β-Tubulina III (TUJ1) (Mysz)	IgG2a 1:500	Covance Nr kat.: MMS-435P
Monoklonalne anty- MAP-2 (Mysz)	IgG1 1:1000	Sigma Nr kat.: M4403
Poliklonalne anty- GFAP (Królik)	IgG (H+L) 1:50	Cappel Nr kat.: 10555
Poliklonalne anty- S100β (Królik)	IgG (H+L) 1:1000	Swant Nr kat.: 37
Monoklonalne anty- O4 (Mysz)	IgM 1:20	Sigma Nr kat.: O7139
Monoklonalne anty- Ki67 (Mysz)	IgG1 1:100	Novacastra Nr kat.: NCL-L-Ki67-MMI
Poliklonalne anty- vWF (Królik)	IgG (H+L) 1:200	Sigma Nr kat.: F-3520
Monoklonalne anty- ED1 (Mysz)	IgG1 1:100	AbD Serotec Nr kat.: MCA 341R
Poliklonalne anty- Fibronektyna (Królik)	IgG (H+L) 1:100	DAKO Nr kat.: 117

TABELA 2. Przeciwciała drugorzędowe wykorzystane w badaniach immunocytochemicznych

PRZECIWCIAŁO GOSPODARZ	FLUOROCHROM	IZOTYP ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT NR KAT.
Kozie anty-Królicze	FITC	IgG (H+L) 1:100	Jackson ImmunoResearch Nr kat.: 111-095- 144
Kozie anty-Mysie	FITC	IgG1(γ1) 1:300	Southern Biotechnology Nr kat.: 1070-02
Alexa Fluor Kozie anty-Mysie	Alexa 488	IgG (H+L) 1:100	Molecular Probes Nr kat.: MOPA- 11001
Alexa Fluor Kozie anty-Królicze	Alexa 546	IgG (H+L) 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-11035
Alexa Fluor Kozie anty-Mysie	Alexa 546	IgG1 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-21123
Alexa Fluor Kozie anty-Mysie	Alexa 546	IgG2a (γ2a) 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-21133
Alexa Fluor Kozie anty-Mysie	Alexa 546	IgM 1:500	Molecular Probes Nr kat.: A-21045
Kozie anty-Królicze	Cy2	IgG (H+L) 1:100	Jackson ImmunoResearch Nr kat.: 111-225- 144
Kozie anty-Królicze	Cy3	IgG (H+L) 1:800	Jackson ImmunoResearch Nr kat.: 111-165- 045
Kozie anty-Mysie	TXRD	IgG1 (γ1) 1:300	Southern Biotechnology Nr kat.: 1070-07
Kozie anty-Mysie	TXRD	IgG2a (γ2a) 1:300	Southern Biotechnology Nr kat.: 1080-07

TABELA 3: Liczba replikacji poszczególnych kombinacji użyta do analiz statystycznych

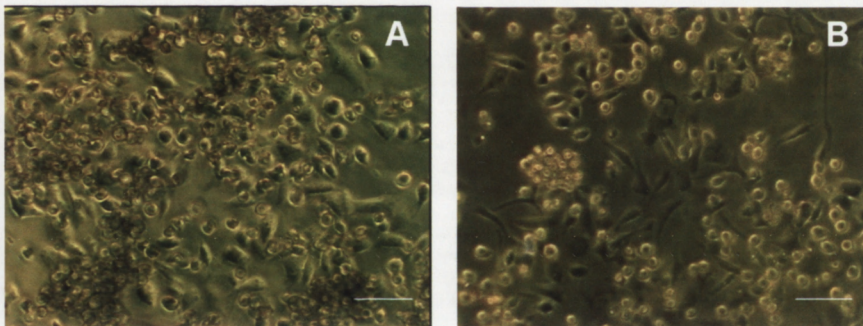
Podłoże	Aktywator	Marker						
		Ki67	Nestyna	NF200	TUJ 1	MAP2	S100β	O4
Astrocyty	brak	5	10	10	9	9	10	10
Astrocyty	LPS	6	6	5	6	6	5	6
Astrocyty	TMT	6	6	6	6	6	6	6
Mikroglej	brak	5	4	3	5	3	3	5
Mikroglej	LPS	5	5	3	5	5	5	5
Mikroglej	TMT	4	4	4	4	4	4	4
Neurony	brak	5	5	5	5	5	5	5
t-End	brak	5	5	5	5	5	4	5
brak	brak	7	7	7	7	7	7	7

V. WYNIKI BADAŃ

V.1 Charakterystyka komórek linii HUCB-NSC hodowanych *in vitro*

V.1.1. Obraz morfologiczny HUCB-NSC

Komórki HUCB-NSC hodowane w pożywce z niską zawartością surowicy (DMEM/F12+2%FBS+ITS+AAS) tworzą heterogenną populację komórek przylegających do podłoża i komórek pływających w toni. Wśród komórek adherentnych obserwuje się komórki o wydłużonym, wrzecionowatym kształcie z krótkimi wypustkami umieszczonymi dwubiegunowo. Natomiast komórki nieprzylegające mają kształt okrągły, występują pojedynczo bądź w postaci agregatów pływających w toni lub luźno osiadłych na komórkach adherentnych (Ryc.11).



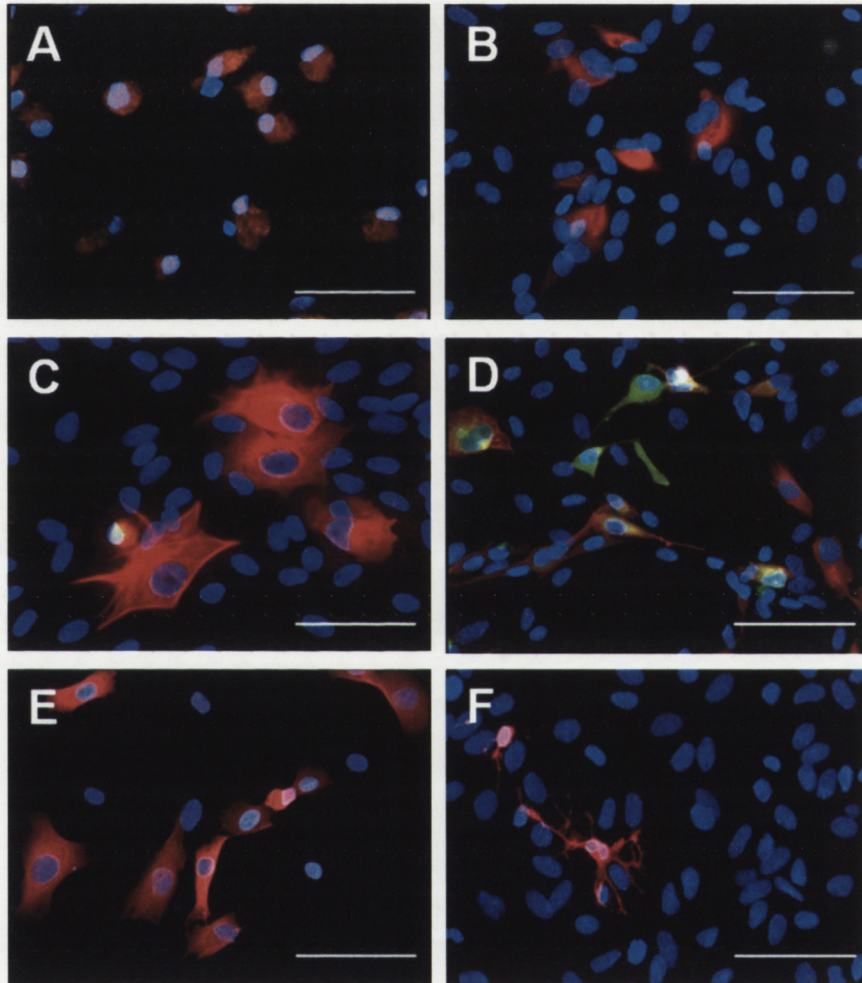
Ryc.11 Komórki HUCB-NSC hodowane *in vitro* (DMEM/F12+2%FBS+ITS+AAS). Heterogenna populacja komórek przyklejonych do podłoża oraz pływających w toni pojedynczo lub w postaci agregatów. Obraz w mikroskopie świetlnym w świetle przechodzącym. Skala 50 μm .

Zastosowane do badań komórki HUCB-NSC ustalonej linii zostały dokładnie scharakteryzowana pod względem molekularnym w poprzednich badaniach naszego zespołu (Jurga i wsp., 2006).

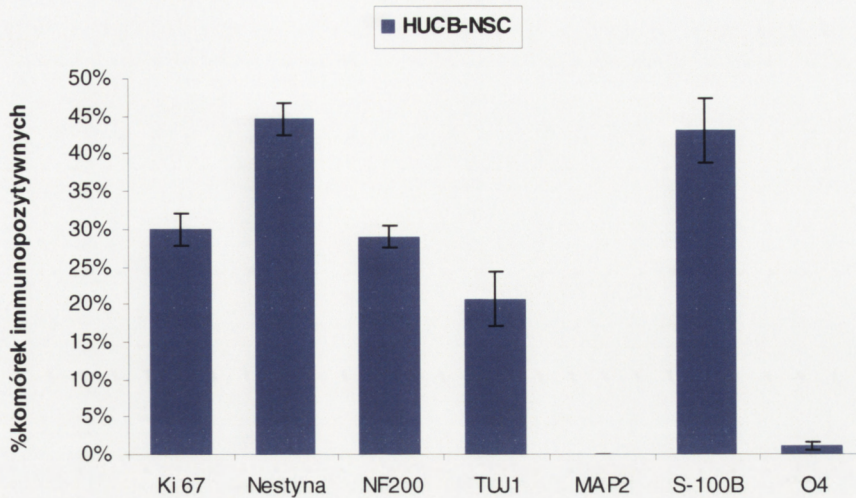
V.1.2. Obecność poszczególnych fenotypów neuralnych w pełnej populacji HUCB-NSC

Komórki HUCB-NSC, hodowane w pożywce DMEM/F12+2%FBS+ITS+AAS, wykazują obecność wczesnych i późnych białek, charakterystycznych dla komórek neuralnych. Badania immunocytochemiczne HUCB-NSC ujawniły obecność Nestyny – filamentu pośredniego charakterystycznego dla neuralnych komórek progenitorowych w $44.6 \pm 2.1\%$ komórek. Procent HUCB-NSC wykazujących markery charakterystyczne dla

neuronów (NF200 i β Tubulina III –TUJ1) wynosił odpowiednio $29 \pm 1.5\%$ i $20 \pm 3.6\%$. W niektórych komórkach widoczna była koekspresja neurofilamentów: NF200 i β Tubuliny III. Nie stwierdzono komórek MAP2-pozytywnych, zawierających białko, które podlega ekspresji w dojrzałych neuronach. Markery typowe dla zaawansowanych w różnicowaniu astrocytach (S100 β) i oligodendrocytach (O4) obserwowano odpowiednio w $43 \pm 4.3\%$ i w $1 \pm 0,5\%$ komórek (Ryc.12,13).



Ryc.12 Analiza immunocytochemiczna komórek HUCB-NSC wykazała obecność białek: Nestyny (kolor czerwony) (A); NF200 (kolor czerwony) (B); TUJ1(kolor czerwony) (C); NF200 (kolor zielony) i TUJ1 (kolor czerwony) (D); S100 β (kolor czerwony) (E); O4 (kolor czerwony) (F). Jądra komórkowe wybarwiono barwnikiem Hoechst (kolor niebieski). Obraz widoczny w mikroskopie konfokalnym. Skala 50 μ m.



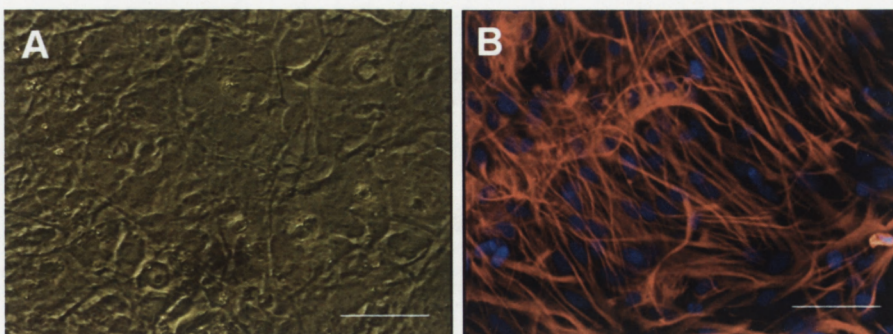
Ryc.13 Wykres przedstawia procentowy udział komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w połączonych frakcjach komórek pływających i przylegających do podłoża. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie \pm SD, n=5.

Proliferację, ocenianą liczbą komórek wykazujących obecność Ki67 – białka obecnego w jądrach komórek aktywnych mitotycznie stwierdzono w $30 \pm 2.2\%$ HUCB-NSC. Powyższe wyniki przedstawiają procentowy udział komórek w pełnej populacji HUCB-NSC. Taka populacja komórek była używana do wszystkich doświadczeń w tej pracy.

V.2. Współhodowle HUCB-NSC i astrocytów izolowanych z mózgu oseków szczura

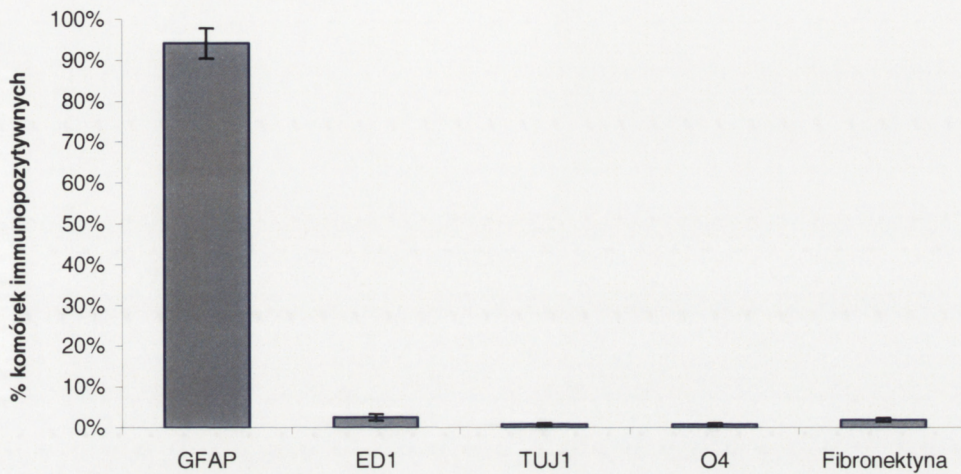
V.2.1. Morfologiczna i fenotypowa charakterystyka hodowli astrocytów mózgu szczura

Opracowana przez nas metoda izolacji i hodowli astrocytów izolowanych z mózgu oseków szczura pozwoliła na powtarzalne otrzymywanie populacji komórek wzbogaconej w astrocyty. Izolowane z różnych rejonów mózgu oseków szczura astrocyty, hodowane w tych samych warunkach, nie różniły się od siebie pod względem morfologicznym, przybierając wydłużony kształt z licznymi rozgałęzionymi wypustkami (Ryc.14A,B).

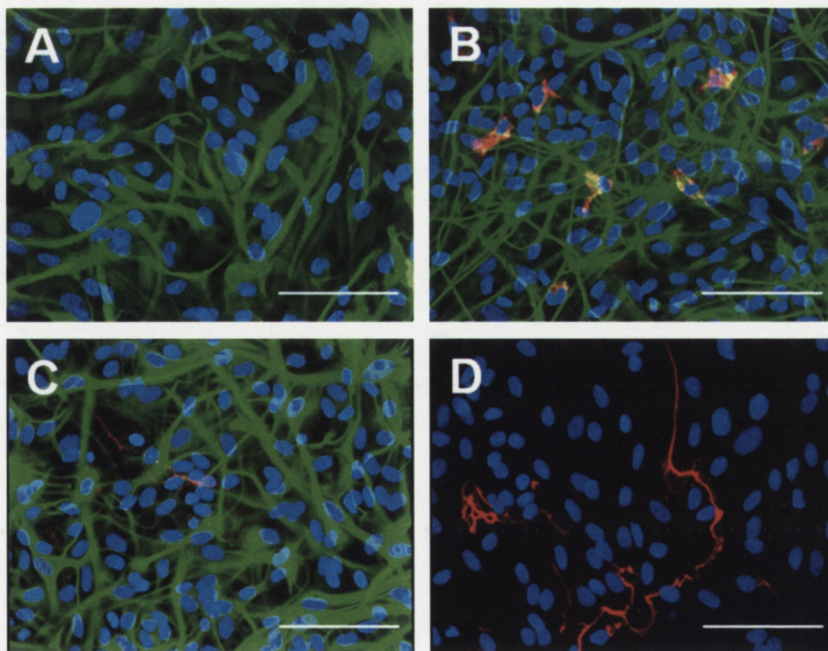


Ryc.14 Astrocyty izolowane z mózgu oseków szczura hodowane przez 7 dni w warunkach *in vitro*. Obraz w mikroskopie świetlnym w świetle przechodzącym (A) i mikroskopie fluorescencyjnym po reakcji immunocytochemicznej z użyciem przeciwciała anti-GFAP (B) (kolor czerwony). Na niebiesko wybarwione jądra komórek (Hoechst). Skala 50 μ m.

Wśród populacji komórek, izolowanych z mózgu oseków szczura, wzbogaconych w astrocyty 94.1 ± 3.7% stanowiły komórki GFAP⁺. Udział pozostałych typów komórek był niewielki i wynosił: 2.5 ± 0.7% ED1⁺; 0.7 ± 0.3% TUJ1⁺; 0.7 ± 0.4% O4⁺ oraz 1.9 ± 0.4% fibroblastów (Ryc.15, 16).



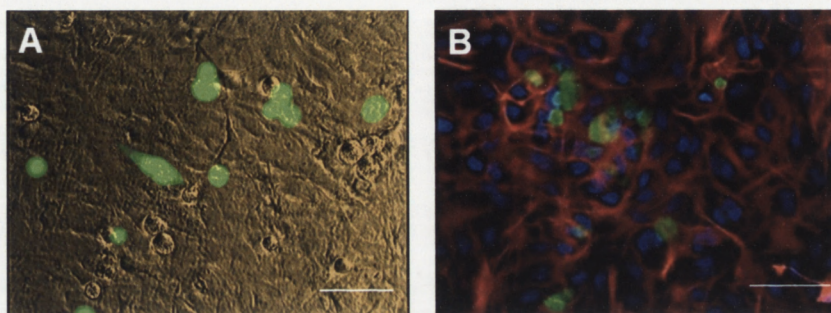
Ryc.15 Wykres przedstawia procentowy udział poszczególnych typów komórek w populacji izolowanej z mózgu oseków szczura wzbogaconej w astrocyty. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie ±SD, n=10.



Ryc.16 Analiza immunocytochemiczna poszczególnych typów komórek mózgu oseków szczura w hodowli wzbogaconej w astrocyty, wykazujących obecność białek: GFAP (A-C) (kolor zielony); ED1 (B), (kolor czerwony); TUJ1 (C), (kolor czerwony); fibronektyna (D) (kolor czerwony). Jądra komórek wybarwiono barwnikiem Hoechst (kolor niebieski). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym. Skala 50 µm.

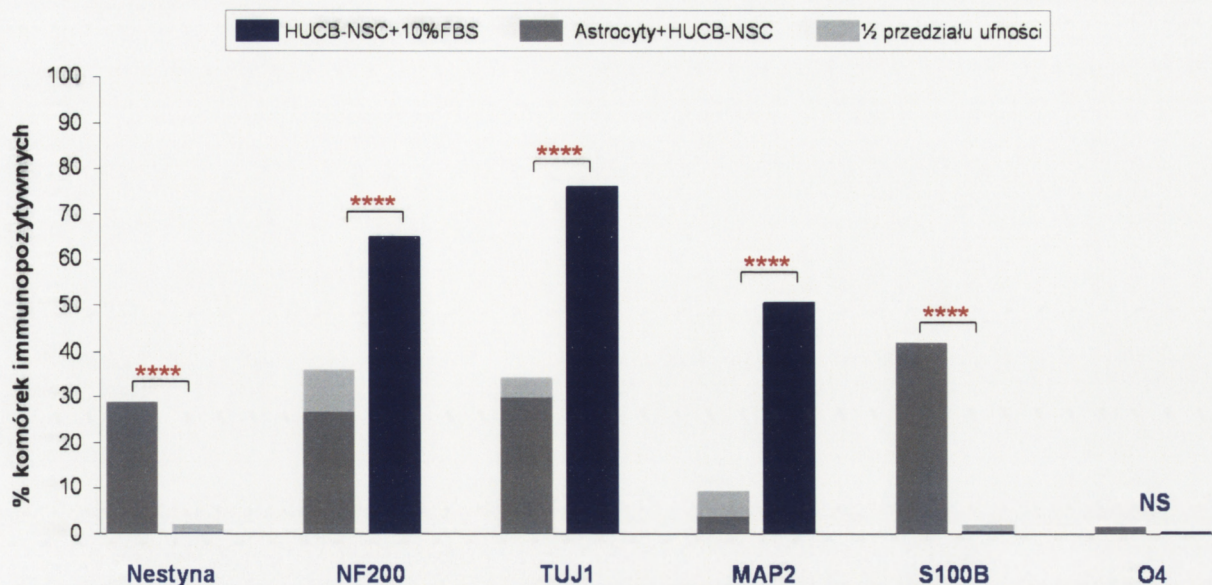
V.2.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności astrocytów izolowanych z mózgu osesków szczura

Komórki HUCB-NSC znakowane barwnikiem CMFDA po wysianiu na astrocyty przyklejały się do podłoża astrocytów. Po 24 godzinach współhodowli niektóre z nich przybierały wrzecionowaty kształt i zaczynały wytwarzać krótkie, pojedyncze wypustki. Po 7 dniach większość HUCB-NSC wykazywała cechy morfologiczne komórek zróżnicowanych neuralnie (Ryc.17).

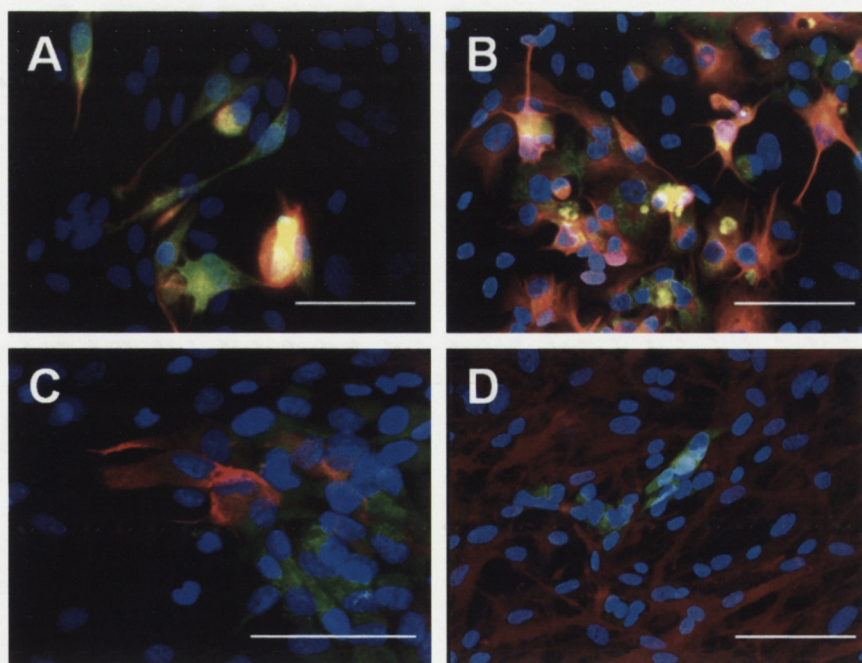


Ryc.17 Współhodowla komórek HUCB-NSC i astrocytów. Obraz w mikroskopie świetlnym w świetle przechodzącym po 24 godz (**A**) i w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna komórek po zastosowaniu przeciwciała anti-GFAP (**B**). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony), astrocyty GFAP⁺ (kolor czerwony). Jądra komórek (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μ m.

Obecność astrocytów izolowanych z mózgu osesków szczura przyspieszała różnicowanie HUCB-NSC w kierunku neuronalnym podczas 7-dniowej współhodowli. Procent HUCB-NSC wykazujących obecność Nestyny obniżał się po 7 dniach współhodowli z astrocytami w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi w medium (DMEM+10%FBS) bez obecności astrocytów, które stanowiły kontrolę. Wśród komórek HUCB-NSC hodowanych na podłożu astrocytów zaobserwowano wzrost liczby komórek NF200⁺, TUJ1⁺ i MAP2⁺, w stosunku do wartości kontrolnych. Jednocześnie wykazano mniej komórek S100 β ⁺ wśród HUCB-NSC współhodowanych z astrocytami w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi w medium bez obecności astrocytów. Nie stwierdzono różnic mających znamienność statystyczną w procentowym udziale komórek O4⁺ pomiędzy HUCB-NSC w obecności lub bez astrocytów. Różnicowanie w kierunku oligodendrocytów było na bardzo niskim poziomie (Ryc.18,19).



Ryc.18 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w przypadku hodowli w obecności astrocytów mózgu szczura (granatowe słupki, n=5) i w medium (kontrola, ciemnoszare słupki, n=7). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. ****: $p < 0.0001$, NS: brak istotności statystycznej.



Ryc.19 Wspóhodowla komórek HUCB-NSC i astrocytów. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna po zastosowaniu przeciwciała anti-NF200 (A) (kolor czerwony); anti-TUJ1 (B) (kolor czerwony); anti-MAP2 (C) (kolor czerwony); anti-S100B (D) (kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (A-D) (kolor zielony) z kolokalizacją poszczególnych białek neuralnych (kolor żółty). Jądra komórek (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μm .

Jednocześnie wykonano analizę mającą na celu określenie statystycznie względnych skłonności komórek HUCB-NSC, hodowanych w obecności astrocytów, do różnicowania w określony typ komórek neuralnych. Różnicowanie komórek HUCB-NSC we współhodowli z astrocytami izolowanymi z mózgu oseków szczura wykazało wyraźną przewagę neurogenezy nad astrogenezą. Podłoże astrocytów promowało ścieżkę różnicowania komórek HUCB-NSC w neurony z ekspresją markerów NF200, TUJ1 i MAP2 znacznie silniej niż różnicowanie w astrocyty z ekspresją S100 β , czy proliferację (Ki67) (Tabela 4).

TABELA 4. Względne skłonności komórek do różnicowania się w różnych kierunkach na podłożu astrocytów. Stosunki $ORR=OR(\text{marker1}):OR(\text{marker2})$ i ich logarytmy (lgORR) oraz odpowiednie 95% przedziały ufności liczone bootstrapem percentylowym. Dodatkowo wartości logarytmu OR wskazują na przewagę różnicowania w kierunku pierwszego markera, wartości ujemne – w kierunku drugiego, co dodatkowo zaznaczono zielonym wyróżnieniem. LCL, UCL – odpowiednio dolna i górna granica przedziału ufności.

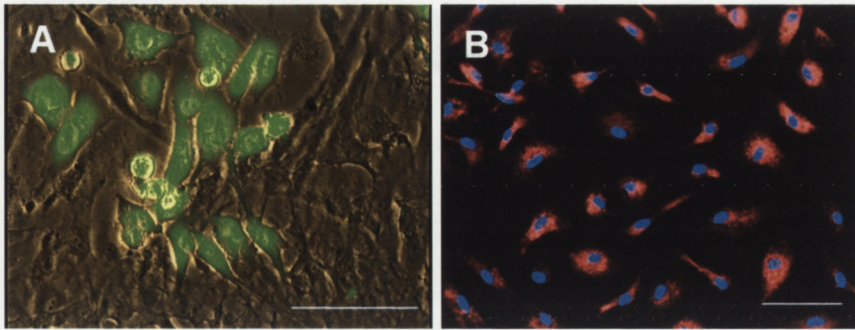
podłoże	marker1	marker2	ORR_LCL	ORR	ORR_UCL	lgORR_LCL	lgORR	lgORR_UCL
Astro	TUJ1	S100B	387.4073	574.5242	959.9822	2.5882	2.7593	2.9823
Astro	MAP2	S100B	1314.1807	1938.9962	3242.9362	3.1187	3.2876	3.5109
Astro	NF200	S100B	231.6026	395.5764	746.7373	2.3647	2.5972	2.8732
Astro	Nestyna	S100B	0.3451	1.0960	2.5411	-0.4620	0.0398	0.4050
Astro	Ki67	S100B	78.0423	108.3582	174.0451	1.8923	2.0349	2.2407
Astro	Ki67	TUJ1	0.1461	0.1886	0.2457	-0.8354	-0.7244	-0.6095
Astro	Ki67	MAP2	0.0429	0.0559	0.0719	-1.3678	-1.2527	-1.1434
Astro	Ki67	NF200	0.1715	0.2739	0.4244	-0.7657	-0.5624	-0.3722
Astro	Ki67	Nestyna	48.2594	98.8668	299.9286	1.6836	1.9951	2.4770
Astro	Nestyna	TUJ1	0.0006	0.0019	0.0040	-3.2122	-2.7195	-2.3943
Astro	NF200	TUJ1	0.4230	0.6885	1.1477	-0.3737	-0.1621	0.0598
Astro	MAP2	TUJ1	2.4368	3.3750	4.7298	0.3868	0.5283	0.6748

V.3. Współhodowle HUCB-NSC i komórek mikrogleju izolowanych z mózgu oseków szczura

V.3.1. Morfologiczna i fenotypowa charakterystyka hodowli komórek mikrogleju mózgu szczura

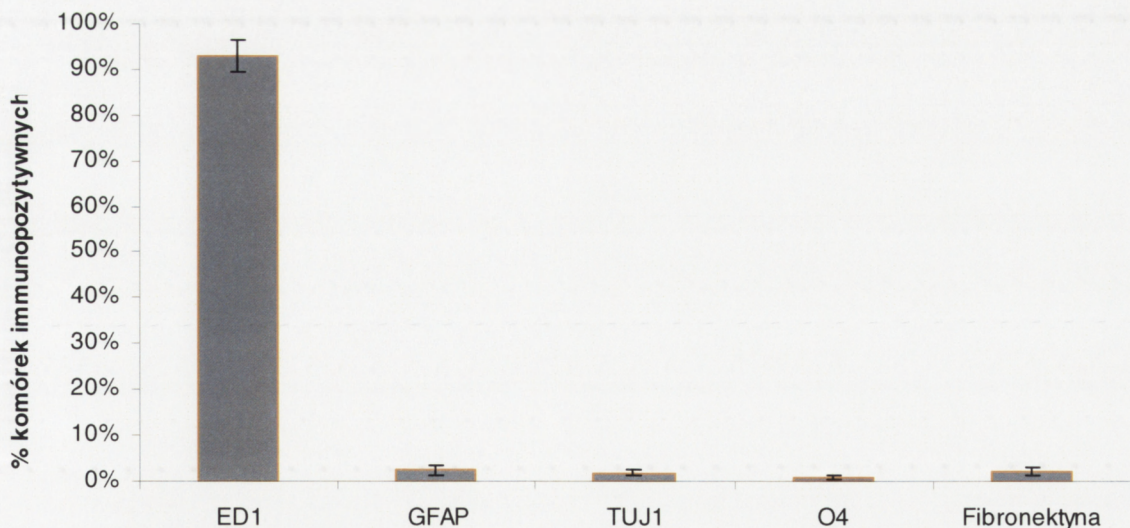
Opisana w rozdziale „Materiał i Metody” procedura izolacji i hodowli komórek mikrogleju mózgu oseków szczura pozwoliła na powtarzalne otrzymywanie populacji komórek wzbogaconej w komórki mikrogleju. Komórki mikrogleju bardzo łatwo przyklejają się do dna szalki. Początkowo komórki mają kulisty kształt, a przylegając do dna szalki przybierają formę wrzecionowatych komórek, wytwarzających wypustki. Utworzona przez 7

dni hodowli warstwa komórek mikrogleju, nie jest tak ścisła jak w przypadku astrocytów (Ryc.20).

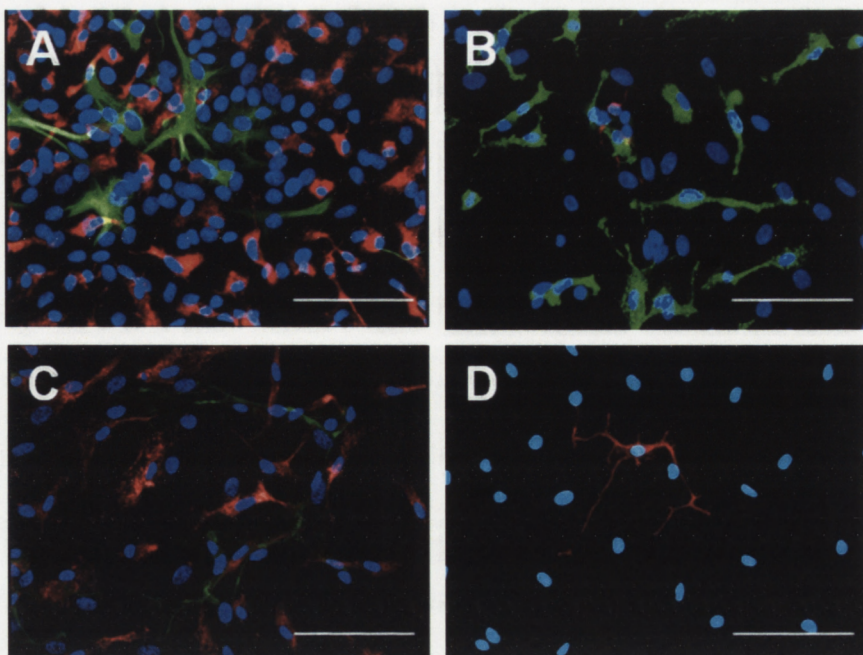


Ryc.20 Komórki mikrogleju izolowane z mózgu osesków szczura hodowane przez 7 dni w warunkach *in vitro*. Obraz w mikroskopie świetlnym w świetle przechodzącym (A) i mikroskopie fluorescencyjnym po reakcji immunocytochemicznej z użyciem przeciwciała anti-ED1 (B) (kolor czerwony). Na niebiesko wybarwione jądra komórek (Hoechst). Skala 50 μm .

W otrzymanej przez nas hodowli komórek izolowanych z mózgu osesków szczura wzbogaconej w komórki mikrogleju $93 \pm 3.6\%$ stanowiły komórki ED1⁺. Ponadto wśród komórek podłoża obserwowano niewielką domieszkę komórek GFAP⁺ ($2.4 \pm 0.9\%$), TUJ1⁺ ($1.9 \pm 0.8\%$), O4⁺ ($0.8 \pm 0.3\%$) oraz fibroblastów ($2.0 \pm 0.8\%$) (Ryc.21, 22).



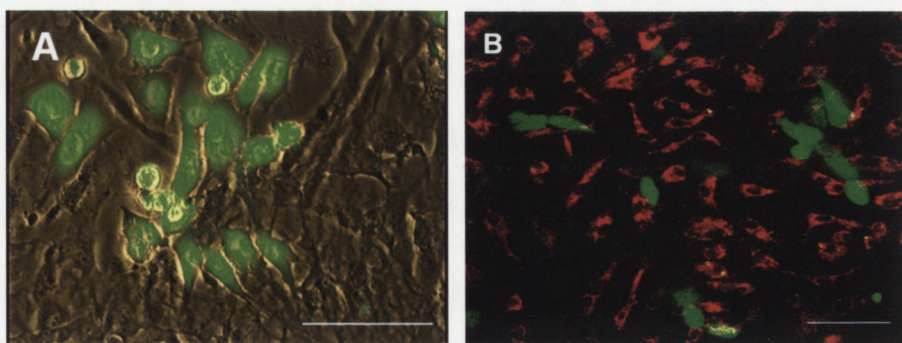
Ryc.21 Wykres przedstawia procentowy udział poszczególnych typów komórek w populacji izolowanej z mózgu osesków szczura wzbogaconej w komórki mikrogleju. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie \pm SD, n=5-8.



Ryc.22 Analiza immunocytochemiczna poszczególnych typów komórek mózgu osesków szczura w hodowli wzbogaconej w komórki mikrogleju, wykazujących obecność białek: ED1 (kolor czerwony) (**A,C**), (kolor zielony) (**B**); GFAP (kolor zielony); (**A**); TUJ1 (**B**) (kolor czerwony); fibronektyny (**C**) (kolor czerwony); O4 (**D**) (kolor czerwony). Jądra komórek wybarwiono barwnikiem Hoechst (kolor niebieski). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym. Skala 50 μm .

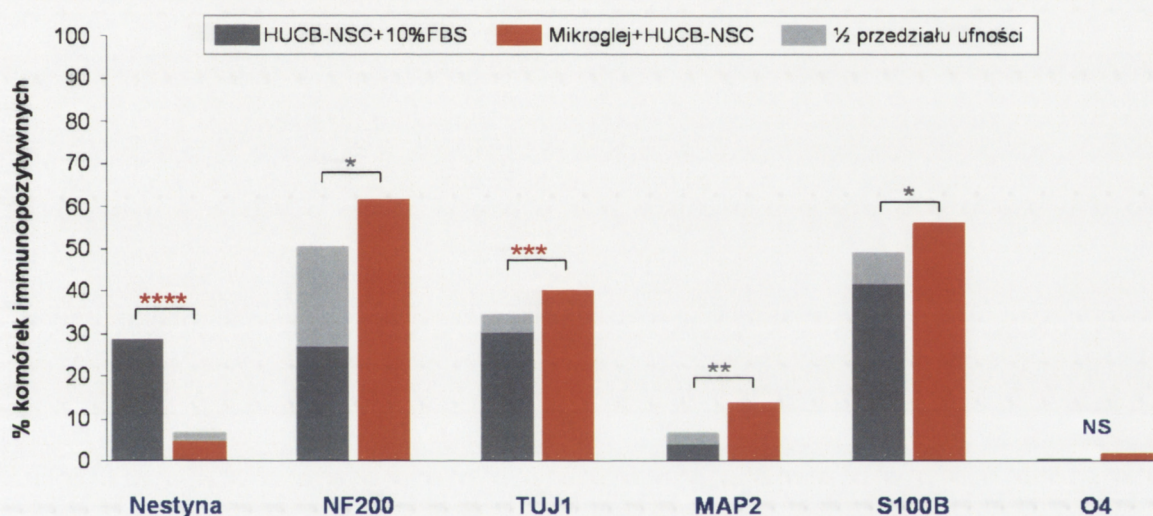
V.3.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności komórek mikrogleju izolowanych z mózgu osesków szczura

Po 7 dniach hodowli komórek mikrogleju wysiewano na nie, wyznakowane zielonym barwnikiem CMFDA komórki HUCB-NSC. Już po 24 godz. współhodowli obserwowano zmiany morfologiczne wśród komórek HUCB-NSC, które przyklejały się do podłoża i zaczynały wytwarzać krótkie wypustki. Po 7 dniach współhodowli, większość komórek HUCB-NSC wykazywała fenotyp komórek zróżnicowanych neuralnie (Ryc.23).

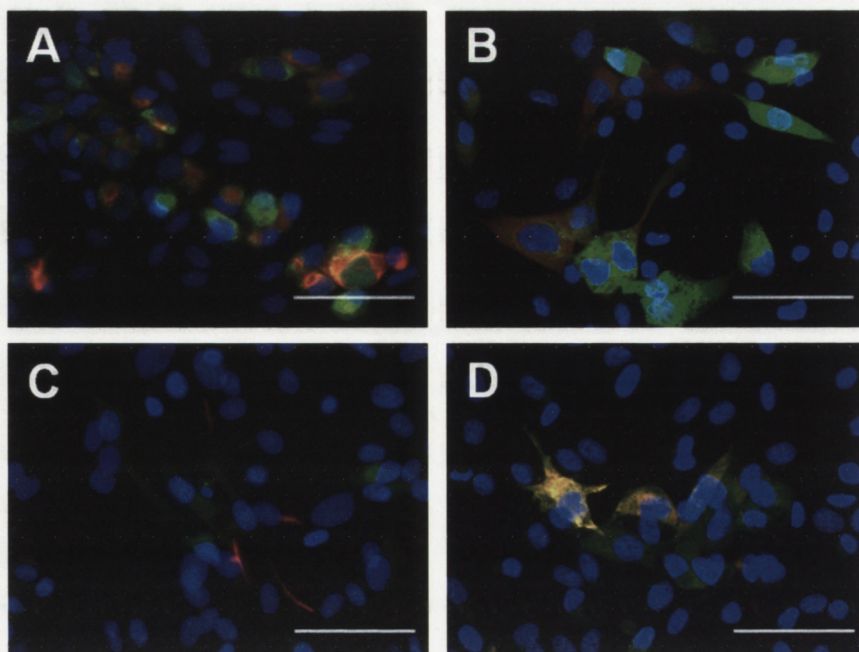


Ryc.23 Współhodowla komórek HUCB-NSC i komórek mikrogleju. Obraz w mikroskopie świetlnym w świetle przechodzącym po 24 godz (**A**) i w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna komórek po zastosowaniu przeciwciała anti-ED1 (**B**). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony), komórki mikrogleju ED1⁺(kolor czerwony). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μm .

Obecność komórek mikrogleju izolowanych z mózgu osesków szczura powodowała przyspieszenie różnicowania HUCB-NSC, co było widoczne poprzez obniżenie się liczby komórek z obecnością Nestyny, w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi w medium (DMEM+10%FBS). Współhodowla HUCB-NSC w obecności komórek mikrogleju spowodowała wzrost liczby komórek NF200⁺, TUJ1⁺, MAP2⁺ i S100β⁺ w stosunku do wartości kontrolnych. Nie zaobserwowano w populacji komórek HUCB-NSC współhodowanych z komórkami mikrogleju, różnic istotnych statystycznie w ilości komórek o charakterze oligodendrocytów z obecnością białka O4 (Ryc.24, 25).



Ryc.24 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w przypadku hodowli w obecności komórek mikrogleju mózgu szczura (pomarańczowe słupki, n=5) i w medium (kontrola, ciemnoszare słupki, n=7). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. *: 0.05>p>0.01, **: 0.01>p>0.001, ***: 0.001>p>0.0001, ****: p<0.0001, NS: brak istotności statystycznej.



Ryc.25 Współhodowla komórek HUCB-NSC i komórek mikrogleju mózgu szczura. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna po zastosowaniu przeciwciała anti-NF200 **(A)** (kolor czerwony); anti-TUJ1 **(B)** (kolor czerwony); anti-MAP2 **(C)** (kolor czerwony); anti-S100 β **(D)** (kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA **(A-D)** (kolor zielony) z kolokalizacją poszczególnych białek neuralnych (kolor żółty). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μ m.

Porównując fenotypy komórek HUCB-NSC hodowanych w obecności komórek mikrogleju izolowanych z mózgu osesków szczura i w warunkach kontrolnych (DMEM+10%FBS), wykazano większą liczbę komórek zróżnicowanych zarówno w kierunku komórek o charakterze neuronalnym z obecnością białek identyfikujących neurony na różnym stopniu zróżnicowania: NF200, TUJ1 i MAP2 oraz komórek o charakterze astrocytów z ekspresją S100 β .

Na podstawie wykonanej analizy zaobserwowano, iż HUCB-NSC hodowane na podłożu komórek mikrogleju, wykazują pewną przewagę skłonności do różnicowania w kierunku neuronalnym (NF200 i MAP2) niż w kierunku astrocytarnym (S100 β). Jednocześnie wykazano większą skłonność komórek HUCB-NSC do różnicowania niż proliferacji (Ki67), czy pozostania na etapie niezróżnicowania (Nestyna) (Tabela 5).

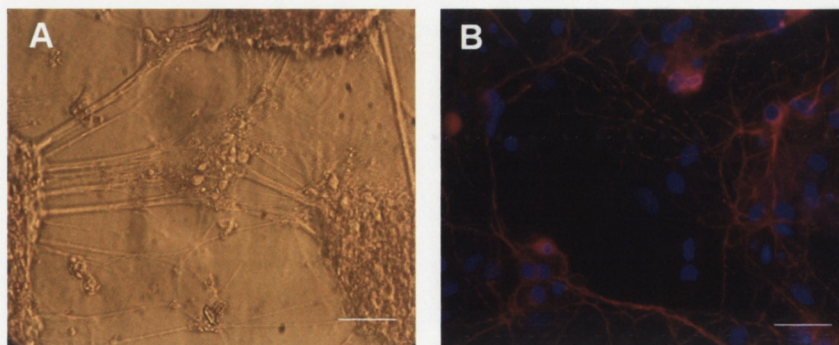
TABELA 5. Względne skłonności komórek do różnicowania się w różnych kierunkach na podłożu mikrogleju. Stosunki $ORR=OR(\text{marker1}):OR(\text{marker2})$ i ich logarytmy ($\lg ORR$) oraz odpowiednie 95% przedziały ufności liczone bootstrapem percytylowym. Dodatkowo wartości logarytmu OR wskazują na przewagę różnicowania w kierunku pierwszego markera, wartości ujemne – w kierunku drugiego, co dodatkowo zaznaczono zielonym wyróżnieniem. LCL, UCL – odpowiednio dolna i górna granica przedziału ufności.

podłoże	marker1	marker2	ORR_LCL	ORR	ORR_UCL	$\lg ORR_LCL$	$\lg ORR$	$\lg ORR_UCL$
Mikro	TUJ1	S100B	0.6860	0.8670	1.1226	-0.1637	-0.0620	0.0502
Mikro	MAP2	S100B	1.7321	2.0929	2.6224	0.2386	0.3208	0.4187
Mikro	NF200	S100B	1.4259	2.4408	4.4463	0.1541	0.3875	0.6480
Mikro	Nestyna	S100B	0.0574	0.0711	0.0917	-1.2410	-1.1481	-1.0375
Mikro	Ki67	S100B	0.3878	0.4621	0.5672	-0.4114	-0.3353	-0.2463
Mikro	Ki67	TUJ1	0.4303	0.5330	0.6550	-0.3662	-0.2733	-0.1837
Mikro	Ki67	MAP2	0.1854	0.2208	0.2589	-0.7319	-0.6560	-0.5869
Mikro	Ki67	NF200	0.1058	0.1893	0.3183	-0.9756	-0.7228	-0.4971
Mikro	Ki67	Nestyna	5.2620	6.4989	7.8103	0.7212	0.8128	0.8927
Mikro	Nestyna	TUJ1	0.0640	0.0820	0.1061	-1.1935	-1.0861	-0.9745
Mikro	NF200	TUJ1	1.6316	2.8152	5.1418	0.2126	0.4495	0.7111
Mikro	MAP2	TUJ1	1.9255	2.4139	3.0298	0.2845	0.3827	0.4814

V.4. Współhodowle HUCB-NSC i neuronów izolowanych z mózgu oseków szczura

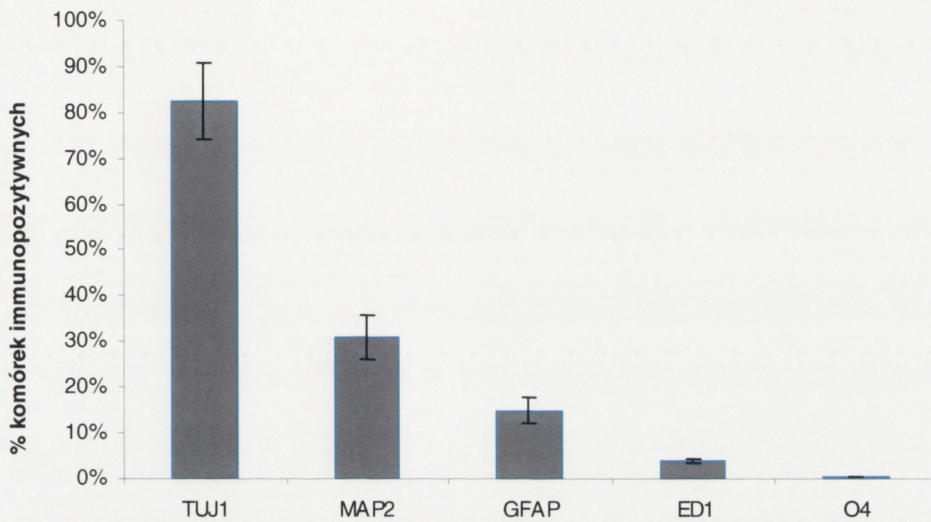
V.4.1. Morfologiczna i fenotypowa charakterystyka hodowli neuronów mózgu szczura

Izolowane z mózgu oseków szczura neurony wysiane na płytce przyklejały się do podłoża, początkowo okrągłe po 3 dniach przyjmowały wydłużony kształt z widocznymi krótkimi wypustkami. Z każdym dniem hodowli wypustki komórek wydłużały się tworząc połączenia między komórkami. Po 7 dniach obserwowano sieć połączonych ze sobą, dużych skupisk neuronów (Ryc. 26).

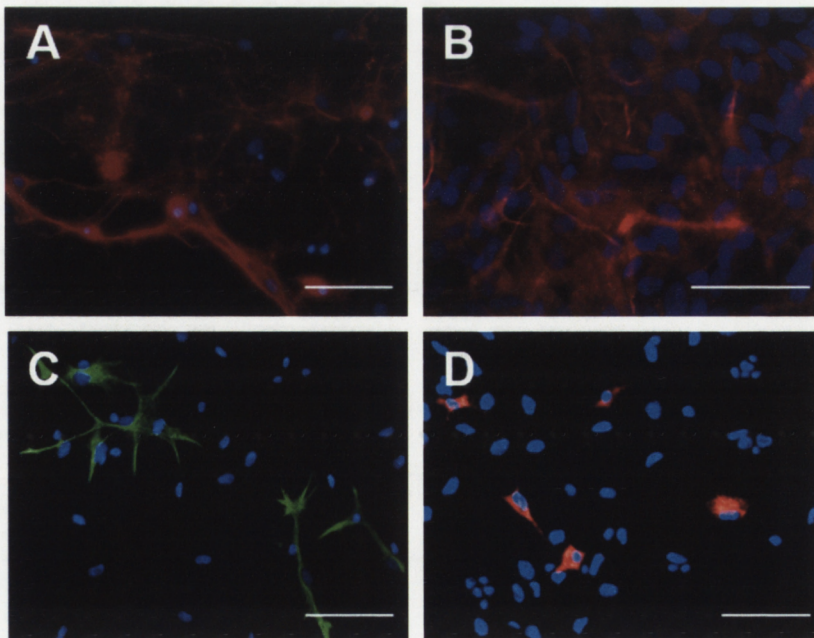


Ryc.26 Neurony izolowane z mózgu oseków szczura hodowane przez 14 dni w warunkach *in vitro*. Obraz w mikroskopie świetlnym w świetle przechodzącym (A) i mikroskopie fluorescencyjnym po reakcji immunocytochemicznej z użyciem przeciwciała anti-TUJ1 (B) (kolor czerwony). Jądra komórek wybarwione barwnikiem Hoechst (kolor niebieski). Skala 50 μm .

Wśród populacji komórek izolowanych z mózgu osesków szczura, wzbogaconych w neurony 82.6 ± 8,3% komórek wykazywała obecność neurofilamentowego białka TUJ1, a 31 ± 4.6% stanowiły komórki MAP2⁺. Niektóre komórki wykazywały obecność zarówno białka TUJ1 jak i MAP2. Udział pozostałych fenotypów neuralnych wynosił: 15 ± 2.9% GFAP2⁺ i 3.8 ± 0.4% ED1⁺. Nie zaobserwowano w podłożu wzbogaconym w neurony oligodendrocytów z obecnością białka O4 (Ryc.27,28).



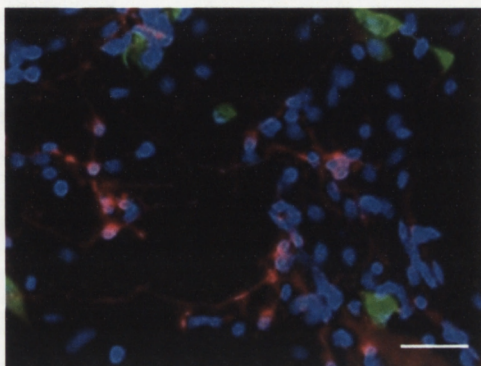
Ryc.27 Procentowy udział poszczególnych typów komórek w populacji izolowanej z mózgu osesków szczura wzbogaconej w neurony. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie ±SD, n=5.



Ryc.28 Analiza immunocytochemiczna poszczególnych typów komórek mózgu osesków szczura w hodowli wzbogaconej w neurony, wykazujących obecność białek: TUJ1 (kolor czerwony) (A); MAP2 (kolor czerwony) (B); GFAP (kolor zielony) (C); ED1 (kolor czerwony) (D). Jądra komórek wybarwiono barwnikiem Hoechst (kolor niebieski). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym. Skala 50 µm.

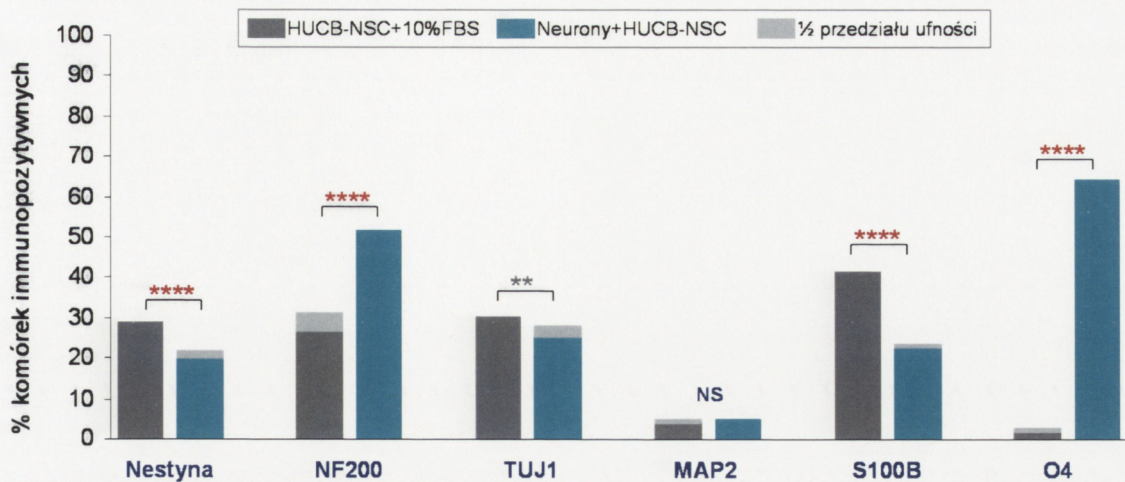
V.3.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności neuronów izolowanych z mózgu ośesków szczura

Komórki HUCB-NSC znakowane barwnikiem CMFDA wysiewano na podłoże wzbogacone w neurony. Komórki HUCB-NSC w czasie dwóch pierwszych dni przyklejały się do podłoża, a przez kolejne dni przybierały wydłużony kształt komórek morfologicznie zróżnicowanych, wytwarzając liczne wypustki (Ryc. 29).

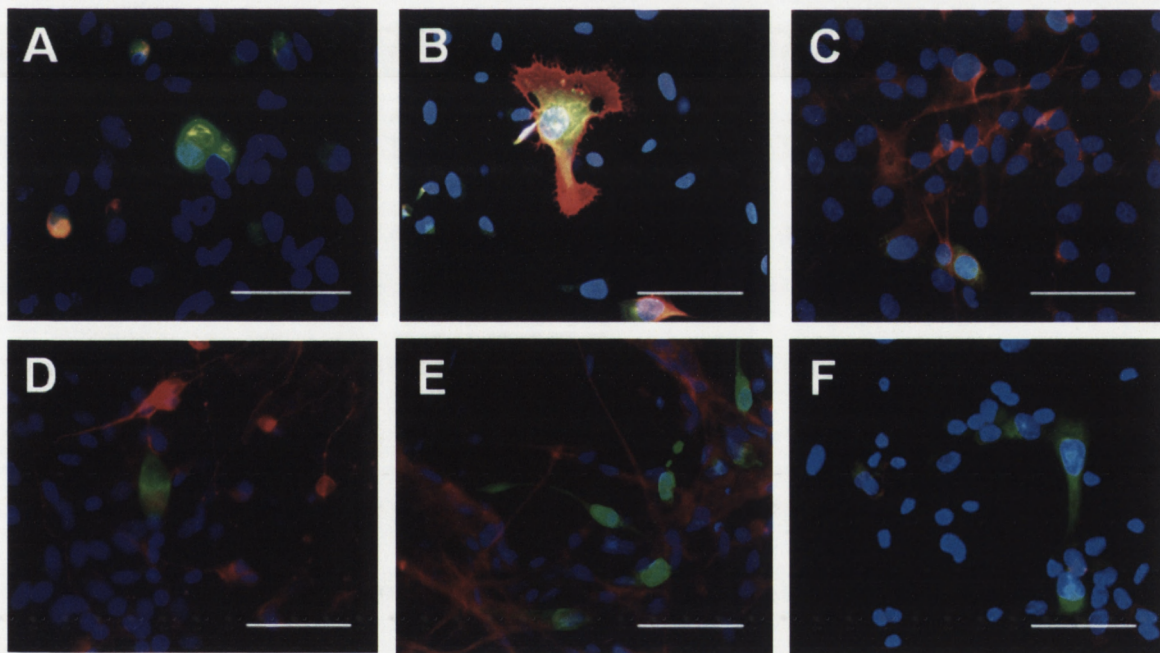


Ryc.29 Współhodowla komórek HUCB-NSC i neuronów. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna komórek po zastosowaniu przeciwciała anti-TUJ1. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony), neurony TUJ1⁺ (kolor czerwony). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μm .

Obecność neuronów w podłożu zmieniała kierunek różnicowania neuralnych komórek macierzystych HUCB-NSC widoczny w medium. We współhodowli HUCB-NSC z neuronami szczura obserwowano spadek udziału procentowego komórek z obecnością Nestyny, a HUCB-NSC różnicowały się głównie w komórki o charakterze oligodendrocytów. Procent komórek O4⁺ był piętnastokrotnie wyższy w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi w medium (DMEM+10%FBS) Wśród HUCB-NSC wykazujących markery neuronalne obserwowano wzrost komórek o charakterze wczesnych neuronów z obecnością białka NF200. Brak było istotnych różnic w populacji komórek TUJ1⁺ i MAP2⁺ w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi w medium, natomiast mniej było komórek S100 β ⁺ (Ryc.30, 31).



Ryc.30 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w przypadku hodowli w obecności neuronów mózgu szczura (błękitne słupki, n=5) i w medium (kontrola, ciemnoszare słupki, n=7). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. **: 0.01 > p > 0.001, ****: p < 0.0001, NS: brak istotności statystycznej.



Ryc.31 Współhodowla komórek HUCB-NSC i neuronów mózgu szczura. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna po zastosowaniu przeciwciała anty-Nestyna (A) (kolor czerwony); anty-O4 (B) (kolor czerwony); anty-NF200 (C) (kolor czerwony); anty-TUJ1 (D) (kolor czerwony); anty-MAP2 (E) (kolor czerwony); anty-S100B (F) (kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (A-F) (kolor zielony) z kolokalizacją poszczególnych białek neuralnych (kolor żółty). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μ m.

Porównanie względnej tendencji HUCB-NSC, hodowanych w obecności neuronów, do różnicowania w kierunku różnych typów neuralnych wykazało ich skłonność do różnicowania w oligodendrocyty (O4). Jednocześnie, komórki HUCB-NSC przejawiały nieco większą tendencję do proliferacji (Ki67) niż do różnicowania, czy to w kierunku neuronalnym, czy astrocytarnym (TUJ1, S100β) (Tabela 6).

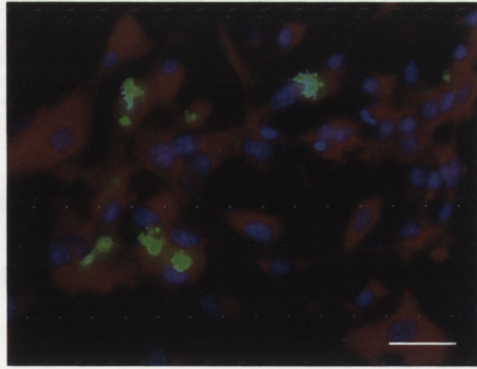
TABELA 6. Względne skłonności komórek do różnicowania się w różnych kierunkach na podłożu neuronów. Stosunki $ORR=OR(marker1):OR(marker2)$ i ich logarytmy (lgORR) oraz odpowiednie 95% przedziały ufności liczone bootstrapem percentylowym. Dodatnie wartości logarytmu OR wskazują na przewagę różnicowania w kierunku pierwszego markera, wartości ujemne – w kierunku drugiego, co dodatkowo zaznaczono zielonym wyróżnieniem. LCL, UCL – odpowiednio dolna i górna granica przedziału ufności.

podłoże	marker1	marker2	ORR_LCL	ORR	ORR_UCL	lgORR_LCL	lgORR	lgORR_UCL
Neuro	Nestyna	NP200	0.1736	0.2136	0.2656	-0.7605	-0.6705	-0.5758
Neuro	Nestyna	TUJ1	0.6813	0.7970	0.9306	-0.1666	-0.0985	-0.0312
Neuro	Nestyna	S100B	1.3884	1.5323	1.6988	0.1425	0.1853	0.2301
Neuro	Nestyna	O4	0.0046	0.0056	0.0067	-2.3409	-2.2520	-2.1721
Neuro	TUJ1	S100B	1.6703	1.9225	2.2214	0.2228	0.2839	0.3466
Neuro	TUJ1	O4	0.0056	0.0070	0.0087	-2.2529	-2.1534	-2.0611
Neuro	S100B	O4	0.0030	0.0037	0.0043	-2.5227	-2.4373	-2.3626
Neuro	Ki67	TUJ1	1.8381	2.1777	2.5680	0.2644	0.3380	0.4096
Neuro	Ki67	S100B	3.7152	4.1867	4.7021	0.5700	0.6219	0.6723
Neuro	Ki67	O4	0.0123	0.0153	0.0186	-1.9087	-1.8154	-1.7315

V.5. Współhodowle HUCB-NSC i komórek śródbłonka ustalonej linii t-END

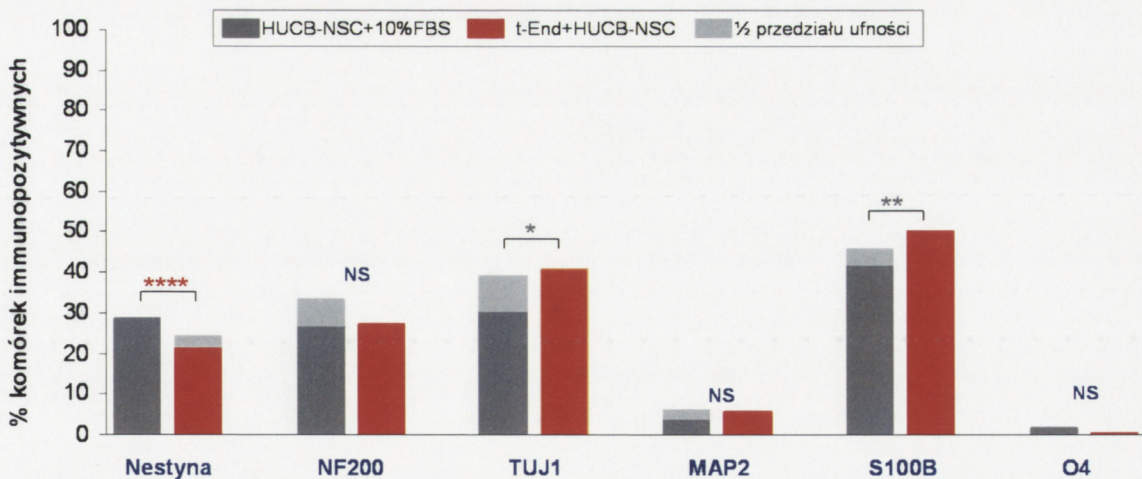
V.5.1. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności komórek śródbłonka

Komórki śródbłonka ustalonej linii (t-End) tworzyły w hodowli jednorodną, zwartą warstwę wrzecionowatych komórek z licznymi wypustkami. Po 7 dniach hodowli, na podłoże komórek śródbłonka nasiewano komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (Ryc.32). Komórki HUCB-NSC po dwóch dniach współhodowli zachowywały jeszcze kulisty kształt. Dopiero po 72 godzinach hodowli w obecności komórek śródbłonka HUCB-NSC przyklejały się do podłoża, zaczynały wytwarzać wypustki zasiedlając całą powierzchnię płytki.

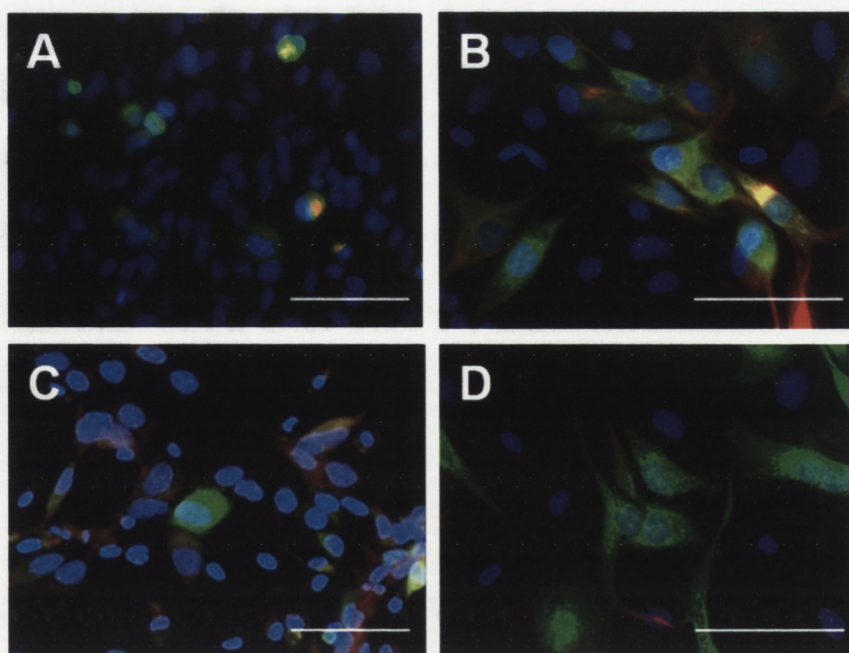


Ryc.32 Współhodowla komórek HUCB-NSC i komórek śródbłonka myszy (t-End). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna komórek po zastosowaniu przeciwciała anti-vWF. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony), komórki t-End vWF⁺ (kolor czerwony). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μ m.

Obecność komórek śródbłonka linii t-End stymulowała różnicowanie HUCB-NSC w kierunku zarówno neuronalnym jak i astrocytarnym, jakkolwiek neuralne komórki macierzyste krwi pępowinowej wykazywały stosunkowo niski potencjał do różnicowania w porównaniu do HUCB-NSC hodowanych w medium (DMEM+10%FBS). Współhodowla HUCB-NSC z komórkami t-End powodowała niewielki wzrost udziału komórek z obecnością białka TUJ1 i S100 β w porównaniu z wartościami kontrolnymi. Nie zaobserwowano zmian statystycznie istotnych w liczbie komórek NF200⁺ i MAP2⁺. Wśród HUCB-NSC hodowanych w obecności t-End brak było komórek O4⁺ o charakterze oligodendrocytów (Ryc.33,34).



Ryc.33 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w przypadku hodowli w obecności komórek śródbłonka (czerwone słupki, n=5) i w medium (kontrola, ciemnoszare słupki, n=7). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. *: 0.05>p>0.01, **: 0.01>p>0.001, ***: 0.001>p>0.0001, ****: p<0.0001, NS: brak istotności statystycznej.



Ryc.34 Współhodowla komórek HUCB-NSC i komórek śródbłonka T-End. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna po zastosowaniu przeciwciała anty-Nestyna **(A)** (kolor czerwony); anty-TUJ1 **(B)** (kolor czerwony); anty-S100β **(C)** (kolor czerwony); anty-MAP2 **(D)** (kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA **(A-D)** (kolor zielony) z kolokalizacją poszczególnych białek neuralnych (kolor żółty). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μm.

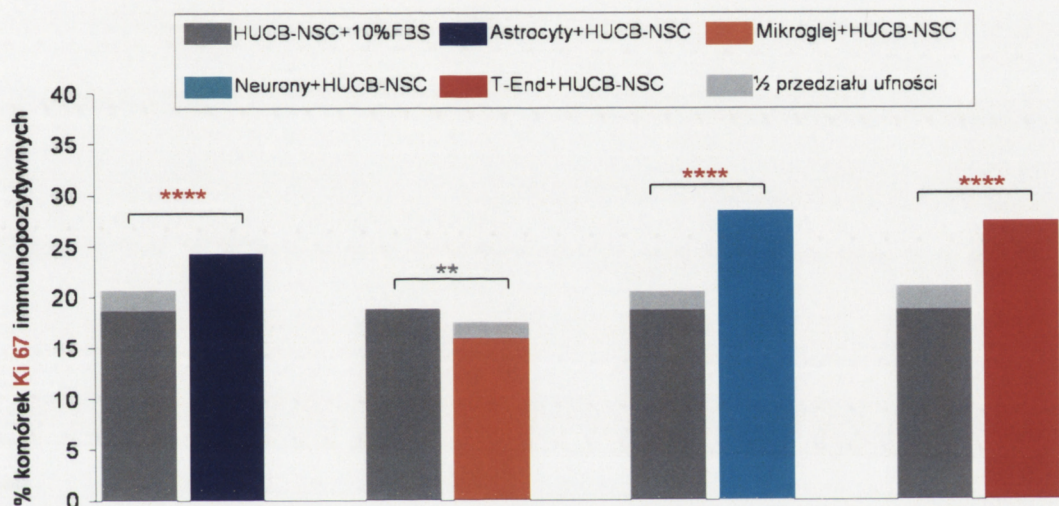
Analizując względne skłonności HUCB-NSC do różnicowania w neurony (TUJ1) czy astrocyty (S100β) w obecności komórek śródbłonka nie wykazano jednoznacznej tendencji wyboru kierunku z ich skłonnością do proliferacji (Ki67) (Tabela 7).

TABELA 7. Względne skłonności komórek do różnicowania się w różnych kierunkach na podłożu komórek śródbłonka t-End. Stosunki $ORR = OR(\text{marker1}) : OR(\text{marker2})$ i ich logarytmy (lgORR) oraz odpowiednie 95% przedziały ufności liczone bootstrapem percentylowym. Dodatnie wartości logarytmu OR wskazują na przewagę różnicowania w kierunku pierwszego markera, wartości ujemne – w kierunku drugiego, co dodatkowo zaznaczono zielonym wyróżnieniem. LCL, UCL – odpowiednio dolna i górna granica przedziału ufności

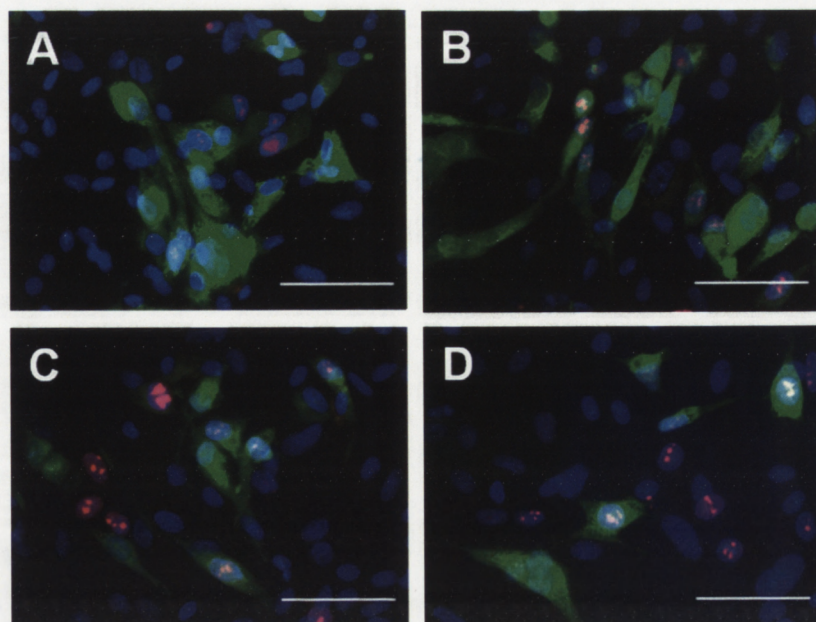
podłoże	marker1	marker2	ORR_LCL	ORR	ORR_UCL	lgORR_LCL	lgORR	lgORR_UCL
t-End	Nestyna	TUJ1	0.2938	0.4228	0.6016	-0.5319	-0.3739	-0.2207
t-End	Nestyna	S100β	0.3976	0.4832	0.5870	-0.4006	-0.3159	-0.2313
t-End	TUJ1	S100β	0.8093	1.1428	1.6334	-0.0919	0.0580	0.2131
t-End	Nestyna	NF200	0.4728	0.6723	0.9545	-0.3253	-0.1724	-0.0202
t-End	Ki67	TUJ1	0.7080	1.0065	1.4221	-0.1500	0.0028	0.1529
t-End	Ki67	S100β	0.9740	1.1503	1.3851	-0.0114	0.0608	0.1415

V.6. Proliferacja HUCB-NSC w różnych warunkach ich hodowli

Potencjał proliferacyjny komórek wyrażono udziałem procentowym komórek Ki67⁺. Poziom proliferacji komórek HUCB-NSC współhodowanych w obecności astrocytów, neuronów i komórek śródbłonka był wyższy w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi w medium (DMEM+10%FBS). Obecność komórek mikrogleju nieznacznie hamowała aktywność mitotyczną HUCB-NSC (Ryc.35,36).



Ryc.35 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność Ki67 - markera komórek aktywnych mitotycznie, hodowanych w obecności różnych typów komórek lub medium (kontrola, ciemnoszare słupki, n=7). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. **: 0.01>p>0.001, ****: p<0.0001.

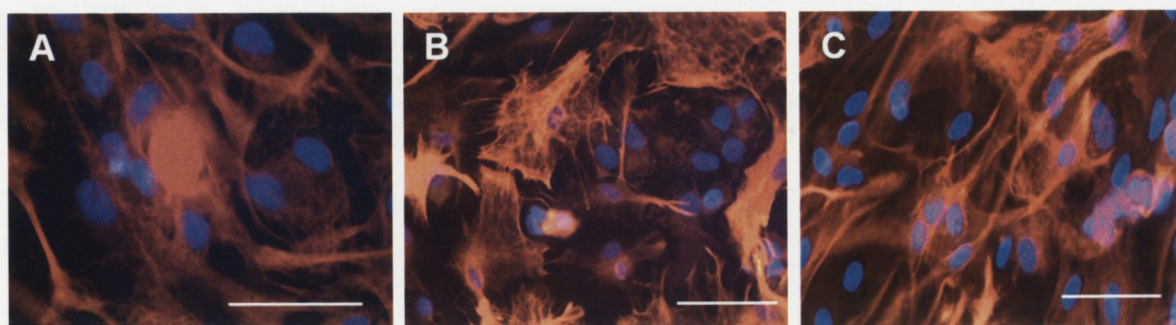


Ryc.36 Współhodowla komórek HUCB-NSC w obecności różnych typów komórek. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna HUCB-NSC po zastosowaniu przeciwciała anti-Ki67: w obecności astrocytów **(A)**; neuronów **(B)**; komórek śródbłonna t-End **(C)** (kolor czerwony) i komórek mikrogleju **(D)** (kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA **(A-D)** (kolor zielony). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Kokalizacja białka Ki67 i barwnika Hoechst (kolor różowy). Skala 50 μ m.

V.7. Współhodowle HUCB-NSC i astrocytów stymulowanych LPS lub TMT

V.7.1. Zmiany morfologiczne astrocytów w odpowiedzi na aktywację LPS lub TMT

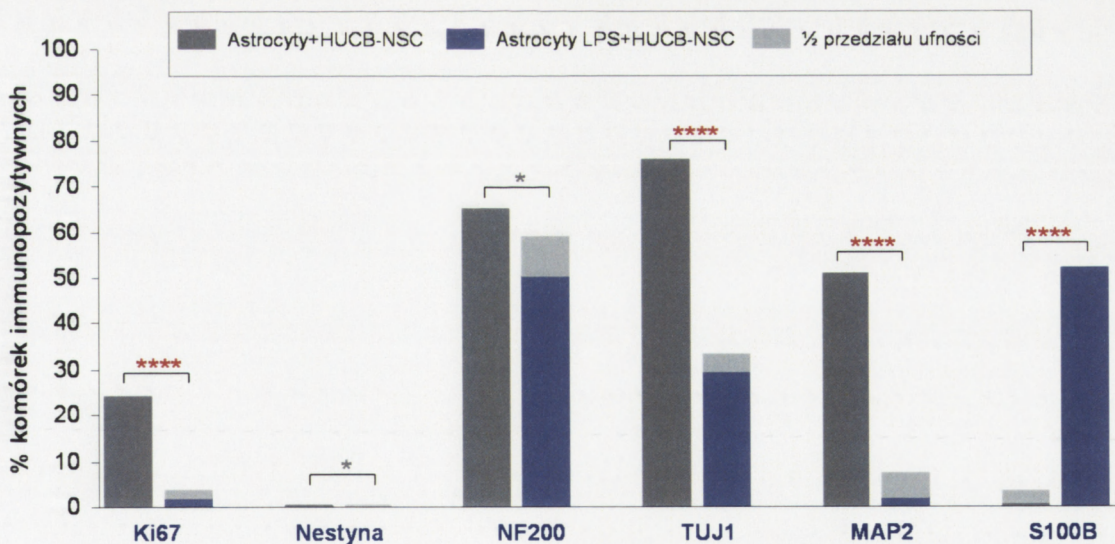
Dodanie do 20 dniowej hodowli astrocytów LPS lub TMT, powodowało charakterystyczne zmiany morfologiczne w obrazie komórek. Astrocyty wcześniej ameboidalne, przybierały kształt komórek gwiazdzistych z licznymi wypustkami i gęsto upakowaną cytoplazmą. Komórki te wykazywały podwyższoną ekspresję GFAP (Ryc. 37).



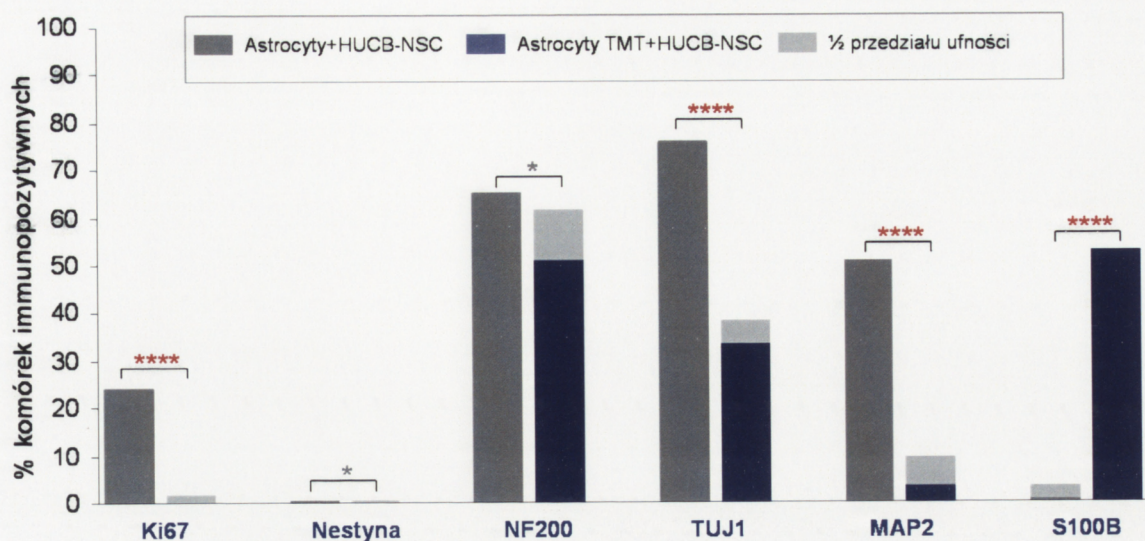
Ryc.37 Astrocyty wyizolowane z mózgu osesków szczura hodowane przez 14 dni: w warunkach standardowych **(A)** a następnie po 24 godzinach ekspozycji na LPS **(B)** lub TMT **(C)**. Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po reakcji immunocytochemicznej z użyciem przeciwciała anti-GFAP (kolor czerwony). Jądra komórek wybarwiono barwnikiem Hoechst (kolor niebieski). Skala 50 μ m.

V.7.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności astrocytów stymulowanych LPS i TMT

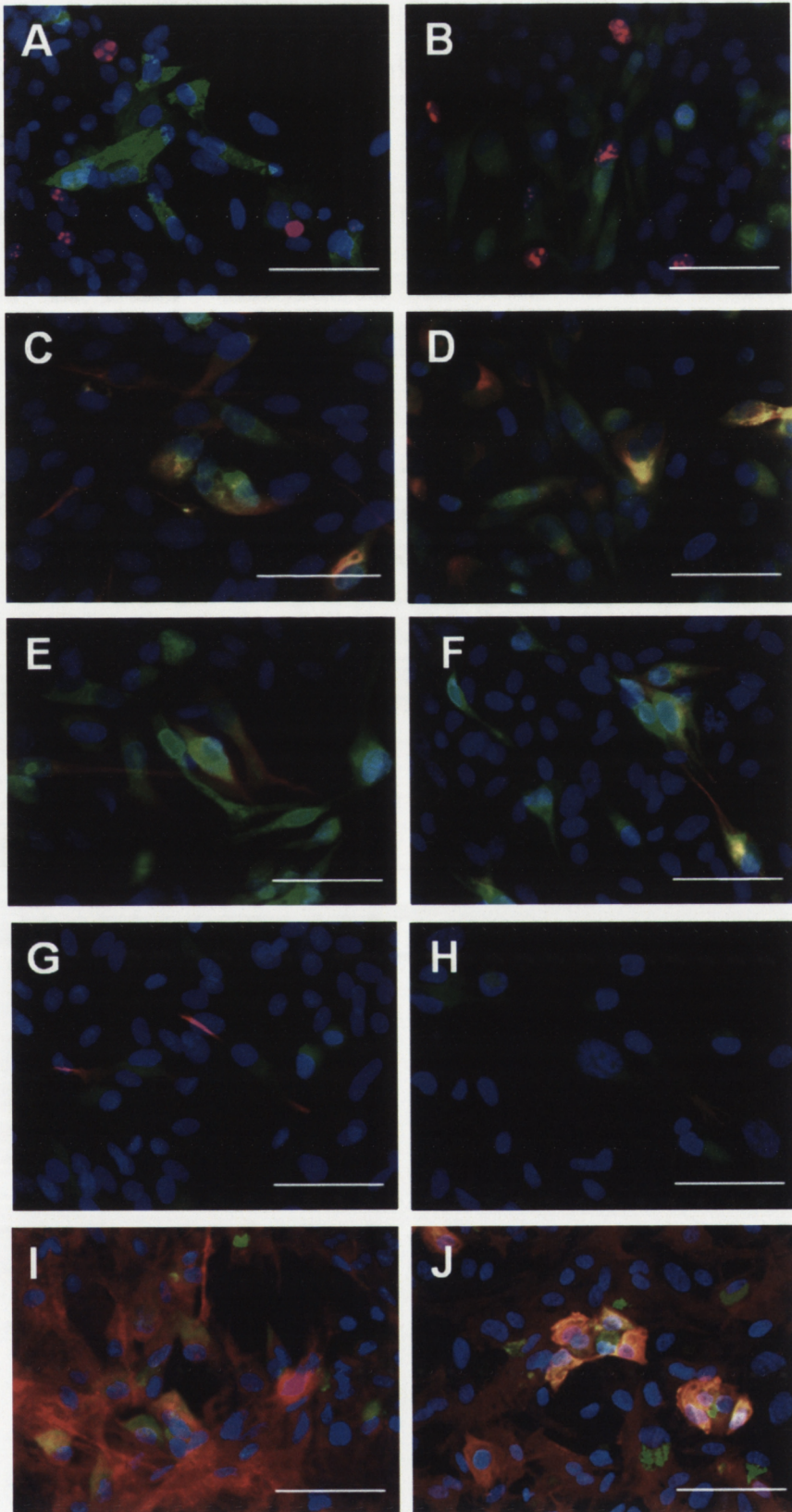
Po 7 dniach hodowli komórek HUCB-NSC na podłożu astrocytów stymulowanych LPS lub TMT obserwowano zmianę kierunku ich różnicowania w porównaniu z hodowlą HUCB-NSC w obecności nieaktywowanych astrocytów. Po ekspozycji astrocytów na LPS lub TMT hodowane w ich obecności HUCB-NSC wykazywały wyraźny spadek liczby komórek o cechach neuronalnych: NF200⁺, TUJ1⁺, MAP2⁺ w porównaniu ze współhodowlą HUCB-NSC w obecności astrocytów nieaktywowanych. Procentowy udział komórek TUJ1⁺ był dwukrotnie mniejszy, natomiast w przypadku komórek MAP2⁺ obniżał się trzykrotnie. Jednocześnie obserwowano wzrost liczby komórek o charakterze astrocytów z obecnością białka S100β, we współhodowli z astrocytami po stymulacji LPS i TMT w porównaniu z ilością komórek S100β⁺ w populacji HUCB-NSC hodowanych w obecności astrocytów nieaktywowanych. Również w tym przypadku wzrost różnicowania komórek w tym kierunku wykazywał wysoką istotność statystyczną. Na podłożu astrocytów stymulowanych LPS lub TMT nie obserwowano różnicowania HUCB-NSC w oligodendrocyty. Na uwagę zasługuje fakt niemal całkowitego zahamowania proliferacji HUCB-NSC w obecności stymulowanych astrocytów (Ryc.38,39,40).



Ryc.38 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w przypadku hodowli w obecności astrocytów mózgu szczura po stymulacji LPS (jasnoniebieskie słupki, n=6), w porównaniu do hodowli w obecności astrocytów niestymulowanych (kontrola, ciemnoszare słupki, n=9-10). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. *: 0.05>p>0.01, **: 0.01>p>0.001, ****: p<0.0001.

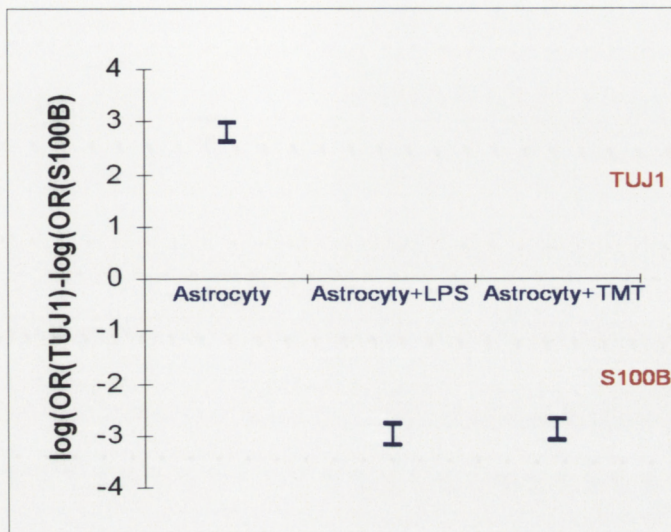


Ryc.39 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w przypadku hodowli w obecności astrocytów mózgu szczura po stymulacji TMT (ciemnoniebieskie słupki, n=6) w porównaniu do hodowli w obecności astrocytów niestymulowanych (kontrola, ciemnoszare słupki, n=9-10). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. *: 0.05>p>0.01, **: 0.01>p>0.001, ****: p<0.0001



Ryc.40 Współhodowla komórek HUCB-NSC i astrocytów stymulowanych LPS (A,C,E,G,I) lub TMT (B,D,F,H,J). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immunocytochemiczna po zastosowaniu przeciwciał: anti-Ki67 (A,B) (kolor czerwony); anti-NF200 (C,D) (kolor czerwony); anti-TUJ1 (E,F) (kolor czerwony); anti-MAP2 (G,H) (kolor czerwony); anti-S100β (I,J) (kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (A-J) (kolor zielony) z kolokalizacją poszczególnych białek neuralnych (kolor żółty). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μm.

Stymulacja astrocytów za pomocą LPS lub TMT miała silny wpływ na wybór ścieżki różnicowania komórek HUCB-NSC hodowanych na tych podłożach. Na podłożu astrocytów niestymulowanych jednoznacznie przeważało różnicowanie HUCB-NSC w neurony, w przypadku stymulacji astrocytów LPS lub TMT – w astrocyty (Ryc.41).

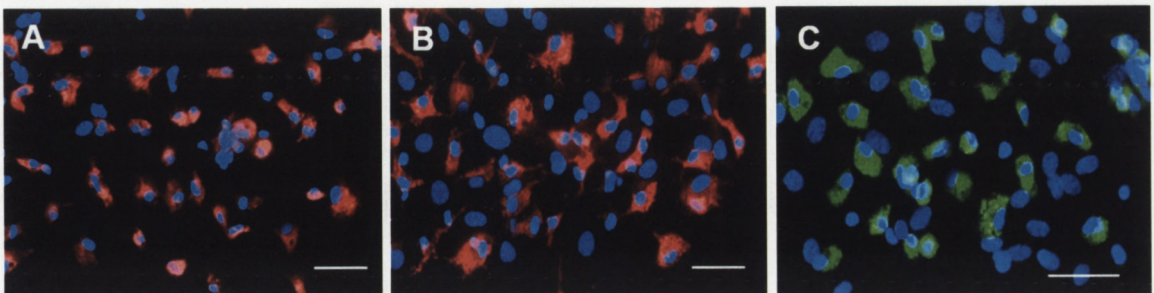


Ryc.41 Porównanie względnego ukierunkowania komórek HUCB-NSC hodowanych na podłożu astrocytów nieaktywowanych i stymulowanych LPS lub TMT. Odcinki oznaczają 95% przedziały ufności dla logarytmu stosunku OR. Wartości dodatnie wskazują na przewagę różnicowania w kierunku neuronów (TUJ1) a wartości ujemne przewagę różnicowania w kierunku astrocytów (S100β).

V.8. Współhodowle HUCB-NSC i komórek mikrogleju stymulowanych LPS i TMT

V.8.1. Zmiany morfologiczne komórek mikrogleju w odpowiedzi na aktywację LPS i TMT

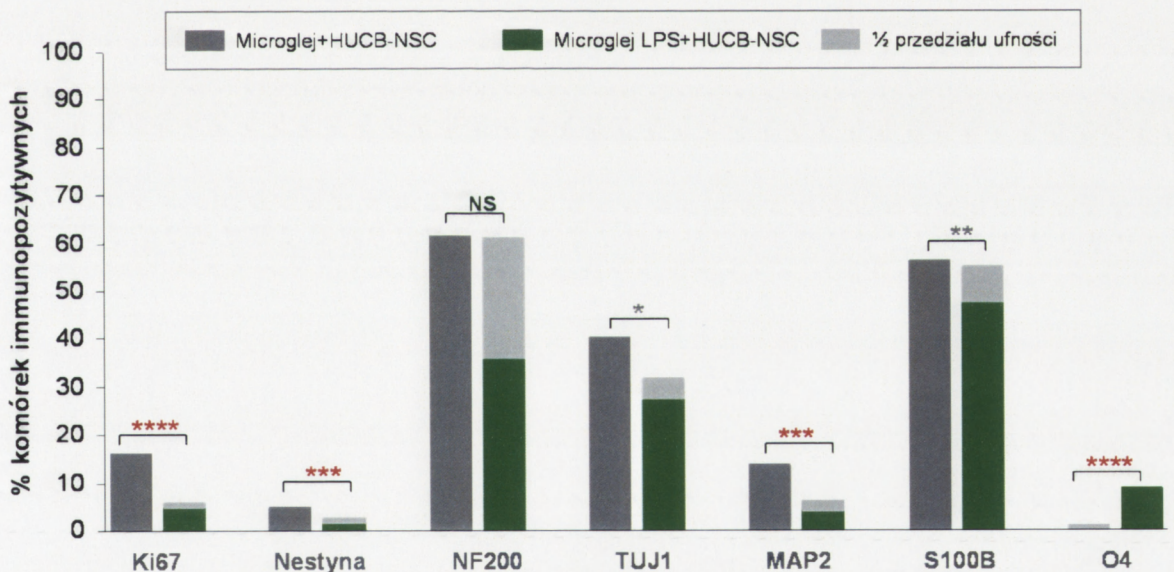
Komórki mikrogleju w wyniku aktywacji LPS lub TMT ulegały zmianom morfologicznym. Obserwowano przekształcanie gwiaździstych komórek zaopatrzonych w liczne wypustki, w komórki ameboidalne z krótkimi i stosunkowo grubymi wypustkami (Ryc.42).



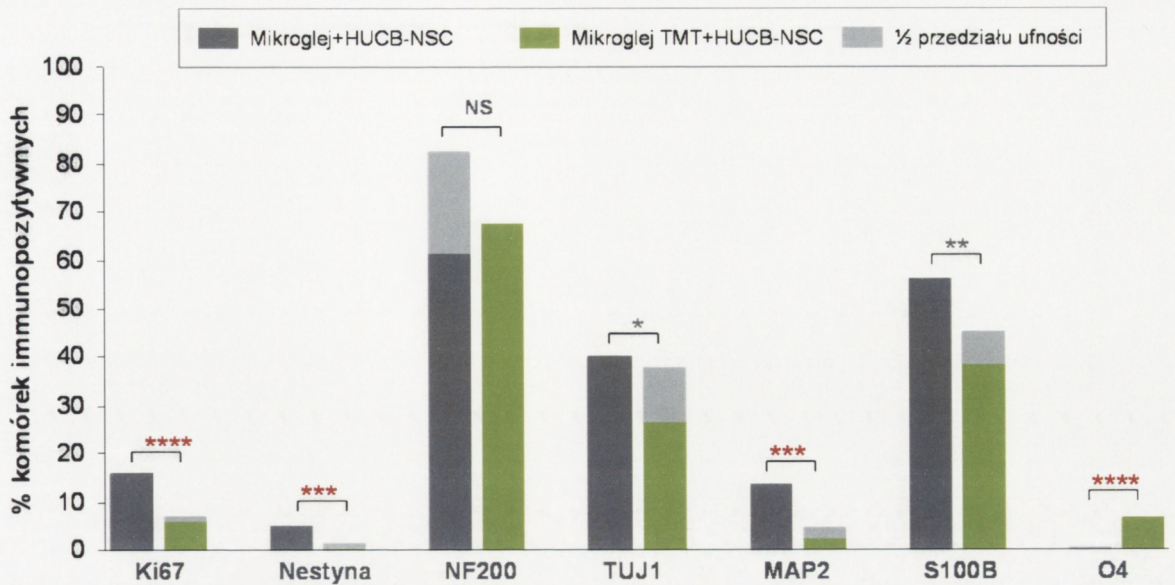
Ryc.42 Komórki mikrogleju wyizolowane z mózgu oseków szczura hodowane przez 7 dni w warunkach standardowych (A), po 24 godzinach ekspozycji na LPS (B) lub TMT (C). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po reakcji immunocytochemicznej z użyciem przeciwciała anti-ED1 (kolor czerwony) (A,B) i (kolor zielony) (C). Na niebiesko wybarwione jądra komórek (Hoechst). Skala 50 µm.

V.8.2. Różnicowanie HUCB-NSC w obecności komórek mikrogleju stymulowanych LPS lub TMT

Obecność komórek mikrogleju stymulowanych LPS lub TMT powoduje zmiany kierunku różnicowania HUCB-NSC w porównaniu z niestymulowanymi komórkami mikrogleju. Aktywacja komórek mikrogleju LPS lub TMT a następnie ich współhodowla z HUCB-NSC powodowała spadek liczby komórek neuronalnych wykazujących obecność białka TUJ1 oraz MAP2, w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi na podłożu niestymulowanych komórek mikrogleju. Po aktywacji komórek mikrogleju LPS lub TMT nieznacznie obniżył się również procent komórek S100 β ⁺. Jednocześnie widoczny był wzrost różnicowania HUCB-NSC w kierunku oligodendrocytów zarówno po stymulacji LPS jak i TMT. Aktywność proliferacyjna HUCB-NSC hodowanych na podłożu aktywowanych komórek mikrogleju (LPS i TMT) była niższa (istotna statystycznie), w porównaniu do HUCB-NSC we współhodowli z normalnymi komórkami mikrogleju (Ryc.43,44,46).

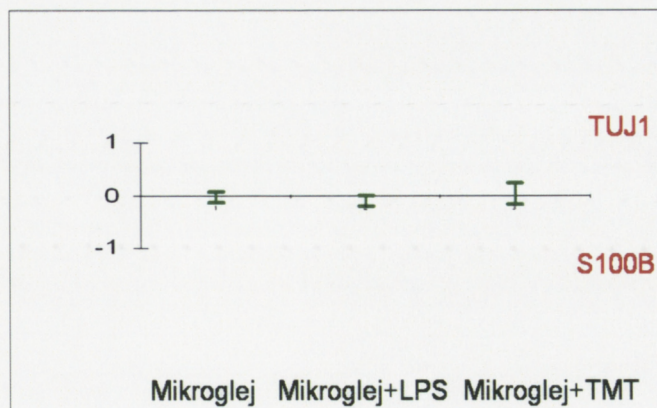


Ryc.43 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w przypadku hodowli w obecności komórek mikrogleju mózgu szczura po stymulacji LPS (ciemnozielone słupki, n=5) w porównaniu do hodowli w obecności astrocytów niestymulowanych (kontrola, ciemnoszare słupki, n=3-5). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. *: 0.05>p>0.01, **: 0.01>p>0.001, ***: 0.001>p>0.0001, ****: p<0.0001, NS: brak istotności statystycznej.

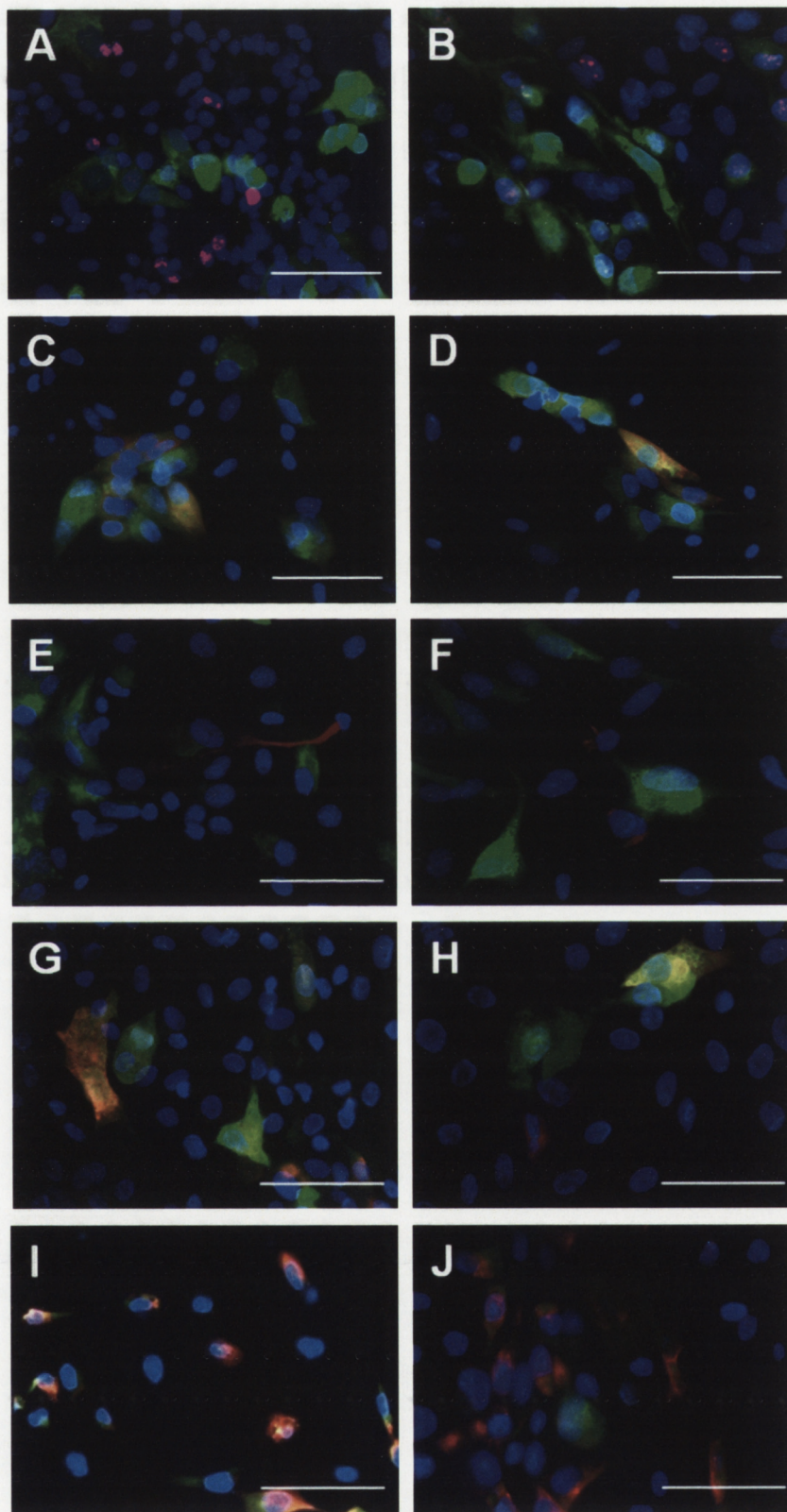


Ryc.44 Porównanie średnich udziałów komórek HUCB-NSC wykazujących obecność wybranych markerów neuralnych w przypadku hodowli w obecności komórek mikrogleju mózgu szczura po stymulacji TMT (jasnozielone słupki, n=4) w porównaniu do hodowli w obecności astrocytów niestymulowanych (kontrola, ciemnoszare słupki, n=3-5). Jasnoszare słupki odpowiadają połowie długości 95% przedziału ufności dla różnicy średnich udziałów; różnica wysokości słupka dłuższego i słupka krótszego wraz z jasnoszarą częścią odpowiada najmniejszej prawdopodobnej różnicy średnich. *: 0.05>p>0.01, **: 0.01>p>0.001, ***: 0.001>p>0.0001, ****: p<0.0001, NS: brak istotności statystycznej.

Porównanie względnych tendencji kierunku różnicowania HUCB-NSC współhodowanych z komórkami mikrogleju stymulowanymi LPS lub TMT z różnicowaniem HUCB-NSC hodowanych w obecności niestymulowanych komórek mikrogleju, nie wykazało wyraźnej przewagi ukierunkowania progenitorów neuralnych do różnicowania w neurony czy astrocyty (Ryc.45).



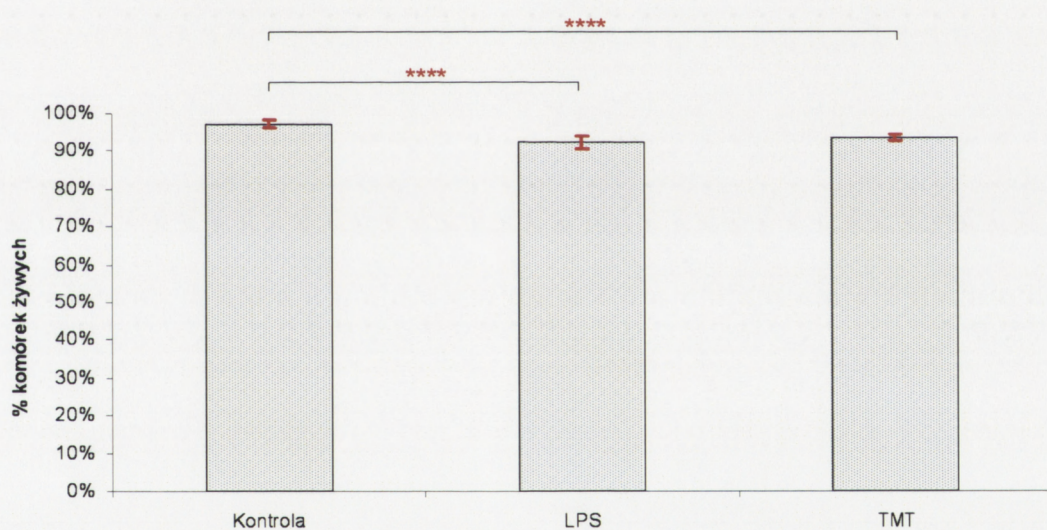
Ryc.45 Porównanie względnego ukierunkowania komórek HUCB-NSC hodowanych na podłożu mikrogleju nieaktywowanego i po stymulacji LPS lub TMT. Odcinki oznaczają 95% przedziały ufności dla logarytmu stosunku OR. Wartości dodatnie wskazują na przewagę różnicowania w kierunku neuronów (TUJ1) a wartości ujemne przewagę różnicowania w kierunku astrocytów (S100β).



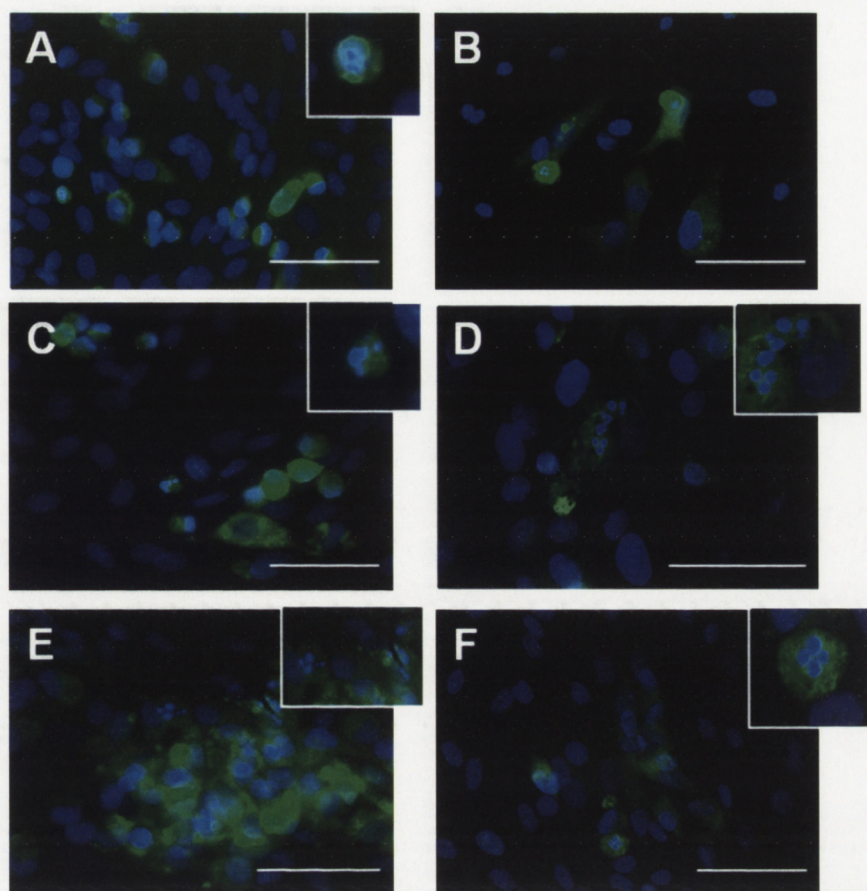
Ryc.46 Współhodowla komórek HUCB-NSC i komórek mikrogleju stymulowanych LPS (A,C,E,G,I) lub TMT (B,D,F,H,J). Obraz w mikroskopie fluorescencyjnym po 7 dniach współhodowli; analiza immuno-cytochemiczna po zastosowaniu przeciwciał: anti-Ki67 (A,B) (kolor czerwony); anti-TUJ1 (C,D) (kolor czerwony); anti-MAP2 (E,F) (kolor czerwony); anti-S100β (G,H) (kolor czerwony); anti-O4 (I,J) (kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (A-J) (kolor zielony) z kolokalizacją poszczególnych białek neuralnych (kolor żółty). Jądra komórkowe (kolor niebieski) wybarwione barwnikiem Hoechst. Skala 50 μm.

V.8.3 Żywotność i ocena morfologiczna HUCB-NSC współhodowanych z astrocytami i komórkami mikrogleju po ich stymulacji LPS i TMT

Zastosowanie barwnika Hoechst 33258, który wiąże się z DNA umożliwiło śledzenie zmian w strukturze jądra komórkowego HUCB-NSC. W obrębie populacji HUCB-NSC współhodowanych z astrocytami stymulowanymi LPS lub TMT, większość komórek wykazywała prawidłową budowę morfologiczną z jądrami o regularnie rozproszonej chromatynie. Procentowy udział tych komórek wśród HUCB-NSC hodowanych na podłożu astrocytów poddanych działaniu LPS wyniósł 92.3 ± 1.5 , stymulowanych TMT: 93.7 ± 0.8 , a w przypadku astrocytów niestymulowanych: 97.1 ± 1.1 . Pojedyncze komórki HUCB-NSC hodowane w obecności astrocytów stymulowanych LPS lub TMT wykazywały zmiany w jądrze charakteryzujące się skondensowaną bądź pofragmentowaną chromatyną jądrową. W niektórych komórkach HUCB-NSC były widoczne ciała apoptotyczne (Ryc.47,48).

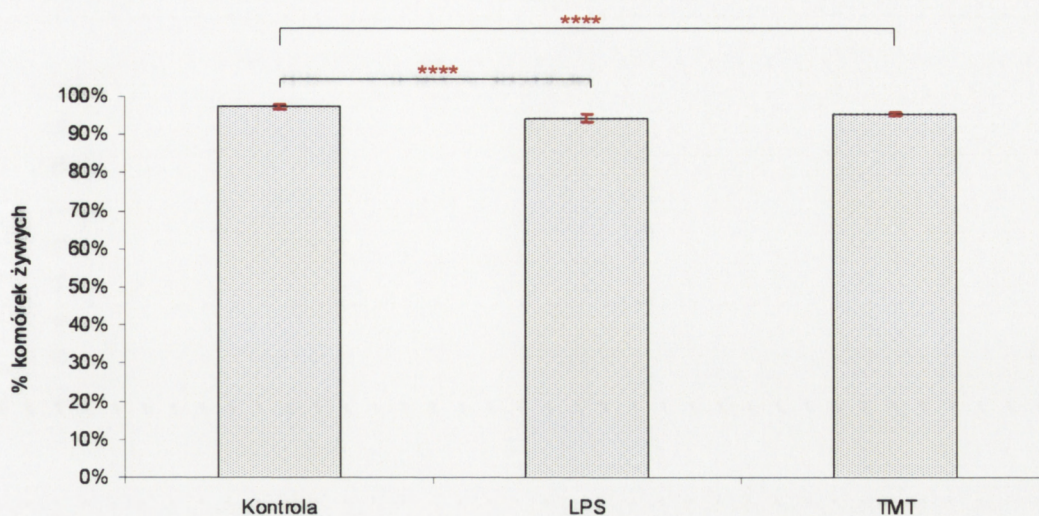


Ryc.47 Wykres przedstawia procentowy udział żywych komórek HUCB-NSC hodowanych w obecności astrocytów po ich stymulacji LPS lub TMT. Kontrolę stanowiły HUCB-NSC współhodowane z niestymulowanymi astrocytami. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie \pm SD ($n \geq 5$), **** $p > 0,001$.



Ryc.48 Obraz morfologiczny HUCB-NSC współhodowanych z astrocytami niestymulowanymi (**A**); astrocytami stymulowanymi LPS (**B**) i TMT (**C**), oraz niestymulowanymi komórkami mikrogleju (**D**); komórkami mikrogleju po stymulacji LPS (**E**) lub TMT (**F**). Wstawki przedstawiają komórki z widocznymi zmianami w jądrach komórkowych sugerującymi apoptozę komórek. Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (kolor zielony), jądra komórkowe wybarwione Hoechst 33250 (kolor niebieski). Skala 50 μm .

Przeprowadzone badania żywotności HUCB-NSC współhodowanych z komórkami mikrogleju stymulowanymi LPS lub TMT wykazały prawidłową morfologię większości komórek. Procentowy udział HUCB-NSC hodowanych w obecności komórek mikrogleju poddanych działaniu LPS wynosił 94.4 ± 1.1 , stymulowanych TMT: 95.4 ± 0.6 , a w przypadku komórek mikrogleju niestymulowanych 97.5 ± 0.2 . W pojedynczych HUCB-NSC współhodowanych na podłożu komórek mikrogleju stymulowanych LPS i TMT widoczne były zmiany apoptotyczne w jądrze (Ryc.48, 49).



Ryc.49 Wykres przedstawia procentowy udział żywych komórek HUCB-NSC hodowanych w obecności komórek mikrogleju po stymulacji LPS i TMT. Kontrolę stanowiły HUCB-NSC współhodowane z nieaktywowanymi komórkami mikrogleju. Wyniki badań przedstawione jako wartości średnie \pm SD ($n \geq 5$), **** $p > 0,001$.

V.9. Poziom wybranych cytokin pro-zapalnych w nadsączach z hodowli astrocytów i komórek mikrogleju aktywowanych LPS i TMT

Analiza cytokin pro-zapalnych w supernatantach z hodowli astrocytów stymulowanych LPS wykazała obecność IL-1 β (39-267 pg/ml) i IL-6 (230-1018 pg/ml). W badanych nadsączach nie stwierdzono obecności IL-1 α ani TNF- α . Po stymulacji astrocytów TMT w nadsączach z hodowli poziom cytokin wynosił: IL-1 β (100-118pg/ml), IL-6 (127-448 pg/ml) i TNF- α (34-73 pg/ml). W nadsączach znad hodowli niestymulowanych astrocytów nie stwierdzono obecności badanych cytokin pro-zapalnych.

Stężenie cytokin pro-zapalnych w supernatantach z hodowli komórek mikrogleju aktywowanych LPS wynosiło: 42-414 pg/ml IL-1 β ; 127-448 pg/ml IL-6; 32-197 pg/ml TNF- α . Po stymulacji TMT w nadsączach znad hodowli komórek mikrogleju stwierdzono obecność IL-1 β (79-374 pg/ml) i IL-6 (95-1285 pg/ml), natomiast nie obserwowano IL-1 α i TNF- α . Analiza wybranych cytokin w supernatantach z hodowli niestymulowanych komórek mikrogleju nie wykazała obecności żadnej z nich.

V.10. Stężenie tlenu azotu w nadsączach z hodowli astrocytów i komórek mikrogleju aktywowanych LPS i TMT

Supernatanty z hodowli astrocytów i mikrogleju stymulowanych LPS i TMT poddano analizie metodą Griessa, która pozwala na oznaczenie uwalnianego przez komórki tlenu

azotu. Stężenie NO mierzone w nadsącach z hodowli astrocytów stymulowanych LPS osiągało wartość 0,848-2,951 μM , a po stymulacji TMT 1,622-7,931 μM . Ilość NO w supernatantach z hodowli astrocytów niestymulowanych wynosiła 0,506-1,955 μM .

W nadsącach z hodowli komórek mikrogleju stymulowanych LPS, zawartość NO wynosiła 2,377-10,253 μM , a po stymulacji TMT 1,407-16,078 μM . W supernatantach z hodowli niestymulowanych komórek mikrogleju ilość NO wahała się w granicach 1,191-3,780 μM .

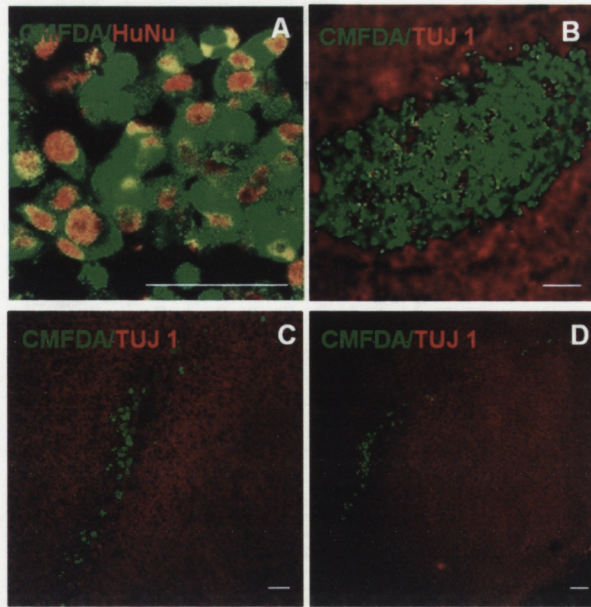
V.11. Identyfikacja HUCB-NSC po ich transplantacji do mózgu osesków szczura

Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA, przeszczepiane do strefy SVZ osesków szczura były identyfikowane za pomocą reakcji immunohistochemicznych z wykorzystaniem przeciwciał skierowanych przeciwko antygenom specyficznym dla komórek ludzkich, tj. NuMa, HuNu (Ryc.50A). Zastosowanie znaczników komórek ludzkich w celu rozpoznania HUCB-NSC w tkance nerwowej biorcy po ich transplantacji, było szczególnie istotne w dłuższych czasach obserwacji z uwagi na nietrwałość i wyświecanie się barwnika CMFDA, którym HUCB-NSC były znakowane przyżyciowo.

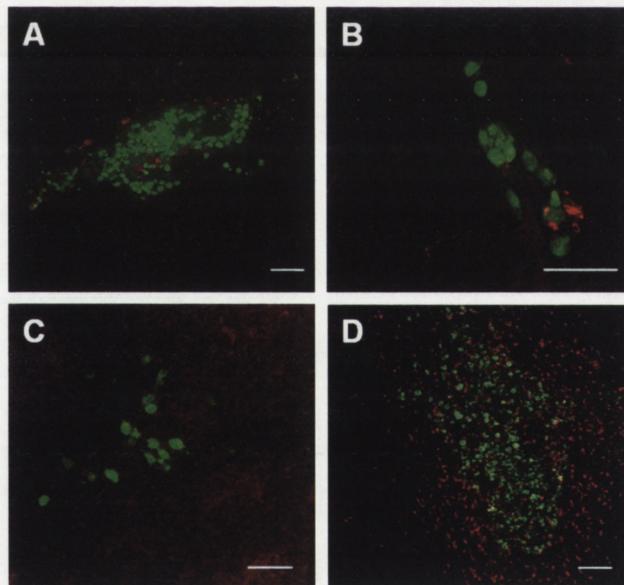
HUCB-NSC oceniane po 24 godz. od momentu ich transplantacji tworzyły zwarty wszczep w mózgu biorcy (Ryc.50B). W ciągu pierwszego tygodnia po przeszczepie obserwowano nieznaczna migrację HUCB-NSC w kierunku światła komory bocznej mózgu. Po 7 dniach od transplantacji pojedyncze komórki HUCB-NSC były widoczne w odległości 240 μm od miejsca, w którym zostały przeszczepione (Ryc.50C). Po 14 i 21 dniach zwiększała się liczba HUCB-NSC migrujących z wszczepu. Komórki te tworzyły widoczne szlaki w korze wzdłuż komór bocznych mózgu migrując na odległość około 400 μm (Ryc.50D).

Przeszczepy komórek u nowonarodzonych zwierząt z niewykształconym jeszcze układem immunologicznym, charakteryzują się niską odpowiedzią ze strony gospodarza. Aby sprawdzić reakcję biorcy na obecność HUCB-NSC przeszczepionych do mózgu osesków szczura, wykonano badania immunohistochemiczne z użyciem przeciwciała ED1 identyfikującego makrofagi i komórki mikrogleju. Komórki te będące efektorami nieswoistej odpowiedzi immunologicznej odgrywają główną rolę w przeszczepach ksenogenicznych i stanowią pierwszą linię obrony.

W naszych badaniach pojedyncze komórki ED1⁺ były widoczne w okolicy wszczepu HUCB-NSC tylko w początkowym okresie (1-4 dni) po ich transplantacji (Ryc.51A-C). Reakcja ta była dużo słabsza w porównaniu z odpowiedzią u dorosłych szczurów, którym przeszczepiano komórki HUCB-NSC do mózgu (Ryc.51D).



Ryc.50 Komórki HUCB-NSC po transplatacji do strefy SVZ noworodka szczura. Barwienie immunocytochemiczne markerem anti-HuNu (kolor czerwony), wykrywającym ludzkie białka jądrowe, potwierdziło ludzkie pochodzenie przeszczepianych komórek (A). Komórki 24h po transplatacji tworzyły zwarty wszczepek (B), a po 7 i 14 dniach obserwowano ich migrację w tkance biorcy (odpowiednio C,D). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (A-D) (kolor zielony). Na zdjęciach B,C i D barwienie immunohistochemiczne markerem anti-TUJ1 (kolor czerwony). Skala 50 μ m.



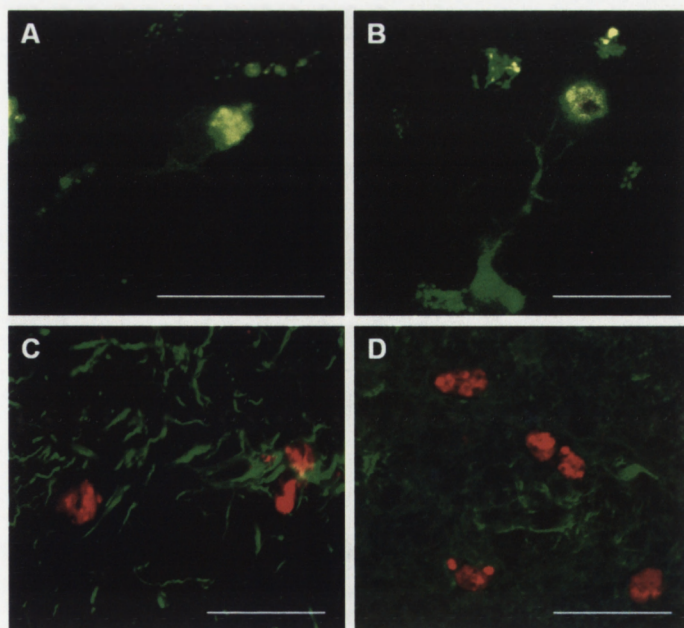
Ryc.51 Komórki HUCB-NSC po transplatacji do mózgu szczura. Analiza immunohistochemiczna po zastosowaniu przeciwciała anti-ED1 (A-D) (kolor czerwony) Obraz w mikroskopie konfokalnym po 24h (A); 7 dniach (B); 14 dniach (C) od przeszczepu HUCB-NSC do strefy SVZ oseków szczura i 24 godz. po transplatacji HUCB-NSC do prążkownia dorosłego szczura (D). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (A-D) (kolor zielony). Skala 50 μ m.

Przeszczepione do strefy SVZ HUCB-NSC przeżywały w mózgu oseków szczura do 5 tygodni, wykazując potencjał proliferacyjny i zdolność do różnicowania.

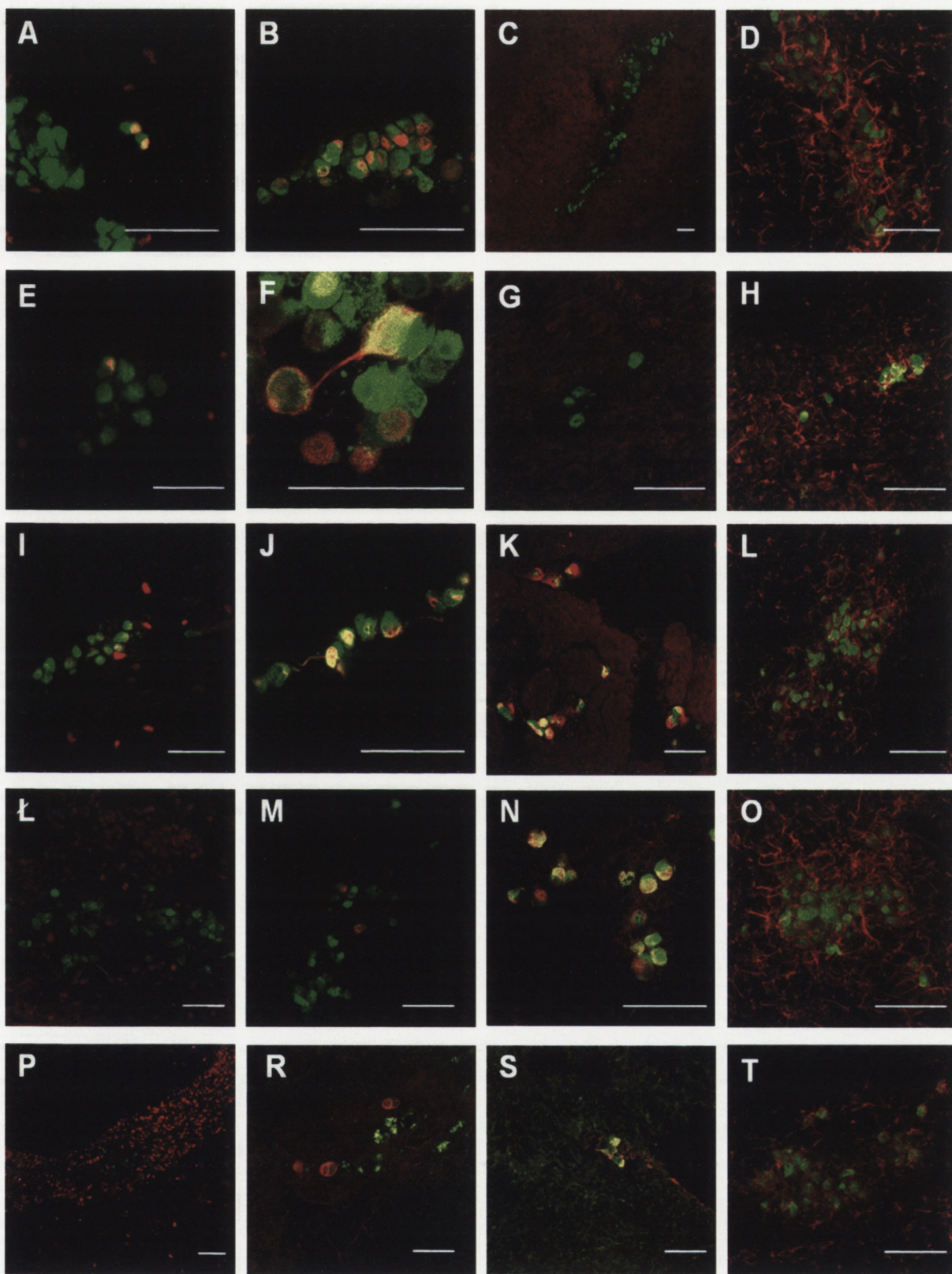
W pierwszych dniach po transplantacji HUCB-NSC, wśród komórek znajdujących się na obrzeżu wszczepu lub migrujących w tkance biorcy, widoczne były dzielące się komórki dawcy (Ki67⁺) (Ryc.52A,E). Po 7-14 dniach nie obserwowano proliferacji HUCB-NSC ani w miejscu wszczepu komórek, ani wśród komórek, które odmigrowały z miejsca podania (Ryc.52I,Ł). Jedynymi komórkami aktywnymi mitotycznie po 3 tygodniach obserwacji były endogenne prekursor neuralne zlokalizowane w strefie SVZ (Ryc.52P).

Badając markery charakterystyczne dla komórek neuralnych w celu oceny stopnia zróżnicowania przeszczepionych HUCB-NSC okazało się, że w ciągu pierwszego tygodnia, w obrębie wszczepu większość komórek dawcy pozostawała niezróżnicowana (Nestyna⁺). Po 1-3 dniach niektóre z przeszczepionych HUCB-NSC wykazywały fenotyp wczesnych neuronów (Ryc.52B,F), bądź komórek GFAP⁺ (Ryc.52D,H). Po 7 dniach od transplantacji, wśród migrujących HUCB-NSC, obok komórek NF200⁺ (Ryc.52J) pojawiały się komórki o charakterze bardziej dojrzałych neuronów (TUJ1⁺) (Ryc.52K), widoczne w tkance biorcy również po 2 i 3 tygodniach (Fig.52N,S). W tym czasie obserwacji brak było HUCB-NSC ekspresjonujących GFAP⁺ (Ryc.52L,O,T).

W czasie 4-5 tygodni pojedyncze komórki HUCB-NSC przeszczepione do mózgu osesków szczura, identyfikowane przy pomocy przeciwciał specyficznych dla antygenów komórek ludzkich NuMa pojawiały się w miejscach odległych od miejsca podania, prezentując fenotyp dojrzałych neuronów (MAP2) (Ryc.53A,B). Wśród HUCB-NSC nie obserwowano komórek wykazujących markery charakterystyczne dla astrocytów: GFAP, S100β (Ryc.53C,D).



Ryc.53 Komórki HUCB-NSC po transplantacji do strefy SVZ noworodka szczura. Obraz w mikroskopie konfokalnym 4-5 tygodni po przeszczepie; analiza immunohistochemiczna po zastosowaniu przeciwciała anty-NuMa (**A-D**) (kolor czerwony); anty-MAP2 (**A,B**) (kolor zielony); anty-GFAP (**C**) (kolor zielony), anty-S100β (**D**) (kolor zielony). Komórki HUCB-NSC znakowane NuMa z kolokalizacją poszczególnych białek neuralnych (kolor żółty). Skala 20 μm.



Ryc.52 Komórki HUCB-NSC po transplantacji do strefy SVZ noworodka szczura. Obraz w mikroskopie konfokalnym 24 godziny (**A-D**), 3 dni (**E-H**), 7 dni (**I-L**), 14 dni (**Ł-O**) i 21 dni (**P-T**) po przeszczepie; analiza immunohistochemiczna po zastosowaniu przeciwciała anti-Ki67 (**A,E,I,Ł,P**) (kolor czerwony); anti-NF200 (**B,F,J,M,R**) (kolor czerwony); anti-TUJ1 (**C,G,K,N,S**) (kolor czerwony); anti-GFAP (**D,H,L,O,T**) (kolor czerwony). Komórki HUCB-NSC znakowane CMFDA (**A-T**) (kolor zielony) z kolokalizacją poszczególnych białek neuralnych (kolor żółty). Skala 50 μ m.

VI. DYSKUSJA WYNIKÓW

Badania nad wykorzystaniem neuralnych komórek macierzystych w terapii komórkowej schorzeń neurologicznych, są w ostatnich latach jedną z wiodących dziedzin neurobiologii. Priorytetem badań *in vitro* stało się ukierunkowanie komórek prekursorowych, zdolnych do odtworzenia *in vivo* populacji zróżnicowanych komórek potomnych o charakterystyce określonej potrzebami danej jednostki chorobowej. Trudności spowalniające rozwój terapii komórkowej, dotyczą niedostatecznej znajomości mechanizmów regulujących proliferację i ukierunkowane różnicowanie neuralnych komórek macierzystych zarówno *in vitro* jak i *in vivo*.

Wyniki moich badań jak również doniesienia literaturowe świadczą o tym, iż mikrośrodowisko ma wpływ na potencjał proliferacyjny, przeżycie i różnicowanie progenitorów neuralnych (Lim i Alvarez-Buylla, 1999; Lindvall i Hagel, 2002; Song i wsp., 2002a; Baizabal i wsp., 2003; Chang i wsp., 2003; Nakayama i wsp., 2003; Bernal i Peterson, 2004; Kim i wsp., 2004; Newman i wsp., 2006; Chen i wsp., 2007). W badaniach stanowiących przedmiot mojej rozprawy doktorskiej wykorzystane zostały ludzkie neuralne komórki macierzyste wyizolowane z krwi pępowinowej (HUCB-NSC) (Bużańska i wsp., 2002). Dostępność progenitorów neuralnych z otrzymanej w naszym laboratorium stabilnej, nietransformowanej linii komórkowej, pozwoliła na stworzenie układów doświadczalnych, które mogą być wykorzystane w badaniach procesu neurogenezy *in vitro* i *in vivo*.

Komórki HUCB-NSC charakteryzuje zdolność do nieograniczonego wzrostu w warunkach *in vitro* oraz klonogenność (Bużanska i wsp., 2006b). Cechy te, jak również ekspresja genów Oct3/4, Rex1, Sox2, będących regulatorami pluripotencjalności świadczą o embrionalnym charakterze HUCB-NSC (D'Amour i Gage, 2003; McGuckin i wsp., 2005; Habich i wsp., 2006; Jurga i wsp., 2006; McGuckin i wsp., 2008). Jednak w przeciwieństwie do komórek embrionalnych, somatyczne HUCB-NSC są stabilne genetycznie, nie wykazują aberracji chromosomalnych (Bużańska i wsp., 2006a), a przeszczepione do myszy NOD/SCID nie powodują rozrostu nowotworowego (dane niepublikowane). Ekspresja wczesnych (OTX1, NeuroD1, MSI1, Nestyna, GFAP, NF200) i późnych genów neuralnych (MAP2) oraz jednoczesny brak ekspresji genów charakterystycznych dla komórek mezodermalnych (Tgene) i endodermalnych (FoxA1) potwierdza multipotencjalny charakter HUCB-NSC, czego dowodem jest ich różnicowanie w trzy typy neuralne w warunkach stymulacji *in vitro* (Bużańska i wsp., 2006a; Jurga i wsp., 2006). Badania elektrofizjologiczne wykazały w zróżnicowanych komórkach HUCB-NSC potencjał spoczynkowy oraz obecność potencjało-zależnych prądów potasowych (Sun i wsp., 2006). Stwierdzono również aktywność receptorów dopaminergicznych, glutamatergicznych i serotonergicznych (Bużańska i wsp., 2006b). Świadczy to o możliwości funkcjonalnego różnicowania HUCB-

NSC w komórki o charakterze neuronów, co jest niezwykle istotne w kontekście ich ewentualnego zastosowania w klinice.

Próby eksperymentalne z zastosowaniem somatycznych komórek macierzystych izolowanych z tkanek dojrzałych organizmów nie przyniosły jednoznacznych wyników w terapii regeneracyjnej. W dalszym ciągu pozostaje niejasne, które z komórek, będące na różnym etapie rozwoju byłyby najbardziej właściwe do transplantacji. Dane literaturowe są niespójne i kontrowersyjne. W chorobach neurodegeneracyjnych tj. choroba Parkinsona pozytywne wyniki uzyskano przeszczepiając bardziej zróżnicowane neurony dopaminergiczne lub ich prekursorzy (Björklund i wsp., 2002; Kim i wsp., 2002; Barberi i wsp., 2003). Jednocześnie wiadomo, że tylko komórki macierzyste i ich progenitory wykazują zdolność migracji i proliferacji, co umożliwia ich stosowanie w schorzeniach, którym towarzyszą rozsiane deficyty neuralne. Poznanie mechanizmów kontrolujących zachowanie somatycznych komórek macierzystych w ich naturalnym środowisku może być decydującym elementem w przełamaniu istniejących trudności ekspansji, zasiedlania i aktywnego udziału egzogennych komórek macierzystych przeszczepianych w celu regeneracji uszkodzonych struktur nerwowych.

Dotychczasowe wyniki badań *in vivo* są fragmentaryczne z uwagi na krótki czas przeżycia ludzkich komórek macierzystych w OUN dorosłych zwierząt, spowodowany ich eliminacją przez komórki immunologiczne biorcy (Kogler i wsp., 2004; Walczak i wsp., 2004; Kuh i wsp., 2005; Pan i wsp., 2005; Liu i wsp., 2006; Kozłowska i wsp., 2007). Stąd poszukiwanie układów doświadczalnych *in vitro*, które pozwoliłyby lepiej poznać mechanizmy warunkujące proliferację i różnicowanie komórek po ich transplantacji do struktur ośrodkowego układu nerwowego bądź stymulację progenitorów neuralnych i ich ukierunkowane dojrzewanie przed podaniem biorcom.

Zaproponowany w moich badaniach układ eksperymentalny współhodowli HUCB-NSC z komórkami izolowanymi z mózgu osesków szczura (astrocyty, komórki mikrogleju, neurony) i komórkami śródbłonna naczyń włosowatych, miał za zadanie przeanalizowanie niektórych z tych aspektów. Wybór komórek, stanowiących mikrośrodowisko dla neuralnych komórek macierzystych był nieprzypadkowy, gdyż stanowią one naturalne elementy niszy w mózgu u dorosłych osobników, gdzie ma miejsce proces endogennej neurogenezy (Jordan i wsp., 2007; Ihrie i Alvarez Buylla, 2008). Ponadto badania te, poprzez zastosowanie znormalizowanych warunków hodowli komórek, prowadzone *in vitro* pozwoliły wyeliminować immunologiczną reakcję organizmu biorcy, która w sytuacji *in vivo* prowadzi do ostrego odrzucenia ksenogenicznych przeszczepów. Komórki glejowe, do niedawna postrzegane jako komórki podporowe w mózgu, modulują środowisko wokół neuronów zarówno przez kontakt jak i wydzielane czynniki. Wykazano, że astrocyty regulują przeżycie, ekspansję, selekcję i ukierunkowane różnicowanie zarówno somatycznych (Lim i Alvarez-Buylla, 1999;

Song i wsp., 2002a; Korneyei i wsp., 2005; Reali i wsp., 2006) jak i embrionalnych (Nakayama i wsp., 2003) komórek macierzystych zwierząt. W procesie neurogenezy aktywnie uczestniczą astrocyty nie tylko wyizolowane z rozwijającego się OUN, ale także obecne w mózgu dorosłych osobników (Song i wsp., 2002b)

Wyniki moich badań wykazały stymulację proliferacji i dojrzewania współhodowanych HUCB-NSC. Jednocześnie obniżał się procent komórek ekspresjonujących Nestynę. Obecność astrocytów izolowanych z mózgu osesków szczura przyspieszała różnicowanie HUCB-NSC w kierunku neuronalnym. Wśród komórek HUCB-NSC hodowanych na podłożu astrocytów, zaobserwowano wzrost komórek NF200-, TUJ1- i MAP2-pozytywnych, natomiast zmniejszenie się udziału komórek S100 β -pozytywnych w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi w medium. Tak, więc różnicowanie HUCB-NSC we współhodowli z astrocytami wykazało wyraźną przewagę neurogenezy nad astrogenezą.

Podobnie hodowle komórek macierzystych szpiku kostnego zdrowych dawców w obecności astrocytów izolowanych z mózgu płodów skutkowały różnicowaniem progenitorów w komórki wykazujące ekspresję markerów typowych dla neuronów tj. NSE, NeuN (Reali i wsp., 2006). Obserwacje te są zgodne z wynikami badań Song'a i wsp. (2002a), którzy wykazali pozytywny wpływ astrocytów hipokampa nowonarodzonych szczurów na proliferację neuralnych komórek macierzystych izolowanych z mózgu dorosłych szczurów i ich ukierunkowanie neuronalne. Ponadto autorzy zademonstrowali regionalną specyficzność astrocytów izolowanych z różnych miejsc OUN w pobudzaniu neurogenezy w warunkach *in vitro*. Astrocyty otrzymane z hipokampa były najbardziej aktywne, podczas gdy astrocyty izolowane z rdzenia kręgowego nie wykazywały aktywności promocyjnej. Ponadto neuralne komórki macierzyste izolowane z hipokampa dorosłych szczurów współhodowane z astrocytami różnicowały się w funkcjonalnie aktywne dojrzałe neurony. Komórki te wykazywały potencjał elektryczny, tworzyły sieć z aktywnymi połączeniami synaptycznymi (Song i wsp., 2002b). Nasze wstępne badania astrocytów pochodzących z hipokampa, kory mózgowej i prądkowia osesków szczura nie wykazały istotnych różnic w stymulacji neurogenezy HUCB-NSC (dane niepublikowane).

Z badań Lim i Alvarez-Buylla (1999) wynika, że poziom neurogenezy komórek macierzystych izolowanych ze strefy SVZ nowonarodzonych lub dorosłych myszy hodowanych w obecności astrocytów był porównywalny z obserwowanym *in vivo*. Proliferyjące *in vitro* prekursor neuralne SVZ tworzyły na podłożu astrocytów agregaty zawierające neuroblasty. Wyniki badań Nakayama i wsp. (2003) wskazują, że tworzenie agregatów i wstępne różnicowanie progenitorów neuralnych jest konieczne do osiągnięcia przez nie stanu wrażliwości na sygnały neurogenne uwalniane przez astrocyty. Pomimo, iż obserwacje wielu autorów potwierdzają udział astrocytów w dojrzewaniu neuronów, niewiele wiadomo na temat czynników odpowiedzialnych za ten proces.

Lim i Alvarez-Buylla (1999) postulują, że bezpośredni kontakt z astrocytami jest niezbędny do proliferacji prekursorów neuralnych SVZ i ich różnicowania w neurobasty. Udział czynników humoralnych w promowaniu neurogenezy przez astrocyty nie jest jasny. Supernatanty z hodowli astrocytów nie wykazywały żadnego efektu w stosunku do neuralnych komórek macierzystych izolowanych od dorosłych zwierząt (Lim i Alvarez-Buylla, 1999; Környei i wsp., 2005) natomiast bezpośredni kontakt progenitorów neuralnych z astrocytami powodował różnicowanie w neurony (Song i wsp., 2002; Nakayama i wsp., 2003). Z badań wielu autorów wynika, że astrocyty prezentują na swojej powierzchni białka przez nieuwalniając jak również cytokiny, czynniki wzrostu, neurotransmitery wydzielane przez inne komórki będące w ich otoczeniu lub dostarczane z krwią i płynem mózgowo-rdzeniowym w odpowiedzi na fizjologiczne lub patologiczne stymulatory. Wśród czynników neurogennych pochodzenia astrocytarnego, GDNF i FGF-2 stymulują proliferację, a Ng-1, Wnt, kwas retinowy powodują różnicowanie progenitorów neuralnych w kierunku neuronów (Bużańska i wsp., 2002; Ueki i wsp., 2005; Chen i wsp., 2005; Környei i wsp., 2005; Lie i wsp., 2005; Shetty i wsp., 2005).

Dane literaturowe wskazują, iż oprócz regulacji procesu neurogenezy na wcześniejszych jego etapach, astrocyty mają wpływ na dojrzałe neurony powodując wzrost aksonów czy tworzenie połączeń synaptycznych (Ma i wsp., 2005).

Wpływ komórek mikrogleju na proliferację i dojrzewanie progenitorów neuralnych w warunkach fizjologicznych nie był przedmiotem zbyt wielu badań, a nieliczne informacje, które można znaleźć w literaturze są w wielu przypadkach kontrowersyjne. Wydaje się, że komórki mikrogleju mogą działać jak „miecz obosieczny” wywierając na neurogenezę efekt korzystny bądź niekorzystny, w zależności od stopnia aktywacji (Walton i wsp., 2006; Ziv i wsp., 2006; Cacci i wsp., 2008).

W moich badaniach obecność komórek mikrogleju mózgu osesków szczura powodowała przyspieszenie różnicowania HUCB-NSC, co było widoczne poprzez obniżenie liczby komórek Nestyno-pozytywnych. Jednocześnie obserwowany był wzrost liczby komórek ekspresjonujących markery neuronalne i astrocytarne w porównaniu do wartości kontrolnych jakkolwiek porównanie względnych tendencji kierunku różnicowania progenitorów neuralnych współhodowanych z komórkami mikrogleju, nie wykazało wyraźnej przewagi ukierunkowania HUCB-NSC do różnicowania w neurony czy astrocyty.

Podobne wyniki otrzymali Cacci i wsp. (2008). W tych badaniach niestymulowane komórki mikrogleju mózgu szczura manifestowały zarówno neurogeny jak i gliogeny efekt w stosunku do neuralnych komórek macierzystych izolowanych z płodów lub dorosłych myszy. Wydaje się, że w przypadku oddziaływania mikrogleju bezpośredni kontakt z progenitorami neuralnymi nie jest konieczny, a za promocję różnicowania w kierunku neuronów są odpowiedzialne uwalniane neurotrofiny (Walton i wsp., 2006). Obserwacje

Aarum i wsp. (2003) wykazały, że medium kondycjonowane znad komórek mikrogleju izolowanych z mózgu płodów myszy powoduje dojrzewanie neuralnych komórek macierzystych w neurony w widoczną ekspresją β Tubuliny III.

Informacje na temat regulacji procesu neurogenezy przez neurony są bardzo ograniczone. Wu i wsp. (2003) opisali zahamowanie powstawania nowych neuronów z progenitorów nabłonka węchowego myszy hodowanych w obecności dojrzałych neuronów. Według autorów odpowiedzialnym za mechanizm zwrotny jest czynnik wzrostu i różnicowania (GDF11), znany również jako białko wzrostowe kości (BMP11), odgrywające istotną rolę w kontroli procesu neurogenezy (Ge i wsp., 2005). Negatywną autoregulację neurogenezy przez dojrzałe neurony potwierdziły także badania Hastings i Gould (2003). Mechanizm ten wydaje się być istotnym ograniczeniem liczby neuronów powstających podczas rozwoju OUN.

W moich badaniach, obecność neuronów mózgu osesków szczura zmieniała kierunek różnicowania neuralnych komórek macierzystych krwi pępowinowej. We współhodowli z neuronami HUCB-NSC różnicowały się głównie w oligodendrocyty. Procent komórek wykazujących marker O4 był piętnastokrotnie wyższy w porównaniu z HUCB-NSC hodowanymi w medium. Wyniki naszych badań są zgodne z opisanymi przez innych autorów. W ciągu 6 dni współhodowli z neuronami izolowanymi z mózgu nowonarodzonych szczurów większość syngenicznych neuralnych komórek macierzystych hipokampa dorosłych osobników wykazywało ekspresję białka RIP, charakterystycznego dla dojrzałych oligodendrocytów (Song i wsp., 2002a). Proces oligodendrogenyzy był stymulowany zarówno przez neurony izolowane z zakrętu zębatego jak i z całego rejonu hipokampa. Z badań innych autorów wynika, że neurony kontrolują proces mielogenezy, stymulując proliferację prekursorów oligodendrocytów (OPC) i przedłużają przeżycie dojrzałych komórek (Bares i Raff, 1999; Simons i Trajcovic, 2006). Na różnicowanie i dojrzewanie komórek oligodendrocytarnych wpływają liczne czynniki wydzielane przez komórki neuralne (Tessier-Lavigne i Goodman, 2000; Hunt i wsp., 2002).

Chang i wsp. (2003) wykazali w swoich badaniach, że neurony mogą promować proces różnicowania komórek macierzystych w kierunku neuronalnym. Autorzy przeprowadzili analizę czynników troficznych uwalnianych przez neurony, które mogą wpływać na profil różnicowania współhodowanych komórek macierzystych. Analiza Western blot białek obecnych w medium znad hodowli neuronów (NCM ang. neuronal condition medium) izolowanych z mózgu nowonarodzonych szczurów wykazała obecność BDNF i NT3, zaangażowanych w różnicowanie komórek w neurony oraz BMP, związanych z różnicowaniem zarówno w neurony jak i astrocyty. Komórki macierzyste mózgu płodów szczura hodowane w obecności NCM manifestowały wzrost ekspresji czynników transkrypcyjnych z rodziny bHLH (ang. basic Helix-Loop-Helix) tj neurogenina-1 (Ngn1) czy

NeuroD, będących czynnikami promującymi proces neurogenezy. Jednocześnie obniżała się ekspresja genów dla czynników transkrypcyjnych wykazujących działanie hamujące w procesie neurogenezy tj. Hes-1 (Chang i wsp. 2003). W naszych badaniach wśród HUCB-NSC hodowanych w obecności neuronów mózgu szczura obserwowano procentowy wzrost komórek o charakterze wczesnych neuronów z obecnością białka NF200, natomiast udział komórek TUJ1- i MAP2-pozytywnych nie zmieniał się w porównaniu z HUCB-NSC pozostającymi w medium.

Komórki śródbłonka stanowią obok astrocytów, komórek mikrogleju i dojrzałych neuronów integralne elementy niszy neuralnej. Komórki macierzyste usytuowane w sąsiedztwie naczyń krwionośnych są pod wpływem działania czynników krwi transportowanych przez barierę krew-mózg. Z doniesień literatury wynika, że komórki śródbłonka kontrolują proces neurogenezy i utrzymanie multipotencjalności progenitorów neuralnych (Shen i wsp. 2004; Wurmser i wsp. 2004; Mathieu i wsp., 2006; Conover i Notti, 2007).

Z naszych badań wynika, że hodowla HUCB-NSC na podłożu komórek endotelialnych linii t-End powoduje stymulację ich proliferacji w stosunku do progenitorów neuralnych hodowanych w medium. Współczynnik proliferacji HUCB-NSC w obecności komórek śródbłonka był wyższy niż w środowisku astrocytów czy komórek mikrogleju. Podobnie Shen i wsp. (2004) wykazali zwiększony potencjał proliferacyjny neuralnych komórek macierzystych myszy hodowanych w obecności komórek śródbłonka linii MbEnd. Neuralne komórki macierzyste współhodowane z komórkami śródbłonka tworzyły klony niezróżnicowanych komórek, ekspresjonujących markery wczesnych progenitorów: Nestynę i LeX. Zastosowanie we współhodowli komórek macierzystych mózgu płodów myszy i komórek śródbłonka linii MbEnd, półprzepuszczalnych membran, pozwalających na przepływ czynników uwalnianych przez komórki podłoża, a zapobiegających bezpośredniemu kontaktowaniu się komórek, spowodowało zwiększenie proliferacji progenitorów neuralnych z jednoczesnym zahamowaniem ich różnicowania (Shen i wsp., 2004). Badania Guo i wsp. (2007) potwierdziły te obserwacje. Komórki śródbłonka, izolowane z naczyń włosowatych mózgu szczura, hodowane z umieszczonymi na błonach półprzepuszczalnych neuralnymi komórkami macierzystymi, stymulowały ich samoodnowę, hamując różnicowanie. Podobnie wyniki badań prowadzonych w naszym zespole z zastosowaniem membran półprzepuszczalnych w hodowli neurosfer neuralnych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej (N-HUCB-NSC) i komórek śródbłonka t-End wykazały zahamowanie aktywacji komórek i ich różnicowania w obrębie neurosfery (Jurga - praca doktorska).

Z obserwacji Shen i wsp. (2004) wynika, że hodowle neuralnych komórek macierzystych w obecności komórek śródbłonka, zapewniające ich bezpośredni kontakt skutkowały zarówno proliferacją komórek w klonie jak i ich różnicowaniem w neurony. Wyniki

badania innych autorów wykazały wpływ komórek śródbłonka na dojrzewanie progenitorów w astrocyty (Huaiyu i wsp., 2001; Dong i wsp., 2007; Imura i wsp., 2008). W moich badaniach HUCB-NSC hodowane w obecności komórek endotelialnych linii t-End miały z nimi bezpośredni kontakt, ale były także pod wpływem uwalnianych przez nie mediatorów, czego efektem była zarówno proliferacja komórek ludzkich jak ich nieznaczne różnicowanie w kierunku zarówno neuronalnym jak astrocytarnym.

Wśród czynników uwalnianych przez komórki śródbłonka, które mogą być odpowiedzialne za regulację procesu neurogenezy autorzy postulują: Notch, PEDF, ułatwiające proliferację neuralnych komórek macierzystych oraz BDNF, VEGF, BMP stymulujące powstawanie neuronów i astrocytów. Badania *in vitro* ujawniły obecność tych czynników uwalnianych przez komórki śródbłonka i ich działanie na komórki macierzyste (Wurmser i wsp., 2004; Dong i wsp., 2007; Jordan i wsp., 2007; Milner, 2007; Imura i wsp., 2008; Teng i wsp., 2008). Wydaje się, iż fizjologicznie komórki śródbłonka mogą być odpowiedzialne za utrzymanie komórek macierzystych w niszy w stanie uśpienia.

Podsumowując ten etap moich badań wykazaliśmy, że określone typy komórek OUN oddziałują w sposób wysoce selektywny na decyzje rozwojowe neuralnych komórek macierzystych. Po wstępnym ustaleniu warunków hodowli pierwotnych, izolowanych z mózgu osesków szczura astrocytów, komórek mikrogleju i neuronów oraz komórek śródbłonka obecność tych komórek promowała proliferację HUCB-NSC lub ich różnicowanie w określone typy neuralne. Astrocyty stymulowały fenotyp neuronalny współhodowanych komórek macierzystych z krwi pępowinowej. Obecność w podścielisku neuronów zwiększała bardzo znacznie różnicowanie HUCB-NSC w oligodendrocyty. Hodowle komórek mikrogleju lub komórek endotelialnych nie powodowały preferencji kierunku różnicowania progenitorów neuralnych, nieznacznie przyspieszając tworzenie zarówno neuronów jak astrocytów. Interesującym wydaje się fakt, iż w środowisku komórek śródbłonka HUCB-NSC wykazują najniższy potencjał do różnicowania, zaś w obecności neuronów osiągają najwyższy współczynnik proliferacji. Powyższe wyniki badań pozwalają sądzić, iż komórki macierzyste znajdują się *in vivo* pod silnym wpływem mikrośrodowiska. W niszach neuralnych, których modelem *in vitro* jest zaproponowany przez nas układ doświadczalny współhodowli NKM z ludzkiej krwi pępowinowej w obecności komórek OUN gryzoni dochodzi do interakcji pomiędzy progenitorami neuralnymi a komórkami „opiekuńczymi”, które dostarczają sygnały konieczne do wyboru ścieżki ekspansji, selekcji lub ukierunkowanego różnicowania.

Należy bardzo wyraźnie podkreślić, iż pomimo dużej liczby cytowanych prac innych autorów, uzyskane przez nas wyniki są unikalne z uwagi na to, iż badania te były przeprowadzane na nietransformowanych neuralnych komórkach macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej. Jednorodny materiał, jaki stanowią HUCB-NSC ustalonej linii, zapewnia powtarzalność otrzymanych wyników. Wykazane przez nas podobieństwa i różnice w

stosunku do komórek macierzystych izolowanych od zwierząt czy ludzi mogą być bardzo cenne w ustalaniu procedur terapeutycznych wykorzystaniem komórek macierzystych.

Zmiany środowiska, jakie towarzyszą chorobom i urazom OUN, mogą wpływać na potencjał proliferacyjny neuralnych komórek macierzystych, ich przeżycie, migrację czy kierunek różnicowania. Nasza wiedza na ten temat jest ciągle znikoma, co stanowi podstawowy problem w osiągnięciu zadawalających wyników zarówno w próbach stymulacji endogennej neurogenezy jak i transplantacji komórek macierzystych w doświadczalnych stanach patologicznych OUN u zwierząt. Wyniki badań *in vivo* wykazały zahamowanie neurogenezy w procesach zapalnych OUN (Vallieres i wsp., 2002; Ehdahl i wsp., 2003; Monje i wsp., 2003). Z badań eksperymentalnych wynika, że w następstwie uszkodzenia lub procesów chorobowych w układzie nerwowym aktywacji ulegają astrocyty i komórki mikrogleju. W warunkach fizjologicznych komórki glejowe odgrywają pozytywną rolę w procesie neurogenezy, co potwierdziliśmy także w swoich dotychczasowych badaniach. Aktywowane astrocyty i komórki mikrogleju ulegają zmianom morfologicznym. Zmienia się też profil produkowanych i uwalnianych przez nie czynników, które mogą oddziaływać neurotoksycznie na sąsiadujące z nimi progenitory neuralne. Sterowanie efektem komórek glejowych wymaga poznania mechanizmów oddziaływań międzykomórkowych. Dość dobrym przybliżeniem takich oddziaływań jest zastosowanie substancji indukujących proces zapalny (LPS) czy działających neurotoksycznie (TMT), które dodawane do hodowli mogą naśladować reakcje towarzyszące procesom patologicznym *in vivo*.

Stymulacja astrocytów i komórek mikrogleju, wywołana dwiema niezależnymi substancjami: LPS i TMT, wykazała w moich badaniach odmienne oddziaływanie komórek glejowych na komórki HUCB-NSC, w porównaniu do hodowli tych komórek w obecności niestymulowanych astrocytów i komórek mikrogleju.

Astrocyty aktywowane *in vitro* LPS lub TMT hamowały proliferację komórek HUCB-NSC. Stymulacja komórek podłoża LPS lub TMT miała także silny wpływ na przyspieszenie i wybór ścieżki różnicowania progenitorów neuralnych. Wspóhodowla HUCB-NSC z astrocytami stymulowanymi LPS bądź TMT powodowała obniżenie różnicowania progenitorów neuralnych w neurony, natomiast promowała powstawanie astrocytów. Może to mieć związek z nadprodukcją IL-1 i IL-6, które stymulują wzrost astrocytów, ich różnicowanie i dojrzewanie (Barbeito i wsp., 2004; Aschner, 1998). Obserwowana jest wtedy wzmożona immunoreaktywność białka GFAP ekspresjonowanego w aktywowanych astrocytach (Lee i wsp., 1995). Podwyższoną ekspresję GFAP w astrocytach po stymulacji LPS lub TMT stwierdziliśmy także w naszych doświadczeniach.

Aktywne astrocyty odznaczają się dużym potencjałem wydzielniczym. Okazało się, że produkują zarówno czynniki zwiększające przeżywalność neuronów i regenerację, jak

również substancje zaangażowane w uszkodzenie neuronów. W początkowym okresie aktywowane astrocyty uwalniają czynniki, które biorą udział w mobilizacji endogennych progenitorów neuralnych (Viviani i Marinovich, 2005). Wykazano, że reaktywny astroglej może odznaczać się podwyższoną syntezą CNTF, który stymulując produkcję FGF-2 korzystnie wpływa na przeżywalność neuronów (Albrecht i wsp., 2003). Ponadto aktywne astrocyty produkują czynnik wzrostu nerwów (Oderfeld-Nowak i wsp., 1992) oraz IL-4 i IL-10 wykazujące działanie neuroprotekcyjne (Hulshof i wsp., 2002). Przedłużająca się aktywacja komórek glejowych może hamować neurogenezę na skutek uwolnienia cytokin pro-zapalnych tj. IL-1, IL-6, TNF α , które upośledzają proliferację i zwiększają apoptozę nowopowstałych neuronów (Nakayama i wsp., 2003, Norenberg, 2005). Przewlekły wzrost poziomu TGF β towarzyszący urazom OUN a spowodowany długotrwałą jego produkcją przez aktywowane astrocyty hamował niemal całkowicie powstawanie neuronów u myszy (Buckwalter i wsp., 2006). W chorobach neurodegeneracyjnych, w wyniku których następuje uszkodzenie neuronów i komórek glejowych obserwuje się obniżenie procesu neurogenezy w związku z ujemnym bilansem czynników wykazujących działanie promujące i hamujące. Zmniejszenie stężenia czynników neurotropowych w tkance nerwowej opisywano w chorobach Parkinsona (GDNF, BDNF, CNTF), Alzheimerza (BDNF, NGF), Huntingtona (BDNF), ALS (NGF). Jednocześnie stwierdzono obecność czynników hamujących wzrost neuralnych komórek macierzystych tj. glikoproteiny związane z mieliną, siarczan proteoglikanu chondroityny a także semaforyny i efryny, które hamują regenerację połączeń neuronalnych (Kielan i Drew, 2005).

Analiza wybranych cytokin pro-zapalnych w nadsączach z aktywowanych *in vitro* LPS lub TMT astrocytów w moich badaniach wykazała obecność IL-1 β , IL-6 i TNF α . Aktywność IL-1 β , IL-6 i TNF- α obserwowano również w supernatantach pochodzących z hodowli astrocytów mózgu myszy stymulowanych LPS (Cheung Hoi Yu i Lau 2000). Ekspresja genów IL-1 β i IL-6 w astrocytach potwierdza możliwość ich udziału w modulacji procesu neurogenezy (Barkho i wsp., 2006). Przewlekłym stanom zapalnym OUN wywołanym np. naświetlaniem towarzyszy nadekspresja IL-6 w aktywowanych astrocytach. Jednocześnie obserwuje się osłabienie procesu neurogenezy (Monje i wsp., 2003). Z badań autorów wynika, że IL-6 wpływa stymulująco na astrogenezę. Kosztem neuronogenezy, program różnicowania komórek macierzystych zostaje przestawiony na różnicowanie w kierunku glejowym. Inhibicja neuronogenezy przez negatywny wpływ IL-6 jest w głównej mierze spowodowana zablokowaniem różnicowania w neurony, a nie negatywnym wpływem na proliferację i indukcją szlaków apoptotycznych w komórkach (Monje i wsp., 2003). Potwierdzają tę opinię także nasze obserwacje. Zmiany apoptotyczne były widoczne jedynie w pojedynczych HUCB-NSC współhodowanych w obecności astrocytów aktywowanych LPS i TMT. Reaktywne astrocyty mogą także zwiększać uszkodzenie tkanki powstałe podczas

urazu uwalniając TNF α , który hamuje wzrost neurytów (Neumann i wsp., 2002) i produkując wolne rodniki tj. tlenek azotu, reaktywne formy tlenu (Chen i Swanson, 2003). W naszych badaniach po stymulacji astrocytów TMT stwierdziliśmy w nadsączach z hodowli obecność TNF α . Towarzyszył temu również wzrost NO.

Badania *in vitro* wykazują, że NO jest bezpośrednim czynnikiem cytostatycznym działającym na wiele typów komórek w tym także na neuroblasty (Murillo-Carretero i wsp., 2002). Postuluje się, że obecność NO w mózgu w warunkach fizjologicznych ogranicza proliferację neuralnych komórek macierzystych, utrzymując proces neurogenezy w obrębie strefy SVZ na określonym poziomie.

Wyniki badań eksperymentalnych *in vivo* demonstrują anty-proliferacyjny efekt działania NO jak również jego hamujący wpływ na proces neurogenezy (Cardenas i wsp., 2005). Doświadczenia *in vitro* z wykorzystaniem komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł wykazały supresyjny efekt działania NO na proliferację tych komórek (Packer i wsp., 2003; Michurina i wsp., 2004). Wydaje się, że NO stanowi czynnik kontrolujący namnażanie komórek ułatwiający jednocześnie ich różnicowanie. Działanie NO prawdopodobnie miało negatywny wpływ na proliferację HUCB-NSC w moich badaniach. Stymulacja LPS i TMT astrocytów skutkowała wzrostem syntezy NO, co wykazaliśmy w nadsączach znad hodowli komórek podłoża.

Istnieją jednak doniesienia, które dowodzą, że w warunkach patologicznych różnego pochodzenia, obserwuje się pozytywny wpływ NO na proliferację i różnicowanie progenitorów neuralnych w rejonie SVZ i opuszce węchowej. Ostatnie badania ujawniły, że istnieje wiele potencjalnych ścieżek działania NO, poprzez które regulowane są procesy proliferacji i różnicowania progenitorów neuralnych (Conover i Notti, 2008). Prawdopodobnie istnieją różne mechanizmy działania NO w zależności od rejonu neurogenego mózgu (SVZ, SGZ). Nie do końca poznany jest również wpływ patologicznych warunków środowiska na zmianę oddziaływania NO na komórki progenitorowe

Cytokiny pro-zapalne mogą także promować przeżycie i różnicowanie neuronów oraz chronić je przed uszkodzeniem. Prace eksperymentalne wykazały, że IL-1 β powoduje zwiększenie ekspresji NGF, co świadczy o pozytywnym wpływie aktywowanych astrocytów na przeżycie neuronów i proces regeneracji (Friedman i wsp., 1990; Spranger i wsp., 1990). Korzystny wpływ IL-6 uwalnianej przez astrocyty stymulowane LPS na neurony obserwowano w badaniach innych autorów (Gadient i Otten, 1997)

Komórki mikrogleju są bardziej wrażliwe na zmiany środowiska niż astrocyty, mogą ulegać aktywacji nawet bez obecności wyraźnych zmian neuropatologicznych w tkance. Do niedawna komórki mikrogleju, choć stanowią istotny składnik mikrośrodowiska mózgu, były ignorowane, jeśli chodzi o ich wpływ na neuralne komórki macierzyste. Procesy zapalne OUN ujawniły udział komórek mikrogleju w zahamowaniu neurogenezy (Ekdahl i wsp., 2003;

Liu i wsp., 2007). Autorzy prac wykazali, że aktywowany mikroglej pozostaje w bliskim sąsiedztwie nowo-powstałych prekursorów neuralnych w SGZ, a stopień ograniczenia neurogenezy zależy od poziomu aktywacji komórek mikrogleju. Obserwowano negatywną korelację pomiędzy liczbą aktywowanych komórek mikrogleju w strefie neurogennej, a liczbą przeżywających, nowopowstałych neuronów w hipokampie dorosłych szczurów po podaniu LPS (Ek Dahl i wsp., 2003). Aktywowane w wyniku ostrych procesów zapalnych komórki mikrogleju ograniczają przeżycie neuralnych komórek macierzystych, stymulują ich różnicowanie w astrocyty jednocześnie hamując powstawanie dojrzałych neuronów (Monje i wsp., 2003; Cacci i wsp., 2005). Komórki mikrogleju w przewlekłych stanach zapalnych nie miały wpływu na różnicowanie progenitorów neuralnych w kierunku astrocytarnym czy neuronalnym (Battista i wsp., 2006; Butovsky i wsp., 2006).

Obecność stymulowanych LPS bądź TMT komórek mikrogleju w moich badaniach powodowała obniżenie potencjału różnicowania HUCB-NSC w neurony i astrocyty. Porównanie względnych tendencji kierunku różnicowania HUCB-NSC w obecności stymulowanych komórek mikrogleju nie wykazała wyraźnej przewagi ukierunkowania progenitorów neuralnych do różnicowania w neurony czy astrocyty. Jednocześnie widoczny był wzrost różnicowania HUCB-NSC w oligodendrocyty. Aktywność proliferacyjna HUCB-NSC w obecności aktywowanych LPS czy TMT komórek mikrogleju była niższa w porównaniu do HUCB-NSC hodowanych na podłożu niestymulowanych komórek mikrogleju.

Następstwem aktywacji komórek mikrogleju jest znaczny wzrost wydzielania przez nie czynników humoralnych. Poziom tych czynników produkowanych przez mikroglej jest dużo wyższy niż w przypadku aktywowanych astrocytów. Niekorzystny efekt na neurogenezę mogą mieć uwalniane cytokiny pro-zapalne. Jedną z najwcześniejszych produkowanych przez komórki mikrogleju, w wyniku ich aktywacji, cytokin jest IL-1 β , a także IL-6, TNF α oraz LIF, LT, NO (Herx i Yang, 2001; Stoll i wsp., 2002).

Nakanishi i wsp., (2007) wykazali, że IL-6 i LIF uwalniane przez komórki mikrogleju zwiększają różnicowanie progenitorów neuralnych w astrocyty. Zastosowanie przeciwciał specyficznie neutralizujących IL-6 i LIF znacznie zredukowało gliogeny efekt działania kondycjonowanego medium z nad hodowli aktywowanych komórek mikrogleju. Badania innych autorów również wykazały, że cytokiny z rodziny IL-6 zmieniały kierunek różnicowania neuralnych komórek macierzystych z neuronalnego na astrocytarny (Taga i Fukuda, 2000). Wydaje się, że IL-6 może indukować preferencyjne różnicowanie multipotencjalnych progenitorów neuralnych w kierunku astrocytów niż neuronów. Alternatywnie, IL-6 może obniżać proliferację neuronalnych komórek progenitorowych lub stymulować ich apoptozę (Kemperman i Neumann, 2003).

Obecność IL-1 β , IL-6, TNF α , a także kilkakrotny wzrost ilości NO w nadsączach z hodowli komórek mikrogleju stymulowanych LPS lub TMT obserwowany w moich

doświadczeniach sugeruje, iż czynniki te mogą być odpowiedzialne za zahamowanie proliferacji i zmianę kierunku różnicowania HUCB-NSC *in vitro*. Jakkolwiek aktywacja mikrogleju jest procesem kompleksowym i dynamicznym to efekt oddziaływań na inne komórki zależy od wielu czynników. Z dotychczasowych badań wynika, że aktywowany mikroglej może oprócz działania neurotoksycznego działać protekcyjnie. W repertuarze substancji uwalnianych przez komórki mikrogleju są cytokiny przeciwzapalne tj. IL-4, IL-10, TGF β oraz czynniki neurotropowe tj. BDNF, NGF (Battista i wsp., 2006; Tanaka i wsp., 2006; Wachs i wsp., 2006; Muzio i wsp., 2007). Substancje te wspomagają przeżycie nowopowstałych neuronów, stymulują ich różnicowanie zarówno *in vitro* jak *in vivo*. Tak, więc opisywany przez wielu autorów efekt działania aktywnych komórek mikrogleju na neurogenezę jest uwarunkowany proporcją wydzielanych przez nie czynników.

Podsumowując tę część moich badań zaobserwowaliśmy, że stymulacja *in vitro* astrocytów i komórek mikrogleju LPS lub TMT powoduje produkcję cytokin pro-zapalnych: IL1 β , IL-6 i TNF α oraz zwiększenie poziomu NO uwalnianych do medium. Obecność w podłożu astrocytów stymulowanych LPS lub TMT przesuwają kierunek różnicowania HUCB-NSC z neuronalnego (obserwowanego w przypadku obecności astrocytów niestymulowanych) na astrocytarny. HUCB-NSC współhodowane z aktywowanymi LPS bądź TMT komórkami mikrogleju różnicują się w neurony i astrocyty, bez względnych tendencji kierunku różnicowania. Stymulują także różnicowanie HUCB-NSC w oligodendrocyty, czego nie obserwowaliśmy w przypadku niestymulowanych komórek mikrogleju. Otrzymane wyniki wskazują na zmianę oddziaływań komórek glijowych wcześniej stymulowanych LPS lub TMT na progenitory neuralne. Może to odzwierciedlać zaburzenia procesu neurogenety obserwowane w stanach patologicznych OUN.

Dotychczasowe nasze obserwacje *in vitro* dotyczące właściwości neuralnych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej i ich reaktywności w środowisku komórek OUN zachęciły do zweryfikowania przydatności HUCB-NSC jako materiału transplantacyjnego w badaniach *in vivo*. W oparciu o wcześniejsze doniesienia literaturowe i wyniki własne ograniczonego przeżycia komórek ludzkich po ich transplantacji u dorosłych zwierząt, spowodowanego silną odpowiedzią immunologiczną, do naszych badań jako biorców przeszczepu HUCB-NSC wybraliśmy nowonarodzone szczury, z uwagi na ich niedojrzały układ odpornościowy. Komórki HUCB-NSC zostały wstrzyknięte do strefy SVZ.

Miejsce transplantacji komórek macierzystych do OUN wpływa na ich dalsze losy. Progenitory neuralne wyizolowane z SVZ czy SGZ przeszczepione do rejonów neurogennych różnicowały się w neurony, a w strefach nieneurogennych - komórki glijowe (Hauwel i wsp., 2005). Podobnie, komórki macierzyste izolowane z rdzenia kręgowego po transplantacji do rdzenia przekształcały się w komórki glijowe, a przeszczepione do hipokampa różnicowały się w neurony ziarniste (Shihabuddin i wsp., 2000). Okazało się, że

różnice nie dotyczą tylko stref neurogennych i nieneurogennych, ale także w obrębie SVZ i SGZ różnicowanie progenitorów neuralnych ma charakter regiono-specyficzny (Emsley i wsp., 2005). Komórki wyizolowane z SVZ przeszczepione do hipokampa różnicowały się w neurony ziarniste, a progenitory neuralne SGZ po transplantacji do RMS przekształcały się w interneurony charakterystyczne dla opuszki węchowej (Arias-Carrion i wsp., 2007). Świadczy to o tym, że na kierunek różnicowania prekursorów neuralnych wpływa znacznie bardziej specyficzność mikrośrodowiska w danym rejonie mózgu niż ich cechy własne i predyspozycje. Co więcej, procesy patologiczne wywołane uszkodzeniem OUN czy chorobami neurodegeneracyjnymi mogą zmieniać strefy nieneurogenne w rejony o aktywnej neurogenezie.

Do takich rejonów należą: kora mózgowa, istota czarna, prążkowie, jądro migdałowe, rdzeń kręgowy (Emsley i wsp., 2005; Arias-Carrion i wsp., 2007). Stąd miejsca te powinno się raczej określać jako strefy potencjalnie neurogenne w odróżnieniu od SVZ i SGZ, które stanowią rejony naturalnie neurogenne (Ortega-Perez i wsp., 2007). Muszą jednak być spełnione pewne warunki umożliwiające występującym lokalnie endogennym komórkom macierzystym proliferację i różnicowanie, a nowo-powstałym neuronom przeżycie i integrację z istniejącymi strukturami nerwowymi (Arias-Carrion i wsp., 2007).

Celem transplantacji egzogennych komórek macierzystych w większości schorzeń neurologicznych jest repopulacja zniszczonych neuronów. Z badań eksperymentalnych wynika, że przeszczepienie progenitorów neuralnych do struktur neurogennych u zwierząt skutkuje ich różnicowaniem w kierunku neuronalnym. Wpłynęło to na wybór miejsca transplantacji HUCB-NSC do SVZ w naszych badaniach, tzn. do rejonu mózgu, w którym zachodzi proces endogennej neurogenezy przez cały okres życia osobniczego.

Przeszczepione do strefy SVZ osesków szczura ludzkie neuralne komórki macierzyste z krwi pępowinowej migrowały w mózgu biorców w kierunku światła komory bocznej tworząc wyraźne szlaki komórek w korze. Wśród pozostających na obrzeżu wszczepu lub migrujących HUCB-NSC widoczne były dzielące się komórki, jakkolwiek ich proliferację obserwowano tylko w pierwszym tygodniu po transplantacji.

Z danych literaturowych wiadomo, że progenitory neuralne ludzi i gryzoni oceniane *in vivo* i *in vitro* charakteryzują się niskim potencjałem mitotycznym. Z badań Englund i wsp. (2002) wynika, iż neuralne komórki macierzyste mózgu płodów ludzkich przeszczepione szczurom do strefy SVZ dzieliły się tylko jeden raz w czasie 4 tygodni trwania eksperymentu. Brak proliferacji można wyjaśnić przedstawieniem się przeszczepionych komórek macierzystych na tor różnicowania kosztem podziałów komórkowych.

W naszych badaniach, w pierwszych dniach po transplantacji większość HUCB-NSC pozostających we wszczepie była w stanie niezróżnicowanym natomiast pojedyncze migrujące komórki dawcy wykazywały fenotyp wczesnych neuronów (NF200⁺) bądź komórek

ekspresjonujących GFAP. Po 7 dniach obok komórek wykazujących wczesne markery neuronalne pojawiały się bardziej dojrzałe neurony (TUJ1⁺), które były widoczne w mózgu biorcy także po 3 tygodniach od transplantacji.

Przeszczepione HUCB-NSC przeżywały w mózgu szczura 4-5 tygodni. Pojedyncze z nich wykazywały wyższy stopień zróżnicowania neuronalnego, o czym świadczy obecność markera MAP2 i morfologia dojrzałych neuronów. Wśród HUCB-NSC nie obserwowano komórek o fenotypie astrocytów. Wydaje się, iż przeszczepianie HUCB-NSC do SVZ osesków szczura powodowało, iż wybierały one ścieżkę różnicowania neuronalnego tracąc swój potencjał do różnicowania w astrocyty. Komórki GFAP⁺ obserwowane wśród HUCB-NSC w początkowym okresie po ich przeszczepie stanowiły prawdopodobnie komórki macierzyste o charakterze astrocytarnym. Wydaje się, że specyficzne warunki panujące w strefie SVZ mogą wpływać na kierunek różnicowania HUCB-NSC. Potwierdzeniem tego są wyniki naszych badań, w których HUCB-NSC przeszczepiane były do komory bocznej mózgu nowonarodzonych szczurów. Komórki te różnicowały się zarówno w neurony jak i astrocyty (dane niepublikowane). Podobne obserwacje opisali Englund i wsp. (2000), neuralne komórki macierzyste izolowane z mózgow ludzkich płodów przeszczepiane do strefy SVZ szczura migrowały do opuszki węchowej i różnicowały się w neurony, natomiast wstrzyknięte do prądkowia wykazywały po 4 tygodniach fenotyp komórek astrocytarnych.

Pomimo iż model transplantacji komórek macierzystych z wykorzystaniem nowonarodzonych osesków szczura jest modelem immunologicznie uprzywilejowanym w porównaniu z wykorzystaniem zwierząt dorosłych, to jednak czas przeżycia komórek dawcy nie jest nieograniczony. Podobne wyniki badań otrzymali inni autorzy, czas przeżycia przeszczepionych komórek macierzystych wyizolowanych z mózgu płodów ludzkich lub krwi pępowinowej wynosił 4-6 tygodni (Zigova i wsp., 2000; Zigova i wsp., 2002; Hudson i wsp., 2004; Kelly i wsp., 2004; Coenen i wsp., 2005).

Układ ksenogeniczny stosowany do badań eksperymentalnych ludzkich komórek macierzystych w celu opracowania standardów transplantacyjnych jest wysoce niekorzystny, ale ze zrozumiałych względów jedyny możliwy. Transplantacje komórek macierzystych u dorosłych zwierząt niezgodnych gatunkowo wywołują odpowiedź immunologiczną gospodarza i w efekcie odrzucenie przeszczepionych komórek.

Przeszczepowi HUCB-NSC w naszych doświadczeniach towarzyszyła nieznaczna reakcja ze strony biorcy w postaci makrofagów/komórek mikrogleju (ED1⁺) pojawiających się w sąsiedztwie komórek dawcy tylko w pierwszych dniach po przeszczepie. Wydaje się, że była to raczej odpowiedź na uraz tkanki wywołany procedurą zabiegu niż reakcja związana z rozpoznaniem obcych antygenów, gdyż nowonarodzone zwierzęta pozbawione są mechanizmów efektorowych odpowiedzi immunologicznej, choć nie możemy wykluczyć tutaj reakcji nieswoistej.

Komórki macierzyste są słabo immunogenne. HUCB-NSC wykazują niską ekspresję antygenów HLA klasy I, nie mają antygenów HLA klasy II (dane niepublikowane), ale po transplantacji pod wpływem środowiska immunogenność ich może wzrastać. Zmiany konformacyjne własnych antygenów, wzrost antygenów zgodności tkankowej w związku z oddziaływaniem czynników uwalnianych przez komórki gospodarza i różnicowaniem komórek dawcy zwiększa immunogenność przeszczepionych komórek macierzystych (Yang XF, 2007). Ponadto wrodzone nieswoiste mechanizmy odporności humoralnej tj. naturalne przeciwciała klasy IgM i białka dopełniacza mogą być odpowiedzialne za eliminację przeszczepianych komórek (Larsson i wsp., 1999; Barker i wsp., 2000; Cascalho i Platt, 2001). W przeprowadzonych przeze mnie eksperymentach nie badaliśmy nieswoistej odpowiedzi humoralnej w mózgu biorców HUCB-NSC, choć jej udział wydaje się prawdopodobny zważywszy na ograniczone przeżycie komórek dawcy w dłuższym czasie.

Do niedawna istniał pogląd, że mózg jest miejscem uprzywilejowanym immunologicznie, umożliwiającym przedłużenie przeżycia przeszczepów. Obecnie wiadomo, że reakcje immunologiczne występujące w OUN mogą być porównywalne z obserwowanymi w innych narządach. Uraz chirurgiczny związany z przeszczepem komórek do mózgu powoduje, że bariera krew–mózg staje się przepuszczalna przez 7–14 dni dla mikrocząsteczek i aktywowanych komórek krwi (Brundin i wsp. 1989).

Uzyskane przez nas wyniki doświadczeń *in vivo* dotyczące sposobu przeszczepiania, dynamiki zasiedlania, przeżycia HUCB-NSC i ich różnicowania w mózgu mają charakter poznawczy i zachęcają do dalszych badań. Neuralnie ukierunkowane komórki macierzyste z ludzkiej krwi pępowinowej wyprowadzonej w naszym laboratorium linii, z uwagi na ich zdolność do samoodnowy i wielokierunkowego różnicowania, a także plastyczność i możliwość długotrwałej hodowli *in vitro*, mogą być źródłem terapii komórkowej w eksperymentalnych modelach chorób neurodegeneracyjnych oraz urazów mózgu i rdzenia kręgowego. Jakkolwiek, pomimo wstępnych obiecujących wyników z wykorzystaniem somatycznych komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł w badaniach eksperymentalnych, jest jeszcze za wcześnie na rozpoczęcie prób klinicznych. Najbardziej krytycznym punktem wydaje się opracowanie modeli zwierzęcych pozwalających na długotrwałe przeżycie przeszczepionych ludzkich komórek macierzystych w celu dokładnego prześledzenia mechanizmów ich różnicowania i wbudowywania nowych neuronów w struktury OUN. Dotychczasowe przekonanie o immunologicznym uprzywilejowaniu komórek macierzystych mózgu nie wytrzymało próby czasu, stąd konieczność zastosowania zwierząt transgenicznych z uogólnionym deficytem immunologicznym do prowadzenia dalszych badań przeszczepów ksenogenicznych.



VII. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Poszczególne typy komórek mózgu oddziałują *in vitro* w sposób selektywny na decyzje rozwojowe neuralnych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej:
 - astrocyty stymulują różnicowanie HUCB-NSC w neurony
 - komórki mikrogleju promują dojrzewanie HUCB-NSC zarówno w kierunku neuronalnym jak astrocytarnym
 - w obecności neuronów HUCB-NSC wykazują najwyższy współczynnik proliferacji, a ich prekursorzy preferencyjnie różnicują się w oligodendrocyty
 - komórki śródbłonna obniżają potencjał HUCB-NSC do różnicowania zachowując najwyższy procent progenitorów neuralnych w stanie nieodróżnicowanym
2. Stymulacja astrocytów LPS lub TMT powoduje zmianę kierunku różnicowania HUCB-NSC hodowanych w ich obecności z neuronalnego na astrocytarny, a po stymulacji komórek mikrogleju LPS lub TMT widoczny jest wzrost różnicowania współhodowanych z nimi HUCB-NSC w oligodendrocyty. W obu układach eksperymentalnych następuje zahamowanie proliferacji HUCB-NSC
3. Aktywacja astrocytów i komórek mikrogleju LPS lub TMT *in vitro* indukuje produkcję cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6 i TNF α oraz NO uwalnianych do podłoża hodowlanego
4. HUCB-NSC przeszczepione do strefy SVZ osesków szczura przeżywają w mózgu biorcy 4-5 tygodni, migrują, dzielą się i różnicują preferencyjnie w komórki o fenotypie neuronalnym
5. Komórki macierzyste ludzkiej krwi pępowinowej ukierunkowane neuralnie mogą być źródłem terapii komórkowej w schorzeniach neurologicznych. Wprowadzenie tych komórek do kliniki wymaga bardziej szczegółowych badań eksperymentalnych na modelach zwierzęcych, pozwalających na długotrwałe obserwacje w celu prześledzenia dojrzałości funkcjonalnej nowopowstałych neuronów i ich integracji z otaczającą tkanką
6. W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że specyficzność mikrośrodowiska OUN wyznacza dalsze losy neuralnych komórek macierzystych. Wyniki naszych badań mają charakter fenomenologiczny, są jednak instruktywne dla zrozumienia reakcji neuralnych komórek macierzystych po ich transplantacji do mózgu. Mogą również stanowić cenny model badawczy dla dalszej identyfikacji ciągle słabo poznanych sygnałów mikrośrodowiska, oddziałujących na endogenne progenitory neuralne w stanach patologicznych OUN



VIII. PIŚMIENNICTWO

- Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA. (2003) Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(26):15983-8
- Aberg MA, Aberg ND, Hedbäcker H, Oscarsson J, Eriksson PS. (2000) Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J Neurosci*. 20(8):2896-2903
- Ahn S, Joyner AL. (2005) In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to sonic hedgehog. *Nature* 437(7060):894-897
- Albrecht PJ, Murtie JC, Ness JK, Redwine JM, Enterline JR, Armstrong RC, Levison SW. (2003) Astrocytes produce CNTF during the remyelination phase of viral-induced spinal cord demyelination to stimulate FGF-2 production. *Neurobiol Dis*. 13(2):89-101
- Altman J, Das GD. (1964) Autoradiographic examination of the effects of enriched environment on the rate of glial multiplication in the adult rat brain. *Nature* 9:204:1161-1163
- Altman J. (1969) Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol*. 137(4):433-457
- Alvarez-Buylla A, García Verdugo JM, Tramontin AD. (2001) A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2(4):287-293
- Alvarez-Buylla A, Lim DA. (2004) For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron* 41(5):683-686
- Andrews PW. (2004) Response: Karyotype of human ES cells during extended culture. *Nat Biotechnol*. 22:371-379
- Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, Hoepfner DJ, Ravin R, Poser SW, Rueger MA, Bae SK, Kittappa R, McKay RD. (2006) Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. *Nature* 442(7104):823-826
- Arias-Carrión O, Hernández-López S, Ibañez-Sandoval O, Bargas J, Hernández-Cruz A, Drucker-Colín R. (2006) Neuronal precursors within the adult rat subventricular zone differentiate into dopaminergic neurons after substantia nigra lesion and chromaffin cell transplant. *J Neurosci Res*. 84(7):1425-1437
- Arias-Carrion O, Drucker-Colin R. (2007) Neurogenesis as a therapeutic strategy to regenerate central nervous system. *Rev Neurol*. 16;45(12):739-745
- Arias-Carrion O, Freundlieb N, Oertel WH, Hoglinger GU. (2007) Adult neurogenesis and Parkinson's disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(5):326-335
- Arjona V, Mínguez-Castellanos A, Montoro RJ, Ortega A, Escamilla F, Toledo-Aral JJ, Pardo R, Méndez-Ferrer S, Martín JM, Pérez M, Katati MJ, Valencia E, García T, López-Barneo J. (2003) Autotransplantation of human carotid body cell aggregates for treatment of Parkinson's disease. *Neurosurgery* 53(2):321-328
- 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(9):963-970

Aschner M. (1998) Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol Lett.* 102-103:283-7

Bachoud-Lévi AC, Rémy P, Nguyen JP, Brugières P, Lefaucheur JP, Bourdet C, Baudic S, Gaura V, Maison P, Haddad B, Boissé MF, Grandmougin T, Jény R, Bartolomeo P, Dalla Barba G, Degos JD, Lisovoski F, Ergis AM, Pailhous E, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M. (2000) Motor and cognitive improvements in patients with Huntington's disease after neural transplantation. *Lancet* 356(9246):1975-1979

Bachoud-Lévi AC, Gaura V, Brugières P, Lefaucheur JP, Boissé MF, Maison P, Baudic S, Ribeiro MJ, Bourdet C, Remy P, Cesaro P, Hantraye P, Peschanski M. (2006) Effect of fetal neural transplants in patients with Huntington's disease 6 years after surgery: a long-term follow-up study. *Lancet Neurol.* 5(4):303-309

Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J, Covarrubias L. (2003) Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res.* 34(6):572-88

Barbeito LH, Pehar M, Cassina P, Vargas MR, Peluffo H, Viera L, Estévez AG, Beckman JS. (2004) A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Brain Res Rev.* 47(1-3):263-74

Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L. (2003) Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol.* 21(10):1200-7

Bareyre FM. (2008) Neuronal repair and replacement in spinal cord injury. *J Neurol Sci.* 265(1-2):63-72

Barker RA, Ratcliffe E, McLaughlin M, Richards A, Dunnett SB. (2000) A role for complement in the rejection of porcine ventral mesencephalic xenografts in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 20(9):3415-24

Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao X. (2006) Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev.* 15(3):407-21

Barres BA, Raff MC. (1999) Axonal control of oligodendrocyte development. *J Cell Biol.* 147(6):1123-8

Battista D, Ferrari CC, Gage FH, Pitossi FJ (2006) Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 23(1):83-93

Bernal GM, Peterson DA. (2004) Neural stem cells as therapeutic agents for age-related brain repair. *Aging Cell.* 3(6):345-51

Björklund A, Lindvall O (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci.* 3(6):537-544

Björklund LM, Isacson O. (2002) Regulation of dopamine cell type and transmitter function in fetal and stem cell transplantation for Parkinson's disease. *Prog Brain Res.* 138:411-20

Bolteus AJ, Bordey A (2004) GABA release and uptake regulate neuronal precursor migration in the postnatal subventricular zone. *J Neurosci.* 24(35):7623-31

- Borchelt DR. (2006) Amyotrophic lateral sclerosis--are microglia killing motor neurons? *N Engl J Med.* 355(15):1611-1613
- Borlongan CV, Hadman M, Sanberg CD, Sanberg PR. (2004) Central nervous system entry of peripherally injected umbilical cord blood cells is not required for neuroprotection in stroke. *Stroke* 35(10):2385-2389
- Borta A, Höglinger GU. (2007) Dopamine and adult neurogenesis. *J Neurochem.* 100(3):587-595
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ. (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res.* 35(5):567-76
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T. (2003) Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron* 40(6):1133-1145
- Brundin P, Widner H, Nilsson OG, Strecker RE, Björklund A. (1989) Intracerebral xenografts of dopamine neurons: the role of immunosuppression and the blood-brain barrier. *Exp Brain Res.* 75(1):195-207
- Buckwalter MS, Coleman BS, Buttini M, Barbour R, Schenk D, Games D, Seubert P, Wyss-Coray T. (2006) Increased T cell recruitment to the CNS after amyloid beta 1-42 immunization in Alzheimer's mice overproducing transforming growth factor-beta 1. *J Neurosci.* 26(44):11437-41
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell Neurosci.* 31, 149-160
- Bużańska L, Machaj EK, Zabłocka B, Pojda Z, Domańska-Janik K. (2002) Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci.* 115(Pt 10):2131-8
- Bużańska L, Habich A, Jurga M, Sybecka J, Domańska-Janik K. (2005) Human cord blood-derived neural stem cell line-possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol In Vitro.* 19(7):991-9
- Bużańska L, Jurga M, Stachowiak EK, Stachowiak MK, Domańska-Janik K. (2006a) Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev.* 15(3):391-406
- Bużańska L, Jurga M, Domańska-Janik K. (2006b) Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegener Dis.*;3(1-2):19-26
- Cacci E, Claasen JH, Kokaia Z. (2005) Microglia-derived tumor necrosis factor-alpha exaggerates death of newborn hippocampal progenitor cells in vitro. *J Neurosci Res.* 80:789-797
- Cacci E, Ajmone-Cat MA, Anelli T, Biagioni S, Minghetti L (2008) In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia* 56(4):412-425
- Callera F, do Nascimento RX. (2006) Delivery of autologous bone marrow precursor cells into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with spinal cord injury: a preliminary safety study. *Exp Hematol.* 34(2):130-1

- Cao L, Jiao X, Zuzga DS, Liu Y, Fong DM, Young D, During MJ. (2004) VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory. *Nat. Genet.* 36(8):827-835
- Cárdenas A, Moro MA, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I. (2005) Dual role of nitric oxide in adult neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev.* 50(1):1-6
- Cascalho M, Platt JL. (2001) The immunological barrier to xenotransplantation. *Immunity.* 14(4):437-46
- Chang MY, Park CH, Lee SH. (2003) Embryonic cortical stem cells secrete diffusible factors to enhance their survival. *Neuroreport.* 14(9):1191-5
- Chen Y, Swanson RA. (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(2):137-49
- Chen N, Hudson JE, Walczak P, Misiuta I, Garbuzova-Davis S, Jiang L, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR, Zigova T, Willing AE. (2005) Human umbilical cord blood progenitors: the potential of these hematopoietic cells to become neural. *Stem Cells.* 23(10):1560-70
- Chen HL, Pistollato F, Hoepfner DJ, Ni HT, McKay RD, Panchision DM. (2007) Oxygen tension regulates survival and fate of mouse central nervous system precursors at multiple levels. *Stem Cells.* 25(9):2291-301
- Cheng A, Wang S, Cai J, Rao MS, Mattson MP. (2003) Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain. *Dev Biol.* 258(2):319-333
- Coenen M, Kögler G, Wernet P, Brüstle O. (2005) Transplantation of human umbilical cord blood-derived adherent progenitors into the developing rodent brain. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 64(8):681-8
- Conover JC, Notti RQ. (2008) The neural stem cell niche. *Cell Tissue Res.* 331(1):211-24
- Corti S, Locatelli F, Donadoni C, Guglieri M, Papadimitriou D, Strazzer S, Del Bo R, Comi GP. (2004) Wild-type bone marrow cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice and contribute to CNS, heart and skeletal muscle tissues. *Brain* 127:2518-2532
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtas S, van Rooijen Wmc, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RLM, Eriksson PS. (2007) Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via the lateral ventricular extension. *Science* 315:1243-1248
- D'Amour KA, Gage FH. (2003) Genetic and functional differences between multipotent neural and pluripotent embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 Suppl 1:11866-72
- Deacon T, Schumacher J, Dinsmore J, Thomas C, Palmer P, Kott S, Edge A, Penney D, Kassissieh S, Dempsey P, Isacson O. (1997) Histological evidence of fetal pig neural cell survival after transplantation into a patient with Parkinson's disease. *Nat Med.* 3(3):350-353
- De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, Mostoslavsky G, Serre AC, Snyder EY, Yoo JJ, Furth ME, Soker S, Atala A. (2007) Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol.* 25(1):100-106
- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1999) Regeneration of a germinar layer in the adult mammalian brain. *PNAS* 96:11619-11624

Doetsch F, Petreanu L, Caille I, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2002) EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells. *Neuron* 36(6):1021-1034

Doetsch F. (2003) A niche for adult neural stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 13:543-550

Domańska-Janik K (2004) Perspektywy zastosowania terapeutycznego komórek macierzystych w chorobach centralnego układu nerwowego. *Nauka* 2:17-26

Dong Z, Su L, Mino J. (2007) Effects of endothelial cells on renewal and differentiation of neural stem cells. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* 24(5):1184-6

Donovan MH, Yazdani U, Norris RD, Games D, German DC, Eisch AJ. (2006) Decreased adult hippocampal neurogenesis in the PDAPP mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.* 495(1):70-83

Dotti CG, Sullivan CA, Banker GA. (1988) The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Neurosci.* 8(4):1454-68

Dougherty KD, Dreyfus CF, Black IB. (2000) Brain-derived neurotrophic factor in astrocytes, oligodendrocytes, and microglia/macrophages after spinal cord injury. *Neurobiol Dis.* 7(6 Pt B):574-585

Drago J, Nurcombe V, Pearse MJ, Murphy M, Bartlett PF. (1991) Basic fibroblast growth factor upregulates steady-state levels of laminin B1 and B2 chain mRNA in cultured neuroepithelial Wells. *Exp Cell Res.* 196(2):246-254

Ekdahl CT, Claasen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. (2003) Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(23):13632-7

Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. (2005) Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol.* 75:321-341

Ende N, Weinstein F, Chen R, Ende M. (2000) Human umbilical cord blood effect on sod mice (amyotrophic lateral sclerosis). *Life Sci.* 67(1):53-59

Englund U, Fricker-Gates RA, Lundberg C, Björklund A, Wictorin K. (2002) Transplantation of human neural progenitor cells into the neonatal rat brain: extensive migration and differentiation with long-distance axonal projections. *Exp Neurol.* 173(1):1-21

Englund U, Björklund A, Wictorin K. (2002) Migration patterns and phenotypic differentiation of long-term expanded human neural progenitor cells after transplantation into the adult rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 134(1-2):123-41

Erdö F, Bührle C, Blunk J, Hoehn M, Xia Y, Fleischmann B, Föcking M, Küstermann E, Kolossov E, Hescheler J, Hossmann KA, Trapp T. (2003) Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(7):780-785

Ereniev SI, Semchenko VV, Sysheva EV, Bogdashin IV, Shapovalova VV, Khizhnyak AS, Gasanenko LN. (2005) Effect of allo- and xenotransplantation of embryonic nervous tissue and umbilical cord blood-derived stem cells on structural and functional state of cerebral cortex of albino rats in posttraumatic period. *Bull Exp Biol Med.* 140(5):612-615

- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.* 4(11):1313-1317
- Fabel K, Fabel K, Tam B, Kaufer D, Baiker A, Simmons N, Kuo CJ, Palmer TD. (2003) VEGF is necessary for exercise-induced adult hippocampal neurogenesis. *Eur J Neurosci.* 18(10):2803-2812
- Fan CG, Zhang QJ, Tang FW, Han ZB, Wang GS, Han ZC. (2005) Human umbilical cord blood cells express neurotrophic factors. *Neurosci Lett.* 380(3):322-325
- Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kapinas K, Sakellari I, Kimiskidis V, Tsompanakou A. (1997) Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* 20(8):631-638
- Fassas A, Passweg JR, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kozak T, Havrdova E, Carreras E, Graus F, Kashyap A, Openshaw H, Schipperus M, Deconinck E, Mancardi G, Marmont A, Hansz J, Rabusin M, Zuazu Nagore FJ, Besalduch J, Dentamaro T, Fouillard L, Hertenstein B, La Nasa G, Musso M, Papineschi F, Rowe JM, Saccardi R, Steck A, Kappos L, Gratwohl A, Tyndall A, Samijn J; Autoimmune Disease Working Party of the EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation). (2002) Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. A retrospective multicenter study. *J Neurol.* 249(8):1088-1097
- Fields RD, Stevens-Graham B (2002) New insights into neuron-glia communication. *Science* 298, 556-562
- Filippov V, Kronenberg G, Pivneva T, Reuter K, Steiner B, Wang LP, Yamaguchi M, Kettenmann H, Kempermann G. (2003) Subpopulation of nestin-expressing progenitor cells in the adult murine hippocampus shows electrophysiological and morphological characteristics of astrocytes. *Mol Cell Neurosci.* 23(3):373-382
- Fink JS, Schumacher JM, Ellias SL, Palmer EP, Saint-Hilaire M, Shannon K, Penn R, Starr P, VanHorne C, Kott HS, Dempsey PK, Fischman AJ, Raineri R, Manhart C, Dinsmore J, Isacson O. (2000) Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant.* 9(2):273-278
- Friedman WJ, Lärkfors L, Ayer-LeLievre C, Ebendal T, Olson L, Persson H. (1990) Regulation of beta-nerve growth factor expression by inflammatory mediators in hippocampal cultures. *J Neurosci Res.* 27(3):374-82
- Frugier T, Koishi K, Matthaei KI, McLennan IS. (2005) Transgenic mice carrying a tetracycline-inducible, truncated transforming growth factor beta receptor (TbetaRII). *Genesis* 42(1):1-5
- Gadient RA, Otten UH. (1997) Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol.* 52(5):379-90
- Gage FH. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287(5457):1433-1438
- Gage FH. (2002) Neurogenesis in the adult brain. *J Neurosci.* 22(3):612-3
- Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane JC, Hudson JE, Chen N, Davis CD, Sanberg PR. (2003) Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J Hematother Stem Cell Res.* 12(3):255-270

- Garcia AD, Doan NB, Imura T, Bush TG, Sofroniew MV. (2004) GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat Neurosci.* 7(11):1233-1241
- Ge G, Hopkins DR, Ho WB, Greenspan DS. (2005) GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol.* 25, 5846-5858
- Ge S, Yang CH, Hsu KS, Ming GL, Song H. (2007) A critical period for enhanced synaptic plasticity in newly generated neurons of the adult brain. *Neuron* 54(4):559-566
- Ghashghaei HT, Lai C, Anton ES. (2007) Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? *Nat Rev Neurosci.* 8(2):141-51
- Goldman SA, Nottebohm F. (1983) Neuronal production, migration, and differentiation in a vocal control nucleus of the adult female canary brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(8):2390-2394
- Goldman SA. (1998) Adult neurogenesis: from canaries to the clinic. *J Neurobiol.* 36(2):267-286
- Goslin K, Banker G. (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol.* 108(4):1507-16
- Göritz C, Thiebaut R., Tessier LH, Nieweg K, Moehle C, Buard I, Dupont JL, Schurgers L, Schmitz G, Pfrieder F (2007) Glia-induced neuronal differentiation by transcriptional regulation. *Glia* 55, 1108-1122
- Greco SJ, Rameshwar P. (2007) Enhancing effect of IL-1alpha on neurogenesis from adult human mesenchymal stem cells: implication for inflammatory mediators in regenerative medicine. *J Immunol* 179(5):3342-3350
- Gross CG. (2000) Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci.* (1):67-73
- Grote HE, Hannan AJ. (2007) Regulators of adult neurogenesis in the healthy and diseased brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(5-6):533-545
- Guo Y, Shi D, Li W, Liang C, Wang H, Ye Z, Hu L, Wang HQ, Li Y. (2008) Proliferation and neurogenesis of neural stem cells enhanced by cerebral microvascular endothelial cells. *Microsurgery.* 28(1):54-60
- Habich A, Jurga M, Markiewicz I, Łukomska B, Bany-Laszewicz U, Domańska-Janik K. (2006) Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured *in vitro*. *Exp. Hematol.* 34:914-925
- Hastings NB, Gould E. (2003) Neurons inhibit neurogenesis. *Nat Med.* 9(3):264-6
- Haughey NJ, Nath A, Chan SL, Borchard AC, Rao MS, Mattson MP. (2002) Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 83(6):1509-1524
- Hauser RA, Furtado S, Cimino CR, Delgado H, Eichler S, Schwartz S, Scott D, Nauert GM, Soety E, Sossi V, Holt DA, Sanberg PR, Stoessl AJ, Freeman TB.(2002) Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *Neurology* 58(5):687-695

- Hauwel M, Furon E, Canova C, Griffiths M, Neal J, Gasque P. (2005) Innate (inherent) control of brain infection, brain inflammation and brain repair: the role of microglia, astrocytes, "protective" glial stem cells and stromal ependymal cells. *Brain Res Brain Res Rev.* 48(2):220-33
- Hayashi J, Takagi Y, Fukuda H, Imazato T, Nishimura M, Fujimoto M, Takahashi J, Hashimoto N, Nozaki K. (2006) Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26(7):906-914
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A. (2004) Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *Cell Sci.*117:4411-4422
- Herx LM, Yong VW. (2001) Interleukin-1 beta is required for the early evolution of reactive astrogliosis following CNS lesion. *J Neuropathol Exp Neurol.* 60(10):961-71
- Höglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC. (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci.* 7(7):726-735
- Hudson JE, Chen N, Song S, Walczak P, Jendelová P, Sykova E, Willing AE, Saporta S, Bickford P, Sanchez-Ramos J, Zigova T. (2004) Green fluorescent protein bone marrow cells express hematopoietic and neural antigens in culture and migrate within the neonatal rat brain. *J Neurosci Res.* 76(2):255-64
- Hulshof S, Montagne L, De Groot CJ, Van Der Valk P. (2002) Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia.* 38(1):24-35
- Humpherys D, Eggan K, Akutsu H, Hochedlinger K, Rideout WM 3rd, Biniszkiewicz D, Yanagimachi R, Jaenisch R. (2001) Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 293(5527):95-97
- Hunt D, Coffin RS, Anderson PN. (2002) The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; a review. *J Neurocytol.* 31(2):93-120
- Ihrie RA, Alvarez-Buylla A. (2008) Cells in the astroglial lineage are neural stem cells. *Cell Tissue Res.* 331(1):179-191
- Imura T, Tane K, Toyoda N, Fushiki S. (2008) Endothelial cell-derived bone morphogenetic proteins regulate glial differentiation of cortical progenitors. *Eur J Neurosci.* 27(7):1596-606
- Iosif RE, Ahlenius H, Ekdahl CT, Darsalia V, Thored P, Jovinge S, Kokaia Z, Lindvall O. (2008) Suppression of stroke-induced progenitor proliferation in adult subventricular zone by tumor necrosis factor receptor 1. *J Cereb Blood Flow Metab.* PMID: 18493257
- Itakura T, Uematsu Y, Nakao N, Nakai E, Nakai K. (1997) Transplantation of autologous sympathetic ganglion into the brain with Parkinson's disease. Long-term follow-up of 35 cases. *Stereotact Funct Neurosurg.*69(1-4 Pt 2):112-115
- Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, VandenBerg S, Alvarez-Buylla A. (2006) PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 51(2):187-199

- Janowski M, Lukomska B, Kozłowska H, Domanska-Janik K. (2004) Intra-carotic administration of neural progenitors derived from human umbilical cord blood mononuclear fraction gives robust behavioral recovery in ouabain model of stroke. *Exp Neurol*, 187
- Janowski M, Gornicka-Pawlak E, Kozłowska H, Domanska-Janik K, Gielecki J, Lukomska B. (2008) Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats. *Cell Proliferat.* (w druku)
- Janson CG, Ramesh TM, During MJ, Leone P, Heywood J. (2001) Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Hematother Stem Cell Res.* 10(6):913-915
- Jiang J, McMurtry J, Niedzwiecki D, Goldman SA. (1998) Insulin-like growth factor-1 is a radial cell-associated neurotrophin that promotes neuronal recruitment from the adult songbird edpendyma/subependyma. *J Neurobiol.* 36(1):1-15
- Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. (2002) Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(18):11946-11950
- Jin K, Sun Y, Xie L, Bateur S, Mao XO, Smelick C, Logvinova A, Greenberg DA. (2003) Neurogenesis and aging: FGF-2 and HB-EGF restore neurogenesis in hippocampus and subventricular zone of aged mice. *Aging Cell* 2(3):175-183
- Jin K, Galvan V, Xie L, Mao XO, Gorostiza OF, Bredesen DE, Greenberg DA. (2004) Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APP^{Sw,Ind}) mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*101(36):13363-7
- Jin K, LaFevre-Bernt M, Sun Y, Chen S, Gafni J, Crippen D, Logvinova A, Ross CA, Greenberg DA, Ellerby LM. (2005) FGF-2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50):18189-18194
- Johansson CB, Svensson M, Wallstedt L, Janson AM, Frisén J. (1999) Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res.* 253(2):733-736
- John GR, Lee SC, Song X, Rivieccio M, Brosnan CF. (2005) IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 49(2):161-176
- Jordan JD, Ma DK, Ming GL, Song H. (2007) Cellular niches for endogenous neural stem cells in the adult brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 6(5):336-341
- Jurga M, Markiewicz I, Sarnowska A, Habich A, Kozłowska H, Łukomska B, Bużańska L, Domańska-Janik K. (2006) Neurogenic potential of human umbilical cord blood: neural-like stem cells depend on previous long-term culture conditions. *J Neurosci Res.* 83(4):627-37
- Kang KS, Kim SW, Oh YH, Yu JW, Kim KY, Park HK, Song CH, Han H.. (2005) A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy* 7(4):368-373
- Kaplan MS, Hinds JW. (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197(4308):1092-1094

- Keene CD, Sonnen JA, Swanson PD, Kopyov O, Leverenz JB, Bird TD, Montine TJ. (2007) Neural transplantation in Huntington disease: long-term grafts in two patients. *Neurology* 68(24):2093-2098
- Kelly S, Bliss TM, Shah AK, Sun GH, Ma M, Foo WC, Masel J, Yenari MA, Weissman IL, Uchida N, Palmer T, Steinberg GK. (2004) Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(32):11839-11844
- Kempermann G, Neumann H. (2003) Neuroscience. Microglia: the enemy within? *Science*. 302(5651):1689-90
- Kielan T, Drew PD. (2005) Cytokines of the nervous system. Inflammatory disorders of the nervous system. Ed: *Minagar A, Alexander JS. Humana Press, Totowa, NJ, 3-79*
- Kim JK, Choi BH, Park HC, Park SR, Kim YS, Yoon SH, Park HS, Kim EY, Ha Y. (2004) Effects of GM-CSF on the neural progenitor cells. *Neuroreport*. 15(14):2161-5
- Kim JM, Lee ST, Chu K, Jung KH, Song EC, Kim SJ, Sinn DI, Kim JH, Park DK, Kang KM, Hyung Hong N, Park HK, Won CH, Kim KH, Kim M, Kun Lee S, Roh JK. (2007) Systemic transplantation of human adipose stem cells attenuated cerebral inflammation and degeneration in a hemorrhagic stroke model. *Brain Res*. 1183:43-50
- Kinrade E.F., Hidalgo A (2004) Lateral neuron-glia interactions steer the response of axons to the Robo code. *Neuron Glia Biol*. 1, 101-112
- Kögler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Müschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Müller HW, Zanjani E, Wernet P. (2004) A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med*. 200(2):123-135
- Környei Z, Szlávik V, Szabó B, Gócza E, Czirók A, Madarász E. (2005) Humoral and contact interactions in astroglia/stem cell co-cultures in the course of glia-induced neurogenesis. *Glia*. 49(3):430-44
- Kondziołka D, Wechsler L, Goldstein S, Meltzer C, Thulborn KR, Gebel J, Jannetta P, DeCesare S, Elder EM, McGrogan M, Reitman MA, Bynum L. (2000) Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55(4):565-569
- Kondziołka D, Wechsler L. (2008) Stroke repair with cell transplantation: neuronal cells, neuroprogenitor cells, and stem cells. *Neurosurg Focus*. 24(3-4):E13.
- Kotani S, Yamauchi T, Teramoto T, Ogura H. (2006) Pharmacological evidence of cholinergic involvement in adult hippocampal neurogenesis in rats. *Neuroscience* 142(2):505-514
- Kozłowska H, Markiewicz I, Habich A, Łukomska, Domańska-Janik K. (2005) Neural stem-like cells from human cord blood acquire the phenotype of neural cells after transplantation into neonatal rat brain. *J Neurochem*. 94 supplement 2, 248
- Kozłowska H, Jabłonka J, Janowski M, Jurga M, Kossut M, Domańska-Janik K. (2007) Transplantation of a novel human cord blood-derived neural-like stem cell line in a rat model of cortical infarct. *Stem Cells Dev*. 16(3):481-488

Kuh SU, Cho YE, Yoon DH, Kim KN, Ha Y. (2005) Functional recovery after human umbilical cord blood cells transplantation with brain-derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat. *Acta Neurochir.* 147(9):985-92

Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. (1996) Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci.* 16(6):2027-2033

Laguna Goya R, Tyers P, Barker RA. (2008) The search for a curative cell therapy in Parkinson's disease. *J Neurol Sci.*265(1-2):32-42

Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, Lindvall O. (1999) Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 19(11):1220-8

Laywell ED, Rakic P, Kukekov VG, Holland EC, Steindler DA. (2000) Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(25):13883-13888

Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF. (1995) In human fetal astrocytes exposure to interleukin-1 beta stimulates acquisition of the GD3+ phenotype and inhibits cell division. *J Neurochem.* 64(4):1800-7

Leventhal C, Rafii S, Rafii D, Shahar A, Goldman SA. (1999) Endothelial trophic support of neuronal production and recruitment from the adult mammalian subependyma. *Mol Cell Neurosci.*;13(6):450-64

Levison SW, McCarthy KD. (1991) Characterization and partial purification of AIM: a plasma protein that induces rat cerebral type 2 astroglia from bipotential glial progenitors. *J Neurochem.* 57(3):782-94

Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR. (2001) Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 107(4):603-663

Lie DC, Colamarino SA, Song HJ, Désiré L, Mira H, Consiglio A, Lein ES, Jessberger S, Lansford H, Dearie AR, Gage FH. (2005) Wnt signalling regulates adult hippocampal neurogenesis. *Nature* 437(7063):1370-1375

Lim DA, Alvarez-Buylla A. (1999) Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13):7526-7531

Lim DA, Tramontin AD, Trevejo JM, Herrera DG, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (2000) Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron* 28(3):713-726

Lima C, Pratas-Vital J, Escada P, Hasse-Ferreira A, Capucho C, Peduzzi JD. (2006) Olfactory mucosa autografts in human spinal cord injury: a pilot clinical study. *J Spinal Cord Med.* 29(3):191-203

Lindvall O, Brundin P, Widner H, Rehnström S, Gustavii B, Frackowiak R, Leenders KL, Sawle G, Rothwell JC, Marsden CD. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247(4942):574-577

Lindvall O, Hagell P. (2002) Role of cell therapy in Parkinson disease. *Neurosurg. Focus.*15;13(5)

- Lindvall O, Hagell P. (2002) Role of cell therapy in Parkinson disease. *Neurosurg Focus*. 13(5)
- Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med*. 10 Suppl:S42-50
- Lindvall O, Kokaia Z. (2006) Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 441(7097):1094-1096
- Ling ZD, Potter ED, Lipton JW, Carvey PM. (1998) Differentiation of mesencephalic progenitor cells into dopaminergic neurons by cytokines. *Exp Neurol*. 149(2):411-423
- Liu X, Wang Q, Haydar TF, Bordey A. (2005) Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci*. 8(9):1179-1187
- Liu YP, Lin HI, Tzeng SF. (2005) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-18 modulate neuronal cell fate in embryonic neural progenitor culture. *Brain Res*. 1054(2):152-158
- Liu CT, Yang YJ, Yin F, Wang X, Yu XH, Wang QH, Wang XL, Xie M. (2006) The immunobiological development of human bone marrow mesenchymal stem cells in the course of neuronal differentiation. *Cell Immunol*. 244(1):19-32
- Liu HY, Zhang QJ, Li HJ, Han ZC (2006) Effect of intracranial transplantation of cD34⁺ cells derived from human umbilical cord blood in rats with cerebral ischemia. *Chin. Med. J* 119(20):1744-1748
- Liedo PM, Alonso M, Grubb MS. (2006) Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci*. 7(3):179-193
- Lo EH. (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med*. 14(5):497-500
- Lois C, Alvarez-Buylla A. (1994) Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264(5162):1145-1148
- López-Lozano JJ, Bravo G, Abascal J, Brera B, Millan I. (1999) Clinical outcome of cotransplantation of peripheral nerve and adrenal medulla in patients with Parkinson's disease. Clínica Puerta de Hierro Neural Transplantation Group. *J Neurosurg*. 90(5):875-882
- Low CB, Liou YC, Tang BL. (2008) Neural differentiation and potential use of stem cells from the human umbilical cord for central nervous system transplantation therapy. *J Neurosci Res*. 86(8):1670-9
- Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, Li Y, Wang L, Sanchez-Ramos J, Chopp M. (2002) Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant*. 11(3):275-281
- Ma DK, Ming GL, Song H (2005) Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 15(5):514-520
- Markiewicz I, Lukomska B. (2006) The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp*. 66(4):343-358

- Martino G, Pluchino S. (2007) Neural stem cells: guardians of the brain. *Nat Cell Biol.* 9:1031-1034
- Mathieu C, Fouchet P, Gauthier LR, Lassalle B, Boussin FD, Mouthon MA. (2006) Coculture with endothelial cells reduces the population of cycling LeX neural precursors but increases that of quiescent cells with a side population phenotype. *Exp Cell Res.* 312(6):707-18
- Mazzini L, Fagioli F, Boccaletti R, Mareschi K, Oliveri G, Olivieri C, Pastore I, Marasso R, Madon E. (2003) Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 4(3):158-161
- Mazzini L, Mareschi K, Ferrero I, Vassallo E, Oliveri G, Nasuelli N, Oggioni GD, Testa L, Fagioli F. (2008) Bone marrow mesenchymal stem cells from healthy donors and sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cell Transplant.* 17(3):255-266
- McCarthy KD, de Vellis J. (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 85(3):890-902
- McGuckin CP, Forraz N, Baradez MO, Navran S, Zhao J, Urban R, Tilton R, Denner L. (2005) Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.* 38(4):245-55
- McGuckin C, Jurga M, Ali H, Strbad M, Forraz N. (2008) Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro. *Nat Protoc.* 3(6):1046-55
- Meier C, Middelanis J, Wasielewski B, Neuhoff S, Roth-Haerer A, Gantert M, Dinse HR, Dermietzel R, Jensen A. (2006) Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res.* 59(2):244-249
- Meng H, Zhang Z, Zhang R, Liu X, Wang L, Robin AM, Chopp M. (2006) Biphasic effects of exogenous VEGF on VEGF expression of adult neural progenitors. *Neurosci. Lett.* 393(2-3):97-101
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. (2006) Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *Neurosci.* 26(30):7907-7918
- Merkle FT, Alvarez-Buylla A. (2006) Neural stem cells in mammalian development. *Curr Opin Cell Biol.* 18(6):704-709
- Metcalfe AD, Ferguson MW. (2008) Skin stem and progenitor cells: using regeneration as a tissue-engineering strategy. *Cell Mol Life Sci.* 65(1):24-32
- Mi H, Haeberle H, Barres BA. (2001) Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci.* 21(5):1538-47
- Michurina T, Krasnov P, Balazs A, Nakaya N, Vasilieva T, Kuzin B, Khrushchov N, Mulligan RC, Enikolopov G. (2004) Nitric oxide is a regulator of hematopoietic stem cell activity. *Mol Ther.* 10(2):241-8
- Milner R. (2007) A novel three-dimensional system to study interactions between endothelial cells and neural cells of the developing central nervous system. *BMC Neurosci.* 8:3

- Ming GL, Song H. (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 28:223-250
- Molcanyi M, Riess P, Bentz K, Maegele M, Hescheler J, Schäfke B, Trapp T, Neugebauer E, Klug N, Schäfer U. (2007) Trauma-associated inflammatory response impairs embryonic stem cell survival and integration after implantation into injured rat brain. *J Neurotrauma.* 24(4):625-37
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science* 302(5651):1760-1765
- Moreno-López B, Romero-Grimaldi C, Noval JA, Murillo-Carretero M, Matarredona ER, Estrada C. (2004) Nitric oxide is a physiological inhibitor of neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and olfactory bulb. *J Neurosci.* 24(1):85-95
- Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM (2004) Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J Neurochem.* 90, 89-101
- Morshead CM, Garcia AD, Sofroniew MV, van Der Kooy D. (2003) The ablation of glial fibrillary acidic protein-positive cells from the adult central nervous system results in the loss of forebrain neural stem cells but not retinal stem cells. *Eur J Neurosci.* 18(1):76-84
- Moviglia GA, Fernandez Viña R, Brizuela JA, Saslavsky J, Vrsalovic F, Varela G, Bastos F, Farina P, Etchegaray G, Barbieri M, Martinez G, Picasso F, Schmidt Y, Brizuela P, Gaeta CA, Costanzo H, Moviglia Brandolino MT, Merino S, Pes ME, Veloso MJ, Rugilo C, Tamer I, Shuster GS. (2006) Combined protocol of cell therapy for chronic spinal cord injury. Report on the electrical and functional recovery of two patients. *Cytotherapy.* 8(3):202-209
- Murillo-Carretero M, Ruano MJ, Matarredona ER, Villalobo A, Estrada C. (2002) Antiproliferative effect of nitric oxide on epidermal growth factor-responsive human neuroblastoma cells. *J Neurochem.* 83(1):119-31
- Muzio L, Martino G, Furlan R. (2007) Multifaceted aspects of inflammation in multiple sclerosis: the role of microglia. *J Neuroimmunol.* 191(1-2):39-44
- Nakanishi M, Niidome T, Matsuda S, Akaike A, Kihara T, Sugimoto H (2007) Microglia-derived interleukin-6 and leukaemia inhibitory factor promote astrocytic differentiation of neural stem/progenitor cells. *Eur J Neurosci.* 25(3):649-658
- Nakao N, Shintani-Mizushima A, Kakishita K, Itakura T. (2004) The ability of grafted human sympathetic neurons to synthesize and store dopamine: a potential mechanism for the clinical effect of sympathetic neuron autografts in patients with Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 188(1):65-73
- Nakashima K, Taga T. (2002) Mechanisms underlying cytokine-mediated cell-fate regulation in the nervous system. *Mol Neurobiol.* 25(3):233-244
- Nakayama T, Momoki-Soga T, Inoue N. (2003) Astrocyte-derived factors instruct differentiation of embryonic stem cells into neurons. *Neurosci Res.* 46(2):241-9
- Nan Z, Grande A, Sanberg CD, Sanberg PR, Low WC. (2005) Infusion of human umbilical cord blood ameliorates neurologic deficits in rats with hemorrhagic brain injury. *Ann N Y Acad Sci.* 1049:84-96

- Nash RA, Bowen JD, McSweeney PA, Pavletic SZ, Maravilla KR, Park MS, Storek J, Sullivan KM, Al-Omaishi J, Corboy JR, DiPersio J, Georges GE, Gooley TA, Holmberg LA, LeMaistre CF, Ryan K, Openshaw H, Sunderhaus J, Storb R, Zunt J, Kraft GH. (2003) High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood* 102(7):2364-2372
- Neumann H, Schweigreiter R, Yamashita T, Rosenkranz K, Wekerle H, Barde YA. (2002) Tumor necrosis factor inhibits neurite outgrowth and branching of hippocampal neurons by a rho-dependent mechanism. *J Neurosci.* 22(3):854-62
- Newcomb JD, Ajmo CT Jr, Sanberg CD, Sanberg PR, Pennypacker KR, Willing AE. (2006) Timing of cord blood treatment after experimental stroke determines therapeutic efficacy. *Cell Transplant.* 15(3):213-223
- Newman MB, Willing AE, Manresa JJ, Sanberg CD, Sanberg PR. (2006) Cytokines produced by cultured human umbilical cord blood (HUCB) cells: implications for brain repair. *Exp Neurol.* 199(1):201-8
- Newman MB, Bakay RA. (2008) Therapeutic potentials of human embryonic stem cells in Parkinson's disease. *Neurotherapeutics* 5(2):237-251.
- Ninkovic J, Götz M. (2007) Signaling in adult neurogenesis: from stem cell niche to neuronal networks. *Curr Opin Neurobiol.* 17(3):338-344
- Norenberg MD, Rao KV, Jayakumar AR. (2005) Mechanisms of ammonia-induced astrocyte swelling. *Metab Brain Dis.* 20(4):303-18
- Norenberg MD. (2005) The reactive astrocyte. The role of glia in neurotoxicity. Ed: Ashner M, Costa LG. *CRC Press Boca Raton, Washington DC.* 73-92
- Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C, Notario PM, Saravanamuthu S, Nueda ML, Sanchez-Sanchez F, Escribano J, Laborda J, Becerra SP. (2006) Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem.* 281(49):38022-38037
- Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G 2nd, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA. (2003) Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med.* 9(4):439-447
- Nystedt J, Mäkinen S, Laine J, Jolkkonen J. (2006) Human cord blood CD34+ cells and behavioral recovery following focal cerebral ischemia in rats. *Acta Neurobiol Ex.* 66(4):293-300
- Oderfeld-Nowak B, Bacia A, Gradkowska M, Fusco M, Vantini G, Leon A, Aloe L. (1992) In vivo activated brain astrocytes may produce and secrete nerve growth factor-like molecules. *Neurochem Int.* 21(3):455-61
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, Stoessl AJ, Sossi V, Brin MF, Shannon KM, Nauert GM, Perl DP, Godbold J, Freeman TB. (2003) A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 54(3):403-414
- Ortega-Perez I, Murray K, Lledo PM. (2007) The how and why of adult neurogenesis. *J Mol Histol.* 38(6):555-62

- Packer MA, Stasiv Y, Benraiss A, Chmielnicki E, Grinberg A, Westphal H, Goldman SA, Enikolopov G. (2003) Nitric oxide negatively regulates mammalian adult neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(16):9566-71
- Palmer TD, Willhoite AR, Gage FH. (2000) Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol*. 425(4):479-494
- Pan Y, Nastav JB, Zhang H, Bretton RH, Panneton WM, Bicknese AR. (2005) Engraftment of freshly isolated or cultured human umbilical cord blood cells and the effect of cyclosporin A on the outcome. *Exp Neurol*. 192(2):365-372
- Park SM, Jung JS, Jang MS, Kang KS, Kang SK. (2008) Progenitor cells. *Cell Prolif*. 41(2):248-264
- Pearson AG, Curtis MA, Waldvogel HJ, Faull RL, Dragunow M. (2005) Activating transcription factor 2 expression in the adult human brain: association with both neurodegeneration and neurogenesis. *Neuroscience* 133(2):437-451
- Piccini P, Brooks DJ, Björklund A, Gunn RN, Grasby PM, Rimoldi O, Brundin P, Hagell P, Rehnström S, Widner H, Lindvall O. (1999) Dopamine release from nigral transplants visualized in vivo in a Parkinson's patient. *Nat Neurosci*. 2(12):1137-1140
- Pieper AA, Wu X, Han TW, Estill SJ, Dang Q, Wu LC, Reece-Fincannon S, Dudley CA, Richardson JA, Brat DJ, McKnight SL. (2005) The neuronal PAS domain protein 3 transcription factor controls FGF-mediated adult hippocampal neurogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(39):14052-14057
- Pluchino S, Martino G. (2008) Neural stem cell-mediated immunomodulation: repairing the haemorrhagic brain. *Brain* 131(Pt 3):604-605
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415(6875):1030-1034
- Ramírez-Castillejo C, Sánchez-Sánchez F, Andreu-Agulló C, Ferrón SR, Aroca-Aguilar JD, Sánchez P, Mira H, Escribano J, Fariñas I. (2006) Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci*. 9(3):331-339
- Ramon y Cajal S. (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system. In Ramon y Cajal S, ed. New York: Haffner Publishing
- Realì C, Scintu F, Pillai R, Cabras S, Argioli F, Ristaldi MS, Sanna MA, Badiali M, Sogos V. (2006) Differentiation of human adult CD34+ stem cells into cells with a neural phenotype: role of astrocytes. *Exp Neurol*. 197(2):399-406
- Rehni AK, Singh I, Singh N, Kumar M. (2008) Implications in Experimental Ischaemic Stroke Therapy. *Stem Cell Rev*. PMID: 18516704
- Reier PJ. (2004) Cellular transplantation strategies for spinal cord injury and translational neurobiology. *NeuroRx* 1(4):424-451
- Reynolds BA, Rietze RL. (2005) Neural stem cells and neurospheres-re-evaluating the relationship. *Nat Methods*. 2(5):333-336
- Reynolds BA, Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 255(5052):1707-1710

- Riquelme PA, Drapeau E, Doetsch F.(2008) Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 363(1489):123-137
- Saccardi R, Mancardi GL, Solari A, Bosi A, Bruzzi P, Di Bartolomeo P, Donelli A, Filippi M, Guerrasio A, Gualandi F, La Nasa G, Murialdo A, Pagliai F, Papineschi F, Scappini B, Marmont AM. (2005) Autologous HSCT for severe progressive multiple sclerosis in a multicenter trial: impact on disease activity and quality of life. *Blood* 105(6):2601-2607
- Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 427(6976):740-744
- Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR. (2003) Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother Stem Cell Res.*12(3):271-278
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2001) Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus *J Neurosci.* 21(18):7153-7160
- Seri B, García-Verdugo JM, Collado-Morente L, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. (2004) Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 478(4):359-378
- Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4(1-2):7-25
- Shen Q, Goderie SK, Jin L, Karanth N, Sun Y, Abramova N, Vincent P, Pumiglia K, Temple S (2004) Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 28 304(5675):1338-1340
- Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA. (2005) Stem/progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. *Glia.* 51(3):173-86
- Shihabuddin LS, Horner PJ, Ray J, Gage FH. (2000) Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci.* 20(23):8727-35
- Simons M., Trajkovic K (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci.* 119, 4381-4389
- Song H, Stevens ChF, Gage FH (2002a) Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 417, 39-44
- Song HJ, Stevens CF, Gage FH. (2002b) Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nat Neurosci.* 5(5):438-45
- Spires TL, Grote HE, Varshney NK, Cordery PM, van Dellen A, Blakemore C, Hannan AJ. (2004) Environmental enrichment rescues protein deficits in a mouse model of Huntington's disease, indicating a possible disease mechanism. *J Neurosci.* 24(9):2270-2276
- Spranger M, Lindholm D, Bandtlow C, Heumann R, Gnahn H, Näher-Noé M, Thoenen H. (1990) Regulation of Nerve Growth Factor (NGF) Synthesis in the Rat Central Nervous System: Comparison between the Effects of Interleukin-1 and Various Growth Factors in Astrocyte Cultures and in vivo. *Eur J Neurosci.* 2(1):69-76

- Stanfield BB, Trice JE. (1988) Evidence that granule cells generated in the dentate gyrus of adult rats extend axonal projections. *Exp Brain Res*. 72(2):399-406
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. (2002) Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol*. 513:87-113
- Simons M, Trajkovic K. (2006) Neuron-glia communication in the control of oligodendrocyte function and myelin biogenesis. *J Cell Sci*. 119(Pt 21):4381-9
- Su L, Xu J, Ji BX, Wan SG, Lu CY, Dong HQ, Yu YY, Lu DP. (2006) Autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Int J Hematol*.84(3):276-281
- Sun W, Bużańska L, Domańska-Janik K, Salvi RJ, Stachowiak MK. (2005) Voltage-sensitive and ligand-gated channels in differentiating neural stem-like cells derived from the nonhematopoietic fraction of human umbilical cord blood. *Stem Cells*. 23(7):931-45
- Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. (2006) Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol*. 289(2):329-335
- Taga T, Fukuda S (2005) Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation. *Clin Rev Allergy Immunol*. 28, 249-256
- Tanaka S, Ide M, Shibutani T, Ohtaki H, Numazawa S, Shioda S, Yoshida T. (2006) Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats. *J Neurosci Res*. 83(4):557-66
- Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. (2006) NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature* 442(7105):929-933
- Tattersfield AS, Croon RJ, Liu YW, Kells AP, Faull RL, Connor B. (2004) Neurogenesis in the striatum of the quinolinic acid lesion model of Huntington's disease. *Neuroscience* 127(2):319-332
- Taupin P. (2006) Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system. *Ann Acad Med Singapore* 35:814-820
- Temple S. (2001) Stem cell plasticity--building the brain of our dreams. *Nat. Rev Neurosci*. 2(7):513-520
- Teng H, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Zhang L, Morris D, Gregg SR, Wu Z, Jiang A, Lu M, Zlokovic BV, Chopp M. (2008) Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28(4):764-71
- Tessier-Lavigne M, Goodman CS. (2000) Perspectives: neurobiology. Regeneration in the Nogo zone. *Science*. 287(5454):813-4
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-7
- Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O. (2006) Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24(3):739-747

- Trejo JL, Carro E, Torres-Aleman I. (2001) Circulating insulin-like growth factor I mediates exercise-induced increases in the number of new neurons in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 21(5):1628-1634
- Tuszynski MH, Thal L, Pay M, Salmon DP, U HS, Bakay R, Patel P, Blesch A, Vahlsing HL, Ho G, Tong G, Potkin SG, Fallon J, Hansen L, Mufson EJ, Kordower JH, Gall C, Conner J. (2005) A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nat Med.* 11(5):551-555
- Ueki T, Tanaka M, Yamashita K, Mikawa S, Qiu Z, Maragakis NJ, Hevner RF, Miura N, Sugimura H, Sato K (2003) A novel secretory factor, Neurogenesis-1, provides neurogenic environmental cues for neural stem cells in the adult hippocampus. *J Neurosci.* 23(37):11732-11740
- Unsicker K, Strelau J. (2000) Functions of transforming growth factor-beta isoforms in the nervous system. Cues based on localization and experimental in vitro and in vivo evidence. *Eur J Biochem.* 267(24):6972-6975
- Vallières L, Campbell IL, Gage FH, Sawchenko PE. (2002) Reduced hippocampal neurogenesis in adult transgenic mice with chronic astrocytic production of interleukin-6. *J Neurosci.* 22(2):486-92
- Vendrame M, Cassady J, Newcomb J, Butler T, Pennypacker KR, Zigova T, Sanberg CD, Sanberg PR, Willing AE. (2004) Infusion of human umbilical cord blood cells in a rat model of stroke dose-dependently rescues behavioral deficits and reduces infarct volume. *Stroke* 35(10):2390-2395
- Viviani B, Marinovich M. (2005) Cytokines in Neuronal-Glial Interaction. In *The Role of Glia in Neurotoxicity*. Ed: Ashner M and Costa LG. CRC Press Boca Raton, Washington DC, p. 125-140
- Wachs FP, Winner B, Couillard-Despres S, Schiller T, Aigner R, Winkler J, Bogdahn U, Aigner L. (2006) Transforming growth factor-beta1 is a negative modulator of adult neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 65(4):358-370
- Walczak P, Chen N, Hudson JE, Willing AE, Garbuzova-Davis SN, Song S, Sanberg PR, Sanchez-Ramos J, Bickford PC, Zigova T. (2004) Do hematopoietic cells exposed to a neurogenic environment mimic properties of endogenous neural precursors? *J Neurosci Res.* 76(2):244-254
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP 2nd, Scheffler B, Steindler DA (2006) Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54(8):815-825
- Watts RL, Subramanian T, Freeman A, Goetz CG, Penn RD, Stebbins GT, Kordower JH, Bakay RA. (1997) Effect of stereotaxic intrastriatal cografts of autologous adrenal medulla and peripheral nerve in Parkinson's disease: two-year follow-up study. *Exp Neurol.* 147(2):510-517
- Wennersten A, Holmin S, Al Nimer F, Meijer X, Wahlberg LU, Mathiesen T. (2006) Sustained survival of xenografted human neural stem/progenitor cells in experimental brain trauma despite discontinuation of immunosuppression. *Exp Neurol.* 199(2):339-47

- Wilczynski GM, Konopacki FA, Wilczek E, Lasiecka Z, Gorlewicz A, Michaluk P, Wawrzyniak M, Malinowska M, Okulski P, Kolodziej LR, Konopka W, Duniec K, Mioduszevska B, Nikolaev E, Walczak A, Owczarek D, Gorecki DC, Zuschratter W, Ottersen OP, Kaczmarek L. (2008) Important role of matrix metalloproteinase 9 in epileptogenesis. *J Cell Biol.* 180(5):1021-1035
- Wilkins A., Majed H., Layfield R., Compston A., Chandran S. (2003) Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci.* 23: 4967-4974
- Willing AE, Lixian J, Milliken M, Poulos S, Zigova T, Song S, Hart C, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. (2003) Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res.* 73(3):296-307
- Wu HH, Ivkovic S, Murray RC, Jaramillo S, Lyons KM, Johnson JE, Calof AL (2003) Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron* 23;37(2):197-207
- Wu W, Wong K, Chen J, Jiang Z, Dupuis S, Wu JY, Rao Y. (1999) Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit. *Nature.* 400(6742):331-6
- Wurmser AE, Palmer TD, Gage FH. (2004) Neuroscience. Cellular interactions in the stem cell niche. *Science.* 304(5675):1253-5
- Xiao J, Nan Z, Motooka Y, Low WC. (2005) Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. *Stem Cells Dev.* 14(6):722-733
- Xie T, Spradling AC. (2000) A niche maintaining germ line stem cells in the *Drosophila* ovary. *Science* 290(5490):328-330
- Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K. (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci.* 26(24):6627-6636
- Yang XF. (2007) Immunology of stem cells and cancer stem cells. *Cell Mol Immunol.* 4(3):161-71
- Yoshimura S, Teramoto T, Whalen MJ, Irizarry MC, Takagi Y, Qiu J, Harada J, Waeber C, Breakefield XO, Moskowitz MA. (2003) FGF-2 regulates neurogenesis and degeneration in the dentate gyrus after traumatic brain injury in mice. *J Clin Invest* 112(8):1202-1210
- Yu AC, Lau LT. (2000) Expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 genes in astrocytes under ischemic injury. *Neurochem Int.* 36(4-5):369-77
- Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB, Brismar H, Shupliakov O, Frisen J, Janson AM. (2003) Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13):7925-30
- Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM. (2004) Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci.* 26(2-4):181-196

Zhu DY, Liu SH, Sun HS, Lu YM. (2003) Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J Neurosci.* 23(1):223-229

Zigova T, Pencea V, Sanberg PR, Luskin MB. (2000) The properties of hNT cells following transplantation into the subventricular zone of the neonatal forebrain. *Exp Neurol.* 163(1):31-8

Zigova T, Song S, Willing AE, Hudson JE, Newman MB, Saporta S, Sanchez-Ramos J, Sanberg PR. (2002) Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant.* 11(3):265-274

Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M (2006) Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat. Neurosci.* 9, 268-275



IX. STRESZCZENIE

Od wielu lat trwają próby przywrócenia upośledzonych funkcji komórek nerwowych w schorzeniach neurologicznych. Spełnienie wizji terapii tych chorób przez wykorzystanie stale proliferujących i różnicujących się w komórki układu nerwowego zarodkowych komórek macierzystych do tej pory nie wyszło poza fazę eksperymentalnych badań klinicznych. Również liczne próby zastosowania do tych celów somatycznych komórek macierzystych pozyskiwanych z tkanek dojrzałych przyniosły jedynie umiarkowane skutki kliniczne.

Trudności spowalniające rozwój terapii komórkowej dotyczą niedostatecznej znajomości mechanizmów regulujących proliferację i ukierunkowane różnicowanie komórek macierzystych. Sytuację komplikuje fakt, że odpowiedź ludzkich komórek macierzystych na czynniki instruktywne środowiska jest wysoce nieswoista i trudna do ekstrapolacji z doświadczeń prowadzonych na komórkach gryzoni.

Priorytetem badań *in vitro* stało się ukierunkowanie komórek prekursorowych, zdolnych do odtworzenia *in vivo* populacji zróżnicowanych komórek potomnych o charakterystyce określonej potrzebami danej jednostki chorobowej. Powstaje pytanie czy i w jaki sposób można w warunkach eksperymentalnych wpływać na potencjał proliferacyjny, przeżycie, różnicowanie i integrację ludzkich neuralnych komórek macierzystych.

Przedmiotem moich badań były neuralne komórki macierzyste krwi pępowinowej. Przeprowadzona w naszym zespole selekcja komórek ludzkiej krwi pępowinowej pozwoliła na otrzymanie populacji zawierającej progenitory neuralne i wyprowadzenie unikalnej, jak dotychczas na świecie, stałej linii neuralnych komórek macierzystych (HUCB-NSC) wykazujących stabilność fenotypową i kariotypową. Dostępność ludzkich progenitorów neuralnych stwarza możliwość badania ich potencjału neuronalnego *in vitro* i *in vivo*.

Celem badań stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej była analiza oddziaływań parakrynnych pomiędzy komórkami OUN i neuralnymi komórkami macierzystymi ludzkiej krwi pępowinowej (HUCB-NSC) przeprowadzona w oparciu o badania *in vitro* i *in vivo* wykorzystujące:

- a) ocenę proliferacji i różnicowania HUCB-NSC hodowanych w obecności astrocytów, komórek mikrogleju, neuronów i komórek śródbłonna
- b) identyfikację wybranych czynników uwalnianych przez astrocyty i komórki mikrogleju stymulowane LPS lub TMT oraz fenotypów neuralnych powstałych z HUCB-NSC hodowanych w obecności aktywowanych komórek glejowych
- c) ocenę przeżycia, migracji, proliferacji i różnicowania HUCB-NSC w środowisku mózgu osesków szczura po ich transplantacji

Zaproponowany w moich badaniach *in vitro* układ eksperymentalny polegał na współhodowli HUCB-NSC w obecności komórek izolowanych z mózgu osesków szczura szczepu Wistar (astrocytów, komórek mikrogleju, neuronów) i komórek śródbłonka naczyń włosowatych ustalonej linii t-End. Wybór komórek, stanowiących mikrośrodowisko dla neuralnych komórek macierzystych był nieprzypadkowy gdyż w warunkach fizjologicznych stanowią one naturalne elementy niszy w mózgu u dorosłych osobników, gdzie ma miejsce proces endogennej neurogenezy. Aby poznać oddziaływania poszczególnych typów komórek OUN na progenitory neuralne prowadzone były odrębne współhodowle HUCB-NSC na podłożu komórek mózgu szczura wyselekcjonowanych pod kątem określonych fenotypów. Wpływ zmian środowiska, jakie towarzyszą procesom patologicznym w OUN, na potencjał neuralnych komórek macierzystych badaliśmy stymulując astrocyty i komórki mikroglejowe szczura: LPS (lipopolisacharyd) i TMT (trimetylocyna), które dodawane do hodowli komórek glejowych mogą naśladować reakcje zapalne i toksyczne towarzyszące schorzeniom neurologicznym. Ocena proliferacji i kierunku różnicowania hodowanych w obecności astrocytów, komórek mikrogleju, neuronów i komórek śródbłonka oraz aktywowanych LPS bądź TMT komórek glejowych, HUCB-NSC była przeprowadzona metodami immunocytochemicznymi a analizę wybranych czynników produkowanych przez astrocyty i komórki mikrogleju po stymulacji LPS lub TMT wykonano immunoenzymatycznie.

Badania *in vivo* stanowiące II etap moich badań dotyczyły oceny przeżycia, migracji, proliferacji i różnicowania HUCB-NSC przeszczepionych do strefy SVZ nowonarodzonych szczurów i reakcji biorcy na obecność tych komórek.

Wyniki moich badań wykazały, że:

- poszczególne typy komórek mózgu oddziałują w układach eksperymentalnych *in vitro* w sposób selektywny na decyzje rozwojowe neuralnych komórek macierzystych ludzkiej krwi pępowinowej: astrocyty stymulują różnicowanie HUCB-NSC w neurony; komórki mikrogleju promują dojrzewanie HUCB-NSC zarówno w kierunku neuronalnym jak astrocytarnym; w obecności neuronów HUCB-NSC wykazują najwyższy współczynnik proliferacji a ich prekursorzy preferencyjnie różnicują się w oligodendrocyty; komórki śródbłonka obniżają potencjał HUCB-NSC do różnicowania zachowując najwyższy procent progenitorów neuralnych w stanie niezróżnicowanym.

- stymulacja astrocytów LPS lub TMT *in vitro* powoduje zmianę kierunku różnicowania HUCB-NSC hodowanych w ich obecności z neuronalnego na astrocytarny, a po stymulacji komórek mikrogleju LPS lub TMT widoczny jest wzrost różnicowania współhodowanych z nimi HUCB-NSC w oligodendrocyty. W obu układach eksperymentalnych następuje zahamowanie proliferacji HUCB-NSC

- aktywacja astrocytów i komórek mikrogleju LPS lub TMT *in vitro* indukuje produkcję cytokin prozapalnych: IL-1 β , IL-6 i TNF α oraz NO uwalnianych do podłoża hodowlanego
- HUCB-NSC przeszczepione do strefy SVZ osesków szczura przeżywają w mózgu biorcy 4-5 tygodni, migrują, dzielą się i różnicują preferencyjnie w komórki o fenotypie neuronalnym

W świetle uzyskanych wyników wydaje się, że specyficzność mikrośrodowiska OUN wyznacza dalsze losy neuralnych komórek macierzystych. Komórki macierzyste ludzkiej krwi pępowinowej ukierunkowane neuralnie mogą być źródłem terapii komórkowej w schorzeniach neurologicznych. Wprowadzenie tych komórek do kliniki wymaga bardziej szczegółowych badań eksperymentalnych na modelach zwierzęcych, pozwalających na długotrwałe obserwacje w celu prześledzenia dojrzałości funkcjonalnej nowopowstałych neuronów i ich integracji z otaczającą tkanką.

Wyniki naszych badań mają charakter fenomenologiczny, są jednak instruktywne dla zrozumienia reakcji neuralnych komórek macierzystych po ich transplantacji do mózgu. Mogą również stanowić cenny model badawczy dla dalszej identyfikacji ciągle słabo poznanych sygnałów mikrośrodowiska oddziałujących na endogenne progenitory neuralne w stanach patologicznych OUN.

