

## PERSPEKTYWY TERAPII KOMÓRKOWEJ W CHOROBY PARKINSONA

### *PERSPECTIVES OF CELL THERAPY IN PARKINSON'S DISEASE*

Laboratorium Neuropatologii Molekularnej IMDIK PAN, ul. Pawińskiego 5

#### STRESZCZENIE

*Zarówno badania eksperymentalne, jak i pierwsze próby kliniczne przeprowadzone w ostatnich latach wykazują, że suplementacja prążkowiec komórkami produkującymi dopaminę może stać się skuteczną terapią w chorobie Parkinsona. Do użycia w tym celu neuralnych komórek progenitorowych hodowanych in vitro i ukierunkowanych dopaminergicznie poprzez zastosowanie specyficznych czynników instrukcyjnych lub też manipulacji genetycznych skłaniają głównie względy praktyczne. W ten sposób można pozbyć się problemu ograniczonej dostępności ludzkich tkanek koniecznych do przeszczepu, zwiększyć możliwość kontroli epidemiologicznej i genetycznej materiału oraz standaryzacji użytych procedur. W przypadku coraz realniejszej perspektywy użycia dojrziałych, tkankowo specyficznych komórek macierzystych pochodzących z takich źródeł, jak szpik kostny czy krew pępowinowa (ale również ze skóry, nabłonka węchowego itd.), można uzyskać przeszczepy autologiczne z jednoczesnym ominięciem trudnych problemów etyczno-prawnych wiążących się ze stosowaniem embrionalnych komórek macierzystych. Zastosowanie do przeszczepów własnych komórek gospodarza (lub też właściwy ich dobór immunologiczny z szerokiego asortymentu linii hodowlanych) stwarzałby optymalne warunki prawidłowego przyjęcia transplantu, jego pełnej integracji z tkanką i odtworzenia prawidłowych połączeń neuronalnych w obrębie uszkodzonego prążkowiec. Na poparcie tej tezy przedstawiono wyniki najnowszych badań doświadczalnych w zwierzęcych modelach choroby Parkinsona, wskazujące na możliwość funkcjonalnej rekonstrukcji uszkodzonych obwodów korowo-podkorowych po domózgowym przeszczepie komórek macierzystych. Zwrócono też uwagę na istotne problemy, które muszą zostać rozwiązane przed zastosowaniem tych metod w praktyce klinicznej.*

#### ABSTRACT

*Both experimental studies and preliminary results of clinical trials performed during the last few years showed that supplementation of striatum by cells producing dopamine may be effective in the treatment of Parkinson's disease. The use of neural progenitor cells cultured in vitro and directed dopaminergically by exposition to specific instructive factors or by genetic manipulation, results mainly from practical premises. This may allow to overcome the problem of limited availability of human tissue required for transplantation, to enhance epidemiologic and genetic control of biologic material and to standardize the whole procedure. The perspective of using mature, tissue-specific stem cells from such sources as bone marrow or placental blood (also from skin, olfactory epithelium, etc.) is becoming very real, thus supplying autologous grafts and overcoming difficult ethical and legal problems associated with the use of embryonal stem cells. The use of own host cells for transplantation (or their correct selection from a wide range of available cultured cell lines) would provide optimal conditions for good transplant "take", it's full integration with host tissues and restoration of normal neural connections in the damaged striatum. This thesis is supported by recently published results of experimental studies on animal models of Parkinson's disease, indicating the possibility of functional reconstruction of damaged corticobasal circuits after intracerebral transplantation of stem cells. Highlighted are significant problems, which must be solved before this method will be introduced into clinical practice.*

#### 1 WPROWADZENIE

Początki neurotransplantologii jako dziedziny badań naukowych sięgają końca XIX wieku<sup>(1)</sup>. W I połowie ubiegłego wieku poznano neuropatologiczne podłoże choroby Parkinsona (ChP), w której dochodzi do obumierania stosunkowo wąskiej grupy komórek nerwowych zlokalizowanych w istocie czarnej<sup>(2)</sup>. Następnie dokładnie scharakteryzowano te komórki pod względem funkcjonalnym oraz opisano projekcje ich neurytów do prążkowiec<sup>(3)</sup>. Wkrótce potem rozpoczęto badania nad skutkami selektywnego uszkodzenia istoty czarnej i prążkowiec u zwierząt. Efektem tych badań było opracowanie stosowanego do dzisiaj eksperymentalnego modelu ChP, który pozwala na ilościową ocenę behawioralną stopnia uszkodzenia układu nigrostriatalnego oraz jego ewentualnej naprawy<sup>(4)</sup>. W modelu tym wykorzystuje się dwa związki: amfetaminę powodującą wyrzut dopaminy z zakończeń aksonalnych i apomorfinę, która jest agonistą receptorów dopaminergicznych. Efektem jednostronnego uszkodzenia istoty czarnej u szczurów jest tożsronne odnerwienie dopaminergiczne prążkowiec. W tej sytuacji podanie amfetaminy powoduje przewagę napędu ruchowego w połowie ciała z zachowanym szlakiem nigrostriatalnym, co przejawia się rotacją zwierząt w kierunku leżji. Natomiast w wyniku podania apomorfiny

następuje rotacja w stronę przeciwną spowodowana wzrostem napędu w tożsronnej do leżni połowie ciała, w której doszło do wzrostu gęstości receptorów dopaminergicznych w odnerwionym prążkowie. Zmiany behawioralne dobrze korelują z neuropatologicznym obrazem uszkodzenia układu nigrostriatalnego. Stopniowe wyczerpywanie się skuteczności farmakologicznej terapii w miarę postępu choroby Parkinsona, której istotą jest obumieranie komórek dopaminergicznego układu nigrostriatalnego, przy dobrze scharakteryzowanym modelu tej choroby zainspirowało badaczy do podjęcia prób zastosowania przeszczepów tkanki mózgowej w celu leczenia ChP.

W 1979 roku ukazały się dwa doniesienia wskazujące na zmniejszenie deficytu funkcjonalnego w eksperymentalnym modelu ChP po przeszczepieniu płodowej istoty czarnej do prążkowie<sup>(5)</sup> lub do komory bocznej<sup>(6)</sup>. Trudności z pozyskaniem ludzkiej tkanki płodowej skłoniły badaczy do poszukiwań innego, łatwiej dostępnego źródła komórek dopaminergicznych, np. pochodzących z rdzenia nadnerczy. Poza nielicznymi wyjątkami<sup>(7)</sup> nie osiągnięto jednak zadowalających rezultatów, stosując tę metodę<sup>(8,9,10,11)</sup>. Równolegle prowadzone badania na zwierzęcych modelach ChP potwierdziły słabą skuteczność przeszczepu tkanki rdzenia nadnerczy w porównaniu z płodową istotą czarną w niwelowaniu objawów uszkodzenia układu nigrostriatalnego<sup>(12,13,14,15)</sup>. Z kolei pozytywne rezultaty przeszczepu płodowej tkanki mózgowej uzyskane w badaniach na zwierzętach znalazły potwierdzenie w klinice<sup>(16,17,18,19,20,21)</sup>. Należy jednak podkreślić duże różnice dotyczące indywidualnej odpowiedzi chorych na domóżgowy przeszczep tkanki płodowej: podczas gdy u niektórych pacjentów uzyskiwano poprawę kliniczną umożliwiającą odstawienie leków przeciwparkinsonowskich i powrót do aktywności zawodowej, u innych notowano jedynie nieznaczne efekty pozytywne. U niektórych chorych wystąpiły ponadto działania niepożądane, takie jak halucynacje i dyskinezy.

Na podstawie tych obserwacji wydaje się, że transplantacja płodowej istoty czarnej może być częściowo skuteczna w leczeniu ChP<sup>(22)</sup>. Wszczepiona tkanka w części przypadków wykazuje funkcjonalną integrację z prążkowie biorcy, wzbogaca je w dopaminę oraz powoduje kliniczną poprawę u leczonych pacjentów.

Stosunkowo najlepsze rezultaty przeszczepów istoty czarnej w jawnych próbach klinicznych odnotowano w ośrodkach szwedzkich<sup>(23,24,25)</sup>, gdzie stosowano duże ilości tkanki (pochodzącej nawet od 7 płodów na jedno prążkowie) oraz minimalizowano czas pomiędzy pobraniem tkanki a jej wszczępieniem. Postępowanie takie wymagało jednak łatwego dostępu do płodowych tkanek ludzkich oraz zorganizowania wysokospecjalistycznych, współpracujących ze sobą zespołów naukowo-klinicznych.

Z kolei badanie metodą podwójnie ślepej próby przeprowadzone przez ośrodki z Denver i Nowego Jorku<sup>(26)</sup> w celu oceny skuteczności neurotransplantacji płodowej istoty czarnej w leczeniu ChP nie dało tak zadowalających wyników jak jawne próby kliniczne. Różnice wyników mogły być spowodowane dłuższym okresem przechowywania tkanki (nawet do kilku tygodni) przed wszczępiem oraz znacznym ograniczeniem jej ilości.

Neurotransplantacje płodowej istoty czarnej były wykonywane także w Polsce – na początku lat 90. w Klinice Neurochirurgii CMKP Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego<sup>(27)</sup>. Osiągnięto wstępnie pewne pozytywne rezultaty, jednak wprowadzenie ustawy antyaborcyjnej zahamowało dalszy rozwój klinicznego zastosowania tej metody (prof. Dymecki, informacja ustna).

Wydaje się oczywiste, że aby neurotransplantacje znalazły pełne zastosowanie kliniczne w leczeniu ChP na szeroką skalę, potrzebne jest inne, łatwo dostępne i wystandaryzowane źródło komórek lub tkanek, które zastąpiłoby płodową istotą czarną. Przelomem przybliżającym taką perspektywę stało się odkrycie przez Thomsona w 1998 roku możliwości teoretycznie Nielimitowanej ilościowo hodowli ludzkich komórek macierzystych, które m.in. mogą różnicować się do neuronów<sup>(28)</sup>.

Neurotransplantacja komórkowa, stosowana do tej pory głównie w eksperymentalnym leczeniu ChP, stawia sobie dwa cele o zróżnicowanym stopniu trudności. Pierwszym (i praktycznie łatwiejszym do osiągnięcia) jest trwałe uzupełnienie przez przeszczepione komórki niedoboru dopaminy, drugim (i na razie ciągle nieosiągniętym) byłaby funkcjonalna integracja przeszczepu z tkanką chorego, a tym samym odbudowa prawidłowych szlaków korowo-podkorowych w mózgu biorcy. Dodatkowym wykorzystaniem terapii komórkowej w ChP są próby użycia jej do suplementacji chorej tkanki przez niezbędne czynniki troficzne i neuroprotektynne, które mogłyby zapobiegać postępującej neurodegeneracji będącej istotą tej choroby.

## 2 TERAPIA KOMÓRKOWA NASTAWIONA NA UZUPEŁNIENIE NIEDOBORU DOPAMINY

### 2.1 NIENEURONALNE KOMÓRKI PRODUKUJĄCE DOPAMINĘ

Pierwsze prace nad zastąpieniem przeszczepów tkanki płodowej przez terapię komórkową w leczeniu ChP dotyczyły modyfikacji genetycznych nieneuronalnych linii komórkowych w kierunku produkcji dopaminy. Wykazano, że tak zmodyfikowane fibroblasty produkują znaczące ilości dopaminy *in vitro* i *in vivo*<sup>(29)</sup>. Ich przeszczep zmniejszał objawy funkcjonalnego uszkodzenia prążkowie określane ilością obrotów u szczurów z uszkodzonym układem nigrostriatalnym w próbie z apomorfina. Zaobserwowano, że komórki te miały jednak tendencję do tworzenia guzów nowotworowych, wobec czego efekt przeszczepu oceniano jedynie w czasie ograniczonym do 2 tygodni po operacji. Badania neuropatologiczne wykazały doskonale przeżycie przeszczepionych komórek z obfitą ekspresją hydroksylazy tyrozyny (TH).

W innych badaniach niedojrzałe astrocyty poddawano modyfikacji genetycznej w kierunku nadekspresji TH. Po ich przeszczepieniu uzyskano dobre przeżycie transplantu. I jakkolwiek analiza immunohistochemiczna ujawniła, że tylko niewielki procent wszczepionych astrocytów wykazywał długoterminową ekspresję transgenu, to jednak osiągnięto znaczące, aczkolwiek niecałkowite, ustąpienie rotacji po stymulacji apomorfina<sup>60</sup>.

Schwarz i wsp. wykorzystali zmodyfikowane komórki pochodzenia szpikowego do produkcji dopaminy. Przy pomocy wektorów retrowirusowych wprowadzono do komórek geny dla TH oraz GTP-zależnej cyklohydrolazy I, produkującej tetrahydrobiopterynę (kofaktor współpracujący z TH). Transfekcji poddano zarówno szczurze, jak i ludzkie komórki pochodzenia szpikowego. Zmodyfikowane komórki allogeniczne zostały wszczepione do prądkowia szczurów z eksperymentalnym modelem choroby Parkinsona. Podstawą oceny funkcjonalnej przeszczepu były uzyskany poziom produkcji katecholamin w prądkowiu oraz klasyczna analiza behawioralna. Szczury poddane próbie z apomorfina wykazały znaczące zmniejszenie się rotacji, a w dializatach prądkowia obserwowano zwiększone stężenie lewodopy i jej metabolitów. Jednak ekspresja produktów obu transgenów w zmodyfikowanych komórkach nie wykazała długotrwałej stabilności<sup>61</sup>.

Innym postępowaniem, które miało zwiększyć przeżycie (i jednocześnie zapobiec inwazji) komórek produkujących dopaminę w prądkowiu biorcy, było zamknięcie ich *in vitro* w kapsułach polimerowych. Po wszczepieniu kapsuł do uszkodzonego prądkowia małp uzyskano zmniejszenie objawów wywołanego eksperymentalnie parkinsonizmu. Badanie przy pomocy pozytonowej tomografii emisyjnej (PET) ujawniło zmnożony wychwyty (<sup>18</sup>F)-Dopy w prądkowiu, co przemawiało za funkcjonalnym wykorzystaniem przez wszczepione komórki endogennych szlaków metabolicznych produkujących dopaminę. Badania pośmiertne nie ujawniły w mózgu gospodarza wzrostu gęstości zakończeń dopaminergicznych, wykazując tym samym niespecyficzny wpływ troficzny przeszczepu na system nigrostriatalny gospodarza<sup>62</sup>.

Osiągnięcie częściowo pozytywnych rezultatów przeszczepów komórek nieneuronalnych, ale zdolnych do produkcji DOPA lub dopaminy wskazuje, że wydzielanie toniczne tego neuroprzekaźnika stanowi istotny mechanizm odpowiedzialny za działanie transplantu. Jednak przy tym postępowaniu nie osiągnięto całkowitego zniesienia deficytu funkcjonalnego. Wydaje się więc, że odtworzenie prawidłowych połączeń neuronalnych jest niezbędne do pełnego cofnięcia się objawów ChP. Dlatego też zapewne zanim komórki nieneuronalne zmodyfikowane w kierunku produkcji dopaminy osiągnęły poziom badań klinicznych w leczeniu ChP, zostały one wyparte w laboratoriach przez prekursor neuralne i komórki macierzyste. Neurony dopaminergiczne powstające *in situ* z tych komórek prekursorowych mają niewątpliwie większe możliwości odtworzenia połączeń synaptycznych i integracji funkcjonalnej z mózgiem biorcy.

## 2.2 KOMÓRKI DOPAMINERGICZNE

### 2.2.1 UKIERUNKOWANE DOPAMINERGICZNIE KOMÓRKI PREKURSOROWE

W badaniach na szczurach wykazano, że kilkudniowe namnażanie *in vitro* komórek pochodzących z płodowej istoty czarnej, a następnie hodowanie ich w obecności wybranych czynników wzrostowych i neuromorfenów prowadzi do wydatnego zwiększenia odsetka komórek produkujących dopaminę. Niestety, po transplantacji do mózgu większość z tych zróżnicowanych komórek ginie (ponad 90%). Jednak nawet niewielka ilość komórek przeżywających może okazać się wystarczająca do zmniejszenia objawów behawioralnych w zwierzęcym modelu ChP<sup>63</sup>.

W następnych latach ci sami autorzy poszukiwali sposobów dalszej optymalizacji hodowli komórek dopaminergicznych z mózgu płodów. Odkryto na przykład, że dodanie do hodowli kwasu askorbinowego oraz warunki hipoksyjne zwiększają jej zdolność do generacji komórek dopaminergicznych<sup>64</sup>.

Analogicznym zabiegom poddano ludzką płodową istotę czarną, uzyskując subpopulację komórek neuronalnych, z których część nabywała fenotyp dopaminergiczny. Wszczepienie tych komórek do prądkowia szczurów z uszkodzonym układem nigrostriatalnym wykazywało pozytywny efekt behawioralny w próbie z amfetamina<sup>65</sup>.

W badaniach tych wykazano, że komórki prekursorowe ukierunkowane dopaminergicznie *in vitro* pomimo słabej przeżywalności zachowują swój fenotyp po transplantacji i są zdolne do produkcji dopaminy *in situ*. Z kolei komórki macierzyste i linie komórkowe pochodzenia nowotworowego, które zostaną omówione w następnej części tego przeglądu, charakteryzują się znacznie większymi zdolnościami do proliferacji, dobrą przeżywalnością, jednak istnieją ciagle duże trudności w kontroli ich rozrostu i różnicowania w tkance.

### 2.2.2 KOMÓRKI MACIERZYSTE

#### 2.2.2.1 Pochodzące z obszarów neurogennych mózgu

Neuralne komórki prekursorowe pochodzące ze śródmózgowia szczurzych płodów można poddać ekspansji klonalnej *in vitro*. Wyselekcjonowane linie komórkowe hodowane w obecności czynników różnicujących (IL1, IL11, LIF, GDNF) wykazują się zdolnością do produkcji dopaminy. Najbardziej wydajna linia komórkowa dawała do 98% komórek

dopaminergicznych. Podanie ukierunkowanych dopaminergicznie komórek szczurom z eksperymentalnym modelem choroby Parkinsona spowodowało zmniejszenie typowych dla ChP objawów behawioralnych w stopniu porównywalnym z transplantacją świeżej płodowej istoty czarnej. Badania te wykazały, że zastosowanie komórek dopaminergicznych uzyskanych z hodowlanej linii prekursorowej może być równie skuteczne w terapii choroby Parkinsona jak stosowanie przeszczepów świeżej tkanki płodowej<sup>(36)</sup>.

Różnicowanie neuralnych komórek prekursorowych w pożądanym kierunku można również wymusić drogą manipulacji genetycznych *in vitro*. Wywołanie nadekspresji czynnika transkrypcyjnego Nurr1 w linii mysich komórek C17.2 z jednoczesną ich ekspozycją na czynniki wydzielane przez astrocyty typu I pochodzące z brzuszego śródmózgowia pozwoliło otrzymać ok. 80% komórek potomnych o fenotypie identycznym z endogennymi mysimi komórkami dopaminergicznymi. Ta metoda otrzymywania komórek dopaminergicznych także zapewnia praktycznie stałe źródło materiału. Jednakże w ten sposób otrzymane komórki nie wykazały zadowalającej przeżywalności w mózgu po przeszczepie<sup>(37)</sup>.

Ostatnie dane wskazują, że omawiana linia mysich neuralnych komórek macierzystych (C17.2), nawet niepoddana żadnym modyfikacjom genetycznym ani czynnikom różnicującym, po przeszczepie zarówno do uszkodzonego, jak i nieuszkodzonego prądkowia spontanicznie nabywa fenotyp neuronalny. W ciągu kilku kolejnych tygodni wszczepione komórki migrują, dzielą się, a w końcu zaczynają produkować zestaw enzymów niezbędnych do produkcji dopaminy. U niektórych zwierząt odnotowano zmiany zachowania motorycznego<sup>(38)</sup>. Eksperymenty te wykazują, że prądkowie dorosłych osobników zawiera czynniki instruktywne wystarczające, aby zadecydować o dopaminergicznym losie wszczepianych neuralnych komórek macierzystych. Sugeruje to, że wbrew wcześniejszym obserwacjom wskazującym na konieczność wstępnego ukierunkowania dopaminergicznego wszczepianych komórek prekursorowych, do skutecznego postępowania w ChP można stosować również niezróżnicowane linie neuralnych komórek macierzystych hodowanych *in vitro*.

#### 2.2.2.2 Embrionalne (ESC)

W 1996 roku opracowano oryginalną, 5-stopniową metodę różnicowania mysich ESC w kierunku neuronalnym<sup>(39)</sup>. Wzbogacenie tej metody o dodatkowe zastosowanie czynników neurotroficznych występujących w śródmózgowiu (Shh i FGF8) oraz wykorzystanie jej do różnicowania komórek z nadekspresją Nurr1 (patrz rozdział poprzedni) pozwoliło na uzyskanie w 80% komórek fenotypu dopaminergicznego<sup>(40)</sup>. Takie komórki wszczepione do odnerwionego prądkowia przeżywały co najmniej kilka miesięcy, nie tracąc zdolności do produkcji dopaminy. Co więcej, dawały liczne wypustki penetrujące do komórek prądkowia biorcy. Ekspresja kalbindyny i badania elektrofizjologiczne przeprowadzone na żywych skrawkach mózgowych pobranych od tych zwierząt wykazały morfologiczne i funkcjonalne podobieństwo wszczepionych komórek do neuronów śródmózgowia. Należy podkreślić, że w badaniach tych nie stwierdzono tendencji do rozrostu nowotworowego wszczepianych komórek. Co jednak najważniejsze, testy behawioralne wykazały znaczącą poprawę w zachowaniu zarówno spontanicznym, jak i indukowanym przez leki u zwierząt z uszkodzonym układem nigrostriatalnym<sup>(41)</sup>.

Inną interesującą metodę ukierunkowywania ESC opisali badacze japońscy. Zarówno mysie ESC<sup>(42)</sup>, jak i ESC naczelnych<sup>(43)</sup> różnicowano w kierunku dopaminergicznym poprzez ekspozycję na czynniki wydzielane przez komórki pochodzące ze zrębu szpiku (linia PA6). Zróżnicowane komórki wszczepione do prądkowia myszy z uszkodzonym układem nigrostriatalnym zadowalająco przeżywały, nie wykazywały rozrostu nowotworowego i długotrwale utrzymywały fenotyp dopaminergiczny *in vivo*.

Kolejne badania wykazały, że nieukierunkowane mysie ESC wszczepione w małych ilościach do prądkowia szczurow proliferują i spontanicznie różnicują się do dojrzałych neuronów dopaminergicznych. Na zadowalającą integrację przeszczepu z tkanką biorcy wskazywały przeprowadzone badania obrazowe: pozytonowa tomografia emisyjna (PET) i czynnościowy rezonans magnetyczny (fMRI). Również w ocenie behawioralnej wykazano istotne statystycznie zmniejszenie się asymetrii motorycznej wynikłej z jednostronnego uszkodzenia układu nigrostriatalnego. Otrzymane wyniki potwierdzają zdolność ESC do proliferacji po przeszczepie i do samorzutnego różnicowania się w funkcjonalnie aktywne komórki dopaminergiczne *in vivo*. Zanotowano jednak wyraźną tendencję do niekontrolowanego rozrostu komórek prowadzącego do powstawania potworników. Tak więc ewentualne zastosowanie ESC do terapii wiąże się z koniecznością likwidacji tego zagrożenia nowotworowego<sup>(44)</sup>. Należy zaznaczyć, że dodatkowa modyfikacja tych komórek w kierunku nadekspresji receptora jądrowego Nurr1 kilkakrotnie zwiększyła procent powstających *in vitro* komórek dopaminergicznych<sup>(45)</sup>.

#### 2.2.2.3 Szpikowe (BMSC)

Ostatnio z mezenchymalnych komórek szpikowych wyprowadzono pluripotencjalną linię progenitorową wykazującą właściwości podobne do ESC<sup>(46)</sup>. Poddanie jej różnicowaniu analogicznemu do wcześniej zastosowanego wobec komórek macierzystych pochodzenia mózgowego indukowało je do powstania trzech głównych fenotypów komórek charakterystycznych dla mózgu. Poprzez dalszą ekspozycję tych komórek na specyficzne czynniki różnicujące otrzymano populację stosunkowo bogatą (ok. 30%) w komórki dopaminergiczne. Dane te predysponują szpikowe komórki macierzyste (BMSC)

do użycia w doświadczalnych modelach ChP. Ciekawe, że spontaniczną tendencję BMSC do różnicowania neuronalnego potwierdzają najświeższe obserwacje fenomenologiczne przeprowadzone u biorców systemowych przeszczepów szpiku kostnego wykonywanych ze wskazań hematologicznych. Pośmiertne badania neuropatologiczne części przypadków wykazały klonalny rozrost i zróżnicowanie neuronalne komórek dawcy szpiku w mózgu biorcy<sup>(47)</sup>. Pierwsze pozytywne dane o możliwościach wykorzystania BMSC do terapeutycznej repopulacji mózgu uzyskano w ostatnim roku głównie w leczeniu doświadczalnych udarów mózgu<sup>(48,49)</sup>. Powtarzające się doniesienia o możliwościach różnicowania się BMSC w kierunku neuronalnym *in vivo* oraz dopaminergicznym *in vitro* roją szybkie podjęcie prób ich zastosowania w eksperymentalnym leczeniu ChP.

#### 2.2.2.4 Pępowinowe

Jeszcze mniej danych w kontekście terapii ChP istnieje na temat wykorzystania w tym celu neuralnych prekursorów otrzymanych z frakcji mononuklearnej krwi pępowinowej<sup>(50,51)</sup>. Doświadczenia ostatniego roku wykazały możliwość utrzymania stałej hodowli tych progenitorów, które pod wpływem czynników środowiskowych różnicują się w kierunku neuronalnym<sup>(52)</sup>. Wykazano *in vitro* obecność zróżnicowanych komórek z ekspresją markera neuronów dopaminergicznych TH wydzielających po stymulacji katecholaminy i wykazujących typową charakterystykę elektrofizjologiczną funkcjonalnych komórek nerwowych<sup>(53)</sup>. Pierwsze próby przeszczepów do mózgu noworodków szczurzych potwierdziły przeżycie komórek w tkance przez co najmniej miesiąc (dane niepublikowane). Uzyskane wyniki sugerują, że również hodowane w stałej linii komórki neuralne pochodzące z krwi pępowinowej mogą stać się użytecznym materiałem dla mózgowych przeszczepów terapeutycznych, w tym również w chorobie Parkinsona.

### 2.2.3 NEURONALNE LINIE KOMÓRKOWE POCHODZENIA GUZOWEGO

Linia komórkowa NT2 została wyprowadzona z ludzkiego potwornika na początku lat 80. Poddanie jej działaniu kwasu retinowego powoduje przejście w postmitotyczne komórki nazwane hNT, o morfologicznych i funkcjonalnych właściwościach neuronów<sup>(54)</sup>. Zostały one z powodzeniem zastosowane jako materiał transplantacyjny w zwierzęcych modelach ischemii mózgu<sup>(55,56)</sup>, a ostatnio rozpoczęto pierwszą próbę kliniczną z ich użyciem w leczeniu udarów mózgu<sup>(57)</sup>. Potwierdzono też możliwość zróżnicowania dopaminergicznego tych komórek *in vitro* oraz poddano je wstępnym eksperymentom w zwierzęcym modelu ChP. Immunohistochemia potwierdziła zasiedlenie przeszczepionych komórek w prążkowie biorcy, nie udało się jednak uzyskać satysfakcjonujących wyników w behawioralnej próbie z amfetaminą<sup>(58)</sup>. W analogicznym badaniu wykazano natomiast pozytywny efekt behawioralny transplantu po poddaniu zwierząt próbie z apomorfiną<sup>(59)</sup>. Komórki te są więc kolejnym kandydatem do zastosowania w terapii repopulacyjnej ChP.

## 3 TERAPIA KOMÓRKOWA NASTAWIONA NA DOSTARCZANIE CZYNNIKÓW NEUROPROTEKCYJNYCH

Komórki dobrze tolerowane przez gospodarza mogą być użyte jako źródło czynników troficznych i neuroprotekcyjnych w terapii wspomagającej leczenie wielu schorzeń neurodegeneracyjnych, w tym również w ChP. Najpierw do tego celu używano zróżnicowanych komórek somatycznych, takich jak np. fibroblasty. Produkcję czynników neuroprotekcyjnych uzyskiwano poprzez genetyczną modyfikację tych komórek. Podanie ich do prążkowie lub do istoty czarnej, zarówno przed, jak i po uszkodzeniu układu nigrostriatalnego, znacząco zmniejszało stopień wywołanych uszkodzeń u szczurów<sup>(60,61,62)</sup>. W tego rodzaju terapii istotna wydaje się też możliwość wyboru właściwej okolicy mózgu poddawanej neuroprotekcji. Oprócz prążkowie i istoty czarnej zmodyfikowane do produkcji GDNF fibroblasty podawano również do miejsca sinawego (*locus coeruleus*), które jest siedliskiem neuronów noradrenergicznych w mózgu. W zaawansowanej ChP, szczególnie z towarzyszącymi objawami otepiennymi, dochodzi do degeneracji tej właśnie struktury. Poddanie miejsca sinawego ochronnemu działaniu przeszczepionych fibroblastów skutecznie zmniejszyło degenerację komórek noradrenergicznych. Badania te potwierdzają zasadność wzbogacenia tkanki nerwowej w czynniki neuroprotekcyjne w przebiegu ChP<sup>(63)</sup>.

Z jeszcze lepszym skutkiem niż fibroblasty można wykorzystać do tego celu zmodyfikowane genetycznie komórki macierzyste. Po podaniu domózgowym mysich komórek macierzystych zdolnych do produkcji GDNF wykazano ich różnicowanie do trzech typów komórek neuronalnych, które następnie migrowały i stabilnie wydelały GDNF przez okres co najmniej 4 miesiące. Potencjał terapeutyczny tych komórek został sprawdzony poprzez doprążkowiowe wszczepy myszom, którym następnie niszczone komórki dopaminergiczne istoty czarnej metodą miejscowego podania 6-OHDA. Wszczepienie komórek produkujących GDNF do prążkowie zmniejszało nasilenie objawów eksperymentalnie wywołanej choroby Parkinsona, a nawet częściowo zapobiegało degeneracji komórek dopaminergicznych w istocie czarnej<sup>(64)</sup>. Ostatnio opisuje się coraz więcej nowych, obiecujących czynników neuroprotekcyjnych, które mają szansę zahamować neurodegenerację. Za taki przykład może posłużyć persefyna, która także ogranicza eksperymentalne uszkodzenie szlaku nigrostriatalnego<sup>(65)</sup>.

#### 4 PODSUMOWANIE

Wyniki uzyskane w ostatnich latach zachęcają do dalszych badań nad zastosowaniem terapii komórkowej w leczeniu ChP. Przedtem należy jednak rozwiązać następujące problemy:

- zwiększyć przeżywalność przeszczepionych komórek w mózgu poprzez ustalenie optymalnej metodyki przeszczepu (neuroprotekcja miejscowa, immunosupresja, ukrwienie transplantu itp.);
- opanować groźbę niekontrolowanego rozrostu, często nowotworowego, przeszczepianych komórek – należy podkreślić, że zagrożeniem tym objęte są bardziej komórki embrionalne niż uzyskiwane z tkanek (np. szpiku, krwi pępowinowej lub tkanki nerwowej);
- ustalić, które komórki z szerokiego asortymentu testowanych do tej pory i na jakim stopniu wstępnego zróżnicowania rokują najlepiej, jeśli chodzi o funkcjonalne uzupełnienie zdegenerowanych neuronów i odtworzenie prawidłowych połączeń z mózgiem chorego;
- opracować zunifikowane i bezpieczne metody hodowli neuralnych komórek progenitorowych na szeroką skalę.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Thompson W.G.: Successful brain grafting. *NY Med. J.* 1890; 51: 701-702.
2. Tretiakoff C.: Contribution a l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques deductions relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Thesis, University of Paris, 1919.
3. Hornykiewicz O.: Die topische Lokalisation und das Verhalten von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) in der Substantia nigra des normalen und des Parkinsonkranken Menschen. *Wien. Klin. Wochenschr.* 1963; 75: 309-312.
4. Ungerstedt U., Arbuthnott G.W.: Quantitative recording of rotational behavior in rats after 6-hydroxy-dopamine lesions of the nigrostriatal dopamine system. *Brain Res.* 1970; 24 (3): 485-493.
5. Bjorklund A., Stenevi U.: Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res.* 1979; 177 (3): 555-560.
6. Perlow M.J., Freed W.J., Hoffer B.J. i wsp.: Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 1979; 204 (4393): 643-647.
7. Madrazo I., Drucker-Colin R., Diaz V. i wsp.: Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 1987; 316 (14): 831-834.
8. Backlund E.O., Granberg P.O., Hamberger B. i wsp.: Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J. Neurosurg.* 1985; 62 (2): 169-173.
9. Lindvall O., Backlund E.O., Farde L. i wsp.: Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann. Neurol.* 1987; 22 (4): 457-468.
10. Goetz C.G., Stebbins G.T. 3<sup>rd</sup>, Klawans H.L. i wsp.: United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry: multicenter US and Canadian data base, presurgical and 12 month follow-up. *Prog. Brain Res.* 1990; 82: 611-617.
11. Bakay R.A., Allen G.S., Apuzzo M. i wsp.: Preliminary report on adrenal medullary grafting from the American Association of Neurological Surgeons Graft Project. *Prog. Brain Res.* 1990; 82: 603-610.
12. Morihisa J.M., Nakamura R.K., Freed W.J. i wsp.: Adrenal medulla grafts survive and exhibit catecholamine-specific fluorescence in the primate brain. *Exp. Neurol.* 1984; 84 (3): 643-653.
13. Freed W.J., Cannon-Spoor H.E., Krauthamer E.: Intra-striatal adrenal medulla grafts in rats. Long-term survival and behavioral effects. *J. Neurosurg.* 1986; 65 (5): 664-670.
14. Bankiewicz K.S., Plunkett R.J., Koplin I.J. i wsp.: Transient behavioral recovery in hemiparkinsonian primates after adrenal medullary allografts. *Prog. Brain Res.* 1988; 78: 543-549.
15. Plunkett R.J., Bankiewicz K.S., Cummins A.C. i wsp.: Long-term evaluation of hemiparkinsonian monkeys after adrenal autografting or cavitation alone. *J. Neurosurg.* 1990; 73 (6): 918-926.
16. Lindvall O., Rehncrona S., Brundin P. i wsp.: Neural transplantation in Parkinson's disease: the Swedish experience. *Prog. Brain Res.* 1990; 82: 729-734.
17. Lindvall O., Widner H., Rehncrona S. i wsp.: Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: one-year clinical and neurophysiological observations in two patients with putaminal implants. *Ann. Neurol.* 1992; 31 (2): 155-165.
18. Lindvall O., Sawle G., Widner H. i wsp.: Evidence for long-term survival and function of dopaminergic grafts in progressive Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1994; 35 (2): 172-180.
19. Freed C.R., Greene P.E., Breeze R.E. i wsp.: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344 (10): 710-719.
20. Spencer D.D., Robbins R.J., Naftolin F. i wsp.: Unilateral transplantation of human fetal mesencephalic tissue into the caudate nucleus of patients with Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327 (22): 1541-1548.

21. Peschanski M., Defer G., N'Guyen J.P. i wsp.: Bilateral motor improvement and alteration of L-dopa effect in two patients with Parkinson's disease following intrastriatal transplantation of foetal ventral mesencephalon. *Brain* 1994; 117 (Pt 3): 487-499.
22. Lindvall O., Hagell P.: Role of cell therapy in Parkinson disease. *Neurosurg. Focus* 2002; 13 (5), artykuł nr 2.
23. Wenning G.K., Odin P, Morrish P. i wsp.: Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 1997; 42 (1): 95-107.
24. Hagell P., Schrag A., Piccini P. i wsp.: Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain* 1999; 122 (Pt 6): 1121-1132.
25. Brundin P, Pogarell O., Hagell P i wsp.: Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarets in Parkinson's disease. *Brain* 2000; 123 (Pt 7): 1380-1390.
26. Freed C.R., Breeze R.E., Rosenberg N.L. i wsp.: Survival of implanted fetal dopamine cells and neurologic improvement 12 to 46 months after transplantation for Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 1992; 327 (22): 1549-1555.
27. Ząbek M., Mazurowski W., Dymecki J. i wsp.: Transplantation of fetal dopaminergic cells in Parkinson disease. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1992; supl. 1: 13-19.
28. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. i wsp.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282 (5391): 1145-1147.
29. Horellou P, Lundberg C., Le Bourdelles B. i wsp.: Behavioural effects of genetically engineered cells releasing dopa and dopamine after intracerebral grafting in a rat model of Parkinson's disease. *J. Physiol. (Paris)* 1991; 85 (3): 158-170.
30. Lundberg C., Horellou P, Mallet J., Bjorklund A.: Generation of DOPA-producing astrocytes by retroviral transduction of the human tyrosine hydroxylase gene: *in vitro* characterization and *in vivo* effects in the rat Parkinson model. *Exp. Neurol.* 1996; 139 (1): 39-53.
31. Schwarz E.J., Alexander G.M., Prockop D.J., Azizi S.A.: Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10 (15): 2539-2549.
32. Subramanian T, Emerich D.F., Bakay R.A. i wsp.: Polymer-encapsulated PC-12 cells demonstrate high-affinity uptake of dopamine *in vitro* and 18F-Dopa uptake and metabolism after intracerebral implantation in nonhuman primates. *Cell Transplant.* 1997; 6 (5): 469-477.
33. Studer L., Tabar V., McKay R.D.G.: Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat. Neurosci.* 1998; 1 (4): 290-295.
34. Yan J., Studer L., McKay R.D.G.: Ascorbic acid increases the yield of dopaminergic neurons derived from basic fibroblast growth factor expanded mesencephalic precursors. *J. Neurochem.* 2001; 76 (1): 307-311.
35. Sanchez-Pernaute R., Studer L., Bankiewicz K.S. i wsp.: *In vitro* generation and transplantation of precursor-derived human dopamine neurons. *J. Neurosci. Res.* 2001; 65 (4): 284-288.
36. Chung S., Sonntag K.C., Andersson T. i wsp.: Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 16 (10): 1829-1838.
37. Wagner J., Akerud P., Castro D.S. i wsp.: Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in Nurr1-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat. Biotechnol.* 1999; 17 (7): 653-659.
38. Yang M., Stull N.D., Berk M.A. i wsp.: Neural stem cells spontaneously express dopaminergic traits after transplantation into the intact or 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Exp. Neurol.* 2002; 177 (1): 50-60.
39. Okabe S., Forsberg-Nilsson K., Spiro A.C. i wsp.: Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro*. *Mech. Dev.* 1996; 59 (1): 89-102.
40. Lee S.H., Lumelsky N., Studer L. i wsp.: Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 2000; 18 (6): 675-679.
41. Kim J.H., Auerbach J.M., Rodriguez-Gomez J.A. i wsp.: Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418 (6893): 50-56.
42. Kawasaki H., Mizuseki K., Nishikawa S. i wsp.: Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000; 28 (1): 31-40.
43. Kawasaki H., Suemori H., Mizuseki K. i wsp.: Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99 (3): 1580-1585.
44. Bjorklund L.M., Sanchez-Pernaute R., Chung S. i wsp.: Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99 (4): 2344-2349.
45. Carvey P.M., Ling Z.D., Sortwell C.E. i wsp.: A clonal line of mesencephalic progenitor cells converted to dopamine neurons by hematopoietic cytokines: a source of cells for transplantation in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2001; 171 (1): 98-108.
46. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L. i wsp.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418 (6893): 41-49.

47. Mezey E., Key S., Vogelsang G. i wsp.: Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100 (3): 1364-1369.
48. Zhao L.R., Duan W.M., Reyes M. i wsp.: Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp. Neurol.* 2002; 174 (1): 11-20.
49. Hess D.C., Hill W.D., Martin-Studdard A. i wsp.: Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 2002; 33 (5): 1362-1368.
50. Song S., Sanchez-Ramos J.: Preparation of neural progenitors from bone marrow and umbilical cord blood. *Methods Mol. Biol.* 2002; 198: 79-88.
51. Buzańska L., Machaj E.K., Zabłocka B. i wsp.: Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J. Cell Sci.* 2002; 115 (Pt 10): 2131-2138.
52. Buzańska L., Stachowiak E., Stachowiak M. i wsp.: Neural stem cell line derived from human umbilical cord blood – morphological and functional properties. ESN abstrakt – w druku.
53. Buzańska L., Sun W., Salvi R.J. i wsp.: Changing electrophysiological properties in differentiating human cord blood-derived neural stem cells (HUCB-NSC). ESN abstrakt – w druku.
54. Andrews P.W.: Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line *in vitro*. *Dev. Biol.* 1984; 103 (2): 285-293.
55. Borlongan C.V., Tajima Y., Trojanowski J.Q. i wsp.: Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp. Neurol.* 1998; 149 (2): 310-321.
56. Saporta S., Borlongan C.V., Sanberg PR: Neural transplantation of human neuroteratocarcinoma (hNT) neurons into ischemic rats. A quantitative dose-response analysis of cell survival and behavioral recovery. *Neuroscience* 1999; 91 (2): 519-525.
57. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. i wsp.: Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000; 55 (4): 565-569.
58. Baker K.A., Hong M., Sadi D., Mendez I.: Intrastratial and intranigral grafting of hNT neurons in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2000; 162 (2): 350-360.
59. Willing A.E., Janowski W., Igova T. i wsp.: A comparison of dopaminergic cells from the human Ntera2/D1 cell line transplanted into the hemiparkinsonian rat. *Exp. Neurol.* 2002; 175 (2): 447 INTR – 8. abstrakt.
60. Yoshimoto Y., Lin Q., Collier T.J. i wsp.: Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1995; 691 (1-2): 25-36.
61. Frim D.M., Uhler T.A., Galpern W.R. i wsp.: Implanted fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevent 1-methyl-4-phenylpyridinium toxicity to dopaminergic neurons in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91 (11): 5104-5108.
62. Levivier M., Przedborski S., Bencsics C., Kang U.J.: Intrastratial implantation of fibroblasts genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 1995; 15 (12): 7810-7820.
63. Arenas E., Trupp M., Akerud P., Ibanez C.F.: GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain noradrenergic neurons *in vivo*. *Neuron* 1995; 15 (6): 1465-1473.
64. Akerud P., Canals J.M., Snyder E.Y., Arenas E.: Neuroprotection through delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by neural stem cells in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2001; 21 (20): 8108-8118.
65. Akerud P., Holm P.C., Castelo-Branco G. i wsp.: Persephin-overexpressing neural stem cells regulate the function of nigral dopaminergic neurons and prevent their degeneration in a model of Parkinson's disease. *Mol. Cell Neurosci.* 2002; 21 (2): 205-222.