

MIROŚLAW JANOWSKI

**NEUROTRANSPLANTACJE EKSPERYMENTALNE
LUDZKICH NEURALNYCH KOMÓREK
MACIERZYSTYCH ORAZ ANALIZA CZYNNIKÓW
WARUNKUJĄCYCH ICH MIGRACJĘ**

ROZPRAWA DOKTORSKA



ZS 309

H 4345

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Krystyna Domańska-Janik

Zakład Neurobiologii Naprawczej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
im. M. J. Mossakowskiego
Warszawa, 2010

Pracę doktorską dedykuję córce Leili i żonie Sylwii...

*Pragnę serdecznie podziękować promotorowi mojej pracy doktorskiej **Pani Prof. dr hab. Krystynie Domańskiej-Janik** za stworzenie warunków do przeżycia największej przygody życia jaką się stały neurotransplantacje i medycyna regeneracyjna.*

Chciałbym podkreślić wyjątkową wyrozumiałość Pani Profesor, bez której nie byłoby możliwe pogodzenie bardzo wyczerpującej pracy klinicznej z badaniami w zakresie nauk podstawowych, które stały się przyczynkiem do niniejszej pracy.

Składam szczególne podziękowania
Pani Prof. dr hab. Barbarze Łukomskiej
za niewyczerpane pokłady cierpliwości, ciepła i zrozumienia oraz
wiele cennych rad, które bardzo przyczyniły się do mojego rozwoju
naukowego

Dziękuję
ŚP Pani Prof. dr hab. Marii Dąbskiej
za cenne konsultacje neuropatologiczne

Dziękuję także
Pani dr Hannie Kozłowskiej
za nieocenioną pomoc w rozwiązywaniu bieżących
problemów podczas wielu lat badań eksperymentalnych

Mirek

Wyniki badań zawarte w tej pracy ukazały się w następujących publikacjach:

1. Domanska-Janik K, Habich A, Sarnowska A, **Janowski M**: Neural commitment of cord blood stem cells (HUCB-NSC/NPs): therapeutic perspectives. *Acta Neurobiol Exp*, 2006, 66, 279-91.
2. Habisch HJ, **Janowski M**, Binder D, Kuzma M, Widmann A, Habich A, Schwalenstocker B, Hermann A, Brenner R, Lukomska B, Domanska-Janik K, Ludolph AC, Storch A: Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: Limited intraparenchymal migration narrows therapeutic effects. *J Neural Transm*, 2007, 117, 1395-1406
3. Kozłowska H, Jablonka J, **Janowski M**, Jurga M, Kossuth M, Domanska-Janik K: Transplantation of a Novel Human Cord Blood-derived Neural Stem Cell Line in Rat Model of Cortical Infarct. *Stem Cells Dev*, 2007, 16, 481-8
4. **Janowski M**, Górnicka-Pawlak E, Kozłowska H, Domanska-Janik K, Gielecki J, Lukomska B: Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats. *J Neurol Sci*, 2008, 273, 40-8
5. **Janowski M**, Kuzma-Kozakiewicz M, Binder D, Habisch H-J, Habich A, Lukomska B, Domanska-Janik K, Ludolph AC, Storch A: Neurotransplantation in mice: The concorde-like position ensures minimal cell leakage and widespread distribution of cells transplanted into the cisterna magna. *Neurosci Lett*, 2008, 430: 169-174

Badania przedstawione w tej pracy zostały częściowo sfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach grantu promotorskiego nr 3326/B/P01/2009/36

Per scientiam ad salutem aegroti

SPIS TREŚCI	6
SKRÓTY I AKRONIMY UŻYWANE W PRACY	10
PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA	12
WPROWADZENIE	12
RYS HISTORYCZNY	12
KOMÓRKI MACIERZYSTE	14
MODELE EKSPERYMENTALNE CHORÓB OUN	15
WPROWADZENIE KOMÓREK TERAPEUTYCZNYCH DO OUN	17
Podanie miejscowe komórek macierzystych/progenitorowych	17
Podanie systemowe komórek macierzystych/progenitorowych	18
Podanie komórek macierzystych/progenitorowych do płynu mózgowo- rdzeniowego	18
ZAGADNIENIA IMMUNOLOGICZNE W PRZESZCZEPACH KOMÓRKOWYCH	19
Autotransplantacje	20
Allotransplantacje	21
Ksenotransplantacje	22
MECHANIZMY DZIAŁANIA TERAPEUTYCZNEGO PRZESZCZEPÓW KOMÓRKOWYCH W OUN	23
Bezpośrednia suplementacja komórkowa	23
Komórki neuronalne	23
Komórki nieneuronalne oraz mieszane	25
Pośrednie mechanizmy oddziaływania komórek po transplantacji	26
INDUKOWANA MIGRACJA KOMÓREK W NEUROTRANSPLANTACJACH	29
Rola procesu migracji komórkowej w neurotransplantacjach	29
Mechanizmy migracji komórkowej	30
Migracja komórek zapalnych	30
Migracja komórek macierzystych i progenitorowych	31
Migracja progenitorów neuralnych i neuralnych komórek macierzystych	32
OBRAZOWANIE PRZESZCZEPIONYCH KOMÓREK	33
Rola obrazowania komórkowego w neurotransplantacjach	33
Morfologiczne badania przeszczepów komórkowych <i>ex vivo</i>	34
Obrazowanie komórek <i>in vivo</i>	35
ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	38
SCHEMATY ZADAŃ BADAWCZYCH Z UWZGLĘDNIENIEM ZASTOSOWANYCH METOD	39

MATERIAŁ	42
ZWIERZĘTA EKSPERYMENTALNE	42
POPULACJE KOMÓREK	42
Komórki pochodzące z krwi pępowinowej	42
Komórki szpiku	43
METODY BADAŃ	44
PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO TRANSPLANTACJI	44
EKSPERYMENTALNA NEUROCHIRURGIA GRYZONI	44
Operacja otwarta - neurotransplantacja komórek do zbiornika wielkiego u myszy	44
Operacja stereotaktyczna - wykonanie modelu udaru mózgu u szczurów z zastosowaniem roztworu ouabainy oraz miejscowa transplantacja zawiesiny komórkowej	45
INIEKCJE BROMODEOKSYURYDYN (BRDU)	46
POZYSKIWANIE I OBRÓBKA TKANEK ZWIERZĘCYCH	46
Opis preparowania OUN u myszy	47
Preparatyka prądkowia i wzgórza u szczurów	47
Zamrażanie mózgów i rdzeni kręgowych	47
Krojenie mózgów i rdzeni kręgowych na kriostacie	48
Homogenizacja fragmentów mózgu i pozyskiwanie nadsącza	48
HODOWLE KOMÓRKOWE	48
PRZYGOTOWANIE KOMÓREK HUCB-NSC DO BARWIEŃ	49
ZNAKOWANIE KOMÓREK HUCB-NP CZĄSTECZKAMI TLENKU ŻELAZA (SPIO)	50
BARWIENIA SKRAWKÓW MÓZGU I KOMÓREK	50
Badania histologiczne	50
Barwienie metodą Perla	50
Badania immunocytochemiczne preparatów na szkiełkach podstawowych	51
Badania immunohistochemiczne pływających skrawków mózgu	53
Badania immunocytochemiczne komórek HUCB-NSC znajdujących się na płytce 24-dołkowej	54
OBRAZOWANIE KOMÓREK I SKRAWKÓW MÓZGU	54
DETEKCJA SYGNAŁU MR GENEROWANEGO PRZEZ WYZNAKOWANE KOMÓRKI HUCB-NP	55
METODY ANALIZY STRUKTUR MÓZGU PODDANEGO UDAROWI	55
Analiza ilościowa	55

Analiza jakościowa	56
MIGRACJA KOMÓREK HUCB-NSC <i>IN VITRO</i>	56
Ocena migracji komórek nieadherentnych	57
Ocena migracji komórek adherentnych	58
METODY STATYSTYCZNE	58
WYNIKI BADAŃ	59
MODEL PRZESZCZEPU LUDZKICH KOMÓREK DO ZBIORNIKA WIELKIEGO U MYSZY	59
OPRACOWANIE MODELU USZKODZENIA MÓZGU Z ZASTOSOWANIEM OUABAINY	65
Analiza morfologiczna uszkodzenia mózgu	65
Pomiar wielkości oraz analiza topograficzna uszkodzenia mózgu	66
ANALIZA KOMÓRKOWYCH PROCESÓW NAPRAWCZYCH PO UDARZE MÓZGU ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ENDOGENNEJ NEUROGENEZY	69
TRANSPLANTACJA NEURALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (HUCB-NSC/NP) DO MÓZGU SZCZURA W EKSPERYMENTALNYM MODELU USZKODZENIA Z ZASTOSOWANIEM OUABAINY	72
BADANIE CZYNNIKÓW ODDZIAŁUJĄCYCH NA MIGRACJĘ NEURALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (HUCB-NSC) <i>IN VITRO</i>	75
Badanie obecności receptorów i białek zaangażowanych w migrację komórek HUCB-NSC <i>in vitro</i>	75
Badanie zdolności komórek HUCB-NSC do migracji <i>in vitro</i>	79
Migracja komórek nieadherentnych	79
Migracja komórek adherentnych	83
OBRAZOWANIE NEURALNYCH KOMÓREK PROGENITOROWYCH Z KRWI PĘPOWINOWEJ METODĄ REZONANSU MAGNETYCZNEGO	87
DYSKUSJA	89
POTRZEBA ROZWOJU NOWYCH PROCEDUR BADAWCZYCH W DZIEDZINIE NEUROTRANSPLANTACJI	89
Podanie komórek do zbiornika wielkiego w mysim modelu ALS	89
Nowy model udaru mózgu z zastosowaniem ouabainy	91
NEUROGENEZA INDUKOWANA UDAREM	93
TRANSPLANTACJE KOMÓREK DO MÓZGU	96
Czas przeżycia przeszczepionych komórek i reakcja immunologiczna gospodarza na przeszczep	96

Migracja komórek po przeszczepie do OUN	99
BADANIE CZYNNIKÓW ODDZIAŁUJĄCYCH NA MIGRACJĘ NEURALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (HUCB-NSC) <i>IN VITRO</i>	100
Oś PDGF – PDGFR	100
Oś HGF – c-Met	101
Oś VEGF – Flk-1	101
Oś IGF-1 – IGF-1R	102
Oś SDF-1 – CXCR4	102
Macierz zewnątrzkomórkowa a migracja komórek	103
Migracja komórek indukowana homogenatami z mózgu	104
ZNAKOWANIE I DETEKcja NEURALNYCH KOMÓREK PROGENITOROWYCH METODĄ REZONANSU MAGNETYCZNEGO	105
PODSUMOWANIE I WNIOski	109
PIŚMIENNICTWO	110
STRESZCZENIE PRACY	135

SKRÓTY I AKRONIMY UŻYWANE W PRACY

AAS	(ang. antibiotic, antimycotic solution) – roztwór antybiotyku i środka przeciwgrzybiczego
AD	(ang. Alzheimer disease) – choroba Alzheimera
ASC	(ang. adult stem cells) – komórki pochodzące z ukształtowanych tkanek
ALS	(ang. amyotrophic lateral sclerosis) – stwardnienie boczne zanikowe
Ang-1	(ang. angiopoietin-1) – angiopoetyna 1
BDNF	(ang. brain-derived neurotrophic factor) – mózgowopochodny czynnik neurotroficzny
bFGF	(ang. basic fibroblast growth factor) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów
BrdU	bromodeoksyurydyna
CD	(ang. cluster of differentiation) – cząsteczka różnicowania
CED	(ang. convection-enhanced delivery) – metoda podania substancji wykorzystująca zjawisko jej równomiernego rozchodzenia się na skutek odpowiedniego dostosowania prędkości iniekcji
CEST	(ang. chemical exchange saturation transfer) – wysycenie chemicznego transferu protonów
c-Met	receptor dla HGF
CMFDA	(ang. 5-chloromethylfluorescein diacetate) – znacznik komórek
CNTF	(ang. ciliary neurotrophic factor) – rzęskowy czynnik neurotropowy
CXCR4	(ang. C-X-C receptor – 4) – receptor nr 4 zawierający motyw C-X-C
DCX	(ang. doublecortin) – komórkowy marker neuroblastów
DMEM	(ang. Dulbecco's modified Eagle medium) – komponent pożywki do hodowli komórek
DNA	(ang. deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy
ED1	komórkowy marker aktywowanego mikrogleju
EGF	(ang. epidermal growth factor) – naskórkowy czynnik wzrostu
ESC	(ang. embryonic stem cells) – embrionalne komórki macierzyste
ET-1	endotelina-1
FACS	(ang. fluorescent-activated cell sorting) – fluorescencyjne sortowanie komórek
FBS	(ang. fetal bovine serum) – płodowa surowica wołowa
FISH	(ang. fluorescent in situ hybridization) – fluorescencyjna hybrydyzacja in situ
Flk-1	(ang. fetal liver kinase-1) – kinaza płodowej wątroby – receptor dla VEGF
GBM	(łac. glioblastoma) – glejak wielopostaciowy
GDNF	(ang. glial-derived neurotrophic factor) – glejopochodny czynnik neurotroficzny
GFAP	(ang. glial fibrillary acid protein) – kwaśne białko włóknkowe
GFP	(ang. green fluorescent protein) – zielone białko fluorescencyjne
HD	(ang. Huntington disease) – choroba Huntingtona
H-E	hematoksylina-eozyna
HGF	(ang. hepatocyte growth factor) – wątrobowopochodny czynnik wzrostu
HLA	(ang. human leukocyte antigen) – antygen zgodności tkankowej
HUCB	(ang. human umbilical cord blood) – ludzka krew pępowinowa
HuNu	(ang. human nucleus) – przeciwciało specyficzne dla antygenów jądrowych ludzkich komórek
ITS	insulina + transferyna + selen (dodatek do pożywki dla komórek)
IFN	interferon
IGF-1	(ang. insulin-like growth factor -1) – insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IPS	(ang. induced Pluripotent Cells) – indukowane komórki pluripotencjalne
LMS	(ang. lowest means square) – kwadraty najmniejszych średnich
MACS	(ang. magnetic-activated cell sorting) – magnetyczne sortowanie komórek
MCA	(ang. middle cerebral artery) – tętnica środkowa mózgu
MCAO	(ang. middle cerebral artery occlusion) – okluzja tętnicy środkowej mózgu
MPIO	(ang. microparticles of iron oxide) – mikrocząsteczki tlenku żelaza
MR	(ang. magnetic resonance) rezonans magnetyczny
MSC	(ang. mesenchymal stem cells) – mezenchymalne komórki macierzyste
NF	neurofilament
NG2	(ang. neuroglycan-2) – neuroglikan – 2, marker specyficzny dla progenitorów neuralnych
NLS	(ang. nuclear localization sequence) – sekwencja lokalizacji jądrowej
NP	(ang. neural progenitors) – progenitory neuralne
NSC	(ang. neural stem cells) – neuralne komórki macierzyste
NuMa	(ang. nuclear matrix) – przeciwciało skierowane przeciwko ludzkim antygenom macierzy jądrowej
OUN	ośrodkowy układ nerwowy
PBS	(ang. phosphate buffer solution) – bufor fosforanowy
PCR	(ang. polymerase chain reaction) – łańcuchowa reakcja polimerazy
PD	(ang. Parkinson disease) choroba Parkinsona
PDGF	(ang. platelet-derived growth factor) – płytkopochodny czynnik wzrostu
PET	(ang. positron emission tomography) – pozytronowa tomografia emisyjna
PFA	paraformaldehyd
PIGF	(ang. placental growth factor) – łożyskowy czynnik wzrostu
PSA-NCAM	(ang. poly-sialated neural cell adhesion molecule) – molekula adhezyjna komórek neuralnych zawierająca kwas sialowy
RMS	(ang. rostral migratory stream) – przedni strumień migracji
SCI	(ang. spinal cord injury) – uraz rdzenia kręgowego
SDF-1	(ang. stroma-derived factor-1) – czynnik 1 podścieliska
SM	(łac. sclerosis multiplex) – stwardnienie rozsiane
SPECT	(ang. single photon emission computed tomography) – tomografia emisyjna pojedynczych fotonów
SPIO	(ang. superparamagnetic iron oxide) – tlenek żelaza o właściwościach superparamagnetycznych
SVZ	(ang. subventricular zone) – strefa okołokomorowa
SWI	(ang. susceptibility weighted image) – obrazowanie zależne od podatności magnetycznej
T	Tesla, jednostka indukcji magnetycznej
TUJ1	komórkowy marker młodych neuronów
USG	ultrasonografia
USSC	(ang. unrestricted somatic stem cells) – niezdeterminowane somatyczne komórki macierzyste
VEGF	(ang. vascular endothelial growth factor) – naczyniopochodny czynnik wzrostu

PRZEGLĄD PIŚMIENICTWA

WPROWADZENIE

Choroby układu nerwowego są najczęstszą przyczyną ciężkiego inwalidztwa (Adamson i wsp., 2004). Ich istotą jest m.in. utrata komórek w wyniku procesów patologicznych takich jak: udar, uraz, zapalenie czy zwyrodnienie. Dotychczas stosowane strategie leczenia mające na celu zapobieganie obumieraniu komórek mózgu i rdzenia kręgowego nie przyniosły spodziewanych rezultatów (Drummond i wsp., 2000). W związku z tym powstała koncepcja zastąpienia martwych komórek nowymi, dostarczonymi z zewnątrz drogą neurotransplantacji. Pierwsze próby kliniczne transplantacji fragmentów mózgów płodowych przyniosły obiecujące wyniki, ale ze względu na bardzo ograniczoną dostępność materiału do przeszczepów nie znalazły szerszego zastosowania. Dopiero odkrycie w ostatniej dekadzie metod pozyskiwania, hodowli i ekspansji *in vitro* ludzkich komórek macierzystych i progenitorowych przyniosło nadzieję na przełom w możliwości naprawy mózgu i rdzenia kręgowego.

RYS HISTORYCZNY

Współczesne terapeutyczne neurotransplantacje komórek macierzystych wywodzą się z rozwoju dwóch niezależnych nurtów naukowych, z których każdy może się poszczycić ponad 100-letnią tradycją. Samo pojęcie „komórek macierzystych”, z których wywodzą się wszystkie komórki organizmu zostało zaproponowane przez Arthura Pappenheima na przełomie XIX i XX wieku. W tym samym okresie wykonano także pierwsze zabiegi neurotransplantacyjne. Kolejne dekady nie przyniosły przełomu w żadnej z tych dziedzin. Dopiero w II poł. XX wieku dokonał się istotny postęp w badaniach nad wykorzystaniem komórek macierzystych, ale początkowo dotyczył on głównie zagadnień hematologicznych (Lajtha, 1979). Także w tym samym okresie wykonano pierwsze neurotransplantacje ukierunkowane na leczenie chorób neurologicznych (Bjorklund i Stenevi, 1979; Perlow i wsp., 1979). Były one poprzedzone gruntownymi badaniami nad procesami reinerwacji zachodzącymi po uszkodzeniu mózgu (Bjorklund i wsp., 1975), oraz nad pomyslną

interakcją przeszczepów fragmentów mózgów płodowych z nieuszkodzonym mózgiem biorcy (Bjorklund i Stenevi, 1977). Ze względu na relatywnie dobrze poznaną patofizjologię oraz ograniczony charakter procesu chorobowego neurotransplantacje zostały początkowo zastosowane w chorobie Parkinsona (PD).

Solidne podstawy eksperymentalne spowodowały dość szybkie zastosowanie neurotransplantacji w klinice. Ze względu na ograniczoną dostępność tkanek płodowych oraz ryzyko odrzucenia przeszczepu z powodu niezgodności immunologicznej poszukiwano do zastosowań klinicznych innego źródła tkanek produkujących dopaminę. Wybór padł na rdzeń nadnerczy – narząd wyspecjalizowany w dostarczaniu katecholamin do krwioobiegu. Już w 1982 r. Erik-Olof Backlund wykonał w Szwecji taki przeszczep po roku oczekiwania na pozytywną decyzję komisji etycznej. Jednak efekt pierwszych autologicznych neurotransplantacji klinicznych nie był satysfakcjonujący (Backlund i wsp., 1985; Lindvall i wsp., 1987). W związku z tym ośrodek szwedzki zaprzestał przeszczepiania nadnerczy i rozpoczął przeszczepianie fragmentów mózgów płodowych (Lindvall i wsp., 1988).

Jednak w tym samym czasie ukazało się doniesienie z Meksyku o spektakularnej poprawie klinicznej w wyniku autoprzeszczepu rdzenia nadnerczy u 2 młodych chorych cierpiących na PD (Madrado i wsp., 1987). Wstępne doniesienia także z innych ośrodków wydawały się zachęcające. Jednak dokładna analiza przeprowadzona na większej liczbie pacjentów (ok. 200) wykazała, że poprawa jest tylko przejściowa, a zabieg jest związany z licznymi powikłaniami. Analiza zysków i strat nie wypadła pomyślnie (Goetz et al., 1991). Wobec tego ostatecznie wycofano się z tego sposobu leczenia. Należy zwrócić uwagę, że przeprowadzone kilka lat wcześniej eksperymenty w zwierzęcych modelach PD nie wykazały skuteczności transplantacji fragmentów rdzenia nadnerczy (Freed i wsp., 1986; Morihisa i wsp., 1984).

W następnych latach dalej rozwijano przeszczepianie fragmentów mózgów płodowych w PD. Potwierdzono ich skuteczność u niektórych chorych. Wykazano także pozytywny efekt transplantacji u chorych z HD. Jednak dwie podwójnie ślepe próby kliniczne przeprowadzone u chorych z PD nie wykazały statystycznie istotnego efektu terapeutycznego (Olanow i wsp., 2003; Freed i wsp., 2001).

Podsumowując, technologie przeszczepów tkanek płodowych nie stały się przełomem w leczeniu PD, a trudność w pozyskiwaniu materiału do transplantacji oraz problemy logistyczne spowodowały, że zarzucono ten kierunek postępowania.

Nowe nadzieje pojawiły się dopiero po nabyciu umiejętności hodowli komórek macierzystych na szeroką skalę.

KOMÓRKI MACIERZYSTE

Istotą komórek macierzystych jest ich zdolność do samoodnowy oraz do wytwarzania komórek potomnych, które ulegają różnicowaniu. Jednak pojęcie komórek macierzystych nie obejmuje jednego rodzaju komórek, ale różne hierarchicznie ich typy pojawiające się kolejno w czasie rozwoju organizmu. Najbardziej pierwotną komórką macierzystą każdego organizmu rozmnażającego się drogą płciową jest zygota. Jako jedyna jest w stanie „utworzyć” w pełni funkcjonalny organizm. Nazywamy ją totipotencjalną komórką macierzystą. Zachowuje ona taką zdolność przez pierwsze 2 podziały komórkowe. Dotychczas nie udało się utrzymać w hodowli komórek w stanie totipotencjalności. Komórki pobrane z zarodka w późniejszym stadium (np. blastocysty) są zdolne do wytworzenia *in vitro* lub po przeszczepie wszystkich, poza płciowymi, typów komórek. Zostały one nazwane pluripotencjalnymi komórkami macierzystymi. Nabycie umiejętności stałej hodowli takich komórek pochodzenia ludzkiego stanowiło znaczący krok w rozwoju nowej gałęzi wiedzy – tzw. medycyny regeneracyjnej (Thomson i wsp., 1998). W trakcie dalszego rozwoju ontogenetycznego dochodzi do stopniowego ograniczania możliwości komórek macierzystych w zakresie tworzenia narządów i tkanek. Zaczynają się one specjalizować w wytwarzaniu komórek tylko określonej tkanki i zyskały nazwę specyficznych tkankowo lub multipotencjalnych komórek macierzystych.

Pomimo względnej łatwości pozyskiwania oraz namnażania pluripotencjalnych komórek macierzystych pochodzenia zarodkowego (ESC) to regulacja procesu ich różnicowania okazała się bardzo trudna. Po przeszczepie mają one skłonność do przekształcania się w potworniaki (Asano i wsp., 2006). Poza tym badania nad komórkami zarodkowymi wywołują kontrowersje etyczne, co ogranicza przyzwolenie społeczne na ich szerokie rozpowszechnienie (Wadman, 1999). Liczne wady ESC przyczyniają się do upowszechnienia badań nad otrzymywaniem komórek macierzystych z ukształtowanych narządów i dojrzałych tkanek (ASC) takich jak szpik (Prockop, 1997), mózg (Doetsch i wsp., 1999), a ostatnio skóra (Mignone i wsp., 2007), tkanka tłuszczowa (Dhar i wsp., 2007), czy krew obwodowa (Kucia i

wsp., 2008). Krew pępowinowa do pewnego stopnia posiada zalety specyficzne zarówno dla ESC jak i ASC. Zawiera w sobie komórki na wczesnym etapie rozwoju ontogenetycznego w czym przypomina ESC, a jednocześnie nie budzi kontrowersji etycznych oraz nie wykazuje tendencji do niekontrolowanego rozrostu po transplantacji, co należy do pozytywnych cech ASC. Z krwi pępowinowej uzyskano już nie tylko tkankowo specyficzne linie komórkowe takie jak interesująca nas w kontekście neurotransplantacji linia neuralnych komórek macierzystych (neural stem cells, NSC) (Buzanska i wsp., 2002), czy mezenchymalne komórki macierzyste (mesenchymal stem cells, MSC) (Lee i wsp., 2004), ale pluripotencjalne komórki macierzyste przypominające ESC (McGuckin i wsp., 2006). Ostatnio podobne pluripotencjalne komórki macierzyste zidentyfikowano także w szpiku (Ratajczak i wsp., 2008).

MODELE EKSPERYMENTALNE CHORÓB OUN

Podjęcie badań przedklinicznych nad możliwościami zastosowania neurotransplantacji komórek macierzystych wymaga odpowiedniego modelowania chorób OUN u zwierząt (Sughrue i wsp., 2009). Najliczniejszą grupę stanowią modele chorób powstałe wskutek zadziałania czynnika fizycznego, chemicznego lub biologicznego na układ nerwowy zwierzęcia, włączając w to naczynia OUN. Spośród nich wyróżniamy modele wywołujące chorobę po nagłej, często jednorazowej lub wielokrotnej aplikacji czynnika patogennego (Coyle i Schwarcz, 1976; Borlongan i wsp., 1995). Poza tym zwierzęta transgeniczne mogą prezentować genetyczne podłoże determinujące powstanie chorób (tzw. modele transgeniczne) (Kaufmann i wsp., 2009). Stosowane modele powinny możliwie najbardziej patofizjologicznie odpowiadać odpowiednim jednostkom chorobowym, a także być względnie łatwe do wykonania oraz powtarzalne. Instytut, w którym pracuję jest od wielu lat związany z badaniami nad niedokrwieniem mózgu. Ze względu na częstość występowania, ciężkość przebiegu oraz trwałość następstw udar mózgu stanowi olbrzymie obciążenie dla społeczeństwa. Badania w tym zakresie mają więc znaczenie strategiczne.

Istnieje wiele różnych zwierzęcych modeli udaru mózgu. Najczęściej do tego celu używa się gryzoni. Pierwszą dużą grupę stanowią modele, w których

uszkodzenie obejmuje obszar unaczynienia dystalnych gałęzi tętnicy środkowej mózgu (MCA) i u gryzoni dotyczą one wybiórczo kory mózgu. Do ich wykonania stosuje się podwiązanie dystalnego odcinka MCA przez kraniotomię skroniową (Risedal i wsp., 2002), wykorzystuje się reakcję fotochemiczną (Jablonka i wsp., 2007) oraz podanie substancji naczyniozężającej (ET-1) w bezpośrednie sąsiedztwo MCA (Ostrowski i wsp., 1998). Ze względu na odmienności anatomiczne (pofałdowanie kory i stosunek ilości istoty szarej do białej) u ludzi nie występują selektywne, ogniskowe uszkodzenia ograniczone do kory mózgu. Poza tym takie modele udaru mózgu nie wywołują u zwierząt znaczących, długotrwałych i łatwo mierzalnych objawów behawioralnych, co ogranicza ich zastosowanie do testowania skuteczności terapii eksperymentalnych.

W badaniach przedklinicznych udar mózgu najczęściej wywołuje się drogą wewnątrznacyniową (MCAO model) (Yanamoto i wsp., 2003). Wystąpienie znaczących objawów behawioralnych związane jest jednak z olbrzymim obszarem uszkodzenia obejmującym niekiedy prawie całą półkulę mózgu. Wówczas jednak bezpośrednią przyczyną występujących objawów najczęściej jest obrzęk półkuli i związany z nim efekt masy, a nie tylko wielkość ogniska niedokrwienia (Hofmeijer i wsp., 2004). W tej sytuacji ważniejsze wydaje się być stosowanie leków przeciwoobrzękowych, czy kraniotomii odbarczającej niż neuroprotekcji. Olbrzymi obszar uszkodzenia powiązany z masywną reakcją zapalną może nie sprzyjać także badaniom i strategii naprawy mózgu w terminie późniejszym. Po krytycznym przeglądzie metod badawczych uznano, że optymalnym modelem do testowania terapii komórkowej byłoby uszkodzenie relatywnie małe objętościowo, ale wywołujące znaczące objawy behawioralne utrzymujące się przez dłuższy okres.

W związku z omówionymi powyżej ograniczeniami istniejących modeli, w ramach pracy doktorskiej m.in. opracowano i scharakteryzowano nowy model udaru mózgu (Janowski i wsp., 2008a). Obserwacje kliniczne wskazują na występowanie znaczących i długotrwałych objawów w przypadku nawet niewielkich lezji, ale zlokalizowanych w obrębie struktur głębokich mózgu. Ponieważ brak jest metod selektywnego uszkodzenia unaczynienia biegnącego do tego obszaru mózgu u gryzoni (głównie tętnic przeszywających) użyto substancji chemicznej w celu wywołania zmian odpowiadających udarowi mózgu w zakresie tego obszaru. Do tego celu wykorzystano stereotaktyczną iniekcję ouabainy, która jest inhibitorem pompy sodowo-potasowej. W czasie rzeczywistego niedokrwienia pierwszą i najważniejszą

reakcją jest zahamowanie funkcji tej pompy wskutek braku stałego dopływu energii, co powoduje zniesienie potencjału błonowego i stopniową dezintegrację komórki. Tak więc na poziomie komórkowym ouabaina uruchamia podobny łańcuch zmian patologicznych jak ciężkie niedokrwienie lub niedotlenienie mózgu. Na potwierdzenie tej tezy wykazano wcześniej przy użyciu rezonansu magnetycznego, że domózgowe podanie ouabainy wywołuje wzorec i ewolucję zmian przypominające udar mózgu wykonany metodą tradycyjną (Veldhuis i wsp., 2003).

WPROWADZENIE KOMÓREK TERAPEUTYCZNYCH DO OUN

W zależności od istoty i lokalizacji procesu chorobowego poszczególne schorzenia neurologiczne będą wymagały indywidualnego podejścia determinując sposób transplantacji komórkowych.

Podanie miejscowe komórek macierzystych/progenitorowych

Choroby charakteryzujące się ogniskowym wzorcem obumierania komórek wydają się być głównymi kandydatami do miejscowej aplikacji komórek. W zależności od szybkości postępu procesu patologicznego wyróżniamy choroby przebiegające powoli (neurodegeneracyjne) oraz zachodzące nagle (udary i urazy). Obecnie miejscowe podanie komórek do mózgu polega zwykle na stereotaktycznej iniekcji zawiesiny komórkowej (Molina i wsp., 1993). W przeszłości podawano także drobne fragmenty niektórych narządów. W nielicznych przypadkach chorób mózgu oraz zawsze w chorobach rdzenia kręgowego wykonuje się w tym celu operacje otwarte. Ponieważ najczęstszym schorzeniem rdzenia kręgowego poddawanych próbom terapii komórkowej są urazy, to operacyjne odbarczenie rdzenia oraz wycięcie blizny może mieć dodatkowy efekt terapeutyczny (Yoon i wsp., 2007). Coraz więcej wysiłku naukowców zmierza w kierunku stworzenia trójwymiarowych struktur neuralnych *in vitro* do zastosowania zamiast lub jako uzupełnienie podawanych zawiesin komórkowych (Jurga i wsp., 2009).

Ponieważ w przewlekłe postępujących chorobach neurodegeneracyjnych obumierają głównie neurony, a proces przebiega powoli i bez znaczącego odczynu zapalnego, komórki są przeszczepiane przeważnie do istoty szarej objętej procesem chorobowym (HD) lub bezpośrednio do struktur otrzymujących projekcje z tych jąder

(PD). W przypadku chorób ostrych w obrębie uszkodzenia pojawia się bardzo silny odczyn zapalny, który może wpływać negatywnie na dobrostan przeszczepu. W takich przypadkach zaleca się raczej transplantacje w sąsiedztwo lezji (Kelly i wsp., 2004). Szczególnie, że wszczepiane komórki zwykle posiadają zdolność migracji w kierunku uszkodzenia. Istnieją także pojedyncze doniesienia o transplantacji komórek bezpośrednio do jamy poudarowej w celu odbudowy uszkodzonej tkanki (Bibie i wsp., 2009; Zeng i wsp., 2005).

Podanie systemowe komórek macierzystych/progenitorowych

Podanie systemowe polega zwykle na iniekcji zawiesiny komórkowej do krwioobiegu. Zaletą tego podejścia jest niska inwazyjność zabiegu. Stosowane jest głównie w chorobach przebiegających z nagłym, znaczącym uszkodzeniem tkanek mózgu i/lub rdzenia kręgowego. Początkowo opierało się ono na założeniu, że masywna miejscowa reakcja zapalna wywołana nagłym uszkodzeniem mózgu spowoduje wyrzut chemokin i czynników troficznych, które są zdolne do rekrutacji przeszczepionych komórek z układu krwionośnego do OUN. Wykazano jednak, że zasiedlenie OUN przez podane systemowo komórki nie jest duże i nie wydaje się niezbędne do osiągnięcia pozytywnego rezultatu (Willing i wsp., 2003). Wobec tego zakłada się udział pośrednich mechanizmów regulujących procesy naprawcze mózgu, na które mogą oddziaływać nawet obwodowo umiejscowione przeszczepy komórkowe (Willing i Pennypacker, 2007). Tym niemniej badania eksperymentalne wykazały, że najpewniej na skutek rozcieńczenia we krwi wydzielanych przez przeszczep substancji modulujących konieczna jest aplikacja stosunkowo dużej liczby komórek, trudno osiągalnej w warunkach klinicznych (Janowski i Date, 2009). Tym można wytłumaczyć bardzo niewielki efekt terapeutyczny neurotransplantacji systemowych obserwowany w pierwszej próbie klinicznej u pacjentów z udarem mózgu (Bang i wsp., 2005).

Podanie komórek macierzystych/progenitorowych do płynu mózgowo-rdzeniowego

Zupełnie inna sytuacja występuje w przypadku rozsianego charakteru procesu chorobowego wykazującego powolny postęp, czego przykładem jest stwardnienie

boczne zanikowe (ALS). Objęcie procesem chorobowym znacznych obszarów mózgu i rdzenia nie sprzyja miejscowej aplikacji terapeutycznych komórek. Dodatkowo wybiórczy i stopniowo postępujący proces jak i apoptotyczny charakter obumierania elementów komórkowych, nie wywołuje znaczącej odpowiedzi zapalnej i nie doprowadza do przerwania bariery krew-mózg tym samym ograniczając przechodzenie komórek z krwiobiegu. W związku z tym atrakcyjnym sposobem dostarczenia komórek do organizmu biorcy chorego na ALS może być aplikacja do przestrzeni podpajęczynówkowej. W ten sposób komórki zostają dostarczone poza barierę krew-mózg oraz potencjalnie zyskują dostęp do dużych obszarów mózgu i rdzenia. O ile u ludzi najprostszym sposobem infuzji podpajęczynówkowych jest nakłucie lędźwiowe, to u myszy służących za transgeniczne modele wielu chorób OUN droga ta ze względu na rozmiar zwierzęcia, nie jest łatwo dostępna i efektywna. Natomiast transplantacja komórek do układu komorowego znacząco podwyższa inwazyjność zabiegu. Jedynym miejscem, gdzie w sposób dobrze kontrolowany, a jednocześnie bez uszkodzania tkanki nerwowej można podać komórki do przestrzeni podpajęczynówkowej u myszy jest zbiornik wielki. Jednak ten bezpośredni i szeroki kontakt z przestrzenią zewnątrzczaszkową może usposabiać do wstecznego wypływu komórek po transplantacji. Grupa japońskich badaczy wycofała się tylko z tego powodu z tej drogi podania komórek na rzecz bardziej inwazyjnej transplantacji do komory IV (Ohta i wsp., 2004). Ponieważ dotychczas nie istniał w literaturze dokładny opis tej procedury, w ramach pracy doktorskiej opracowałem i opublikowałem m.in. metodę skutecznego dostarczenia komórek *via cisterna magna* do przestrzeni płynowych OUN u myszy (Janowski i wsp., 2008b).

ZAGADNIENIA IMMUNOLOGICZNE W PRZESZCZEPACH KOMÓRKOWYCH

Od początku swego istnienia transplantologia zmagą się z procesem odrzucania przeszczepu. Wynika on z występowania odpowiedzi immunologicznej biorcy przeciwko wprowadzonej obcej tkance dawcy. Dopiero odkrycie i zastosowanie leków hamujących odpowiedzi immunologiczną przyczyniło się do znaczącej poprawy wyników transplantacji wielu narządów. Należało więc oczekiwać, że kwestia indukcji odpowiedzi immunologicznej może okazać się istotnym czynnikiem ograniczającym osiąganie pozytywnych wyników również w neurotransplantacjach. Transplantologia kliniczna obecnie głównie dotyczy

przeszczepów narządowych, które są wykonywane w obrębie jednego gatunku. Nazywają się one allotransplantacjami. Ominięciem problemu może być wykonywanie przeszczepów identycznych genetycznie, czyli autoprzeszczepów lub przeszczepów syngenicznych. Stopień pokrewieństwa pomiędzy dawcą, a biorcą nie jest dokładnie określony w pierwszych doniesieniach o neurotransplantacjach eksperymentalnych, ale z zasady były one wykonywane wsobnie – wewnątrz jednego szczepu szczurów (Sprague-Dawley) (Bjorklund i Stenevi, 1979; Perlow i wsp., 1979). Wówczas dopiero zaczęły pojawiać się pierwsze doniesienia o pozytywnym wpływie leków immunosupresyjnych (cyklosporyna) na przeżycie alloprzeszczepów narządowych, tak więc te leki nie były stosowane we wczesnych badaniach nad neurotransplantacjami (Green i Allison, 1978; Ruegger i wsp., 1976). Przed zastosowaniem allotransplantacji fragmentów mózgów płodowych w warunkach klinicznych wykonano badania nad przeszczepami ludzkich tkanek w doświadczalnych modelach zwierzęcych. Takie przeszczepy, w których dawca i biorca pochodzą z różnych gatunków nazywają się ksenotransplantacjami. W tych pierwszych ksenotransplantacjach zastosowano zapobiegawczo stosunkowo duże dawki cyklosporyny (Brundin i wsp., 1986; Brundin i wsp., 1988). Immunosupresja została także użyta w pierwszych klinicznych allotransplantacjach domózgowych (Lindvall i wsp., 1990; Lindvall i wsp., 1988). W kolejnych próbach klinicznych ograniczono jej stosowanie ze względu na występowanie efektów ubocznych (Olanow i wsp., 2003; Freed i wsp., 2001). Skuteczność i korzyści płynące z zastosowania immunosupresji w neurotransplantacjach wciąż nie są udowodnione.

Autotransplantacje

Pod względem immunologicznym najbardziej korzystne jest stosowanie przeszczepów autologicznych. Występuje wówczas pełna zgodność pomiędzy biorcą i przeszczepem. Jednak istnieją znaczne ograniczenia w zastosowaniu praktycznym tego podejścia. Jeżeli komórki będą musiały być poddane ekspansji i manipulacji *in vitro* zabierze to określoną ilość czasu i nie będzie możliwości zastosowania tej terapii w trybie pilnym. Poza tym indywidualizacja procesu przygotowywania komórek zwiększyłaby koszty procedury. Jednak taka procedura została już opracowana w celu naprawy tkanki łącznej (Kim i wsp., 2009b) i jest dostępna komercyjnie w Polsce (Impomed, Polska).

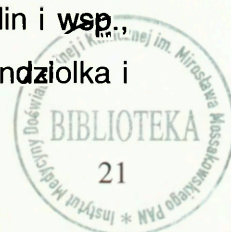
Z drugiej strony można przewidzieć, że rozwój banków krwi pępowinowej i szpiku przyczyni się do zapewnienia dostępu do autologicznego materiału dla coraz szerszej grupy pacjentów. W przypadku krwi pępowinowej komórki te zostały pobrane we wczesnym okresie rozwoju osobniczego. Ponieważ uważa się, że komórki „młode” ontogenetycznie charakteryzują się wyższym potencjałem naprawczym, to mogą one stanowić cenne źródło do wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. Dodatkowym bodźcem do zastosowania w klinice może być nacisk członków rodzin, które zainwestowały pieniądze w bankowanie krwi pępowinowej swoich dzieci.

Inna sytuacja występuje w przypadku chorób genetycznych. Autologiczny materiał może powielać istniejące patologie i przed przeszczepem wymagać „naprawy” genetycznej *ex vivo*.

W kontekście autoprzeszczepów warto zwrócić uwagę na uzyskane ostatnio indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (iPS) (Takahashi i Yamanaka, 2006). Po raz pierwszy otrzymano je poprzez wszczepienie do zwykłych komórek somatycznych (fibroblasty) genów charakterystycznych dla komórek macierzystych. Obecnie wykazano, że wystarczające jest wprowadzenie do wnętrza komórek białek – produktów tych genów, dzięki czemu wyeliminowano konieczność genetycznej modyfikacji komórek. Poznanie mechanizmu przemiany dojrzałych ludzkich komórek somatycznych w komórki iPS wskazało nowe możliwości zastosowania autotransplantacji (Park i wsp., 2008). Nieograniczona potencjalnie dostępność autologicznych komórek macierzystych pozyskanych w ten sposób może pozwolić na szerokie zastosowanie terapii zindywidualizowanej (personalized medicine) opartej na naprawie materiału genetycznego *ex vivo* oraz ekspansję i różnicowanie „naprawionych” komórek do zastosowania w autotransplantacji (Dimos i wsp., 2008). Łatwość namnażania i utrzymywania w stałej hodowli komórek iPS jest porównywalna z komórkami pochodzenia embrionalnego.

Allotransplantacje

Najczęściej przeszczepy wykonuje się w obrębie jednego gatunku. Dotychczasowe neurotransplantacje kliniczne były przeprowadzane zgodnie z tym paradygmatem, głównie z użyciem fragmentów mózgów płodowych (Brundin i wsp., 2000; Hauser i wsp., 2002) lub komórek pochodzenia nowotworowego (Kondziolka i



wsp., 2005). Jednak z powodów etycznych, trudnej dostępności materiału oraz braku standaryzacji i możliwości właściwej oceny jego jakości przed przeszczepem, obecnie odchodzi się od stosowania tkanek płodowych (Wijeyekoon i Barker, 2009). Zastępowane zostają w badaniach na modelach zwierzęcych komórkami macierzystymi pochodzenia embrionalnego, które charakteryzują się łatwością namnażania i utrzymywania w stałej hodowli (Tavakoli i wsp., 2009). Progenitory oligodendrocytarne wywodzące się z embrionalnych komórek macierzystych zostaną wprowadzone do badań klinicznych I fazy w roku 2010 (Geron, USA).

Zaletą tego podejścia jest hipotetyczna możliwość masowej produkcji wysokiej jakości komórek w bioreaktorach (Zweigerdt, 2009). Ułatwiłoby to uzyskanie produktów komórkowych (biologików) na szeroką skalę do rutynowego stosowania w klinice, na wzór farmaceutyków i tym samym ograniczyło koszty terapii.

Ksenotransplantacje

Ksenotransplantacje są stosowane z konieczności w badaniach przedklinicznych, co stanowi duży problem w rozwoju samej terapii komórkowej (Borlongan i wsp., 1998b; Daadi i wsp., 2008). O ile przeszczepy komórkowe do mózgu osesków i zwierząt bez wykształconego układu odpornościowego wykazują lepsze przeżycie i różnicowanie się, to wyniki neurotransplantacji do dorosłych zwierząt są mniej optymistyczne. Pomimo stosowania immunosupresantów i zwierząt z deficytami immunologicznymi dotychczas nie został rozwiązany problem zwiększenia tolerancji biorcy na przeszczep ksenogeniczny. Chociaż ostatnio stwierdzono pewien postęp poprzez ekspozycję noworodków zwierzęcych na ludzkie komórki metodą iniekcji dootrzewnowej zawiesiny komórkowej (Kelly i wsp., 2009).

Wykazano też częściową skuteczność fragmentów mózgów płodowych i komórek otrzymywanych ze świńskich mózgów w badaniach klinicznych (Fink i wsp., 2000; Schumacher i wsp., 2000). Jednak obecny rozwój badań nad ludzkimi komórkami macierzystymi być może wykluczy konieczność rozwiązania problemu przeszczepów międzygatunkowych. Ksenoprzeszczepy są jednak wciąż rozważane jako alternatywne źródło materiału dla neurotransplantacji pomimo ryzyka związanego z transmisją chorób odzwierzęcych (Harrower i Barker, 2004).

MECHANIZMY DZIAŁANIA TERAPEUTYCZNEGO PRZESZCZEPÓW KOMÓRKOWYCH W OUN

Identyfikacja patologii leżącej u podstaw określonej jednostki chorobowej umożliwia precyzyjne zdefiniowanie wymagań stawianych wszczepianym komórkom. Opierając się na tym założeniu zaprojektowano i podjęto pierwsze badania doświadczalne nad komórkami macierzystymi. Jednak okazało się, że nie w każdym przypadku komórki podejmowały wymaganą funkcję, a pomimo to obserwowano poprawę funkcjonalną (Jackson i wsp., 2009). Szczególnie często ma to miejsce w przypadku neurotransplantacji systemowych (Li i wsp., 2001; Li i wsp., 2000; Zhao i wsp., 2002).

W związku z tym podejrzewa się istnienie nie poznanych jeszcze do końca mechanizmów najpewniej o charakterze niespecyficznych działań naprawczych warunkujących pozytywny efekt funkcjonalny. Teoretycznie mechanizmy działania przeszczepów komórkowych można podzielić na bezpośrednie i pośrednie. Bezpośrednie obejmowałyby zastąpienie komórek obumarłych lub wykazujących dysfunkcję przez przeszczepione komórki. W zależności od rodzaju schorzenia dotyczy to komórek zarówno neuronalnych jak i nieneuronalnych komórek OUN lub też obu typów łącznie. Natomiast pośrednie mechanizmy działania wymagają obecności czynnika pośredniczącego (mediatora) oraz adresata dla tego mediatora. W ten sposób przeszczepione komórki mogą wywierać różny efekt na adresata, czyli na komórki mózgu biorcy. Istnieją trzy zasadnicze grupy mediatorów produkowanych przez komórki uznawane za terapeutyczne: czynniki troficzne, czynniki immunomodulujące i enzymy, które zostaną omówione w poszczególnych podrozdziałach.

Bezpośrednia suplementacja komórkowa

Komórki neuronalne

Wybiórczo komórki neuronalne obumierają w niektórych chorobach neurodegeneracyjnych. Zwykle jest to powolny proces nie wywołujący masywnej odpowiedzi zapalnej. Obszar objęty procesem chorobowym bardzo różni się pomiędzy jednostkami nozologicznymi. Rozproszenie procesu degeneracji neuronów

nastręcza większe trudności w selektywnym zastępowaniu ich nowymi komórkami. Neurony tworzą sieć wzajemnie komunikujących się komórek, które łączą się pomiędzy sobą cienkimi wypustkami często na znaczne odległości. Wytworzenie odpowiednich wypustek przez wszczepione komórki, ich właściwe ukierunkowanie, osiągnięcie struktur docelowych oraz produkcja i sekrecja pożądaných neuroprzekaźników stanowi o złożoności takiego procesu naprawczego.

Przykładem neurodegeneracji o ogniskowym charakterze i dotyczącej tylko jednego rodzaju komórek może być PD. Właśnie ta choroba jako pierwsza została poddana eksperymentom neurotransplantacyjnym. Ze względu na znaczną odległość pomiędzy strukturą zawierającą obumierające komórki, a strukturą docelową stosowano przeszczepy komórek do tej ostatniej, aby ograniczyć konieczność wytworzenia długich wypustek. To umożliwia stosunkowo szybką i pełną reinerwację poprzez wytworzenie połączeń eferentnych. Jednak ektopowe położenie przeszczepionych komórek powoduje brak możliwości wytworzenia odpowiednich połączeń aferentnych i w następstwie tego ograniczenie regulacji przewodnictwa nerwowego przez inne struktury mózgowia. To może być przyczyną braku pełnego ustąpienia objawów neurologicznych. W związku z tym podejmowano pojedyncze próby wszczepiania komórek do obu struktur: objętej bezpośrednio procesem neurodegeneracyjnym istoty czarnej i struktury docelowej – prążkowie. Pomimo wydłużenia czasu i zwiększenia inwazyjności procedury (operacja stereotaktyczna śródmózgowia) oraz zwiększenia zapotrzebowania na komórki, to zwiększenie zakresu reinerwacji zostało osiągnięte (Mendez i wsp., 2002; Mendez i wsp., 2005). W innych chorobach neurodegeneracyjnych mózgu takich jak HD i AD proces chorobowy obejmuje większe obszary oraz wykazuje bardziej zróżnicowany skład komórkowy. Wobec tego osiągnięcie bezpośredniej suplementacji komórkowej jest o wiele trudniejsze, choć takie badania są prowadzone (Clelland i wsp., 2008; Sugaya i Merchant, 2008). Z najtrudniejszą sytuacją patologiczną spotykamy się w rozsianych chorobach mózgu i rdzenia kręgowego. Modelowym przykładem może być stwardnienie boczne zanikowe (ALS). Proces chorobowy jest powolny i obejmuje zarówno neurony dróg piramidowych jak i rogów przednich rdzenia kręgowego. Obydwie populacje komórek charakteryzują się bardzo długimi aksonami. Z tego powodu są bardzo trudne do zastąpienia przez przeszczepione komórki. Chociaż *in vitro* wyhodowano neurony piramidowe i motoneurony, to dotychczas nie udało się

nimi zastąpić obumierających neuronów w chorobowo zmienionym OUN (Jordan i wsp., 2009; Thonhoff i wsp., 2009).

Komórki nieneuronalne oraz mieszane

Zastosowanie neurotransplantacji w celu zastąpienia obumarłych lub dysfunkcyjnych komórek nieneuronalnych jest koncepcją teoretycznie łatwiejszą do realizacji. Patologie zwykle dotyczą komórek produkujących mielinę. Zaburzenia funkcji oligodendrocytów często mają podłoże genetyczne. Najczęstszą nabytą chorobą demielinizacyjną jest stwardnienie rozsiane. W urazach rdzenia kręgowego także podkreśla się rolę uszkodzenia osłonek mielinowych i konieczność ich odtworzenia. W zwierzęcych modelach powyższych chorób osiągnięto zadowalające rezultaty terapii komórkowej (Lavdas i wsp., 2008; Windrem i wsp., 2004). Oparte na nich pierwsze próby kliniczne przeprowadzone w krajach wysoko rozwiniętych nie wykazały jednak ewidentnej poprawy klinicznej u pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (Rice i wsp., 2004), ani z urazami rdzenia kręgowego (Mackay-Sim i wsp., 2008). Obecnie duże nadzieje wiąże się z badaniem klinicznym z zastosowaniem prekursorów oligodendrocytów otrzymanych z komórek macierzystych pochodzenia zarodkowego u pacjentów w ostrej fazie po całkowitym czynnościowym przecięciu rdzenia kręgowego prowadzonym przez firmę Geron (Alper, 2009).

W celu odtwarzania naczyń ostatnio testuje się możliwości systemowego podawania prekursorów endotelialnych (Oyamada i wsp., 2008).

W udarach i urazach mózgu dochodzi do jednoczesnego uszkodzenia zarówno komórek neuronalnych jak i nieneuronalnych. Strategia terapeutyczna powinna więc obejmować wszystkie rodzaje uszkodzonych komórek w obrębie udaru lub urazu mózgu. Już dawno wykazano pozytywny efekt behawioralny i integrację przeszczepu tkanek płodowego prądkowia (Nishino i wsp., 1993). Dalsze badania wykazały większy efekt terapeutyczny czystej populacji post-mitotycznych neuronów pochodzenia nowotworowego (Borlongan i wsp., 1998a). We wcześniejszych badaniach wykazano integrację tych komórek z mózgiem biorcy (Kleppner i wsp., 1995). Jednak próba kliniczna ujawniła tylko niewielki pozytywny efekt tego podejścia terapeutycznego (Kondziolka i wsp., 2000). Opublikowane badanie post-mortem jednego z pacjentów wykazało przeżycie wszczepionych neuronów. Natomiast w tym

opisie przypadku nie badano, czy wytworzyły się bezpośrednie połączenia pomiędzy przeszczepem a mózgiem biorcy (Nelson i wsp., 2002). Próba kliniczna z analogicznym zastosowaniem ksenotransplantacji płodowego prążkowania również nie okazała się przełomem (Savitz i wsp., 2005). Zastosowanie komórek macierzystych w zwierzęcym modelu udaru mózgu oprócz pozytywnego efektu behawioralnego wykazało różnicowanie się zarówno komórek neuronalnych jak i nieneuronalnych chociaż w tym przypadku także nie badano, czy wytworzyły się bezpośrednie połączenia pomiędzy tymi komórkami a mózgiem biorcy. W związku z tym trudno przesądzić, czy wystąpił tu bezpośredni mechanizm działania przeszczepu (Chen i wsp., 2001). Ostatnio stwierdzono skuteczne neuralne różnicowanie się komórek pochodzących z mózgu płodowego po podaniu ich do jamy poudarowej i bezpośrednie połączenie tych komórek z mózgiem biorcy (Zeng i wsp., 2005). Podobny efekt otrzymano po podaniu prekursorów neuralnych otrzymanych ze stałych linii ESC w okolicę udaru w jego ostrej fazie (Hayashi i wsp., 2006). W obu powyższych pracach nie oceniano jednak efektu behawioralnego. W kolejnej pracy neurofizjologicznie potwierdzono obecność bezpośrednich połączeń synaptycznych pomiędzy wszczepionymi prekursorami neuralnymi a mózgiem biorcy (Buhnenmann i wsp., 2006). Dopiero ostatnio opublikowano wyniki kompleksowych badań potwierdzających skuteczną integrację przeszczepionych tkanek płodowych mózgu u zwierząt po udarze zarówno na poziomie neuropatologicznym, neurofizjologicznym jak i behawioralnym (Daadi i wsp., 2009). Ta praca w sposób najbardziej pełny oddaje ideę bezpośredniego mechanizmu działania przeszczepów komórkowych złożonych z komórek neuralnych i nieneuronalnych. Jednak należy zwrócić uwagę, że takie efekty są prezentowane tylko w bardzo nielicznych publikacjach.

Pośrednie mechanizmy oddziaływania komórek po transplantacji

- Czynniki troficzne. Wywierają one wpływ bezpośrednio na komórki układu nerwowego przez receptory obecne na ich powierzchni. Do najważniejszych czynników troficznych oddziałujących na układ nerwowy należą: VEGF, IGF-1, PDGF, HGF, GDNF, BDNF.

- Czynniki immunomodulujące. Każda choroba organiczna układu nerwowego jest związana z aktywacją układu immunologicznego o różnym nasileniu. W

przypadku niektórych chorób proces ten jest bardzo ograniczony, ale aktywny przez wiele lat (PD). W innych schorzeniach występuje gwałtownie i jest masywny (udar mózgu, uraz mózgu i rdzenia). Wydaje się, że nadmierna reakcja zapalna jest w tym przypadku dodatkową przyczyną wtórnego uszkodzenia mózgu. Czynniki immunomodulujące reagując z komórkami zapalnymi mogą ograniczać ten proces.

Innym przykładem są pierwotnie zapalne choroby OUN takie jak stwardnienie rozsiane. W tej sytuacji wykorzystuje się immunosupresyjny efekt podania komórek macierzystych.

Nie można jednak wykluczyć, że niektóre molekuły mogą jednocześnie pełnić rolę czynnika troficznego oraz immunomodulującego. Jedną z nich jest chemokina SDF-1, która nie tylko moduluje odpowiedź immunologiczną (Janowski, 2009), ale także wchodzi w bezpośrednią interakcję z komórkami układu nerwowego (Ohab i wsp., 2006).

- Enzymy: Wrodzone choroby metaboliczne wynikają ze spichrzania się określonych substancji wskutek defektów enzymów służących do ich rozkładu. Wówczas dostarczenie do mózgu komórek zawierających ów enzym pozwala na zaopatrzenie w niego komórek endogennych dzięki zjawisku sekrecji enzymów lizosomalnych do przestrzeni zewnątrzkomórkowej i ich internalizacji przez okoliczne komórki biorcy (tzw. cross-correction phenomenon). Do tego celu wykonuje się przeszczep szpiku lub krwi pępowinowej od niespokrewnionego dawcy wykorzystując naturalne zjawisko krążenia komórek makrofagalnych pomiędzy szpikiem, krwią i mózgiem (Prasad i Kurtzberg, 2008). Zasiedlenie w tkance nawet niewielkiej liczby komórek zdolnych do produkcji określonego enzymu jest wystarczające do uzyskania efektu klinicznego.

Do efektów wywieranych przez opisane mediatory na komórki biorcy należą m.in.: ograniczenie procesu apoptozy, nasilenie procesu neurogenezy i angiogenezy, przebudowa OUN i remielinizacja. W przeprowadzonej ostatnio meta-analizie wykazano, że statystycznie najbardziej znaczącym, pozytywnym efektem neurotransplantacji systemowych na komórki biorcy jest ograniczenie procesu apoptozy (Janowski i wsp., 2010). Ujawniono, że w obrębie komórki proces ten jest zbieżny z zahamowaniem kaspazy 3 (Dasari i wsp., 2007a). Jednak nie

zidentyfikowano dotychczas parakrynnego mediatora odpowiedzialnego za efekt antyapoptotyczny.

Reaktywne nasilenie procesu neurogenezy polega na wytwarzaniu nowych neuroblastów głównie w niszach neuralnych komórek macierzystych, któremu zwykle towarzyszy migracja tych neuroblastów w kierunku obszaru objętego procesem chorobowym. Nie zdefiniowano dotychczas mediatorów bezpośrednio sterujących neurogenezą w mózgu. Jednak stwierdzono, że namnażanie neuralnych komórek macierzystych *in vitro* jest warunkowane udziałem określonych czynników troficznych (Tarasenko i wsp., 2004), a proces neurogenezy *in vivo* jest hamowany przez eksperymentalnie wywołany proces zapalny (Hoffmann i wsp., 2007).

Proces angiogenezy towarzyszy przeważnie chorobom przebiegającym z masywnym, ogniskowym uszkodzeniem wszystkich elementów komórkowych OUN i jest niezbędny do odbudowy uszkodzonej tkanki. Wykazano pozytywny wpływ głównie neurotransplantacji systemowych na angiogenezę po udarze mózgu i urazie rdzenia kręgowego (Kim i wsp., 2009a; Liu i wsp., 2006; Toyama i wsp., 2009). Mediatory specyficzne dla procesu angiogenezy są stosunkowo dobrze poznane i należą do nich: PIGF, VEGF i Ang-1.

U zwierząt poddanych eksperymentalnemu udarowi mózgu grupa z Detroit opisała pozytywne zmiany w strukturze OUN spowodowane podaniem mezenchymalnych komórek macierzystych (Li i Chopp, 2009). Zaobserwowano zmniejszenie blizny glejowej wokół jamy poudarowej (Li i wsp., 2005), pogrubienie ciała modzelowatego (Shen i wsp., 2006) oraz rozszerzenie zakresu unerwienia ciała przez półkulę kontralateralną (Liu i wsp., 2008). Jednak nie podjęto dalszych badań nad mediatorami tych reakcji. Podobne do powyższych obserwacji zjawisko reorganizacji OUN zostało także opisane po podaniu komórek bezpośrednio do półkuli kontralateralnej do uszkodzenia wywołanego niedokrwieniem (Veizovic i wsp., 2001).

Wzmocnienie remielinizacji jest obserwowane po neurotransplantacjach w stwardnieniu rozsianym. Skorelowane to jest z ograniczeniem stanu zapalnego na podłożu którego dochodzi do uszkodzenia osłonek mielinowych (Kassis i wsp., 2008). Wykazano szczególną przydatność komórek transfekowanych potencjalnymi mediatorami, tj. BDNF (Makar i wsp., 2009) i IFN-beta (Makar i wsp., 2008). Stwierdzono, że BDNF także wywiera działanie immunomodulujące poprzez korektę profilu cytokin w obrębie mózgowia.

INDUKOWANA MIGRACJA KOMÓREK W NEUROTRANSPLANTACJACH

Termin migracja lub taksja komórkowa odnosi się do zjawiska przemieszczania się komórek. W zależności od czynników warunkujących ten proces wyróżnia się chemotaksję, haptotaksję, elektrotaksję, itd. Procesy migracji obok proliferacji pełnią zasadniczą rolę w rozwoju osobniczym poprzedzając proces różnicowania się komórek w tkankach i narządach. W dojrzałym organizmie migracja komórek bierze udział w utrzymaniu homeostazy w procesach: zapalnym i naprawczym. Ma to związek z istnieniem wyspecjalizowanych stref namnażania komórkowego w obrębie organizmu, z których komórki przemieszczają się do miejsc swojego przeznaczenia, aby podjąć właściwe im funkcje.

Rola procesu migracji komórkowej w neurotransplantacjach

Bezpośrednie dostarczenie komórek do miejsca przeznaczenia jest często niewskazane lub w ogóle niemożliwe. Jeżeli nawet transplantacja do docelowej struktury OUN jest możliwa to nadal oczekuje się lepszego efektu jeżeli komórki odmigrują z miejsca złożenia depozytu komórkowego. Długotrwałe pozostawianie komórek w skupisku o gęstym upakowaniu nie tylko może pogorszyć ich przeżywalność, ale przede wszystkim ogranicza szansę na interakcję i integrację z tkankami biorcy. Uważa się, że takie ogniskowe rozmieszczenie komórek może być odpowiedzialne za wystąpienie działań niepożądanych po terapii komórkowej choroby Parkinsona (Bjorklund i wsp., 2003). Nadmierna stymulacja dopaminergiczna tkanki w bezpośrednim sąsiedztwie skupisk wszczepionych komórek w zestawieniu z brakiem reinerwacji w rejonach prążkowania odległych od transplantów prowadzi do występowania niepożądanych gradientów dopaminy. W związku z tym dokładne poznanie mechanizmów zarządzających migracją wszczepianych komórek oraz nabycie umiejętności określenia ich potencjału migracyjnego przed procedurą transplantacyjną, wydaje się być warunkiem podstawowym dla osiągnięcia sukcesu terapeutycznego.

Mechanizmy migracji komórkowej

Migracja komórkowa wydaje się być uwarunkowana koniecznością wystąpienia interakcji ligand-receptor. Ligandami mogą być zarówno rozpuszczalne molekuly (chemotaksja) jak i białka macierzy zewnątrzkomórkowej (haptotaksja). Wśród tych pierwszych ważną rolę wydają się pełnić chemokiny – białka o niskiej masie cząsteczkowej, w związku z czym łatwo przenikliwe i ulegające szybkiej dyfuzji. Przykładem może być SDF-1. Receptory dla nich są zwykle powiązane z białkami G, przez które dalej przekazują sygnał do wnętrza komórki. Wystąpienie gradientu stężeń liganda stymuluje ruch komórki w kierunku jego wyższej koncentracji. Białka macierzy zewnątrzkomórkowej natomiast, oprócz oddziaływania przez specyficzne receptory, wywierają także wpływ na intensywność procesu migracji poprzez bezpośrednią interakcję z błoną komórkową i znajdującymi się na niej proteoglikanami.

Z drugiej strony nie można wykluczyć zdolności komórek do „spontanicznego” ruchu i przemieszczania się z miejsc o większej gęstości do okolic rzadko zasiedlonych (zjawisko dyspersji). Ten proces w odniesieniu do komórek nie został jeszcze dobrze poznany, a może brać istotny udział w migracji komórek z depozytów komórkowych do otaczających tkanek. Jego przejawem może być np. spontaniczna migracja komórkowa obserwowana w eksperymentach *in vitro*.

Migracja komórek zapalnych

Kluczowym elementem reakcji zapalnej jest gromadzenie się komórek naciekowych w określonych obszarach organizmu. W reakcji zapalnej biorą udział białe krwinki oraz układ fagocytów tkankowych. Gromadzenie się komórek zapalnych jest możliwe dzięki ich zdolności do migracji zgodnie z gradientem stężeń określonych chemoatraktantów. W związku z szybkością, siłą zachodzenia oraz znaczeniem tego procesu, badania nad migracją komórek są najbardziej zaawansowane w obrębie układu immunologicznego. Zdefiniowano cząsteczki odgrywające kluczowe role w migracji różnych typów komórek krwi na określonych etapach procesu zapalnego.

Oprócz chemotaksji nie można wykluczyć występowania również innych komórkowych reakcji kierunkowych, takich jak: haptotaksja, czy elektrotaksja.

Ostatnio na powierzchni mikrogłęju zidentyfikowano kanały zależne od pH, które mogłyby pełnić rolę swoistych receptorów właściwości fizykochemicznych środowiska (Moriata i wsp., 2008). Ale ich rola w procesie migracji komórkowej dotychczas nie została potwierdzona.

Migracja komórek macierzystych i progenitorowych

Zagadnienie migracji komórek macierzystych i progenitorowych jest mniej poznane. W dojrzałym organizmie komórki te biorą udział w ciągłym odtwarzaniu tkanek stale regenerujących się (naskórek, krew, jelita) oraz w procesach naprawczych pozostałych tkanek. Komórki macierzyste są zlokalizowane w miejscach wykazujących specyficzne warunki mikrośrodowiska, czyli w tzw. niszach, których biologiczna funkcja polega na utrzymaniu stałej puli komórek macierzystych.

Możliwe są dwa scenariusze w odniesieniu do migracji komórek biorących udział w naprawie tkanek. Komórki macierzyste mogą przemieszczać się ze swoich nisz do miejsc, gdzie występuje na nie zapotrzebowanie i dopiero tam różnicować się w zależności od lokalnych wskazówek. Z taką sytuacją mamy do czynienia w przypadku hematopoetycznych komórek macierzystych różnicujących się w kierunku komórek śródbłona w odpowiedzi na uszkodzenie naczyń (Kaplan i wsp., 2007). Drugą możliwością jest powstanie określonych progenitorów w obrębie nisz komórek macierzystych i dalsza migracja już zdeterminowanych form komórkowych, co wydaje się mieć miejsce w obrębie układu nerwowego. Wciąż nie jest rozstrzygnięty związek komórek macierzystych pochodzących ze szpiku z komórkami macierzystymi specyficznymi tkankowo, zlokalizowanymi w poszczególnych narządach. Niektórzy wskazują na nadrzędną i regulacyjną rolę szpiku w dostarczaniu pluripotencjalnych komórek macierzystych do poszczególnych narządów, szczególnie w odpowiedzi na ich uszkodzenie (Kucia i wsp., 2008).

W badaniach *in vitro* zwykle mamy do czynienia z hodowlami komórkowymi, które są mieszaniną komórek macierzystych i powstałych z nich komórek progenitorowych o różnym potencjale migracyjnym. Z powodu braku markera charakterystycznego tylko dla komórek macierzystych nie ma możliwości łatwej ich identyfikacji, czy też selekcji. Tak więc trudno ocenić czy komórki, które przemigrowały należą do puli komórek macierzystych, czy też uległy wstępnemu różnicowaniu. W tej sytuacji stosunek liczby komórek „*sensu stricto*” macierzystych

do potomnych może w większym stopniu wpływać na wyniki badań migracji *in vitro* niż samoistna zdolność do migracji badanej populacji komórkowej w określonych warunkach.

Migracja progenitorów neuralnych i neuralnych komórek macierzystych

W różnych rejonach mózgu migracja nowopowstających komórek może zależeć od odmiennych mechanizmów. W obrębie dojrzałego OUN występują dwa wyspecjalizowane obszary namnażania komórek neuronalnych: strefa przykomorowa w komorach bocznych i warstwa ziarnista zakrętu zębatego hipokampa. W warunkach fizjologicznych komórki ze strefy przykomorowej migrują w kierunku opuszki węchowej wzdłuż przedniego strumienia migracji, a w obrębie zakrętu zębatego przemieszczają się ze strefy podziarnistej do warstwy komórek ziarnistych. Poza tym istnieje ograniczone występowanie prekursorów neuronalnych w mózgu poza rejonami neurogenezy.

Nagłe uszkodzenie mózgu, oprócz wywołania reakcji zapalnej prowadzącej do uprzątnięcia martwiczych tkanek, wpływa także na zmianę stałych szlaków migracji neuroblastów, które zaczynają przemieszczać się w kierunku obszaru objętego uszkodzeniem. Powiązane to jest ze wzmożoną proliferacją w strefach namnażania. Większość powstałych w ten sposób neuroblastów i neuronów obumiera w ciągu następnych kilku tygodni (Kokaia i Lindvall, 2003). Dotychczas nie jest znany wpływ tej neurogenezy na przebieg procesów naprawczych w mózgu.

Zjawisko migracji indukowanej uszkodzeniem próbuje się wykorzystać w terapii komórkowej udaru mózgu (Kozłowska i wsp., 2007). Nie zdefiniowano dokładnie czynników warunkujących tę migrację, chociaż stwierdzono zależność tego procesu od obecności pewnych substancji w środowisku oraz ekspresji receptorów na komórkach. Poznanie dokładnego mechanizmu tej migracji może ułatwić selektywne i skuteczne dostarczenie określonych typów komórek do uszkodzonych miejsc po transplantacji.

W badaniach *in vitro* wykazano, że migracja NSC opiera się zarówno na chemotaksji jak i haptotaksji. Wśród chemoatraktantów należy wyróżnić dwie duże grupy związków: chemokiny i czynniki wzrostu. Receptory dla nich posiadają typową charakterystykę przeszywającą 7-krotnie błonę komórkową. Na podstawie danych literaturowych wybrano do badań kilka typów receptorów zaangażowanych w proces

chemotaksji. Na komórkach HUCB-NSC oceniłem występowanie: Flk-1, PDGFRA, PDGFRB, c-Met, IGF-1R i CXCR4. Oprócz tego zbadałem ekspresję molekuly adhezyjnej PSA-NCAM. Jako że haptotaksja odbywa się wzdłuż białek macierzy zewnątrzkomórkowej, do których możemy zaliczyć lamininę i fibronektynę, oba te białka zostały uwzględnione w przedstawionych badaniach.

O intensywności migracji świadczy indeks chemotaktyczny, czyli proporcja komórek, który przemigrowały w warunkach eksperymentalnych oraz kontrolnych. Według danych literaturowych komórki zapalne oraz komórki macierzyste pochodzenia szpikowego osiągają wysoki, dwucyfrowy indeks chemotaktyczny. Natomiast neuralne komórki macierzyste wydają się wykazywać znacznie mniejsze zdolności migracyjne (Xu i wsp., 2007).

Istnieją w literaturze rozbieżności pomiędzy poszczególnymi, badanymi pod kątem migracji populacjami NSC w zależności od ich pochodzenia, jednorodności, itd., w zakresie ich zdolności do odpowiedzi na bodźce chemo- i haptotaktyczne. Dodatkowo każdy rodzaj lezji może indukować odmienny zestaw poszczególnych substancji stymulujących migrację. W związku z tym optymalizacja terapii komórkowej będzie wymagać definiowania potencjału migracyjnego swoistego dla każdej populacji komórkowej oraz dla każdego typu lezji.

W ramach pracy doktorskiej podjąłem próbę scharakteryzowania *in vitro* właściwości migracyjnych przeszczepianych przeze mnie komórek.

OBRAZOWANIE PRZESZCZEPIONYCH KOMÓREK

Rola obrazowania komórkowego w neurotransplantacjach

Podstawowe barwienia umożliwiające mikroskopowe obserwowanie komórek w preparatach tkankowych znane są już od ponad wieku. W neurotransplantologii, która wciąż jest głównie obszarem badań przedklinicznych niezbędne jest zestawianie lokalizacji i fenotypu wszczepionych eksperymentalnie komórek z ich funkcją mierzoną na poziomie biochemicznym, neurofizjologicznym i behawioralnym. W klinice natomiast konieczne jest opracowanie nieinwazyjnych metod przyżyciowej identyfikacji i selektywnego obrazowania przeszczepionych komórek i odróżniania ich

od komórek biorcy. Możliwość nieinwazyjnej detekcji *in vivo* pozwoli potwierdzić udane przeszczepienie komórek we właściwe miejsce oraz długość przeżycia w organizmie biorcy. W jednej z niewielu dotychczas opublikowanych prac klinicznych na ten temat wykazano tylko 50% skuteczność w dostarczeniu komórek do węzłów chłonnych drogą bezpośredniego nakłucia pod kontrolą ultrasonograficzną (USG) (de Vries i wsp., 2005). To może być przyczyną obserwowanej, dużej zmienności odpowiedzi pacjentów na komórkowe terapie transplantacyjne.

Morfologiczne badania przeszczepów komórkowych *ex vivo*

Od początku badań nad neurotransplantacjami pośmiertna weryfikacja przeszczepionych komórek wchodziła w skład podstawowego arsenału badawczego. W pierwszych pomyślnych neurotransplantacjach wykorzystywano radiograficzną detekcję komórek znakowanych promieniotwórczym nukleozydem (3H-tymidyna) (Das i Altman, 1971). W eksperymencie zwierzęcym podawano ten nukleozyd dootrzewnowo przyszłym dawcom przed pobraniem materiału do przeszczepu. Ta metoda umożliwiała jednak śledzenie losu tylko frakcji aktualnie dzielących się komórek.

W dalszych badaniach ukierunkowanych pod kątem przyszłych zastosowań klinicznych do detekcji wszczepionych komórek wykorzystywano histochemiczne metody identyfikacji produkowanych przez nie neuroprzekaźników i związanych z nimi enzymów (Lindvall i wsp., 1973). Ta metoda pozwala ocenić jednocześnie lokalizację i funkcję wszczepionych komórek *ex vivo*, jednak jest przydatna tylko w sytuacji braku podobnych, endogennych komórek w operowanej okolicy. Następnie powyższe metody zostały zastąpione przez immunohistochemię, która pozwoliła na bardziej wybiórczą oraz bardziej kompleksową ocenę przeszczepionych komórek.

Jeżeli istnieje niezgodność gatunkowa pomiędzy dawcą i biorcą można wykorzystać przeciwciała skierowane wybiórczo przeciwko gatunkowo specyficznym epitopom. Takie przeciwciała (NuMA, HuNu) są używane do identyfikacji ludzkich komórek przeszczepionych do mózgów zwierzęcych. Inną, rzadko spotykaną metodą wizualizacji wszczepionych komórek jest fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). Zastosowanie tej metody w układzie: komórki od dawcy płci męskiej przeszczepiane biorcy płci żeńskiej pozwala na ich identyfikację nawet w układzie syngenicznym bez

żadnego uprzedniego znakowania poprzez zastosowanie sondy skierowanej przeciwko chromosomowi Y.

Przez pewien czas dużą popularnością cieszyła się bromodeoksyurydyna (BrdU) jako znacznik przeszczepianych komórek. BrdU początkowo zastąpiła promieniotwórczą tymidynę w podawaniu systemowym przyszłym dawcom (Shetty i wsp., 1994). Następnie została także zastosowana do znakowania komórek hodowanych *in vitro* (Okoye i wsp., 1995). Ponieważ jest nukleozydem to posiada negatywne cechy jako znacznik: wbudowuje się jedynie do dzielących się komórek, a dalsze podziały po wycofaniu BrdU z pożywki powodują szybkie pogorszenie możliwości jej detekcji (Lee i wsp., 2009). Poza tym stwierdzono toksyczny efekt BrdU na prekursor neuronów (Caldwell i wsp., 2005). Pomimo tego, ta metoda jest nadal używana w neurotransplantacjach, chociaż w ograniczonym zakresie (Chen i wsp., 2009a).

Powyższe metody pozwalają na identyfikację wszczepionych komórek w organizmie gospodarza *ex vivo*. Informacje na temat ich fenotypu są dostarczane poprzez badanie współwystępowania znaczników wszczepionych komórek oraz przeciwciał skierowanych przeciwko określonym antygenom komórkowym. Alternatywną metodą wnioskowania o fenotypie jest wprowadzenie do komórek genów dla białek powodujących fluorescencję (dostępnych jest już kilka kolorów) pod promotorami specyficznymi dla określonych białek markerowych komórki.

Podsumowując, obrazowanie *ex vivo* pozwala pośmiertnie sprawdzić, czy transplantowane *in vivo* komórki zachowały się w oczekiwany sposób.

Obrazowanie komórek *in vivo*

Z powodu wysokiej rozdzielczości metodą najbardziej użyteczną do bezpośredniego obrazowania wszczepionych komórek *in vivo* jest MR. Najpowszechniej stosowanym sposobem znakowania komórek w celu detekcji w MR jest wprowadzenie do ich wnętrza SPIO. Ten wybór znacznika jest podyktowany superparamagnetycznymi właściwościami nanocząsteczek żelaza przy braku ewidentnej toksyczności związku dla komórek, tkanek czy organizmów. Ta metoda pozwala na precyzyjną lokalizację przeszczepu w odniesieniu do innych struktur OUN. Przy jej użyciu w eksperymencie na zwierzętach wykazano możliwość śledzenia dynamiki przemieszczania się przeszczepionych komórek w czasie

rzeczywistym, zarówno po podaniu domózgowym (Guzman i wsp., 2008) jak i systemowym (Walczak i wsp., 2008). Wyżej wymienione neurotransplantacje eksperymentalne z użyciem znaczników MR zostały przeprowadzone na gryzoniach. Dopiero ostatnio wykazano bezpieczeństwo takiej terapii u naczelnych (Ke i wsp., 2009) i w pierwszych obwodowych przeszczepach u ludzi (de Vries i wsp., 2005). W naszym zespole wykonano neurotransplantację kliniczną komórek neuralnych z krwi pępowinowej z zastosowaniem SPIO i detekcję przy użyciu MR (Domanska-Janik i wsp., 2009; Janowski i wsp., 2009).

Jednak zastosowanie znaczników wewnątrzkomórkowych może prowadzić do uzyskiwania fałszywych wyników. Endogenne makrofagi wypełnione hemosyderyną mogą być trudne do odróżnienia od wszczepionych komórek wyznakowanych żelazem, szczególnie jeżeli podczas lokalnego podawania komórek doszło do krwawienia, a neuroobrazowanie nie było wykonane bezpośrednio po zabiegu. Poza tym komórki zawierające ww. znaczniki mogą być fagocytowane przez endogenne makrofagi, które w ten sposób będą naśladować wszczepione komórki (Higuchi i wsp., 2009). Z drugiej strony rozcieńczanie znacznika w wyniku proliferacji wszczepionych komórek może fałszywie negatywnie wskazywać na brak ich migracji w tkance po przeszczepie (Walczak i wsp., 2007b).

Aby przełamać powyższe ograniczenia prowadzone są badania w kierunku zastosowania genów reporterowych w celu detekcji komórek w MR. Wprawdzie ich użycie wymaga manipulacji genetycznych to uzyskiwane obrazy w sposób bardziej wiarygodny pozwalają wnioskować o obecności i funkcji wszczepionych komórek. Jednak konieczność zastosowania ultrawysokopolewych, czyli bardzo drogich i trudnodostępnych aparatów do rezonansu magnetycznego oraz stosunkowo długi czas akwizycji obrazu ogranicza szerokie zastosowanie tej technologii. Ze względu na szybkość i łatwość obrazowania oraz znacząco niższe koszty aparatury, pewną popularność w przypadku badań małych gryzoni zyskało zastosowanie bioluminescencji, wymagające wprowadzenia do komórek genu dla lucyferazy. W celu topograficznej lokalizacji przeszczepu komórkowego stosuje się rezonans magnetyczny, natomiast informacje na temat przeżycia i funkcji komórek pozyskuje się metodą detekcji bioluminescencji.

Podsumowując, terapia komórkowa chorób OUN rozumiana jako medycyna oparta na dowodach (evidence-based medicine) wciąż jest na bardzo wczesnym

etapie badań przedklinicznych i klinicznych. Wymaga dalszego rozwoju odpowiednich narzędzi badawczych w celu dokładniejszego poznania biologii przeszczepianych komórek oraz pełniejszego wyjaśnienia mechanizmów ich działania.

ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

Obecnie brak jest skutecznego leczenia wielu chorób neurologicznych przebiegających z obumieraniem komórek. Wobec tego powstała koncepcja zastąpienia obumarłych komórek nowymi, wszczepionymi. W Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDIK PAN uzyskano z krwi pępowinowej, ludzkie, ukierunkowane neuralnie komórki macierzyste, które potencjalnie mogłyby zostać zastosowane w terapii tych chorób. (Buzanska i wsp., 2006a; Buzanska i wsp., 2006b; Buzanska i wsp., 2002).

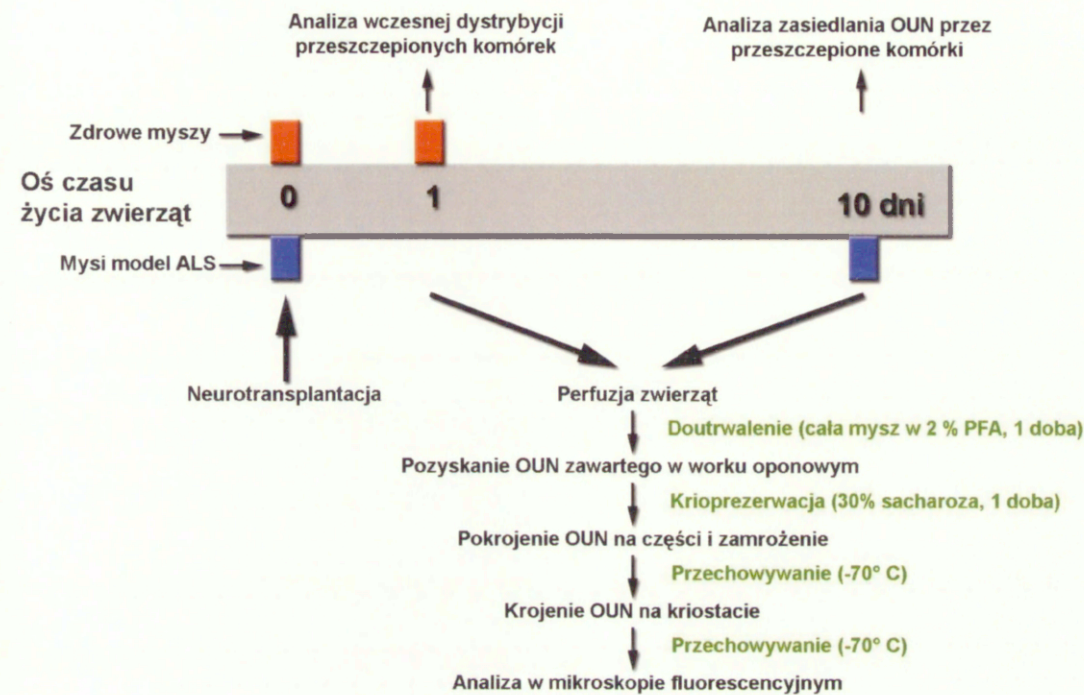
Głównym celem pracy doktorskiej było przygotowanie i rozwój narzędzi badawczych przydatnych do eksperymentalnej terapii komórkowej OUN oraz analiza czynników warunkujących migrację przeszczepionych domózgowo, ukierunkowanych neuralnie komórek macierzystych i progenitorowych wywodzących się z krwi pępowinowej (HUCB-NSC/NP). W ramach wielośrodkowej współpracy klinicznej wykonano również znakowanie progenitorów neuralnych znacznikiem superparamagnetycznym (SPIO) w celu detekcji tych komórek w mózgu pacjenta po przeszczepie.

CELE SZCZEGÓŁOWE I ETAPY REALIZACJI BADAŃ:

1. Opracowanie techniki neurotransplantacji komórek do zbiornika wielkiego u myszy (ryc. 1)
2. Opracowanie modelu udaru mózgu u szczura z zastosowaniem ouabainy (ryc. 2)
3. Ocena endogennej neurogenezy indukowanej udarem w mózgu szczura (ryc. 3)
4. Neurotransplantacja komórek HUCB-NSC/NP i ocena ich migracji w nieuszkodzonym i uszkodzonym ogniskowo mózgu szczura (ryc. 4)
5. Analiza czynników warunkujących migrację badanych komórek HUCB-NSC *in vitro* (ryc. 5)
6. Znakowanie SPIO, analiza cytochemiczna i obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego komórek HUCB-NP przygotowywanych do transplantacji klinicznej (ryc. 6)

SCHEMATY ZADAŃ BADAWCZYCH Z UWZGLĘDNIENIEM ZASTOSOWANYCH METOD:

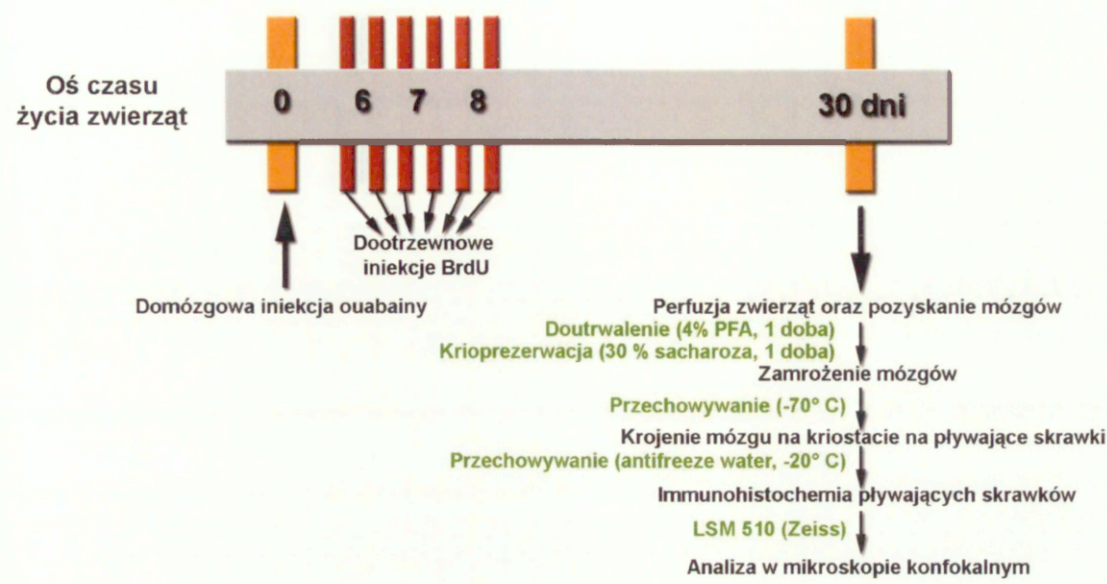
Ryc. 1 Opracowanie techniki neurotransplantacji komórek do zbiornika wielkiego u myszy



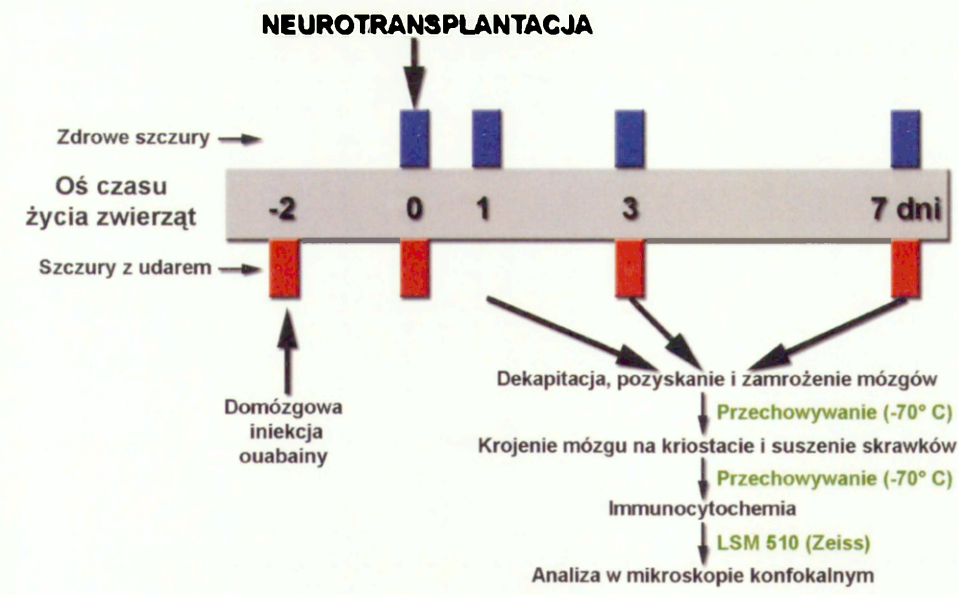
Ryc. 2 Opracowanie modelu udaru mózgu u szczura z zastosowaniem ouabainy



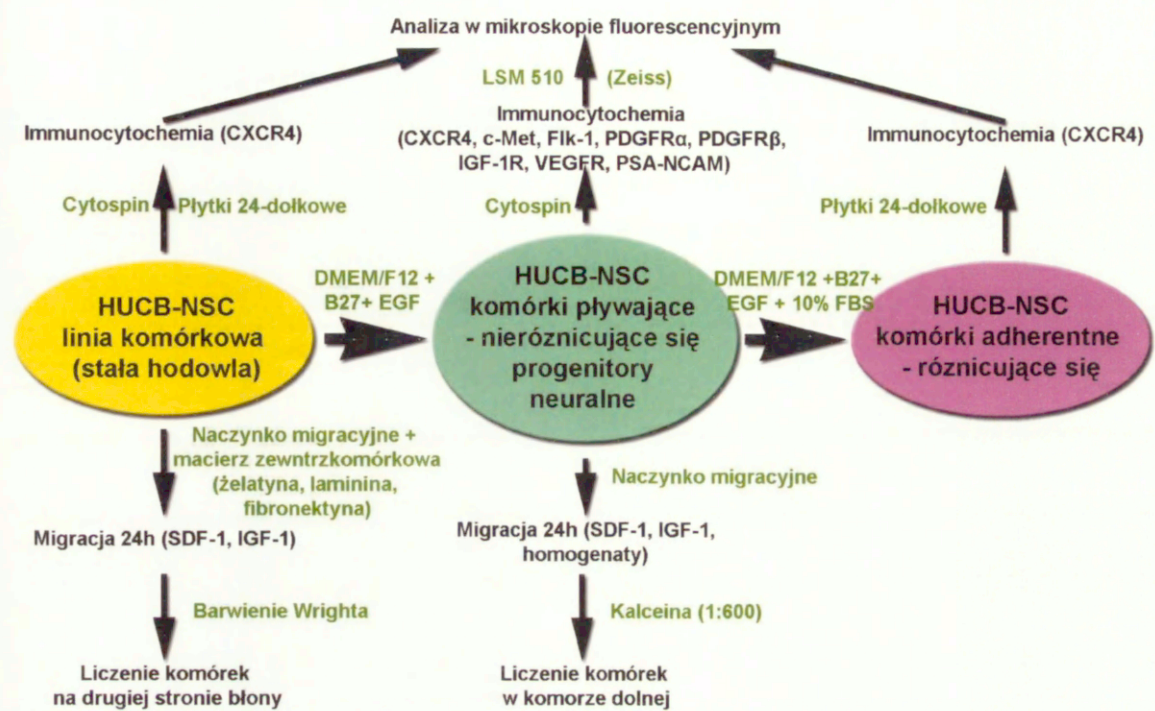
Ryc. 3 Ocena endogennej neurogenezy indukowanej udarem w mózgu szczura



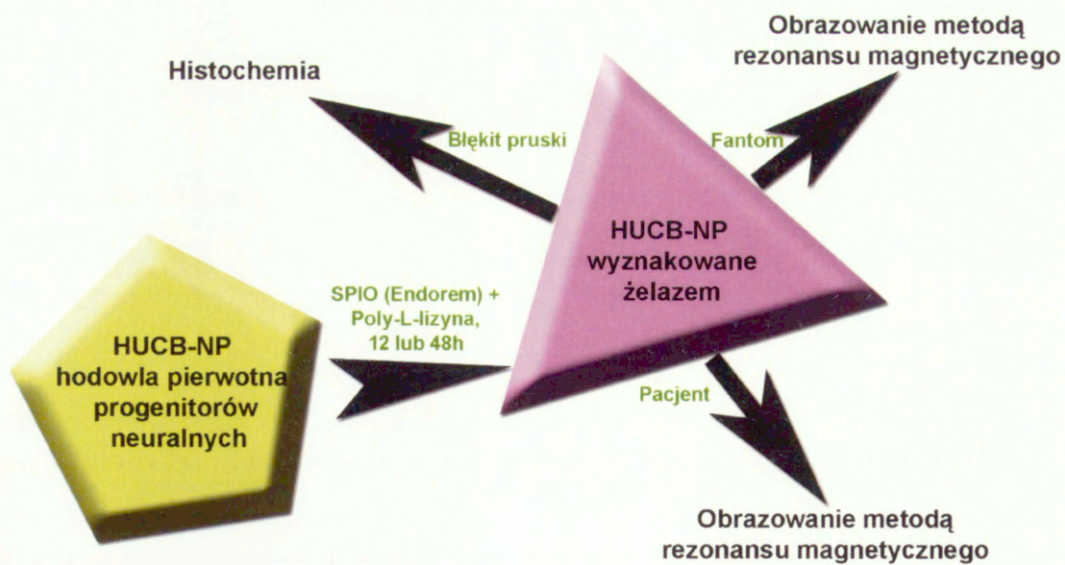
Ryc. 4 Neurotransplantacja komórek HUCB-NSC/NP i ocena ich migracji w nieuszkodzonym i uszkodzonym ogniskowo mózgu szczura



Ryc. 5 Analiza czynników warunkujących migrację komórek HUCB-NSC *in vitro*



Ryc. 6 Znakowanie SPIO, analiza cytochemiczna i obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego komórek HUCB-NP przygotowywanych do transplantacji klinicznej



MATERIAŁ

ZWIERZĘTA EKSPERYMENTALNE:

Myszy szczepu B6SJL obu płci – nie transgeniczne oraz zmodyfikowane genetycznie w celu nadprodukcji dysmutazy ponadtlenkowej cytoplazmatycznej (Cu/Zn-SOD1) stanowiące zwierzęcy model rodzinnej postaci stwardnienia bocznego zanikowego (ALS) zakupione w Jackson Laboratories (Ben Harbor, ME, USA). W trakcie eksperymentu zwierzęta były umieszczone w plastikowych klatkach pojedynczo. Badania na myszach zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną w Tubingen, a eksperymenty zostały przeprowadzone w Ulm w Niemczech.

Szczury (samce) szczepu Wistar wagi ok. 250g pochodzące z hodowli zwierzętarni IMDIK PAN. W trakcie trwania eksperymentów w każdej klatce znajdowały się 2 zwierzęta. Badania na szczurach zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną w Warszawie.

Zarówno myszy jak i szczury miały zapewniony wolny dostęp do wody i pożywienia oraz 12-godzinny cykl dobowy światło-ciemność.

POPULACJE KOMÓREK:

Komórki pochodzące z krwi pępowinowej

Neuralne progenitory (HUCB-NP) izolowane były na gradiencie Ficoll/Hypaque w ciągu 12 godzin od pobrania krwi pępowinowej bezpośrednio po porodzie (za zgodą pacjentek). Komórki negatywne pod względem antygenu CD34 selekcjonowane były poprzez sortowanie immunomagnetyczne na MiniMACS (MilteneyBiotek) zawieszane w pożywce DMEM/F12 (Gibco) + 30% FBS (Gibco) lub w pożywce bezsurowiczej o składzie: DMEM/F-12 + B27 (1:100, Gibco) + EGF (40ng/ml, Sigma) + bFGF (20ng/ml, Sigma) + AAS (1:100, Gibco). W ten sposób po kilku dniach otrzymywano populację komórek ukierunkowanych neuralnie, którą przygotowywano do transplantacji oraz do znakowania i obrazowania metodą rezonansu magnetycznego (Habich i wsp., 2006).

Linia neuralnych komórek macierzystych (HUCB-NSC) otrzymana wskutek izolacji niehematopoetycznej frakcji komórek jednojądrzastych CD 34(-), wielostopniowej selekcji klonogennych komórek i ich ekspansji w pożywce DMEM/F12 + 10% FBS (Buzanska i wsp., 2006a; Buzanska i wsp., 2006b; Buzanska i wsp., 2002). W efekcie uzyskano hodowlę komórek o cechach NSC pływających w toni – niezróżnicowanych i adherentnych wykazujących ekspresję wczesnych markerów neuralnych. W stałej hodowli komórki były utrzymywane w pożywce o niskim stężeniu surowicy: DMEM/F12 + ITS (1:100, Gibco) + 2% FBS + AAS (1:100). Komórki używane do przeszczepów w eksperymentalnym modelu ALS u myszy były zamrażane i w ten sposób przechowywane do czasu transplantacji. Do transplantacji w eksperymentalnym modelu udaru mózgu używano komórek transfekowanych genem zielonego białka fluorescencyjnego (GFP). Komórki te, a także komórki do badań *in vitro* na dzień przed rozpoczęciem eksperymentu były trypsynizowane i przekładane do pożywki bezsurowiczej, z dodatkiem B27 (1:50), EGF (20ng/ml). W ten sposób otrzymywano populację niezróżnicowanych nieadherentnych neuralnych komórek progenitorowych. Do badań *in vitro* używano zarówno komórki nieadherentne, z pożywki bezsurowiczej, jak i komórki ze stałej hodowli w niskim stężeniu surowicy.

Komórki szpiku

Szpik kostny pobierano od pacjentów podczas rutynowych operacji ortopedycznych (osteotomie miednicy) za zgodą dawców. Komórki pozytywne dla antygenów CD9, CD90, CD 105, CD 166 i negatywne dla CD14, CD34, CD45 były 1-3 - krotnie pasażowane w pożywce DMEM z dodatkiem 10% FBS, 1% glutaminianu, 1% antybiotyku (penicillin/streptozocin) w standardowych warunkach. Następnie komórki były zamrażane. Dalszy etap przygotowania do transplantacji opisany został szczegółowo we wcześniejszej publikacji (Habisch i wsp., 2007).

METODY BADAŃ

PRZYGOTOWANIE KOMÓREK DO TRANSPLANTACJI

W zależności od sposobu przechowywania lub hodowli niektóre rodzaje komórek używanych do transplantacji były najpierw rozmrażane lub odklejane od podłoża. Następnie komórki liczone, wirowano (1000 obr./min, 3 min) i zawieszano w PBS w odpowiedniej objętości, tak aby uzyskać gęstość 10 000 komórek/ μ l.

Komórki używane do opracowania metody podawania komórek do zbiornika wielkiego u myszy były znakowane bezpośrednio przed transplantacją znacznikami fluorescencyjnymi: zielonym (CMFDA), wiążącym się z lipidami błon wewnątrzkomórkowych (37°C, 30 min.) oraz niebieskim (Hoechst), wiążącym się z DNA (37°C, 1:150, 15 min.). Do znakowania komórek HUCB-NP w tych eksperymentach używano tylko CMFDA. W eksperymentach z obrazowaniem w MR komórki znakowano nanocząsteczkami tlenku żelaza (SPIO). Dokładny opis procedury znajduje się na stronie 50.

EKSPERYMENTALNA NEUROCHIRURGIA GRYZONI

Operacja otwarta – neurotransplantacja komórek do zbiornika wielkiego u myszy

Po dootrzewnowym znieczuleniu zwierzęcia (ketamina 100 mg/kg i xylazyna 16 mg/kg) skórę nacinano w linii pośrodkowej w okolicy podpotylicznej, wprowadzano igłę do zbiornika wielkiego pod kontrolą wzroku i wstrzykiwano 10 μ l zawiesiny komórkowej. Do eksperymentu używano komórki pochodzące z krwi pępowinowej oraz w nielicznych zaznaczonych przypadkach wyizolowane z ludzkiego szpiku. Po wstrzyknięciu igłę wycofywano ze zbiornika wielkiego i zszywano skórę. Dokładny sposób przeprowadzenia tej operacji został przeze mnie opracowany i przedstawiony w dziale „Wyniki”.

Operacja stereotaktyczna – wykonanie modelu udaru mózgu u szczurów z zastosowaniem roztworu ouabainy oraz miejscowa transplantacja zawiesiny komórkowej

Przygotowanie roztworu ouabainy do iniekcji: po przeprowadzeniu eksperymentów wstępnych ustalono, że najodpowiedniejsze stężenie roztworu ouabainy do wykonania udaru mózgu wynosi 5 mmol/l. Do sporządzania roztworu używano ośmiowodzianu ouabainy w proszku (ouabain octahydrate, Sigma) oraz sterylnej soli fizjologicznej o temperaturze pokojowej (0,9% NaCl). Każdorazowo roztwór sporządzano bezpośrednio przed aplikacją i do czasu użycia przechowywano go w ciemnym, szklanym opakowywaniu ze względu na światłowrażliwość oraz możliwość reakcji z plastikiem.

Przygotowanie zawiesiny komórek do transplantacji opisano we wcześniejszym rozdziale.

Po znieczuleniu dootrzewnowym (Equithisine 3.5 ml/kg) zwierzęta umieszczano w aparacie stereotaktycznym (Stoelting). Okolicę cięcia skórniego dodatkowo znieczulano miejscowo (1% Lignocaina). Operację przeprowadzano pod mikroskopem operacyjnym OPMI Pico (Zeiss). Przeprowadzano cięcie skórne proste pośrodkowe od linii oczu do punktu lambda. Trepanację czaszki (micro drill trephine, średnica 1,8mm, FST) wykonywano w miejscu wyznaczonym w stosunku do punktu bregma. Do celów hemostatycznych używano koagulacji (Gemini Cautery System), oraz sterylnych kulek z ligniny o średnicy 1-3mm. Następnie do strzykawki (Hamilton, 5 μ l) połączonej z igłą (Hamilton, typ RN, długość 15mm, średnica wewnętrzna 0,11mm, średnica zewnętrzna 0,21mm, końcówka nr 4) nabierano roztwór ouabainowy lub zawiesinę komórek w zależności od potrzeby. Cały zestaw umieszczano w precyzyjnym dozowniku strzykawkowym (Stepper motorized stereotactic injector, Stoelting), który mocowano na aparacie stereotaktycznym. Po odsłonięciu opony twardej powoli wprowadzano igłę do mózgu, w ciągu 1 minuty. Miejsce wprowadzenia igły wyznaczały koordynaty w wymiarze strzałkowym i wieńcowym liczone od punktu bregma oraz w wymiarze osiowym liczone od opony twardej i zależące od rodzaju procedury. Po wprowadzeniu igły czekali 3 minuty w celu powrotu mózgu do prawidłowej topografii po przejściowym odkształceniu spowodowanym przez igłę. Następnie przy użyciu precyzyjnego dozownika strzykawkowego podawano automatycznie określoną objętość roztworu lub

zawiesiny z zaprogramowaną szybkością. Po wykonaniu iniekcji igłę utrzymywano w mózgu przez 3 min, aby zminimalizować ryzyko cofnięcia się wstrzykniętej substancji po torze wyprowadzanej igły. Po wyjęciu igły z mózgu opona nie była zszywana, ani kość przywracana. Skórę zszywano szwami pojedynczymi (Amifil 4.0). Po zszyciu skóry szczury otrzymywały antybiotyk (Baytril, 5 mg/kg). Tak zaopatrzone zwierzęta umieszczano w klatkach z wolnym dostępem do wody z paracetamolem (0,5%).

Różnice w procedurze pomiędzy iniekcją roztworu ouabainy, a zawiesiny komórkowej dotyczyły szybkości wstrzyknięcia i objętości wstrzykiwanej oraz ewentualnie miejsce podania. Roztwór ouabainy podawany był w objętości 1 μ l, z szybkością 0,1 μ l/min. tak, aby uzyskać równomierne rozchodzenie się roztworu wokół końcówki igły (convection-enhanced delivery, CED). Koordynaty zastosowane do podania ouabainy wynosiły: A 0.0, L 3.0, V 5.0. Zawiesina komórkowa była aplikowana w objętości 2 μ l, z szybkością 1 μ l/min. Parametry te zostały określone na podstawie wcześniej przeprowadzonych doświadczeń z użyciem różnych objętości i gęstości komórek oraz różnych szybkości wstrzyknięć. Koordynaty zastosowane do podania komórek zwierzętom nieuszkodzonym były takie same jak do podania ouabainy, natomiast zwierzęta z ouabainowym modelem udaru mózgu otrzymywały komórki do istoty białej zgodnie z koordynatami: A 0.0, L 4.0, V 3.0.

INIEKCJE BROMODEOKSYURYDYN (BRDU)

W celu oceny proliferacji komórkowej indukowanej udarem mózgu zwierzętom podawano dootrzewnowo BrdU. Na podstawie literatury wybrano dawkę (100 mg/kg m.c.) (Cameron i McKay, 2001) oraz czas po wywołaniu udaru mózgu (od 6 do 8 doby), oraz częstość wstrzyknięć (2 x dziennie, łącznie 6 iniekcji) tak, aby uchwycić moment, kiedy namnażanie komórek neuralnych (neurogeneza) zachodzi najbardziej intensywnie (Liu i wsp., 2007).

POZYSKIWANIE I OBRÓBKA TKANEK ZWIERZĘCYCH

W celu pozyskania tkanek zwierzęta były usypiane. Myszy otrzymywały ketaminę (200 mg/kg) i Xylazynę (32 mg/kg), a szczury Equithisine (7 ml/kg), co było dawką podwojoną w stosunku do stosowanej przy znieczuleniu ogólnym. Następnie zwierzęta były dekapitowane lub perfundowane roztworem PFA (2% myszy, 4%

szczury). Po uśmierceniu szczurów, ich mózgi pozyskiwano przy użyciu nożyczek i dysektora, a następnie wkładano je na 40 godz. do 4% PFA w celu dalszego utrwalenia.

Opis preparowania OUN u myszy

Myszy po perfuzji wkładano w całości do 2% roztworu PFA na dobę w celu dalszego utrwalenia. Umożliwiało to uzyskanie odpowiedniej sztywności tkanek do dalszej preparatyki. Takie postępowanie było związane z koniecznością pozyskiwania mózgu i rdzenia kręgowego nie tylko w całości, ale również wewnątrz nie uszkodzonej opony twardej. Wynikało to z faktu, że w tym modelu komórki były podawane podoponowo i zachowanie ciągłości opony było niezbędne w celu oceny liczby i dystrybucji wszczepionych komórek. Ta procedura została opracowana w ramach pracy doktorskiej i została ona przedstawiona w dziale „Wyniki”.

Preparatyka prążkowie i wzgórza u szczurów

W pierwszym etapie wypreparowany mózg był przecinany wzdłuż linii pośrodkowej, a półkulę mózgu umieszczano na szalce Petriego zmrożonej suchym lodem, przyśrodkową częścią półkuli ku górze. Następnie otwierano komorę boczną mózgu wzdłuż szczeliny naczyniówkowej i usuwano hipokamp leżący w tylnej części komory, zyskując lepszy dostęp do pozostałych struktur. W sklepieniu komory bocznej widoczna była istota biała spoidła wielkiego. Kierując się od tego punktu ku bocznej ścianie komory bocznej napotymano na istotę szarą prążkowie, a dalej zwracając się przyśrodkowo znajdowano istotę szarą wzgórza. Następnie posuwając się wzdłuż istoty białej spoidła wielkiego otaczano prążkowie. W drugim etapie oddzielano wzgórze od konara mózgu i usuwano w jednym bloku z prążkowie i zawartą między nimi torebką wewnętrzną.

Zamrażanie mózgów i rdzeni kręgowych

Zamrażanie mózgów i rdzeni kręgowych utrwalonych w PFA było poprzedzone procedurą krioprezerwacji, która polegała na ich umieszczeniu w 30% sacharozie na dobę. Tak przygotowane mózgi zamrażano w temperaturze -70°C. Mózg pozyskany

od zwierząt dekapitowanych umieszczano natychmiast w pojemniku z suchym lodem, a następnie przechowywano w zamrażarce w -70°C . Tak samo postępowano z wypreparowanymi strukturami – prądkowiem i wzgórzem.

Krojenie mózgów i rdzeni kręgowych na kriostacie

W celu wykonania badań immunohistochemicznych mózgi i rdzenie kręgowe były krojone na kriostacie (Microm). Na godzinę przed krojeniem mózg lub rdzeń kręgowy wyjmowano z zamrażarki, umieszczano w kriostacie w temp. -20°C . i krojono w płaszczyźnie wieńcowej. Grubość skrawków używana do badań wynosiła $20\mu\text{m}$. Do obrazowania komórek skrawki były pobierane bezpośrednio na szkiełka i po wysuszeniu z powrotem zamrażane w -70°C do czasu dalszego u życia.

Do obrazowania neurogenezy skrawki były pobierane do pojemników z płynem zapobiegającym zamarzaniu (antifreeze-water) i przechowywane w zamrażarce w -70°C do czasu dalszego u życia.

Homogenizacja fragmentów mózgu i pozyskiwanie nadsączu

Do tego celu używano zamrożonych bloków: prądkowie i wzgórze. Po rozmrożeniu homogenizowano je w pożywce do hodowli komórek DMEM/F12 z dodatkiem antyproteaz (protease inhibitor cocktail, Sigma P-8340) – 150 mg tkanki nerwowej/1 ml pożywki. Homogenat był wirowany z prędkością 4000 obr/min przez 20 minut, a nadsącz delikatnie zlewany, filtrowany (Millipore $0,22\mu\text{m}$), poddany oznaczeniu stężenia białka metodą Lowry’ego i zamrażany w temp. -70°C do czasu dalszego użycia.

HODOWLE KOMÓRKOWE

Stała hodowla linii komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej HUCB-NSC była prowadzona w butelkach (patrz: rozdział „Materiał”). Komórki rosły w dwóch frakcjach, jako adherentne i jako nieadherentne. W celu wykonywania eksperymentów komórki najpierw trypsynizowano, a następnie zawieszano w pożądanej pożywce. Używano 3 rodzajów pożywek: bezsurowiczą, z niską zawartością surowicy i z wysoką zawartością surowicy.

Pożywka bezsurowicza składała się z DMEM/F12 + B27 (1:50) + EGF (20 ng/ml) + AAS (1:100). W takich warunkach komórki utrzymywały się jako neuralne progenitory (nestin positive) i nie ulegały adhezji do podłoża nawet w dłuższych przedziałach czasowych. Komórki hodowane w takich warunkach charakteryzowały się wolnym tempem wzrostu z tendencją do wytwarzania neurosfer. Pożywka bezsurowicza była stosowana do eksperymentów z migracją komórek pływających oraz do transplantacji domózgowych.

Pożywka z wysoką zawartością surowicy składa się z DMEM/F12 + B27 (1:50) + EGF (20 ng/ml) + 10% FBS + AAS (1:100). Została ona zastosowana w celu badania zmian w wewnątrzkomórkowej lokalizacji receptora CXCR4 w trakcie procesu różnicowania komórek. Hodowla była prowadzona na płytkach 24-dołkowych. Do każdego dołka nanoszono 500 μ i zawiesiny komórkowej o gęstości 4×10^4 kom./ml. Tak przygotowane płytki umieszczano w inkubatorze (5% CO₂, 37°C) na dobę lub na tydzień.

Pożywka z niską zawartością surowicy, w której prowadzona jest stała hodowla komórek HUCB-NSC składa się z DMEM/F12 + ITS (1:100, Gibco) + 2% FBS + AAS (1:100). Została ona zastosowana bezpośrednio do eksperymentów z migracją komórek adherentnych, a także do hodowli na płytkach 24-dołkowych, kontrolnej w stosunku do komórek zawieszonych w pożywce z wysoką zawartością surowicy.

PRZYGOTOWANIE KOMÓREK HUCB-NSC DO BARWIEŃ

Komórki HUCB-NSC hodowane w butelkach były trypsynizowane, płukane w PBS, wirowane, a następnie przy użyciu siły odśrodkowej (400 obr/min, 5 min) przenoszone na szkiełka podstawowe (10 000 kom./szkiełko, Shandon Cytospin 4, Thermo Electric Corporation). Szkiełka wraz z komórkami były suszone strumieniem powietrza przez ok. godzinę, utrwalane 15 minut przy użyciu 4% PFA, płukane 3 x w PBS i po wyschnięciu przez noc zamrażane w -70°C.

Komórki HUCB-NSC umieszczane w płytkach 24-dołkowych po określonym czasie hodowli były płukane w dołkach 3 x PBS (pH 7.4) i utrwalane w 4% PFA przez 10 min. Po utrwaleniu komórki w dołkach ponownie płukano 3 x PBS, pozostawiano w nich PBS z antybiotykiem i przechowywano w 4°C do czasu wykonania barwień immunocytochemicznych.

ZNAKOWANIE KOMÓREK HUCB-NP CZĄSTECZKAMI TLENKU ŻELAZA (SPIO)

Progenitory neuralne otrzymywane z ludzkiej krwi pępowinowej hodowane 10 dni w zdefiniowanej pożywce bezsurowiczej, DMEM/F-12 + B27 (1:100) + AAS (1:100) + EGF (40 ng/ml) + bFGF (20 ng/ml) zostały wyznakowane nanocząsteczkami żelaza pokrytymi dekstranem (Endorem, Guerbet SA). Wnikanie żelaza do tych komórek zostało ułatwione przez dodatek poli-L-lizyny (Sigma P1524). W tym celu do ww. pożywki z heparyną (5 µg/ml) dodano SPIO (200 µg/ml) oraz poli-L-Lizynę (1,5 µg/ml) całość mieszając i wytrząsając przez 60 min. Następnie ww. roztwór został dodany do komórek w pożywce w stosunku objętościowym 1:1 uzyskując gęstość 4×10^6 komórek/ml.. Następnie połowę komórek inkubowano przez 12 godz., a drugą połowę przez 48 godz. w standardowych warunkach, (5% CO₂, 37°C). Po tym okresie komórki zostały odklejone, dwukrotnie płukane w PBS i zawieszone tak, aby uzyskać pożądane gęstości komórek.

BARWIENIA SKRAWKÓW MÓZGU I KOMÓREK

Badania histologiczne

Badanie histologiczne polega na sekwencyjnym wybarwianiu jąder komórkowych hematoksyliną (Merck) oraz ciał komórek alkoholowym (70%) roztworem eozyny (Polskie Odczynniki Chemiczne, Gliwice). Wykonywane było na skrawkach szczurzych mózgów. Badanie zostało wykorzystane do analizy ilościowej i jakościowej uszkodzenia mózgu.

Barwienie metodą Perla

Komórki HUCB-NP wyznakowane SPIO najpierw zostały utrwalone w 4% wodnym roztworze glutaraldehydu przez 15 min, 2 x płukane w PBS i inkubowane w 4% roztworze cyjanku żelaza z dodatkiem 10% HCl (1:1) przez 30 min. Następnie zabarwiono jądra używając standardowego barwienia Nuclear Fast Red.

Badania immunocytochemiczne preparatów na szkiełkach podstawowych

Po rozmrożeniu skrawków mózgu w temperaturze pokojowej wykonywano 3 x płukanie w PBS i blokowano niespecyficzne wiązania odpowiednią mieszaną blokującą (tab. 1), po czym nakładano na noc pierwsze przeciwciało w mieszaninie blokującej.

Tab. 1. Mieszaniny blokujące

Mieszaniny blokujące w PBS	Przeciwciała pierwszorzędowe
10% surowica kozia	TUJ1, PSA-NCAM, ED1, NuMa, HLA-ABC class I, NF-200, BrdU, c-Met, Flk-1, IGF-1R, PDGFR- α , NG2, GFAP, GFP
5% surowica ośla z 0,3% + Triton X100	CXCR4, PDGFR- β

Informacja na temat użytych przeciwciał pierwszorzędowych została umieszczona w tabeli nr 2. Następnie wykonywano płukanie preparatów 3 x PBS i nakładano odpowiednie drugie przeciwciało. Informacja na temat użytych przeciwciał drugorzędowych została zawarta w tabeli nr 3. Po godzinnej inkubacji ponownie wykonywano płukanie 3 x w PBS. W celu barwień podwójnych procedurę powtarzano z użyciem drugiego zestawu: blokowanie, pierwsze i drugie przeciwciało. Następnie na preparaty nakładano Hoechst (1:100) na 15 minut w celu wybarwienia jąder komórkowych. Po kolejnych płukaniach 3 x w PBS preparaty zostawały zamykane szkiełkami nakrywkowymi przy użyciu Dako Fluorescent Mounting Medium. Tak przygotowane preparaty były gotowe do akwizycji obrazu.

Tab. 2: Spis przeciwciał pierwszorzędowych

PRZECIWCIAŁO GOSPODARZ	IZOTYP ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT NR KAT.
Monoklonalne anty: β -tubulina III (TUJ1), Mysz	IgG2a 1:750	Covance MMS-435P
Monoklonalne anty: PSA-NCAM, Mysz	IgM 1:200	Chemicon MAB5324

Monoklonalne anty: CD68 (ED1) , Mysz	IgG1 1:100	Serotec MCA341R
Monoklonalne anty: NuMa (Ab-2) , Mysz	IgG2b 1:50	Calbiochem NA09L
Monoklonalne anty: HLA-ABC class I , Mysz	IgG2a 1:50	DakoCytomation M 0736
Monoklonalne anty: NF-200 , Mysz	IgG1 1:400	SIGMA N0142
Monoklonalne anty: BrdU , Mysz	IgG1 1:200	Santa Cruz, sc-32323
Monoklonalne anty: c-Met , Mysz	igM 1:50	Novocastra NCL-cMET
Monoklonalne anty: Fik-1 , Mysz	igG1 1:50	Santa Cruz sc-6251
Monoklonalne anty: IGF-1R Mysz	IgG1 1:100	Oncogene GR11
Poliklonalne anty: PDGFR-α , Królik	IgG (H+L) 1:50	Santa Cruz Sc-338
Poliklonalne anty: PDGFR-β , Koza	IgG (H+L) 1:50	Santa Cruz Sc-339
Poliklonalne anty: CXCR4 , Koza	IgG (H+L) 1:100	Chemicon AB1846
Poliklonalne anty: NG2 królik	IgG (H+L) 1:100	Chemicon AB5320
Poliklonalne anty: GFAP królik	IgG1 1:100	ICN Cappel 10555
Poliklonalne anty: GFP królik	IgG (H+L) 1:50	Chemicon AB3080

Tab. 3: Spis przeciwciał drugorzędowych

PRZECIWCIAŁO GOSPODARZ	FLUOROCHROM	IZOTYP ROZCIEŃCZENIE	PRODUCENT NR KAT.
Przeciwciało kozie anty-mysie	TxRd	IgG2b 1:500	Southern Biotechnology 1090-07
Przeciwciało kozie anty-mysie	TxRd	IgG2a 1:500	Southern Biotechnology 1080-07
Przeciwciało kozie anty-królicze	FITC	IgG(H+L) 1:100	Jackson ImmunoResearch 111-095-144
Przeciwciało kozie anty-mysie	Alexa 546	igG1 1:500	Invitrogen A-21123
Przeciwciało kozie anty-królicze	Alexa 546	IgG(H+L) 1:500	Invitrogen A-11035
Przeciwciało kozie Anty-mysie	Alexa 488	igM	Invitrogen A-21042
Przeciwciało kozie anty-królicze	Alexa 488	IgG(H+L) 1:500	Invitrogen A-11034
Przeciwciało kozie anty-mysie	Alexa 488	IgG2a 1:500	Invitrogen A-21131
Przeciwciało kozie anty-mysie	Alexa 488	IgG1 1:500	Invitrogen A-21121
Przeciwciało ośle anty-kozie	Alexa 546	igG 1:500	Invitrogen A-11056
Przeciwciało kozie Anty-mysie	Alexa 546	IgM 1:500	Invitrogen A-21045

Badanie immunohistochemiczne pływających skrawków mózgu

Badania immunohistochemiczne pływających skrawków mózgu były wykonywane w celu obrazowania BrdU. Barwienie BrdU tą metodą charakteryzuje

się powstaniem mocniejszego sygnału w porównaniu z przeprowadzeniem tej procedury na szkiełkach podstawowych. W pierwszym etapie skrawki były przekładane do naczynka roboczego i płukane 3 x PBS. Następnie wykonywano denaturację kwasów nukleinowych (2N HCl, 37°C, 60 min.) w celu ekspozycji BrdU włączonej do nici DNA. Potem skrawki płukano 3 x 5 min. w buforze boranowym (pH 8,5) oraz 3 x 5 min. w PBS. W następnym etapie tak samo jak w przypadku barwień skrawków mózgu na szkiełkach podstawowych dodawano mieszaninę blokującą, pierwsze przeciwciało i drugie przeciwciało. W celu barwień podwójnych procedurę powtarzano z użyciem drugiego zestawu: blokowanie, pierwsze i drugie przeciwciało. Nie wykonywano barwienia Hoechstem, które jest negatywne w sytuacji denaturacji DNA. Po zakończeniu barwienia skrawki mózgu delikatnie łowiono, nanoszono na szkiełka podstawowe i zamykano szkiełkami nakrywkowymi.

Badania immunocytochemiczne komórek HUCB-NSC znajdujących się na płytce 24-dołkowej

Po wyjęciu płytek z lodówki wykonywano płukanie komórek w dołkach 3 x 5 min. w PBS. Płukanie i nanoszenie substancji do dołków przeprowadzano bardzo delikatnie, zawsze po ściankach dołka tak, aby nie wypłukać komórek utrwalonych na szkiełku nakrywkowym znajdującym się na dnie dołka. Następnie do dołków, tak jak w przypadku barwień na skrawkach podstawowych, nanoszono mieszaninę blokującą, pierwsze i drugie przeciwciało oraz wykonywano dalsze konieczne płukania. Po inkubacji preparatów z II przeciwciałem i wykonaniu płukania 3 x PBS przeprowadzano procedurę barwienia jąder Hoechstem (1:150, 10 minut). Następnie przy użyciu specjalnie zagiętej pęsety szkiełka nakrywkowe zawierające zabarwione komórki były wyjmowane, nakładane na szkiełka podstawowe i zamykane. Tak przygotowane preparaty były gotowe do akwizycji obrazu.

OBRAZOWANIE KOMÓREK I SKRAWKÓW MÓZGU

W celu wykonania zdjęć całych skrawków szczurzych mózgów poddanych badaniu histologicznemu użyto mikroskopu stereoskopowego SteREO Discovery V.12 (Zeiss) sprzężonego z aparatem fotograficznym Powershot A620 (Canon). W

celu rejestracji obrazu z ww. preparatów pod większym powiększeniem użyto mikroskopu świetlnego BX61 (Olympus) sprzężonego z kamerą.

W celu akwizycji fluorescencji (barwienia immunochemiczne i barwniki komórkowe) użyto stacji roboczej LSM 510 (Zeiss) wyposażonej w mikroskop konfokalny wraz z laserami: helowo-neonowym (543 nm) i argonowym (488) oraz lampę fluoroscencyjną i kamerę AxioCam HRm. Do analizy i obróbki obrazów użyto oprogramowania Zeiss LSM 510 v.3.2

DETEKCJA SYGNAŁU MR GENEROWANEGO PRZEZ WYZNAKOWANE KOMÓRKI HUCB-NP

Do pomiaru sygnału MR użyto serię zawiesin komórkowych o stopniowo zwiększających się gęstościach: 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 4×10^6 komórek/ml inkubowanych ze SPIO przez odpowiednio 12 i 48 godz.. Następnie po 200 μ l każdej z ww. zawiesin oraz obu czasów inkubacji zostało umieszczone w probówkach do PCR. W celu stabilizacji probówek oraz aby zapobiec artefaktom powodowanym przez powietrze zastosowano fantom (pojemnik wypełniony 0,8% żelem agarowym z dodatkiem 1% siarczanu miedzi). Probówki umieszczone w fantomie zostały poddane obrazowaniu w rezonansie magnetycznym (Siemens 1.5T Sonata Vision) używając sekwencji T2/SWI gradient-echo (TR = 58, TE = 44.1 ms, SL = 1.6, wielkość voxela 0.76 x 0.76 x 1.2 mm).

METODY ANALIZY STRUKTUR MÓZGU PODDANEGO UDAROWI

Analiza ilościowa

W celu ilościowego określenia obszaru mózgu objętego udarem wykonano specjalną analizę struktur mózgu na podstawie dokumentacji zdjęciowej całych skrawków mózgu barwionych metodą H-E. Następnie na wykonanych zdjęciach kolejnych skrawków mózgu ręcznie obrysowano: obszar jamy poudarowej, całkowity obszar uszkodzenia mózgu, wielkość obu komór bocznych oraz powierzchnię całych skrawków, korzystając z programu Corel Draw 11 (Corel Corporation). Następnie dane (pliki) były przenoszone do programu do rekonstrukcji trójwymiarowej specjalnie napisanego przez Laboratorium Analizy Obrazu Cyfrowego Zakładu Anatomii

Uniwersytetu Śląskiego (Katowice), w celu obliczenia objętości zaznaczonych obszarów.

Ze względu na poudarowe, wtórne poszerzenie tożstronnej komory bocznej całkowita bezwzględna wielkość uszkodzenia była sumą objętości obszaru uszkodzonego mózgu oraz objętości tożstronnej komory bocznej pomniejszoną o objętość przeciwstronnej komory bocznej. Z uwagi na brak przemieszczenia struktur linii pośrodkowej uznano, że poszerzenie ipsilateralnej komory bocznej jest wtórne do miejscowej atrofii mózgu wynikającej z wywołanego udaru mózgu. Względną wielkość uszkodzenia stanowiła proporcja całkowitej bezwzględnej wielkości uszkodzenia do objętości całego mózgu.

Analiza jakościowa

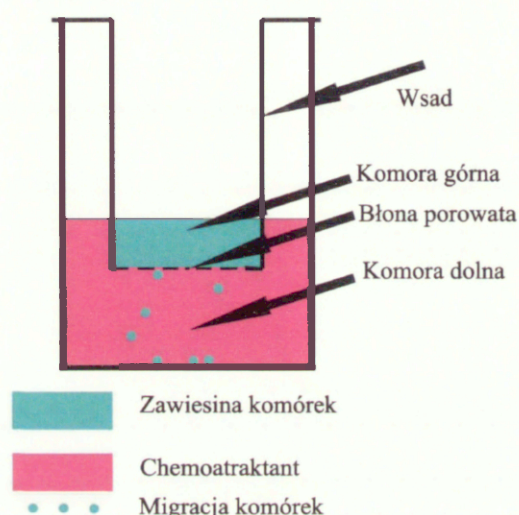
Dokładna identyfikacja i analiza struktur mózgu objętych uszkodzeniem została przeprowadzona w oparciu o znajomość anatomii oraz atlas stereotaktyczny mózgu szczura (Paxinos & Watson) i przedstawiona w postaci tabeli w dziale „Wyniki”. Dokonano podziału stopnia uszkodzenia struktur mózgu na 3 strefy. Strefa całkowitego uszkodzenia obejmuje jamę poudarową (oznaczona jako A w tabeli nr 4). Wokół niej znajduje się strefa dużego uszkodzenia, w obrębie której nie można wyróżnić struktur anatomicznych (oznaczona jako B w tabeli nr 4). Najbardziej obwodowo zlokalizowana jest strefa małego uszkodzenia. Charakteryzuje się ona stosunkowo niewielkimi odchyleniami od prawidłowego wyglądu poszczególnych struktur anatomicznych (oznaczona jako C w tabeli nr 4).

MIGRACJA KOMÓREK HUCB-NSC *IN VITRO*

Badanie migracji komórkowej wykonane w ramach tej pracy polegało na pomiarze przemieszczania się komórek w kierunku zawiesiny charakteryzującej się zdolnością do „przyciągania” komórek czyli do chemotaksji oraz ocenie przesuwania się komórek wzdłuż macierzy zewnątrzkomórkowej, czyli do haptotaksji. Jako chemoatraktantów używano nadsączów pozyskanych z homogenizacji szczurzych mózgów i wybranych czynników neurotroficznych oraz ludzkich albumin i surowicy (30% FBS) jako kontroli. Białka macierzy zewnątrzkomórkowej były reprezentowane przez żelatynę, lamininę i fibronektynę. Bezpośrednio przed eksperymentem ww.

nadsącz był rozmrażany i rozcieńczany w pożywce tak, aby ostatecznie otrzymać stężenie białka 500 $\mu\text{g/ml}$. Ludzkie albuminy także były rozcieńczane w pożywce do stężenia białka 500 $\mu\text{g/ml}$. Stężenia czynników neurotroficznych zostały dobrane na podstawie danych literaturowych.

W warunkach *in vitro* badanie migracji przeprowadzano na płytkach 24-dółkowych zaopatrzonych w specjalne wsady (transwells, Corning) tworzące razem naczynka migracyjne. Dzięki temu każde naczynko podzielone było na dwie komory:



górną i dolną. Dolną komorę stanowiło dno dołka, a górną wsad. Obie komory rozdzielone były porowatą błoną o średnicy porów – 8 μm , która stanowi dno wsadu (ryc. 7). W zależności od zdolności komórek do przylegania do podłoża istniały pewne różnice w protokole eksperymentu.

Ryc. 7 Schemat budowy naczynka migracyjnego oraz graficzne przedstawienie migracji komórek nieadherentnych

Ocena migracji komórek nieadherentnych

Procedura badania migracji komórek polegała na naniesieniu określonej objętości (100 μl) zawiesiny komórek w pożywce (10^5 komórek/wsad) do górnej komory oraz wprowadzeniu chemoatraktanta do takiego samego środowiska znajdującego się w dolnej komorze (600 $\mu\text{l/komorę}$). Następnie naczynka wkładano na określony przedział czasu (24 godz. w przypadku opisywanych eksperymentów) do inkubatora w standardowych warunkach (5% CO_2 , 37°C), aby umożliwić komórkom migrację z górnej do dolnej komory. Po tym okresie usuwano wsady, a do dolnych komór dodawano kalceinę (1:600) – znacznik fluoroscencyjny żywych komórek. Ze względu na zjawisko sedimentacji komórki obecne w dolnej komorze były liczone na jej dnie i ich absolutna liczba stanowiła wynik.

Ocena migracji komórek adherentnych

W przypadku badania migracji komórek adherentnych najpierw błona porowata została powleczona substancją odpowiadającą macierzy zewnątrzkomórkowej, po której komórki przemieszczały się do komory dolnej. W tym przypadku zjawisku chemotaksji towarzyszy haptotaksja. Do powlekania użyto żelatyny (0,5%), lamininy i fibronektyny (obydwie w stężeniu 20 ng/ml). Przed rozpoczęciem powlekania płytka z naczynekami migracyjnymi została wstawiona na 30 min. do inkubatora w celu osiągnięcia odpowiedniej temperatury. W celu powleczenia błony porowatej nakraplano na nią 100 μ l jednej z ww. substancji i inkubowano w standardowych warunkach (5% CO₂, 37°C) przez pół godziny. Następnie zbierano nadmiar tej substancji i dalej kontynuowano procedurę badania migracji tak jak w przypadku komórek pływających, łącznie z 24 godz. inkubacją. W odróżnieniu od komórek pływających, które po przejściu do dolnej komory opadały na jej dno, komórki adherentne pozostawały na dolnej powierzchni błony porowatej. Po określonym czasie inkubacji wykonywano barwienie cytochemiczne komórek wraz z utrwalaniem metodą Wrighta. W tym celu wsady wraz z błonami porowatymi umieszczano na 30 min. w barwniku Wrighta (Merck), po czym wykonywano płukanie 3 x 10 min w buforze dostarczonym wraz z barwnikiem. Po zakończeniu barwienia usuwano komórki z górnej powierzchni błony, a pozostałe na dolnej powierzchni liczone pod mikroskopem. W przeprowadzonych badaniach wyniki z 16 pól widzenia zostały uśrednione. Znając powierzchnię pola widzenia wyliczano całkowitą ilość komórek, które przemiegrowały w badanych warunkach.

METODY STATYSTYCZNE

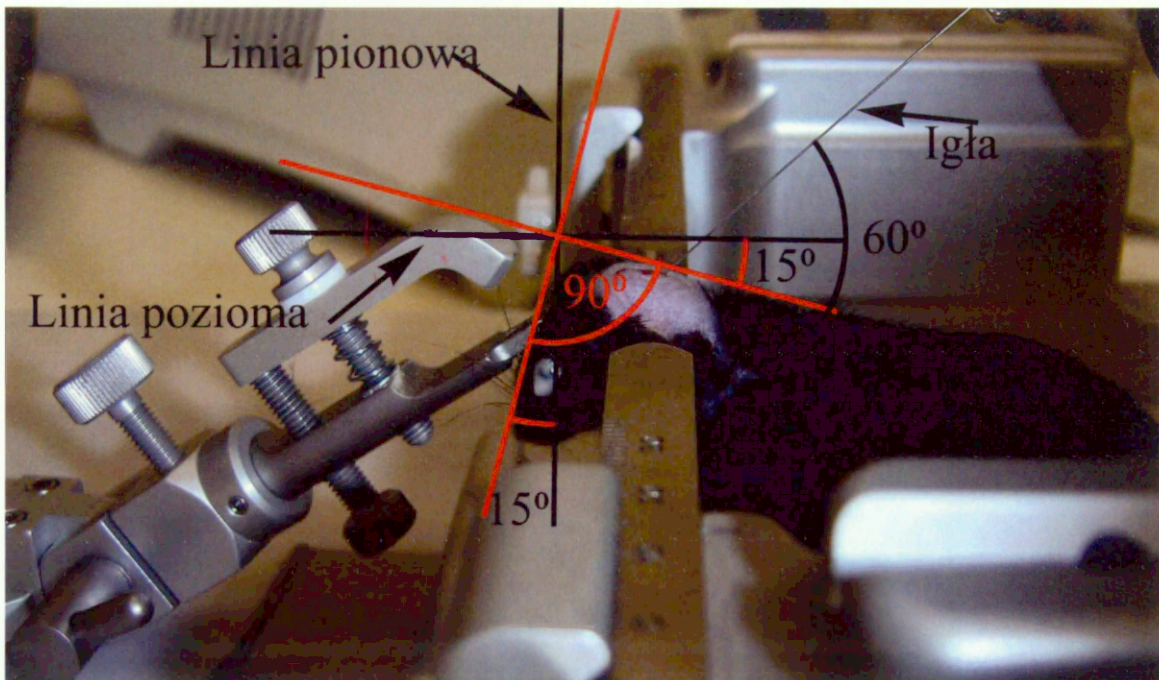
Wielkość uszkodzenia mózgu została podana jako średnia i odchylenie standardowe. Rozrzut wielkości lezji u poszczególnych zwierząt został przedstawiony jako współczynnik wariancji.

W celu oceny migracji komórek zastosowano test najmniejszych kwadratów zawarty w PROC MIXED (SAS). Przyjęto poziom istotności statystycznej $p=0,05$. Wyniki zostały przedstawione graficznie jako średnie i przedziały ufności.

WYNIKI BADAŃ

MODEL PRZESZCZEPU LUDZKICH KOMÓREK DO ZBIORNIKA WIELKIEGO U MYSZY

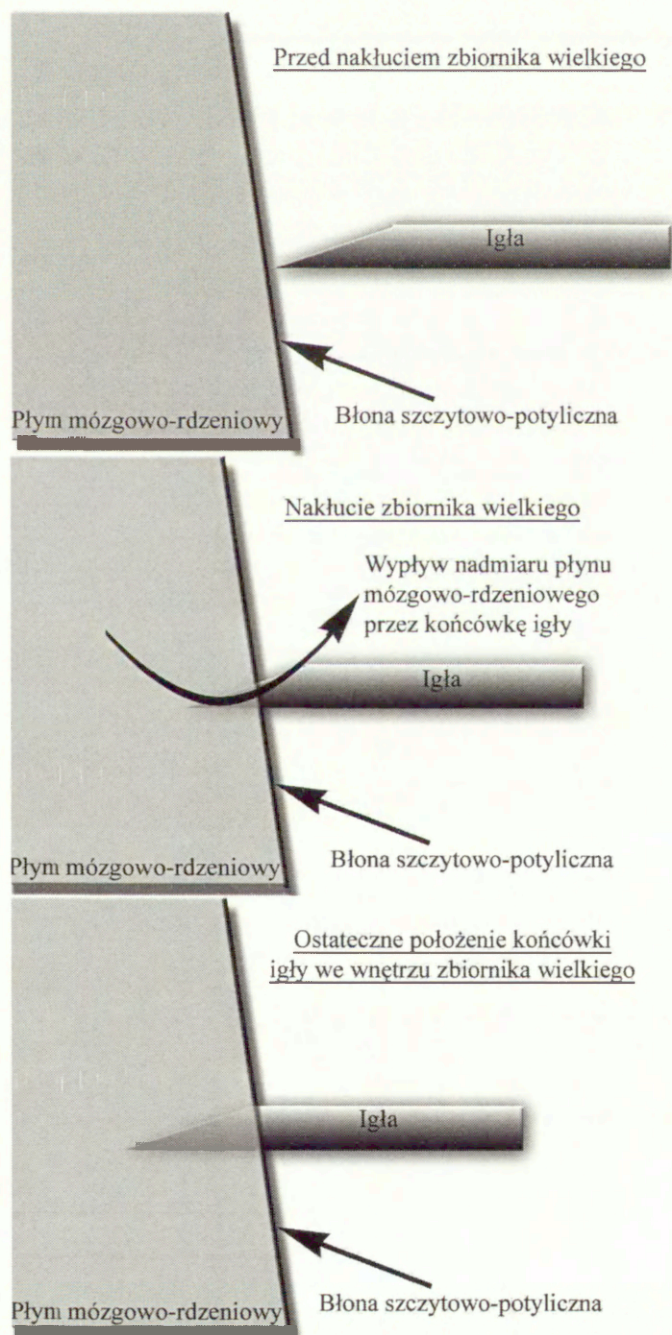
Kluczowym elementem procedury jest właściwe ułożenie zwierzęcia tak, aby okolica podpotyliczna była prawie najwyższym punktem myszy. W tym celu do operacji zwierząt zaadaptowano pozycję *concorde* z neurochirurgii klinicznej. Aby zapewnić sztywne utrzymanie głowy w czasie trwania operacji wykorzystano aparat stereotaktyczny (ASI Instruments, Heidelberg, Germany). W celu dostosowania położenia reszty ciała zwierzęcia do pozycji *concorde* unosi się tylną część aparatu stereotaktycznego tak, aby go pochylić do przodu o 30° w stosunku do stołu operacyjnego. Aby zapewnić podparcie środkowej części ciała pod mysz podkładamy wałek z gazy długą osią skierowany równoległe do linii międzyusznej. Średnicę wałka należy tak dobrać, aby linia łącząca wystające najbardziej ku górze części głowy oraz kręgosłupa (ryc. 8, kolor czerwony) tworzyła kąt 15° z linią poziomą (ryc. 8). Po umieszczeniu głowy w drążkach usznych drążkiem zębowym naciska się na głowę zwierzęcia od góry w punkcie *nasion* do momentu, kiedy powierzchnia czaszki (ryc.



Ryc. 8 Ułożenie myszy w pozycji *concorde* – tak aby operowana okolica była najwyższym punktem zwierzęcia.

8, kolor czerwony) tworzy kąt 15° z linią pionową (ryc. 8) . W ten sposób obie ww. linie koloru czerwonego tworzą kąt 90°. W tej pozycji zbiornik wielki jest niemal najwyższym punktem myszy.

Po odkażeniu pola operacyjnego preparatem octanisept dokonuje się nacięcia skóry w linii środkowej od guzowatości potylicznej zewnętrznej do wyrostka kolczystego kręgu C3. Posuwając się dalej w linii środkowej przy użyciu mikroskopu operacyjnego (Zeiss) rozwarstwia się mięśnie karku i odwarstwia od błony szczytowo-potylicznej. Po jej odsłonięciu przez półprzezroczystą strukturę błony widoczne są: mózdek, rdzeń przedłużony oraz znajdujący się pomiędzy nimi



zbiornik wielki wypełniony płynem mózgowo-rdzeniowym. Wtedy do strzykawki (Hamilton, 20µl) wyposażonej w igłę (Hamilton, typ RN, długość 50mm, końcówka nr 4, średnica wewnętrzna 0,16mm, średnica zewnętrzna 0,31mm) nabiera się określona ilość (10µl) zawiesiny komórek. Do iniekcji komórek użyto pompy mikroinfuzyjnej (WPI, Ultra Micro Pump) zamontowanej na ramieniu mikromanipulatora (Stoelting). Po umocowaniu strzykawki w pompie mikroinfuzyjnej używając pokręteł mikromanipulatora końcówkę igły zbliżono do błony szczytowo-potylicznej w linii środkowej w połowie odległości pomiędzy kością potyliczną, a łukiem tylnym kręgu dźwigacza tak, aby długa oś

Ryc. 9 Kolejne etapy przekłuwania igłą błony szczytowo-potylicznej, tak aby pozwolić na wypłynięcie nadmiarowi płynu mózgowo-rdzeniowego w celu zrobienia miejsca dla zawiesiny komórkowej

igły tworzyła kąt 60° z linią łączącą wystające najbardziej ku górze części głowy oraz kręgosłupa (ryc. 8). W ten sposób w przedłużeniu ku dołowi długiej osi igły znajduje się szczelina mózdkowo-rdzeniowa. Jeżeli błona szczytowo-potyliczna nie jest napięta można nieco zwiększyć pochylenie głowy do przodu za pomocą dźwika zębowego, tak aby ułatwić jej przebicie przez igłę. Dalej szybkim, acz delikatnym ruchem pokrętki mikromanipulatora nakłuwana się błona szczytowo-potyliczna. Podczas wprowadzania igły należy bezpośrednio po nakłuciu błony szczytowo-potylicznej zatrzymać na chwilę igłę, aby przez jej końcówkę wypłynął nadmiar płynu mózgowo-rdzeniowego (ryc. 9). Pozwala to na zrobienie miejsca dla zawiesiny komórkowej, a ułożenie myszy tak, że zbiornik wielki stanowi jej najwyższy punkt zapobiega dostawianiu się powietrza wewnątrzczaszkowo w miejsce wypływającego płynu mózgowo-rdzeniowego. Następnie wprowadza się całą końcówkę igły do zbiornika wielkiego. Podczas tego manewru konieczne jest ciągłe śledzenie końcówki igły przez błonę szczytowo-potyliczną przy użyciu mikroskopu operacyjnego, aby zapobiec uszkodzeniu mózdku lub rdzenia przedłużonego, gdyż to może skutkować natychmiastową śmiercią zwierzęcia. Następnie przy pomocy pompy mikroinfuzyjnej wstrzykuje się komórki do zbiornika wielkiego ($100\ 000$ komórek/ $10\ \mu\text{l}$, z prędkością $1\ \mu\text{l}/\text{min}$), a na pole operacyjne nakłada się kroplę soli fizjologicznej (ok. $100\ \mu\text{l}$), aby zwiększyć ciśnienie panujące na zewnątrz przestrzeni płynowych OUN myszy. Zapobiega to wypływowi komórek na zewnątrz podczas wycofywania igły (ryc. 10).

Po iniekcji igłę utrzymywano w miejscu przez 10 min. pozwalając komórkom na opuszczenie bezpośredniego sąsiedztwa miejsca nakłucia co dodatkowo chroni



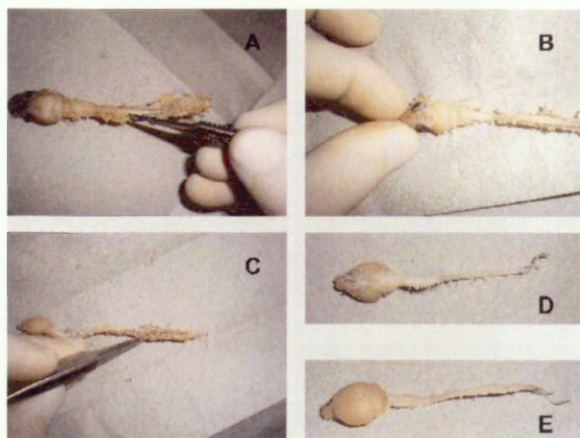
komórki przed wypływem wstecznym. Po wycofaniu igły pobierano próbkę z kropli soli fizjologicznej z pola operacyjnego w celu wykonania rozmazu pod kątem obecności wszczepianych komórek. Skórę zamykano

Ryc. 10 Kropla soli fizjologicznej nałożona na pole operacyjne, aby zapobiec wstecznemu wypływowi komórek

staplerem (3M, Neuss, Germany). Stwierdzono obecność ok. 1% wszczepianych komórek w ww. próbce, co oznacza minimalny wyciek wszczepionych komórek na zewnątrz.

W celu oceny dystrybucji komórek w obrębie OUN bezpośrednio po przeszczepie tą metodą 5 zwierząt zabito w ciągu doby od zabiegu. Z uwagi na podoponowy charakter podania komórek opracowano specjalny, autorski sposób preparowania całego OUN bez naruszania ciągłości opony twardej (ryc. 11).

Początkowo odcinano kończyny, klatkę piersiową i brzuch pozostawiając w całości kręgosłup i czaszkę. W następnym etapie kości chroniące układ nerwowy zostały pozbawione mięśni, ścięgien oraz tłuszczu. Dalsza część dysekcji odbywała się pod mikroskopem (Zeiss). Wykonywano nacięcie więzadła żółtego w odcinku lędźwiowym przy użyciu mikronożyczek, aby dostać się do wnętrza kanału kręgowego i uwidocznić ogon koński. Następnie przecinano nożyczkami łuki kręgów posuwając się w kierunku dogłowym i otwierano kanał kręgowy wyłamując obustronnie nasady i je usuwając wraz z pozostałymi częściami łuków (ryc 11A). Procedurę powtarzano do wysokości C2 uwidaczniając rdzeń kręgowy na całej długości. Kolumny kręgosłupa: przednią i środkową pozostawiano nienaruszone, aby spełniały funkcję podporową i ochronną podczas dalszej preparatyki. Następnie zdejmowano łuk tylny kręgu C1. Ze względu na silny przyczep błony szczytowo-potylicznej do niego procedura ta wymagała szczególnej precyzji. Podobna sytuacja miała miejsce podczas zdejmowania obramowania otworu wielkiego. Wówczas fragmentowano łuskę kości potylicznej i preparując od góry oddzielano oponę twardą tylnej jamy od



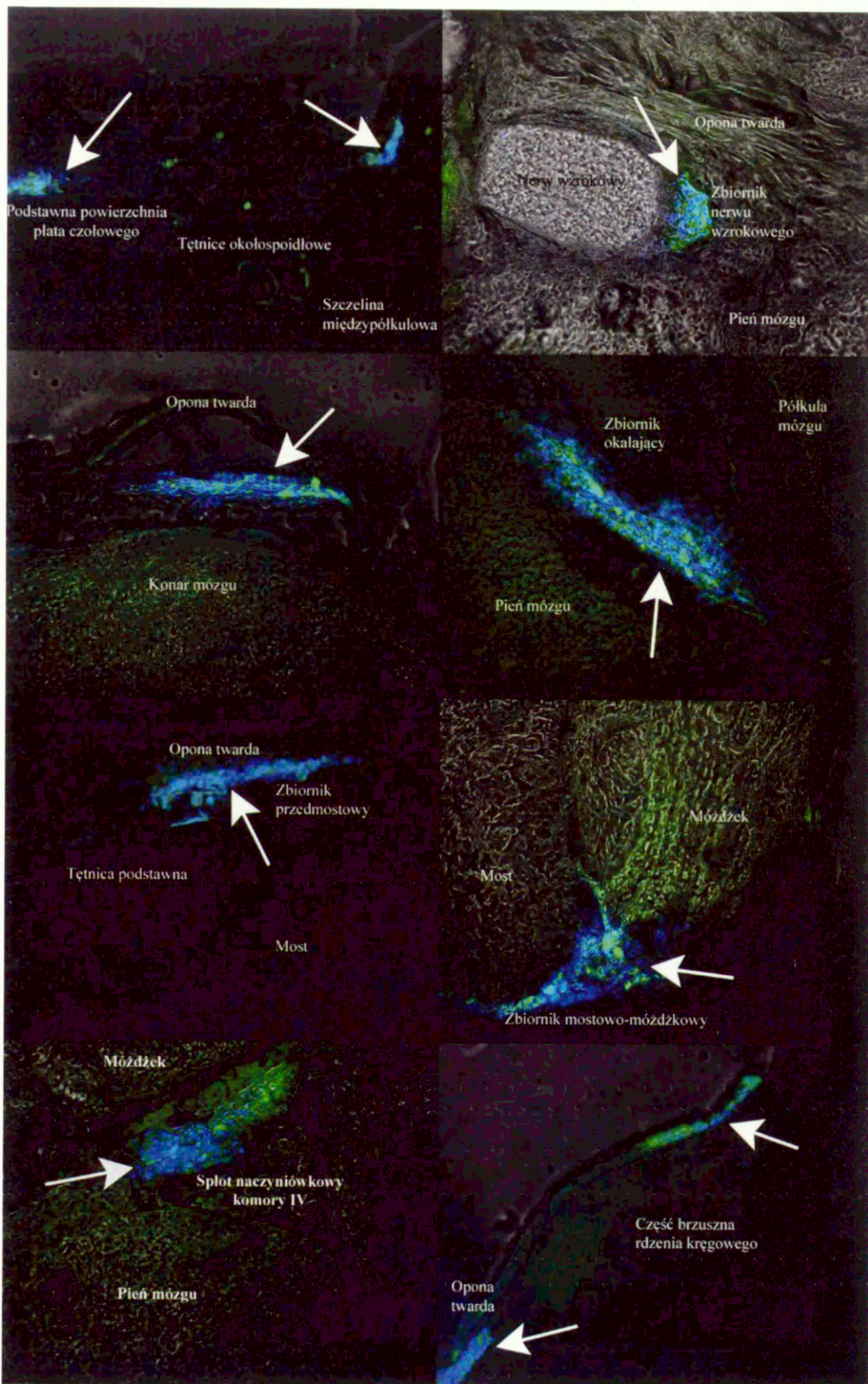
kości i schodząc ku dołowi każdy fragment osobno odpreparowywano od błony szczytowo-potylicznej. Następnie przystępowano do dysekcji podstawy czaszki od opony i mózgu. Ze względu na obecność nerwów czaszkowych oraz piramid kości skroniowych preparatyka w tej okolicy również charakteryzuje się dużym stopniem trudności. W następnym etapie kości sklepienia czaszki zostały

Ryc. 11 Kolejne etapy preparowania ośrodkowego układu nerwowego w całości, bez naruszania worka oponowego

oddzielone od opony i zdjęte, natomiast grzebień nosowy cały czas pełnił rolę sztywnego i pewnego uchwytu dla jednej ręki, podczas gdy druga mogła wykonywać dysekcję (ryc. 11B). W ostatnim etapie usunięto grzebień nosowy oraz oddzielono przednią i środkową kolumnę kręgosłupa od worka oponowego (ryc. 11C). Zarówno brzuszna jak i grzbietowa strona układu nerwowego zostały wypreparowane z nienaruszoną oponą twardą (ryc. 11D i E). Po krioprezerwacji rdzeń kręgowy został odcięty od mózgu, pocięty na kilka części i wraz z mózgiem zamrożony w -70°C. Po pokrojeniu na kriostacie skrawki zostały poddane analizie w mikroskopie fluorescencyjnym (Axiovert 135, Zeiss) pod kątem obecności wszczepionych komórek (ryc. 12). Ocena liczby komórek została przeprowadzona poprzez policzenie jąder wyznakowanych wcześniej znacznikiem Hoechst. Dokładny wynik nie zawsze mógł być uzyskany z powodu zachodzenia na siebie komórek znajdujących się w skupiskach w obrębie zbiorników pajęczynówki. Wówczas dokonywano aproksymacji liczby komórek na podstawie obszaru przez nie zajmowanego. Gęstość komórek w obrębie skupisk była porównywalna, a różnice w ich liczebnej dystrybucji w przestrzeni podpajęczynówkowej wynikały z obszaru zajmowanego przez skupiska. Największa liczba komórek została zdeponowana w zbiornikach kąta mostowo-mózdzkowego, zbiorniku podstawnym oraz okalającym i wynosiła po ok. 15-20 000 komórek/zbiornik licząc parzyste zbiorniki osobno. Mniejsza liczba komórek, bo ok. 10 000 została zlokalizowana wokół rdzenia kręgowego, w tym 90% w odcinku szyjnym, a 10% w piersiowym. Po ok. 5000 komórek znajdowało się w IV komorze, w zbiornikach przedrdzeniowym, przedmostowym i wielkim, a także w każdym z parzystych zbiorników wokół nerwów wzrokowych oraz nerwów węchowych. W zbiorniku blaszki czworaczej oraz w III komorze liczba komórek nie przekraczała 1000. Komórki nie były obecne na sklepiści mózgu oraz w komorach bocznych.

Podsumowując, ok. 90% podanych komórek została odzyskana w obszarach wyżej wymienionych. Nie stwierdzono znaczących różnic pomiędzy poszczególnymi zwierzętami.

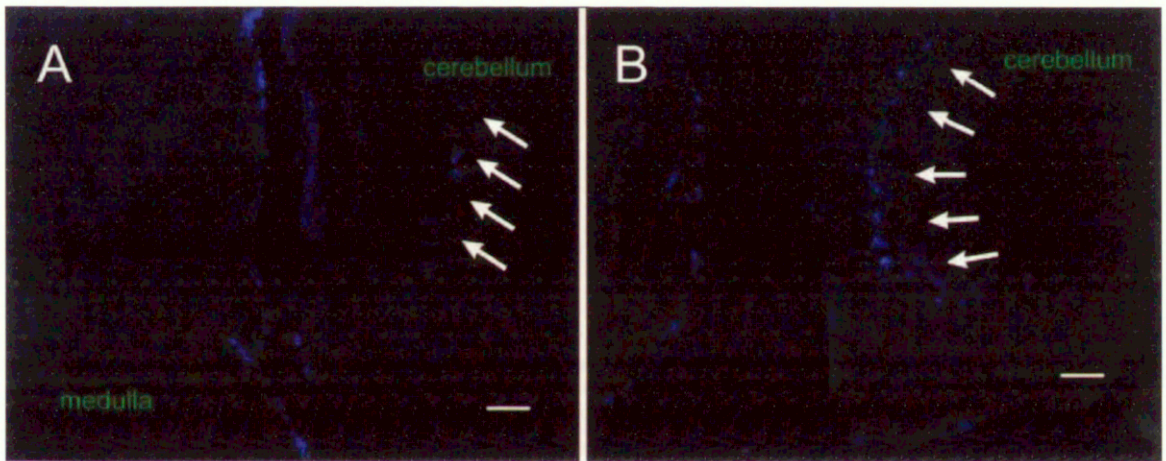
Opisana metoda została zastosowana do ponad 150 procedur neurotransplantacji w mysim modelu stwardnienia bocznego zanikowego (ALS) z użyciem różnych populacji komórek. Nie obserwowano powikłań związanych z procedurą. Stwierdzono śmierć 4 myszy w ciągu zerowej doby po operacji. Zdarzenie miało miejsce w ciągu dwóch kolejnych dni. Wszystkie nieżywe zwierzęta otrzymały



Ryc. 12 Lokalizacja komórek w poszczególnych kompartmentach przestrzeni podpajęczynówkowej. Podwójne znakowanie przeszczepianych komórek: na zielono (CMFDA) i niebiesko (Hoechst)

ten sam rodzaj komórek. W tych **samch** dniach przeszczepiano także inne rodzaje komórek i u zwierząt, które je otrzymały nie obserwowano żadnych niepokojących objawów. Tak więc należy uznać, że śmierć zwierząt była raczej związana z komórkami, czy ich przygotowaniem, a nie z techniką operacyjną. Uważam, że opisana metoda podania komórek do zbiornika wielkiego u myszy jest bezpieczna.

Po 10 dniach od transplantacji u myszy z ALS ponownie dokonano oceny obecności przeszczepionych komórek wewnątrzczaszkowo. Wówczas znaleziono tylko pojedyncze komórki w przestrzeni podpajęczynówkowej oraz warstwie komórek Purkiniego w mózdzku (ryc. 13).



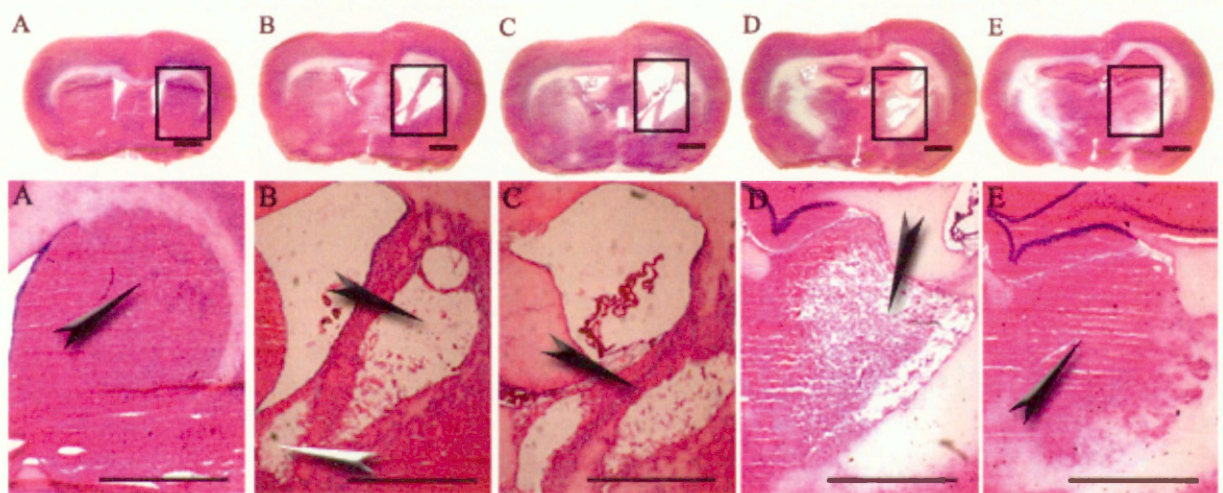
Ryc. 13 Po 10-ciu dniach od transplantacji nieliczne komórki znajdowano w przestrzeni podpajęczynówkowej i warstwie komórek Purkiniego w mózdzku (białe strzałki). Wszczepione komórki zabarwione są na niebiesko (Hoechst). Podziałka 200 μ m.

OPRACOWANIE MODELU USZKODZENIA MÓZGU Z ZASTOSOWANIEM OUABAINY

Analiza morfologiczna uszkodzenia mózgu

Eksperymentalnie ustalono dawkę (5 nmol) i miejsce podania ouabainy [koordynaty: A (0.0), L (3.0), V (5.0)] w celu uzyskania stosunkowo niewielkiego i powtarzalnego ogniskowego uszkodzenia mózgu, które dają zmiany funkcjonalne, wykrywalne w rutynowych testach behawioralnych (Janowski et al., 2008a). Morfologicznie uszkodzenie odpowiada udarowi mózgu z charakterystycznym powstaniem jamy poudarowej otoczonej tkanką bliznowatą, która nie wykazuje cech prawidłowej struktury mózgu (ryc. 14). W niektórych przypadkach występowały

przegrody łącznotkankowe w obrębie jam poudarowych. Incydentalnie stwierdzano łączność jam poudarowych z komorą boczną. Należy zwrócić uwagę na zwiększoną gęstość komórkową obserwowaną w obrębie przedniej części prążkowania, co było związane z towarzyszącym zmniejszeniem objętości tej struktury i następczym poszerzeniem tożstronnej komory bocznej. Takiego zjawiska nie obserwowano na bocznej, czy tylnej granicy lezji. Może to mieć związek z bezpośrednim sąsiedztwem przedniego prążkowania z przykomorową strefą neurogeną (SVZ). Nasilenie zmian organicznych w mózgu odpowiada zaproponowanemu przeze mnie podziałowi na 3 strefy (patrz strona 55). Został on także użyty do topograficznego opisu zakresu uszkodzenia zawartego w tabeli nr 4.

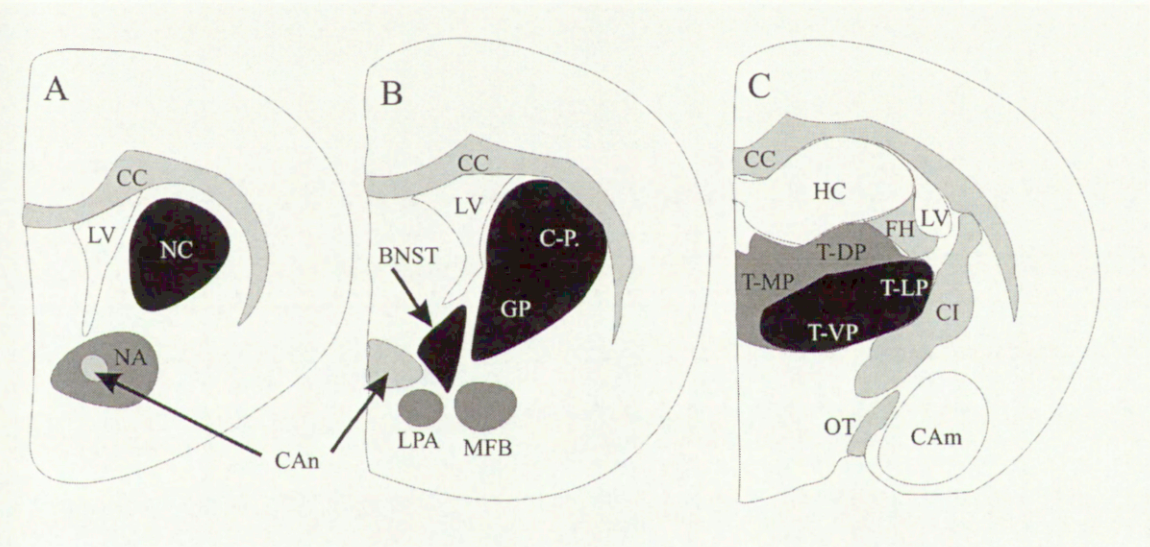


Ryc. 14 Zakres uszkodzenia mózgu szczura na kolejnych przekrojach wieńcowych od przodu ku tyłowi (barwienie H-E). Górny rząd przedstawia przekroje przez całe skrawki mózgu szczura, a dolny powiększenia obszarów objętych uszkodzeniem (strzałki) znajdujących się wewnątrz ramek górnego rzędu. A: Zwiększona gęstość komórkowa w przedniej części prążkowania (strzałka) oraz zmniejszenie objętości tego obszaru. B: Jamy poudarowe w obrębie prążkowania (czarna strzałka) oraz jądra łoża prążka krańcowego (biała strzałka) otoczone przez pas tkanek, które utraciły prawidłową strukturę mózgu. C: Jamy poudarowe obejmujące prążkowie, jądro łoża prążka krańcowego oraz torebkę wewnętrzną (strzałka). D: Duże uszkodzenie pod postacią znacznego zatarcia prawidłowej struktury mózgu w obrębie przednio-bocznej i przednio-środkowej części wzgórza (strzałka). E: Małe uszkodzenie pod postacią niewielkiego zaburzenia prawidłowej struktury mózgu w obrębie tylnio-środkowej części wzgórza. Podziałka 2 mm.

Pomiar wielkości oraz analiza topograficzna uszkodzenia mózgu

Średnia wielkość uszkodzenia wynosiła $28.6 \pm 4.1 \text{ mm}^3$ (współczynnik wariacji 14%), co stanowiło $1.4 \pm 0.2\%$ objętości całego mózgowia (współczynnik wariacji 13.4%). Topograficzna analiza pokazała objęcie uszkodzeniem głównie jąder podstawy, podstawnych jąder przedomózgowia, torebki wewnętrznej oraz wzgórza

(ryc. 15). Wśród jąder podstawy uszkodzenie zawsze stwierdzano w obrębie gałki bladej oraz obu części prążkowania (jądra ogoniastego i skorupy) oraz niekiedy obejmowało ono jądro półleżące. Spośród podstawnych jąder przodomózgowia udar zawsze zajmował jądro wielkokomórkowe podstawne (odpowiadające u ludzi jądra Meynerta) i jądro łoża prążka krańcowego. Uszkodzenie niekiedy sięgało pęczka przyśrodkowego przodomózgowia i pola przedwzrokowego bocznego. Natomiast ciało migdałowe zawsze pozostawało nienaruszone. Przednia część torebki wewnętrznej także wykazywała zmienioną strukturę. Dalej ku tyłowi uszkodzenie zajmowało przednią, brzuszną i boczną część wzgórza. Dokładny, topograficzny opis lezji u poszczególnych zwierząt włączonych do badania, z uwzględnieniem stref uszkodzenia, znajduje się w tabeli nr 4.



Ryc. 15 Schematyczny rysunek przedstawiający przekroje wieńcowe przez półkulę mózgu na wysokości przedniego prążkowania (A), tylnego prążkowania (B) i wzgórza (C). Struktury mózgu objęte zawsze uszkodzeniem zostały zaznaczone na czarno, natomiast struktury rzadko objęte uszkodzeniem są ciemnoszare. Na kolor jasnoszary została zaznaczona istota biała w celu ułatwienia orientacji topograficznej. Skróty: BNST – jądro łoża prążka krańcowego, Cam – ciało migdałowe, CAn – spoidło przednie, CC – ciało modzelowate, CI – torebka wewnętrzna, C-P – kompleks jądra ogoniastego i skorupy, FH – strzępki hipokampa, GP – gałka bladej, HC – hipokamp, LPA – pole przedwzrokowe boczne, LV – komora boczna, MFB – pęczek przyśrodkowy przodomózgowia, NA – jądro półleżące, NC – jądro ogoniaste, OT – pasmo wzrokowe, T-DP – grzbietowa część wzgórza, T-LP – boczna część wzgórza, T-MP – przyśrodkowa część wzgórza, i T-VP – brzuszna część wzgórza.

Tabela 4: Topograficzny opis lezji u poszczególnych zwierząt z uwzględnieniem stopnia uszkodzenia odpowiednich struktur mózgu, A – strefa całkowitego uszkodzenia, B – strefa dużego uszkodzenia, C – strefa małego uszkodzenia. Opis stref został zawarty w tekście na str 64.

Lokalizacja lezji		Numer szczura							
Region	Struktura anatomiczna	1	2	3	4	5	6	7	8
Kora mózgu	Przednio-grzbietowa		C						
	Przednio-boczna								
	Przednio-brzuszną								
	Tylno-grzbietowa								
	Tylno-boczna								
	Tylno-brzuszną								
Jądra podstawy	Głowa jądra ogoniastego	A	A	A	A	A	A	A	A
	Brzuszną część jądra ogoniastego	C	C	C		B		A	C
	Jądro półleżące			C		B	C		C
	Grzbietowa część gałki bladej	A	A	A	A	A	A	A	A
	Brzuszną część prążkowia			A			C		C
	Kompleks jądro ogoniaste-skorupa, górna część	A	A	C	C	C	C	A	A
	Kompleks jądro ogoniaste-skorupa, dolna część		C	C		C		A	C
Jądra przodomózgowia	Boczna część jądra łoża prążka krańcowego	A	A	A	A	A	A	C	A
	Grzbietowa część jądra łoża prążka krańcowego	A	A	A	A	A	A	C	A
	Brzuszną część jądra łoża prążka krańcowego	A							C
	Tylna część jądra łoża prążka krańcowego	A	A	A	A	A	A	C	A
	Jądro podstawne wielkokomórkowe	A	A	A	A	A	A	C	A
	Prążek krańcowy					C		C	
	Pęczek przodomózgowia przyśrodkowy					C			
	Pole przedwzrokowe boczne						C		

Istota biała	Torebka wewnętrzna	A	A	A	A	A	A	A	A
Wzgórze	Jądro przednio-grzbietowe	A		A	A	A			
	Jądro przednio-brzuszne	A	A	A	A	A	A	A	A
	Jądro siatkowate	A	A	A	A	A	A	A	A
	Jądro brzuszno-boczne	A	A	A	a	A	A	A	A
	Jądro brzuszno-przyśrodkowe	A	A	A	A	A	A	A	A
	Jądro przednio-przyśrodkowe	A	A	A	A	A	C	A	A
	Jądro przyśrodkowo-grzbietowe	A	A	B	B	A	C	A	B
	Jądro boczne	A	B	B	B	A	B	A	B
	Jądro tylnoprzyśrodkowe	A	B	B	B	A	B	A	B
	Jądro środkowoboczne	B	B	B	C	B	C	B	C
	Jądro bocznotylne	B	B	B		B	C	B	
	Jądro brzuszne tylnoboczne	B	B	B		B		B	
	Jądro galaretowate		C	C		C			
	Jądro okołosrodkowe		C						
	Jądro tylnoboczne		C						
	Jądro brzuszne tylnoprzyśrodkowe		C						
	Jądro tylne		C						
Inne	Jądro uzdeczki	B		B	B	A			
	Warstwa niepewna	B		B		C			

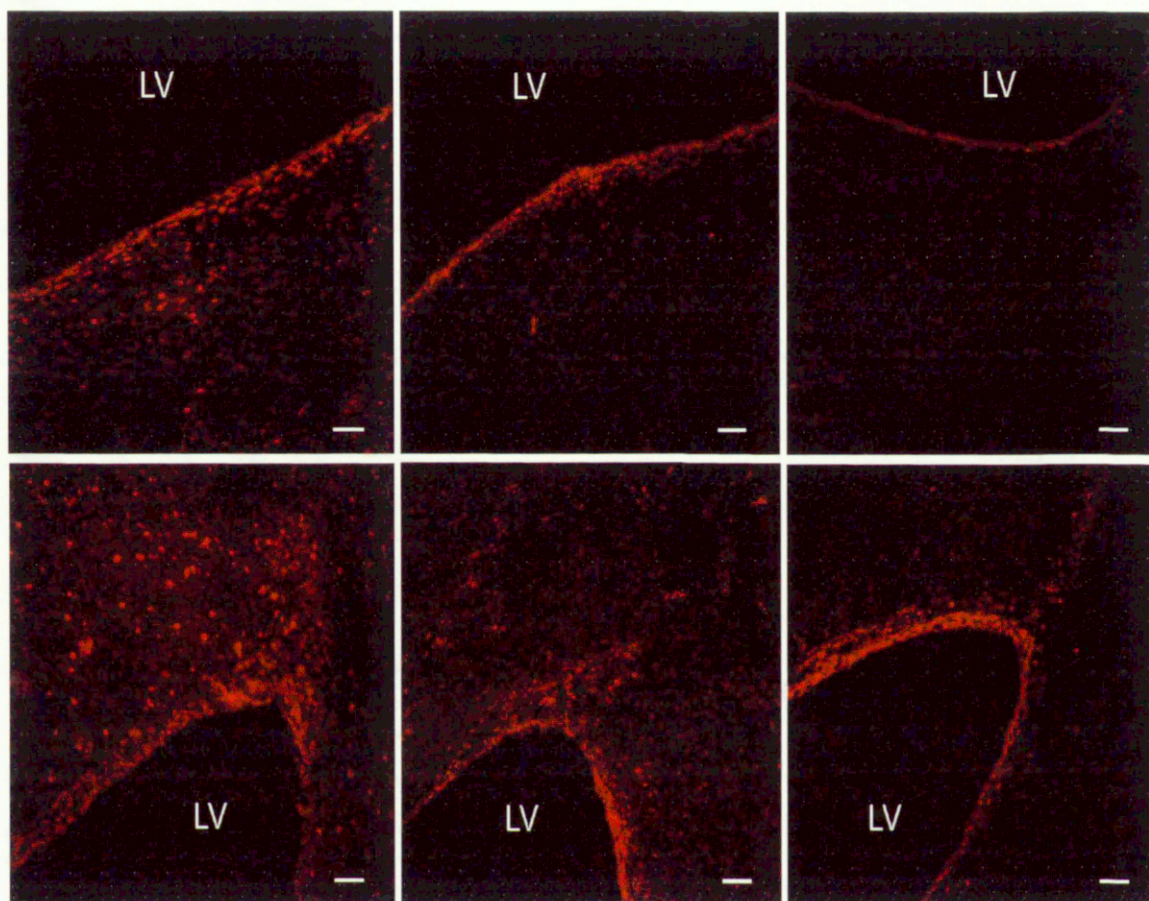
ANALIZA KOMÓRKOWYCH PROCESÓW NAPRAWCZYCH PO UDARZE MÓZGU ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ENDOGENNEJ NEUROGENEZY

Analiza immunohistochemiczna przeprowadzona miesiąc po uszkodzeniu mózgu wykazała obecność licznych komórek BrdU-pozytywnych w okolicy lezji oraz w strefie przykomorowej obu komór bocznych (z przewagą półkuli tożstronnej do lezji), w porównaniu z nieuszkodzonym mózgiem (ryc. 16).

**Półkula tożstronna
do uszkodzenia**

**Półkula przeciwstronna
do uszkodzenia**

**Półkula mózgu nie
poddanego uszkodzeniu**



Ryc. 16 W porównaniu z mózgiem nieuszkodzonego szczura udar mózgu nasilił powstawanie nowych komórek w strefie okołokomorowej obustronnie. Co więcej proces ten jest znacznie wyraźniejszy w uszkodzonej półkuli. U góry fragment ściany komory bocznej, u dołu strefa okołokomorowa. Kolor czerwony pokazuje barwienie przeciwciałem anti-BrdU. LV – komora boczna. Podziałka 50 μ m.

W celu poznania fenotypu nowopowstałych komórek dokonano oceny współwystępowania BrdU ze specyficznymi markerami. Stwierdzono kolokalizację BrdU z PSA-NCAM (neuroblasty), β -tubuliną III (młode neurony), GFAP (astrocyty, progenitory neuralne), NG2 (oligodendrocyty, progenitory neuralne) i ED1 (aktywowany mikoglej) (ryc. 17).

Większość komórek pozytywnych dla BrdU i PSA-NCAM znajdowała się w obrębie uszkodzenia przybierając nieregularny lub owalny kształt charakterystyczny dla migrujących neuroblastów. Stwierdzono także kolokalizację obu powyższych markerów w komórkach posiadających długie, cienkie wypustki (ryc. 17A). Może to świadczyć o dojrzewaniu i przeobrażaniu się migrujących neuroblastów w neurony. Szczególnie, że obserwowano współwystępowanie BrdU z β -tubuliną III (ryc. 17B) w

komórkach zlokalizowanych w obrębie lezji, a więc niektóre z nowopowstałych komórek mogą także przyjmować postać niedojrzałych neuronów. Komórki charakteryzujące się współwystępowaniem BrdU i NG2 wykazują dwa odmienne typy morfologiczne: dwubiegunowy, mogący odpowiadać progenitorom oligodendrocytów oraz gwiaździsty, bardziej wskazujący na różnicujące się oligodendrocyty (ryc. 17D). Komórek o powyższych wzorcach występowania markerów praktycznie nie stwierdzano w półkuli przeciwstronnej do uszkodzenia oraz w mózgu bez lezji w obrębie analogicznych struktur.

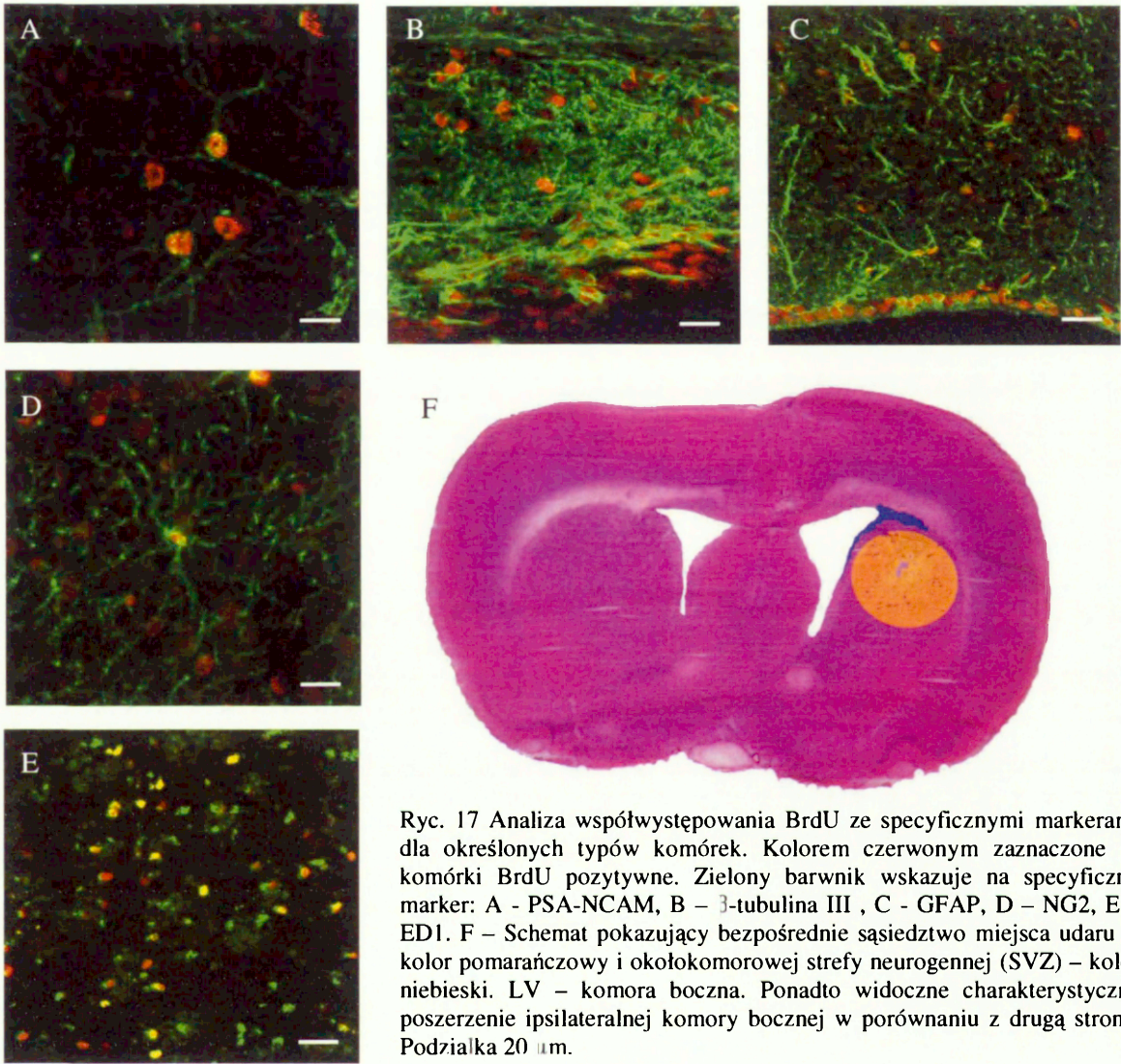
Poza komórkami pozytywnymi dla BrdU, które mogą być zaangażowane w procesy neurogenezy i mielinizacji obserwuje się znaczną ilość nowopowstałych komórek powiązanych z glezją (GFAP) oraz reakcją zapalną (ED1). Większość komórek pozytywnych dla BrdU i GFAP w obrębie lezji najpewniej odpowiada reaktywnemu rozplemowi astrogleju (ryc. 17C). Jednak obecność takich komórek w grzbietowo-bocznej części strefy okołokomorowej może świadczyć, że są one multipotencjalnymi progenitorami neuralnymi zdolnymi do wytworzenia zarówno makrogleju jak i neuronów.

Liczna populacja komórek pozytywnych zarówno dla BrdU jak i ED1 wskazuje na aktywny, przewlekły proces zapalny przebiegający w obrębie tkanek objętych udarem (ryc. 17E).

Podsumowując, podwójne barwienia wykazały, że nowopowstałe komórki nabywają cech fenotypowych charakterystycznych dla wszystkich elementów morfotycznych spotykanych w mózgu: makrogleju (GFAP, NG2), mikrogleju (ED1) oraz, co najbardziej interesujące również neuroblastów i młodych neuronów (PSA-NCAM, TUJ-1). Wzorec anatomicznej lokalizacji neuroblastów odpowiada ich migracji ze strefy okołokomorowej. Wskazuje na to ich wzmożona obecność w tej strefie oraz liczne występowanie w obszarze pomiędzy strefą okołokomorową i lezją, a także przewaga ich występowania w przyśrodkowo-grzbietowej części lezji, która znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie strefy okołokomorowej w porównaniu z przeciwną częścią lezji.

Tak aktywny proces neurogenezy w tym modelu udaru mózgu może wynikać z bezpośredniego sąsiedztwa ogniska uszkodzenia mózgu oraz okołokomorowej strefy neurogennej (ryc. 17F). Dodatkowo, relatywnie ograniczony obszar uszkodzenia

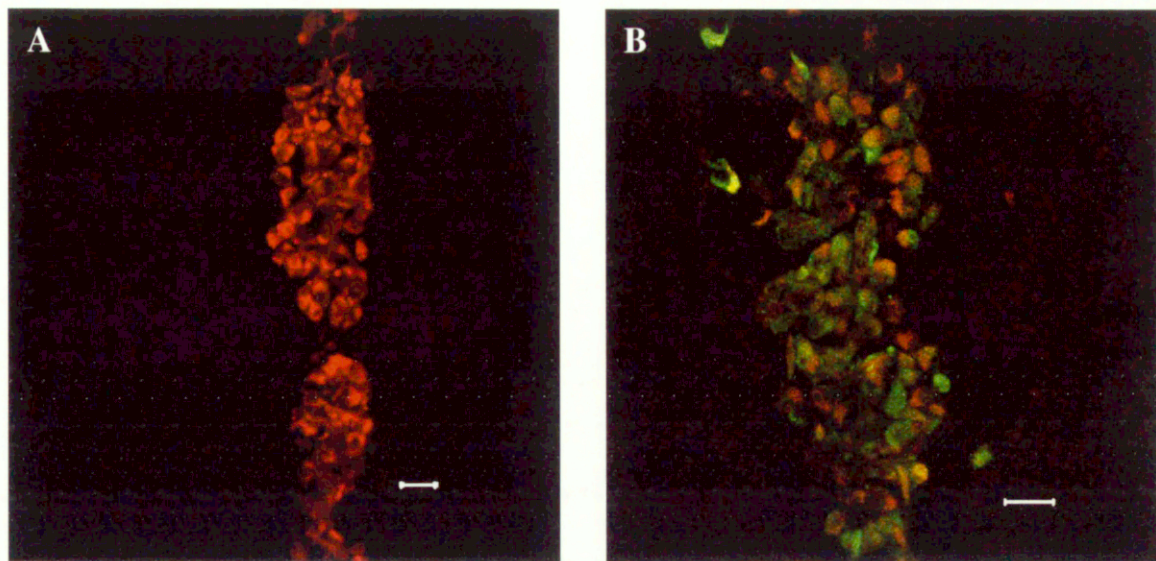
przebiegający bez cech półkulowego obrzęku mózgu powodującego znaczący efekt masy oraz ryzyko wklínowania i masywnej martwicy może sprzyjać występowaniu procesów naprawczych.



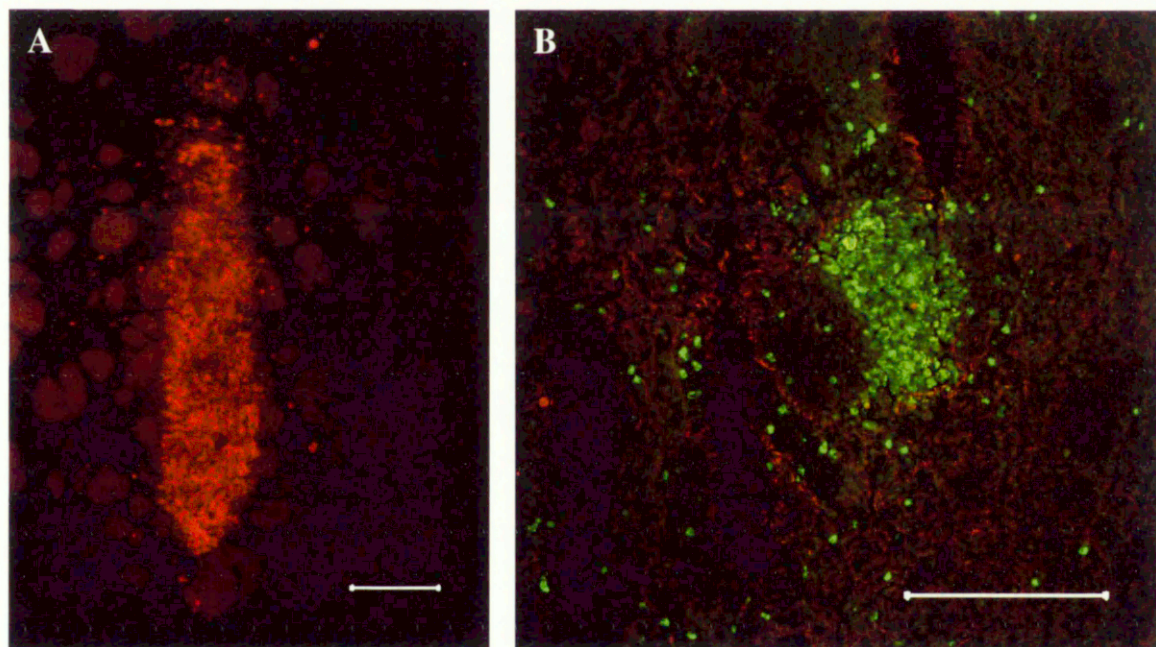
Ryc. 17 Analiza współwystępowania BrdU ze specyficznymi markerami dla określonych typów komórek. Kolorem czerwonym zaznaczone są komórki BrdU pozytywne. Zielony barwnik wskazuje na specyficzny marker: A - PSA-NCAM, B - ̢-tubulina III , C - GFAP, D - NG2, E - ED1. F - Schemat pokazujący bezpośrednie sąsiedztwo miejsca udaru - kolor pomarańczowy i okołokomorowej strefy neurogennej (SVZ) - kolor niebieski. LV - komora boczna. Ponadto widoczne charakterystyczne poszerzenie ipsilateralnej komory bocznej w porównaniu z drugą stroną. Podziałka 20 μ m.

TRANSPLANTACJA NEURALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (HUCB-NSC/NP) DO MÓZGU SZCZURA W EKSPERYMENTALNYM MODELU USZKODZENIA Z ZASTOSOWANIEM OUABAINY

Przeszczepienie komórek HUCB-NSC i HUCB-NP metodą bezpośredniego wstrzyknięcia skutecznie wprowadza komórki do mózgu. Zachowana morfologia przeszczepionych komórek świadczy, że dobrze one zniosły procedurę transplantacji (ryc. 18). Komórki wszczepione do nieuszkodzonego mózgu wykazują spontaniczną,



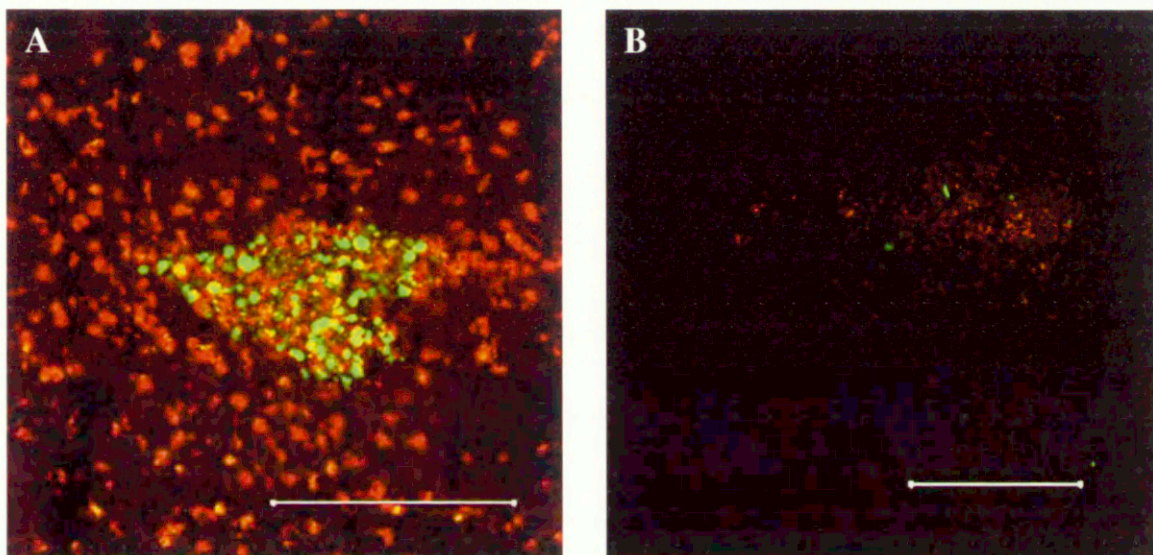
Ryc. 18 Depozyty komórkowe w prążkowie mózgu szczura bezpośrednio po przeszczepie. A – komórki wyznakowane czerwonym znacznikiem komórkowym, B – komórki wyznakowane zielonym znacznikiem komórkowym (CMFDA). Dodatkowo wykonano immunohistochemię przeciwciałem przeciw ludzkiemu antygenowi jądrowemu (NuMA, Chemicon) używając czerwonego koloru. Podziałka 20 μm .



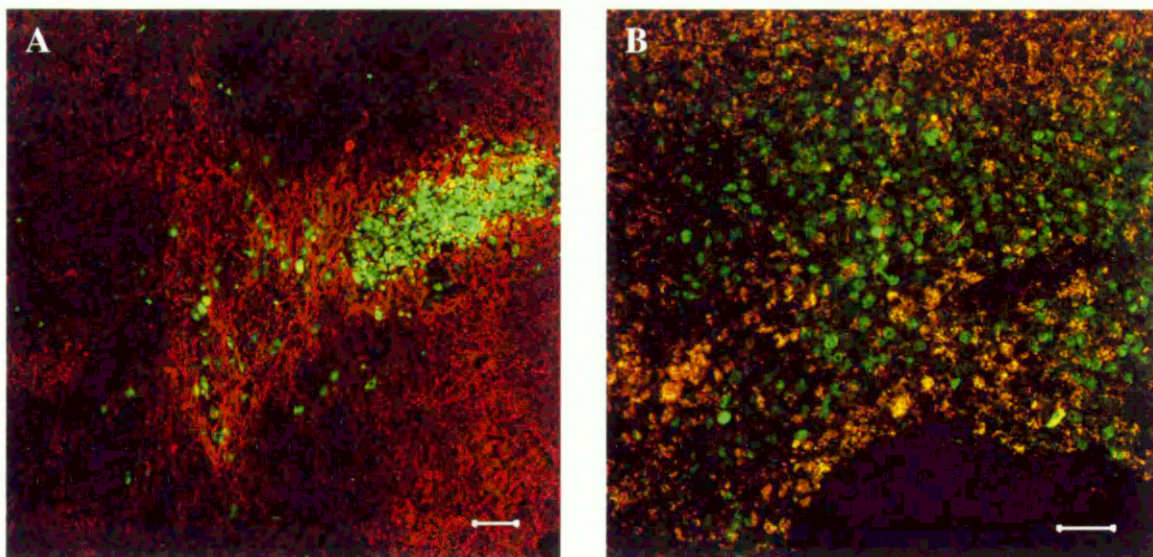
Ryc. 19 Promienista, spontaniczna migracja neuralnych komórek macierzystych HUCB-NSCs, z miejsca podania, w nieuszkodzonym mózgu po 3 dniach od transplantacji. A – wszczepione komórki wybarwione przeciwciałem przeciw ludzkiemu antygenowi zgodności tkankowej klasy I – HLA class I. B - przeszczepione komórki z wprowadzonym genem dla GFP zabarwione na zielono (wzmocnienie przy użyciu przeciwciał anti-GFP). Na czerwono zabarwione są neurony (NF 200). Podziałka 200 μm .

promienistą migrację w ciągu pierwszych dni po przeszczepie (ryc. 19). Równocześnie pojawia się i narasta okołotransplantacyjny naciek zapalny (makrofagi i mikroglej – komórki ED1 pozytywne) wokół przeszczepu (ryc. 20A). Prowadzi to po tygodniu do prawie całkowitego zniszczenia wszczepionych komórek w tkance nieuszkodzonego mózgu. (ryc. 20B).

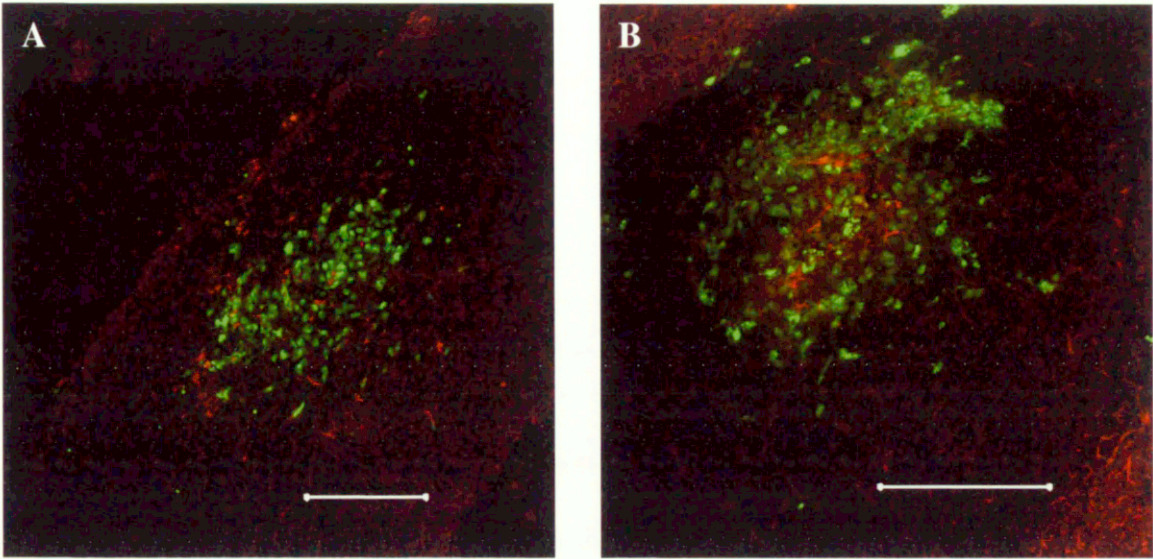
Przeszczep komórek HUCB-NSC do półkuli mózgu poddanej uszkodzeniu ukierunkowuje ich migrację w kierunku lezji oraz wyraźnie wydłuża czas ich przeżycia. Po tygodniu widoczne są zarówno w obrębie lezji jak i na jej granicy liczne wszczepione komórki macierzyste (ryc. 21). Także wstępny eksperyment z wykorzystaniem komórek HUCB-NP hodowanych w warunkach bezsurowiczych i z podaniem ich do istoty białej (ciało modelowate) wydłużył czas przeżycia przeszczepianych komórek oraz ograniczył znacznie naciek zapalny (ryc. 22).



Ryc. 20 Naciek zapalny wokół przeszczepu HUCB-NP. A – 3 dniowy przeszczep. B - Pojedyncze komórki, które przetrwały w nieuszkodzonym mózgu tydzień po transplantacji (zielony barwnik – CMFDA). Kolor czerwony wskazuje na obecność aktywowanego mikrogleju (komórki ED1 pozytywne). Podziałka 200 μ m.



Ryc. 21 Przeszczep komórek HUCB-NSC (zabarwionych na zielono) do półkuli mózgu po lezji ouabainowej. A - po 3 dniach od przeszczepu widoczna jest migracja komórek w kierunku lezji (kolor czerwony – NF200). B – po tygodniu widoczne są liczne komórki macierzyste w obrębie lezji i na jej granicy (kolor czerwony ED1). Zielony barwnik komórkowy - CMFDA. Podziałka 50 μ m.



Ryc. 22 Przeszczep do istoty białej (corpus callosum) komórek HUCB-NP hodowanych w warunkach bezsurowiczych. Na zielono zabarwione są przeszczepione komórki (CMFDA). Czerwonym barwnikiem wyznakowane zostały komórki aktywowanego mikrogleju - ED1 pozytywne (A) i astrocyty – GFAP pozytywne (B). Podziałka 200 μ m.

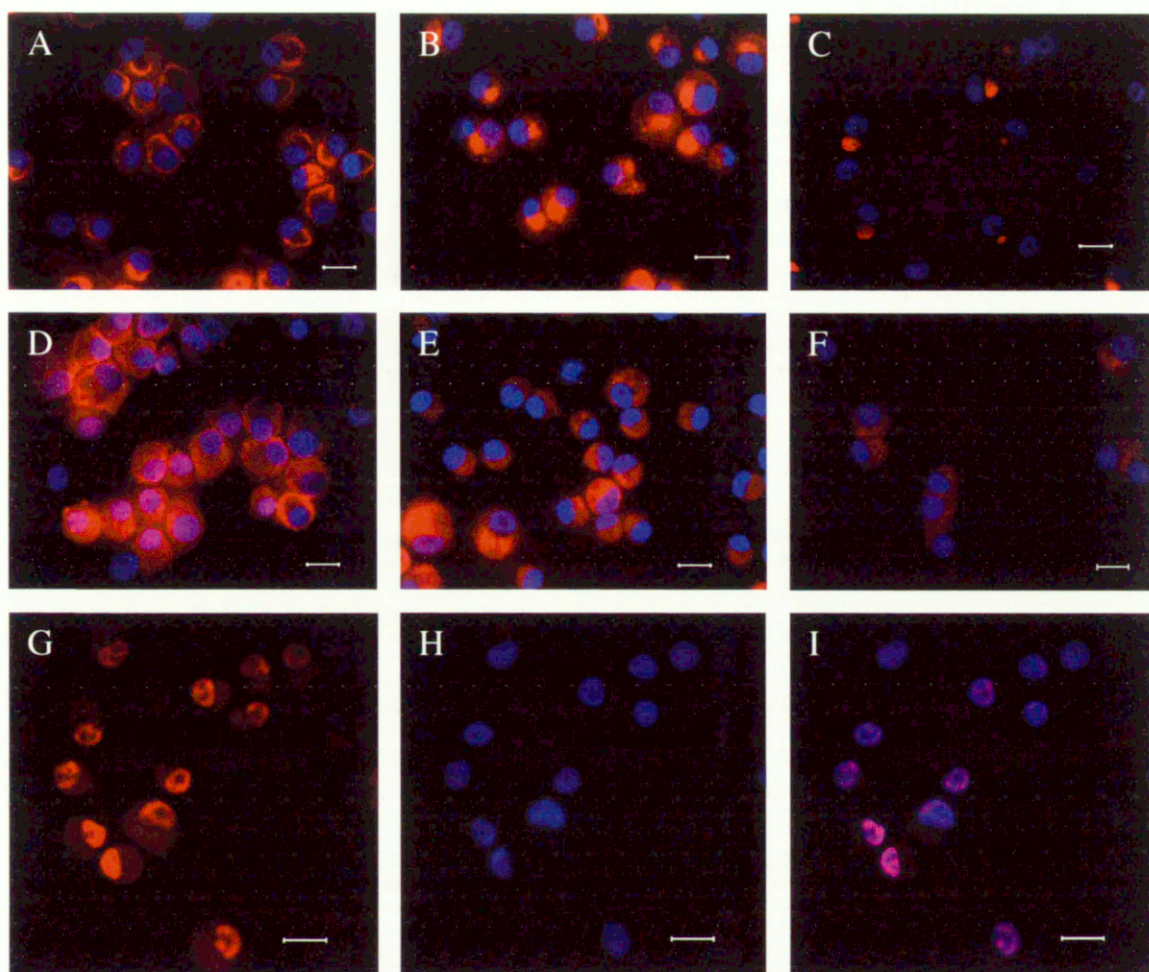
BADANIE CZYNNIKÓW ODDZIAŁUJĄCYCH NA MIGRACJĘ NEURALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (HUCB-NSC) *IN VITRO*

Badanie obecności receptorów i białek zaangażowanych w migrację komórek HUCB-NSC *in vitro*

Metodą barwień immunocytochemicznych wykazano ekspresję wybranych receptorów i białek biorących udział w procesie migracji komórek (tab. 5). Istnieją znaczące różnice lokalizacji subkomórkowej poszczególnych receptorów i białek w obrębie komórek HUCB-NSC przygotowanych do przeszczepu w pożywcze bezsurowiczej (ryc. 23).

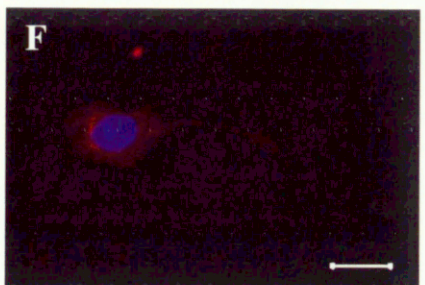
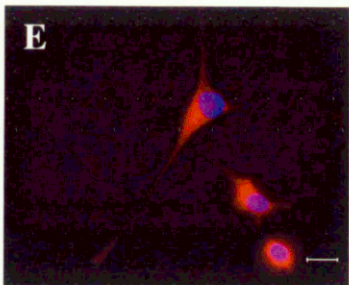
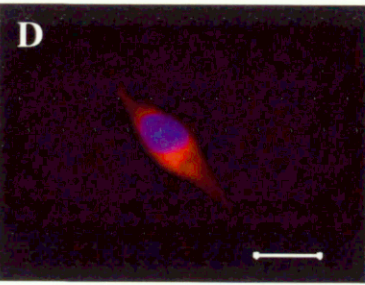
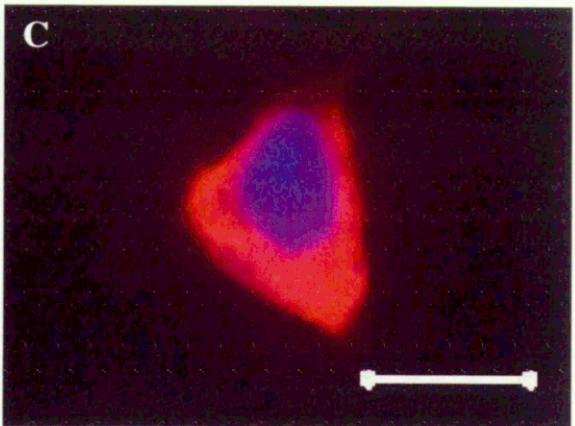
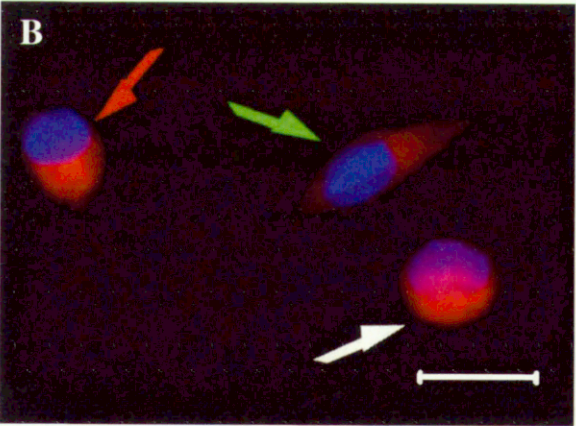
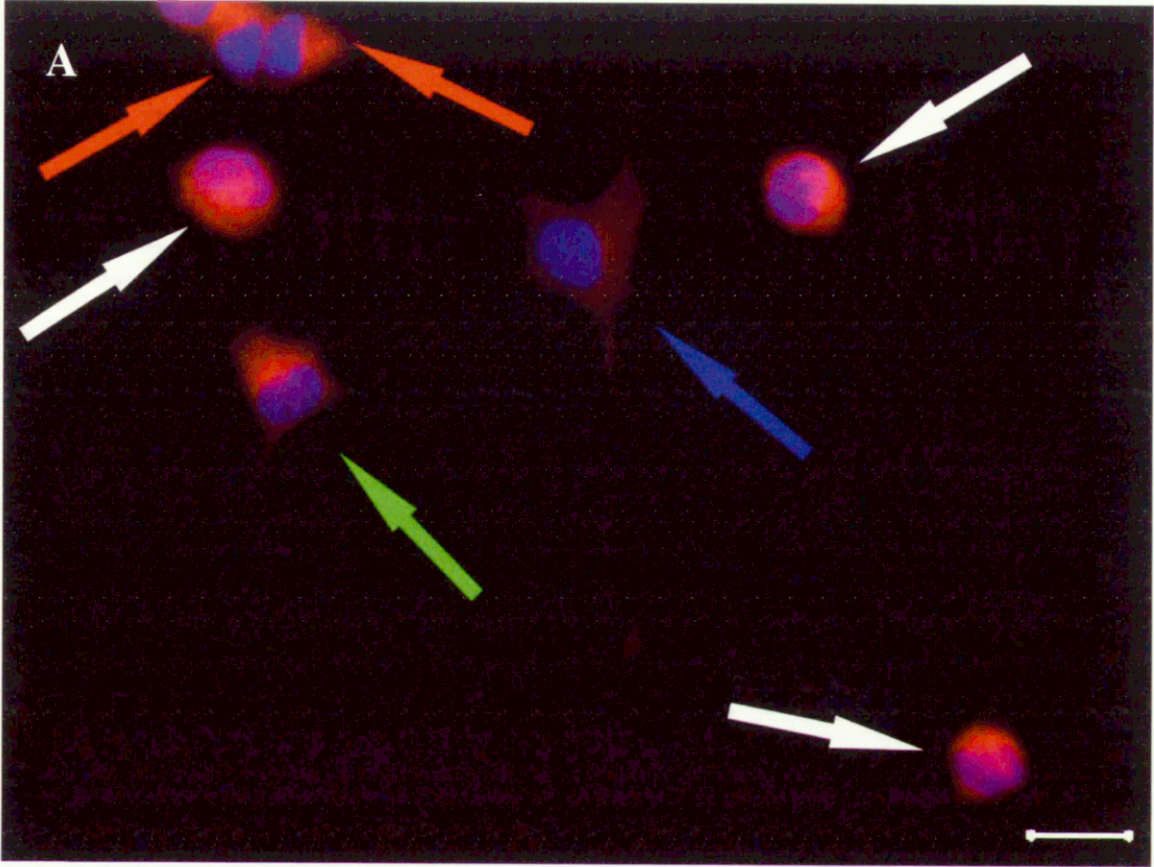
Tab. 5: Procentowy udział komórek HUCB-NSC wykazujących ekspresję wybranych białek i receptorów zaangażowanych w procesy migracji w stosunku do całkowitej liczby komórek.

Antygen	PDGFRA	PDGFRB	c-Met	PSA-NCAM	IGF-1R	Flk-1	CXCR4
Pozytywne komórki	88.6%	89.6%	91.3%	67%	71.2%	93.3%	89.3%

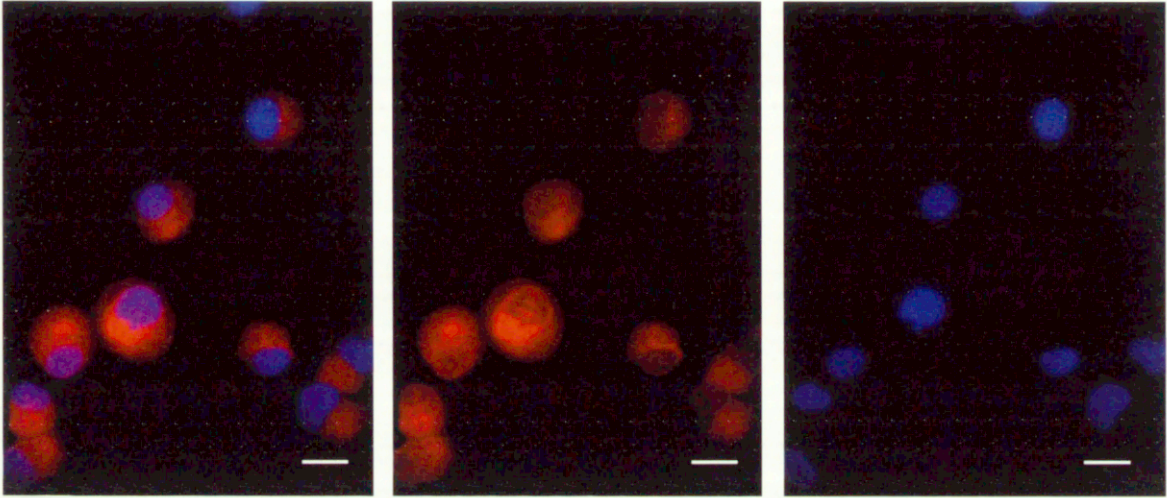


Ryc. 23 Lokalizacja wybranych receptorów i białek na komórkach HUCB-NSC: A – c-Met (receptor dla HGF), B – PDGFRB, C - PSA-NCAM, D – PDGFRA, E - Flk-1 (receptor dla VEGF), F – IGF-1. Ze względu na selektywnie jądrową lokalizację CXCR4 zamieszczono osobno barwienie na obecność receptora (G) oraz znakowanie jąder komórkowych (H). I – nałożenie obrazów G i H. Na niebiesko zabarwione są jądra komórkowe (Hoechst), a na czerwono poszczególne markery migracji. Podziałka 20 μ m.

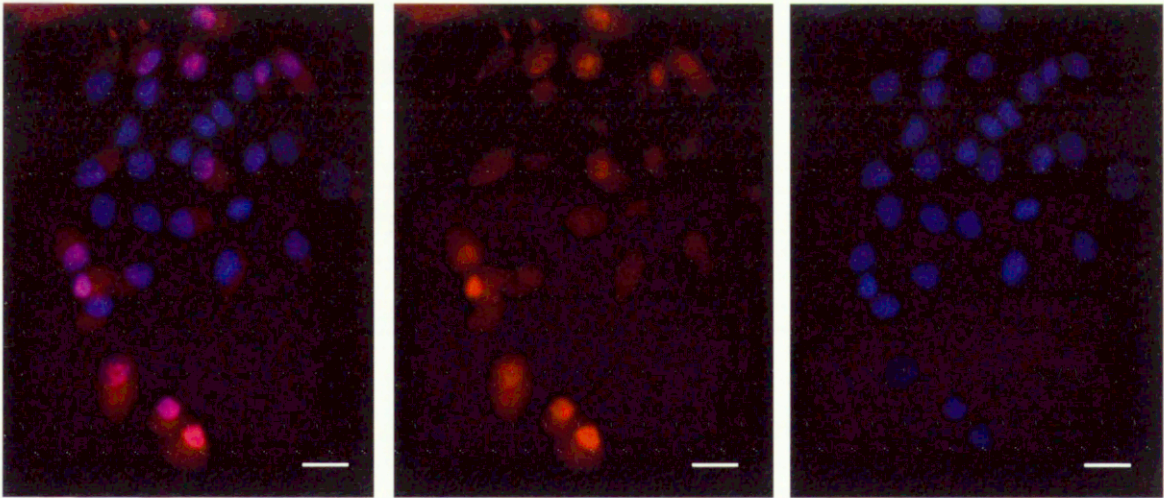
Komórki HUCB-NSC hodowane w ten sposób nie wykazują adhezji do podłoża i przyjmując kształt kulisty swobodnie pływają w toni pożywki. Część badanych receptorów i białek znajduje się w okolicy okołojądrowej (ryc. 23A, B, C) – najpewniej związana z retikulum endoplazmatycznym lub aparatem Golgiego. Wśród nich c-Met (receptor dla HGF) wykazuje błonowe usytuowanie, podczas gdy immunoreaktywność PDGFRB i PSA-NCAM charakteryzuje się bardziej skupionym wzorcem rozmieszczenia we wnętrzu komórki. Pozostałe receptory zlokalizowane są w różnych miejscach komórki: PDGFRA znajduje się głównie w błonie komórkowej, Flk-1 i IGF-1 wykazują raczej cytoplazmatyczny wzorec barwienia, natomiast CXCR4 dość niespodziewanie lokalizuje się selektywnie w obwodowej części jąder.



Ryc. 24 Translokacja receptora CXCR4 podczas procesu różnicowania się komórek HUCB-NSC. Działanie czynnika różnicowania (surowica) powoduje przemieszczanie się receptora z jądra do przestrzeni okołojądrowej w komórkach utrzymujących jeszcze kształt kulisty (A i B - białe strzałki). Komórki zmieniające kształt pod wpływem przylegania do podłoża z okrągłego na owalny lub nieregularny wykazują obecność CXCR4 już tylko poza jądrem (A i B - czerwone strzałki oraz C). W czasie tworzenia się wypustek receptor zaczyna się przemieszczać do ich wnętrza (A i B - zielone strzałki oraz D), aby je wypełnić (E). Natomiast w komórkach o wyglądzie bardziej zróżnicowanych, posiadających rozgałęziające się wypustki zanika ekspresja CXCR4 (A - niebieska strzałka oraz F). Czerwona barwa - CXCR4, niebieska - barwnik jądrowy Hoechst. Podziałka 20 μ m.



Ryc. 25 Cytoplazmatyczny wzorec barwienia receptora CXCR4 w warunkach stałej hodowli komórek HUCB-NSC w niskim stężeniu surowicy (2%) z dodatkiem ITS. Na niebiesko zabarwione są jądra (Hoechst), a na czerwono wyznakowano receptor CXCR4. Cytospin. Podziałka 20 μ m.



Ryc. 26 W miejscach zagęszczeń komórkowych w stałej hodowli HUCB-NSC w niskim stężeniu surowicy (2%) z dodatkiem ITS zaczyna się pojawiać jądrowy wzorec barwienia. Na niebiesko zabarwione są jądra (Hoechst), a na czerwono wyznakowano receptor CXCR4. Hodowla na płytkach 24-dołkowych. Podziałka 20 μ m.

Przyklejenie komórek HUCB-NSC do podłoża i rozpoczęcie procesu ich różnicowania przez dodanie surowicy do hodowli powoduje translokację wewnątrz komórki niektórych typów receptorów. Ten efekt jest szczególnie wyrażony w przypadku receptora CXCR4 (ryc. 24). Dochodzi do stopniowego przemieszczania

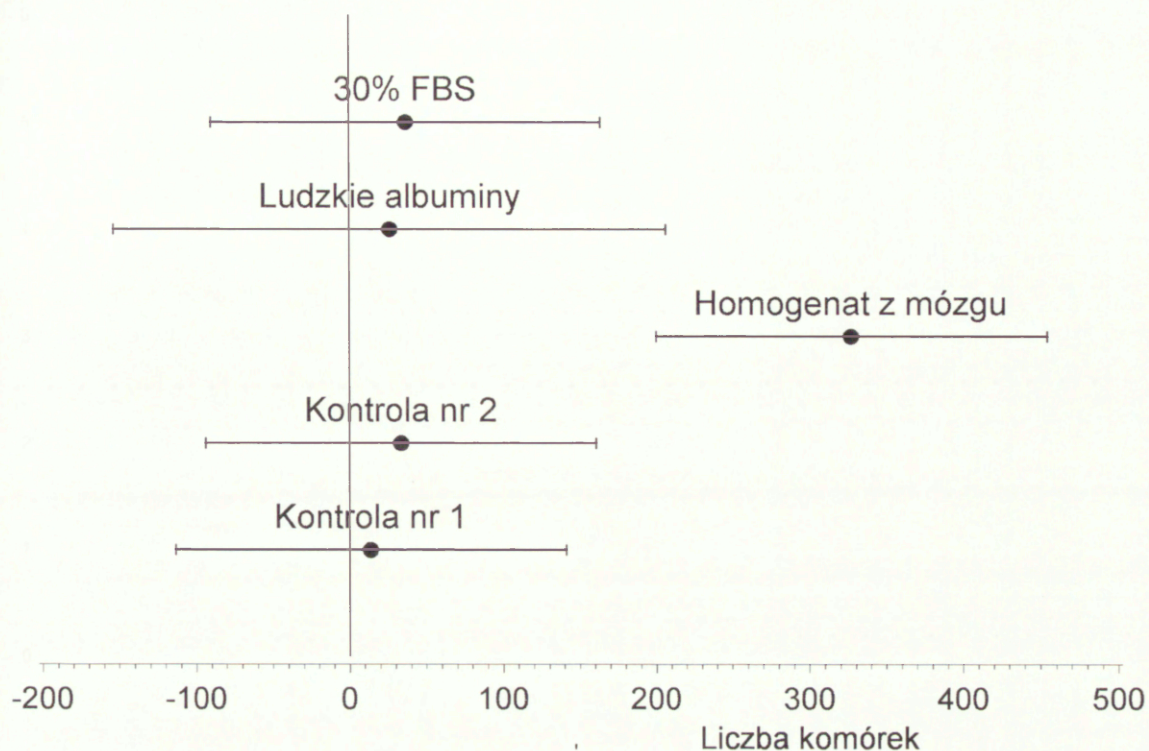
się receptora z jądra do przestrzeni okołojądrowej. Proces ten odbywa się w komórkach HUCB-NSC utrzymujących jeszcze kształt kulisty. Komórki zmieniające kształt pod wpływem przylegania do podłoża z okrągłego na owalny lub nieregularny wykazują obecność CXCR4 jedynie poza jądrem. Następnie obserwuje się jego przemieszczanie w kierunku tworzących się wypustek. Dalszy proces różnicowania prowadzi do stopniowego zmniejszania i zaniku ekspresji CXCR4 w komórkach HUCB-NSC. Natomiast w warunkach, w których jest utrzymywana ciągła hodowla linii neuralnych komórek macierzystych, tj. w niskim stężeniu surowicy z dodatkiem ITS głównie obserwuje się cytoplazmatyczny wzorec barwienia (ryc. 25). Jednak w miejscach zagęszczeń komórkowych zaczyna się pojawiać jądrowy wzorec barwienia (ryc. 26).

Badanie zdolności komórek HUCB-NSC do migracji *in vitro*

Eksperymenty zostały przeprowadzone na dwóch populacjach komórek: adherentnych i nieadherentnych pochodzących z tej samej linii komórkowej, HUCB-NSC. Zdolność do przylegania do podłoża tych komórek zależy od rodzaju pożywki użytej do hodowli. Komórki nieadherentne wykazują mniejszy stopień zróżnicowania niż komórki adherentne.

Migracja komórek nieadherentnych

W pierwszym eksperymencie zbadano migrację komórek HUCB-NSC w kierunku homogenatu z mózgu szczura zwracając szczególną uwagę na właściwe zaplanowanie kontroli. Kontrola nr 1 polegała na wprowadzeniu do dolnej komory tylko pożywki, która służyła do wykonania homogenatu z mózgu. W efekcie po żadnej ze stron błony porowatej nie znajdował się chemoatraktant. Natomiast w celu przygotowania kontroli nr 2 zarówno do komory dolnej jak i do komory górnej dodano taką samą ilość homogenatu z mózgu tak, że nie było gradientu stężeń pomiędzy obiema komorami. Ludzkie albuminy przygotowano tak, aby zawierały taką samą ilość białka, co homogenat z mózgu, aby wykluczyć chemoatrakcyjne właściwości samego białka, np. poprzez obniżanie napięcia powierzchniowego w dolnej komorze. W wielu publikacjach stwierdzono bardzo silne właściwości chemoatrakcyjne surowicy (30% FBS), chociaż głównie dotyczyło to jednak mezenchymalnych



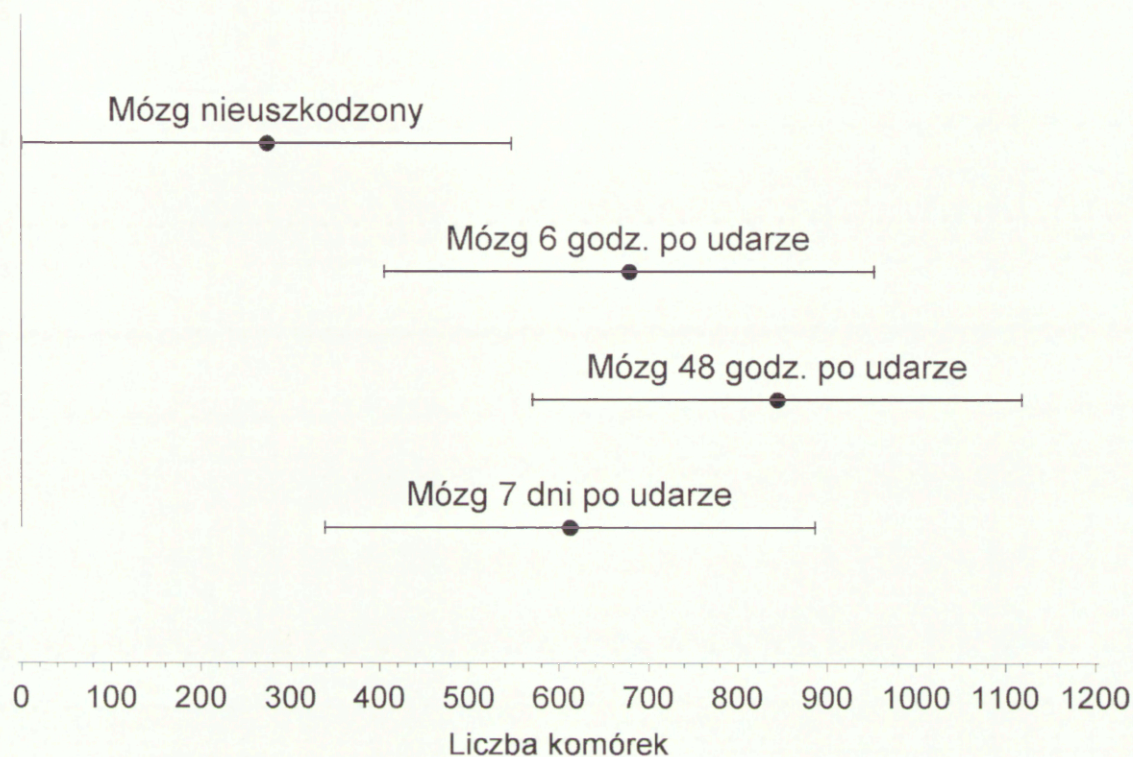
Ryc. 27 Homogenat pobrany z mózgu szczura powoduje statystycznie istotny wzrost migracji komórek HUCB-NSC w porównaniu z kontrolą nr 1, kontrolą nr 2, ludzkimi albuminami i surowicą. Czarne punkty oznaczają średnią, natomiast poziome linie przedziały ufności, $n=6$ (SAS, PROC MIXED, LMS, $p<0,05$).

komórek macierzystych. W związku z tym surowicę zastosowano pierwotnie jako kontrolę pozytywną.

Badanie wykazało statystycznie większą migrację HUCB-NSC w kierunku homogenatu z mózgu w porównaniu z pozostałymi kontrolami ($p<0,05$). Nie stwierdzono znaczących różnic w migracji pomiędzy poszczególnymi kontrolami włączając w to ludzkie albuminy i 30% FBS (ryc. 27).

Drugi eksperyment został zaplanowany w celu porównania zdolności do wzbudzania migracji komórek HUCB-NSC przez homogenat z mózgu objętego udarem w porównaniu z homogenatem z mózgu nieuszkodzonego. Badano także zależność od czasu jaki upłynął od wystąpienia udaru do pobrania mózgu. Badanie wykazało statystycznie większą migrację w kierunku homogenatu mózgu pozyskanego 6 godz. ($p=0,04$) i 48 godz. ($p=0,005$) po udarze w porównaniu z homogenatem z mózgu nieuszkodzonego. Największą migrację komórek HUCB-NSC powodował homogenat z tkanek mózgowych pozyskanych 48 godz. po udarze. Homogenat z mózgu pozyskanego w późniejszym okresie (7 dni) nie powodował już

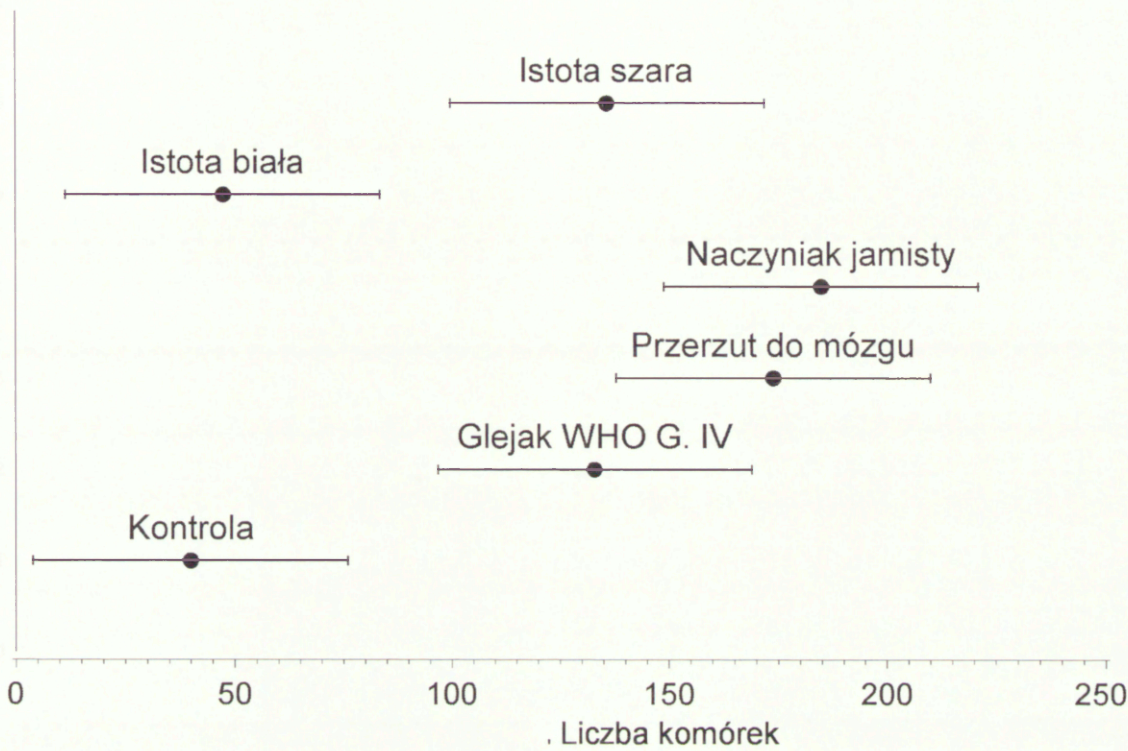
znacząco większej migracji w porównaniu z uzyskanym z mózgu nieuszkodzonego, chociaż wciąż obserwowano taką tendencję ($p=0,09$) (ryc. 28).



Ryc. 28 Migracja komórek HUCB-NSC w kierunku homogenatów z mózgów szczurów pozyskanych w określonej sekwencji czasowej po eksperymentalnym wywołaniu udaru mózgu, w porównaniu z mózgiem nieuszkodzonym. Czarne punkty oznaczają średnią, natomiast poziome linie przedziały ufności, $n=6$ (SAS, PROC MIXED, LMS, $p<0,05$).

W trzecim eksperymencie zdolność do wzbudzania migracji komórek HUCB-NSC przez homogenaty otrzymane z ludzkich tkanek pochodzących z morfologicznie prawidłowej części mózgu (tor dojścia do złośliwego glejaka mózgu) porównano ze złośliwymi zmianami nowotworowymi takimi jak glejak złośliwy (GBM), przerzut do mózgu oraz zmianą niezłośliwą – naczyniakiem jamistym. Wykazano, że homogenat z istoty białej nie ma właściwości chemotaktycznych w odniesieniu do HUCB-NSC, w odróżnieniu od istoty szarej ($p<0,006$). Nie wykazano znacząco większej migracji w kierunku homogenatu z tkanki złośliwego glejaka w porównaniu z homogenatem z istoty szarej. Największą zdolność do wywoływania migracji komórek HUCB-NSC stwierdzono w przypadku homogenatu z naczyniaka jamistego i guza przerzutowego do mózgu. Obydwa powyższe guzy charakteryzują się bardzo bogatym

unaczynieniem, co może wskazywać na silne właściwości chemoatrakcyjne czynników związanych z angiogenezą (ryc. 29).

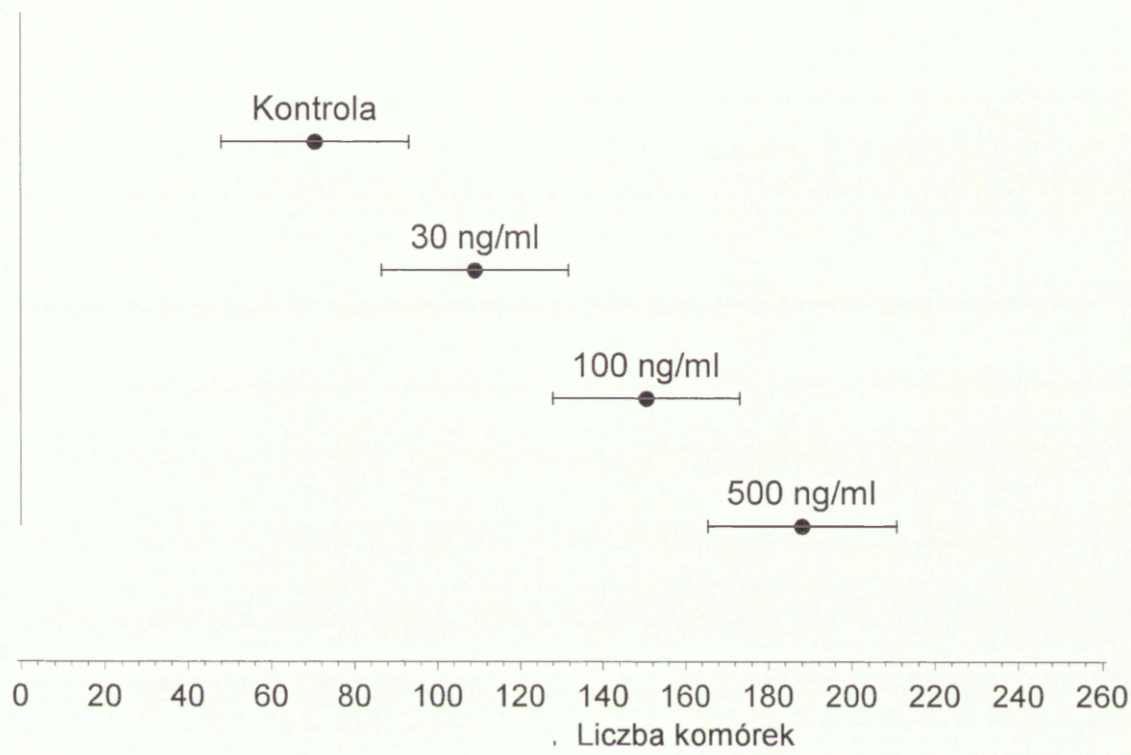


Ryc. 29 Migracja komórek HUCB-NSC w kierunku homogenatów z ludzkich tkanek. Czarne punkty oznaczają średnią, natomiast poziome linie przedziały ufności, n=6 (SAS, PROC MIXED, LMS, p<0,05).

W czwartym eksperymencie oceniono zdolność do wywoływania migracji komórek HUCB-NSC przez poszczególne ligandy, dla których receptory stwierdzono na badanych komórkach. W tym celu wybrano czynnik wzrostu IGF-1 oraz chemokinę SDF-1. Przeprowadzone badania wykazały, że zarówno IGF-1 jak i SDF-1 wywołują migrację komórek HUCB-NSC. W przypadku IGF-1 wykazano wyraźną zależność nasilenia migracji od dawki (ryc. 30). W eksperymentach z użyciem SDF-1 uzyskano większe rozrzuty wyników, a utrzymującą się maksymalnie migrację stwierdzono w dawce 10 ng/ml jak i 100 ng/ml (ryc. 31). Takie dawki SDF-1 plasują się w zakresie stężeń często używanych do badań migracji przez innych badaczy.

Podsumowując, stwierdzono migrację HUCB-NSC zarówno w kierunku homogenatów tkankowych jak i wybranych białek (SDF-1, IGF-1). Migracja w kierunku badanych białek jest znacząco niższa niż w kierunku homogenatów. Największą migrację stwierdzono w kierunku homogenatów z tkanki pobranej we wczesnym okresie, tj. 6 i 48 godz. po udarze. Odpowiada to wynikom uzyskanym w

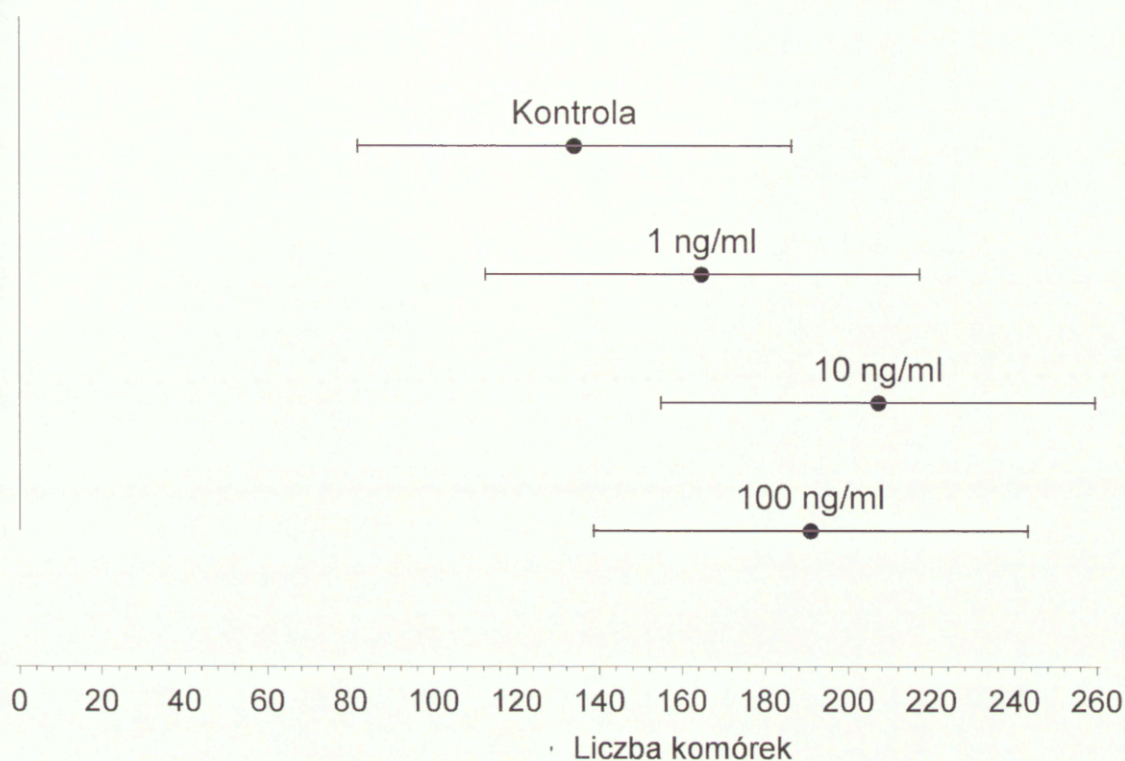
sytuacji *in vivo*. Stosunkowo mniejsza migracja w kierunku oczyszczonych białek w porównaniu z homogenatami może wskazywać na wieloczynnikowy mechanizm aktywacji migracji.



Ryc. 30 Migracja nieadherentnych komórek HUCB-NSC w kierunku IGF-1. Czarne punkty oznaczają średnią, natomiast poziome linie przedziały ufności, n=6 (SAS, PROC MIXED, LMS, $p<0,05$).

Migracja komórek adherentnych

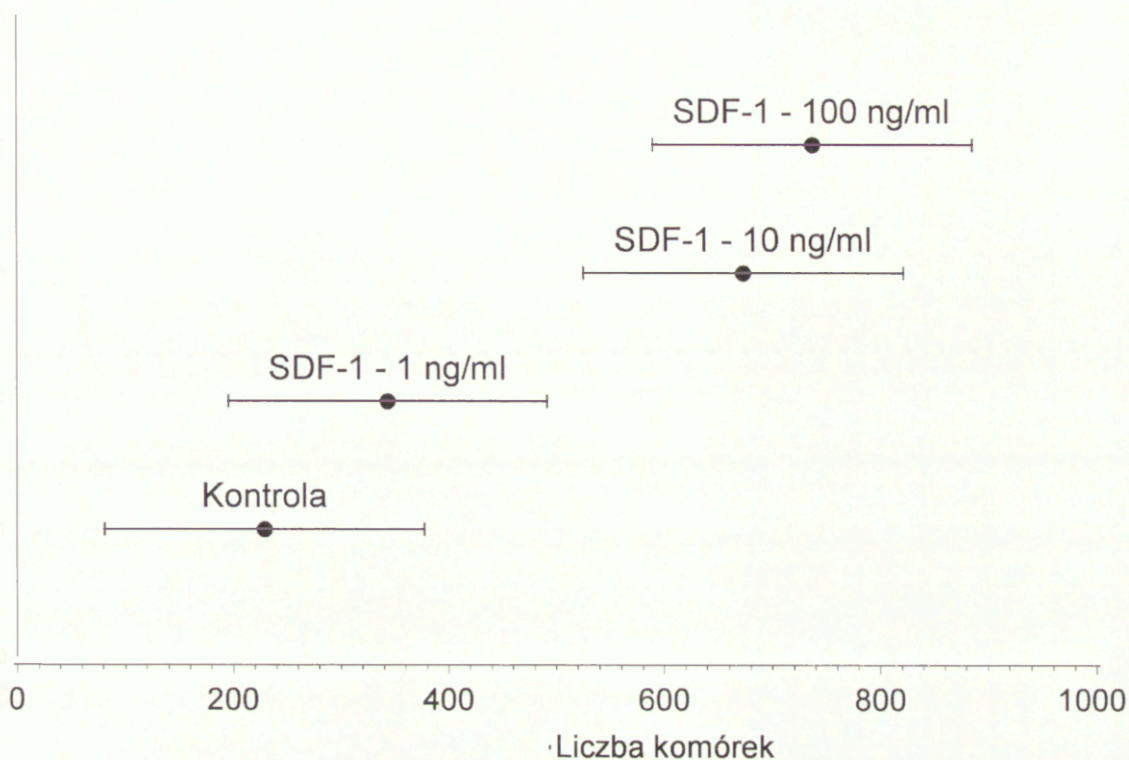
Eksperymenty z zastosowaniem komórek HUCB-NSC nieadherentnych (takich jak przygotowywanych do transplantacji) wykazały zdolność ich migracji w kierunku określonych chemoatraktantów. Pomimo, że uzyskano statystycznie istotne wyniki, to stwierdzono względnie niską zdolność tych komórek do migracji. Jednak komórki podczas całego eksperymentu znajdują się w płynie, co nie odzwierciedla sytuacji *in vivo*, kiedy komórki są transplantowane do stałej tkanki. Takiej sytuacji bardziej odpowiadają eksperymenty z komórkami przylegającymi do podłoża. Dodatkowo komórki adherentne odpowiadają na obecność macierzy zewnątrzkomórkowej jako aktywatora migracji.



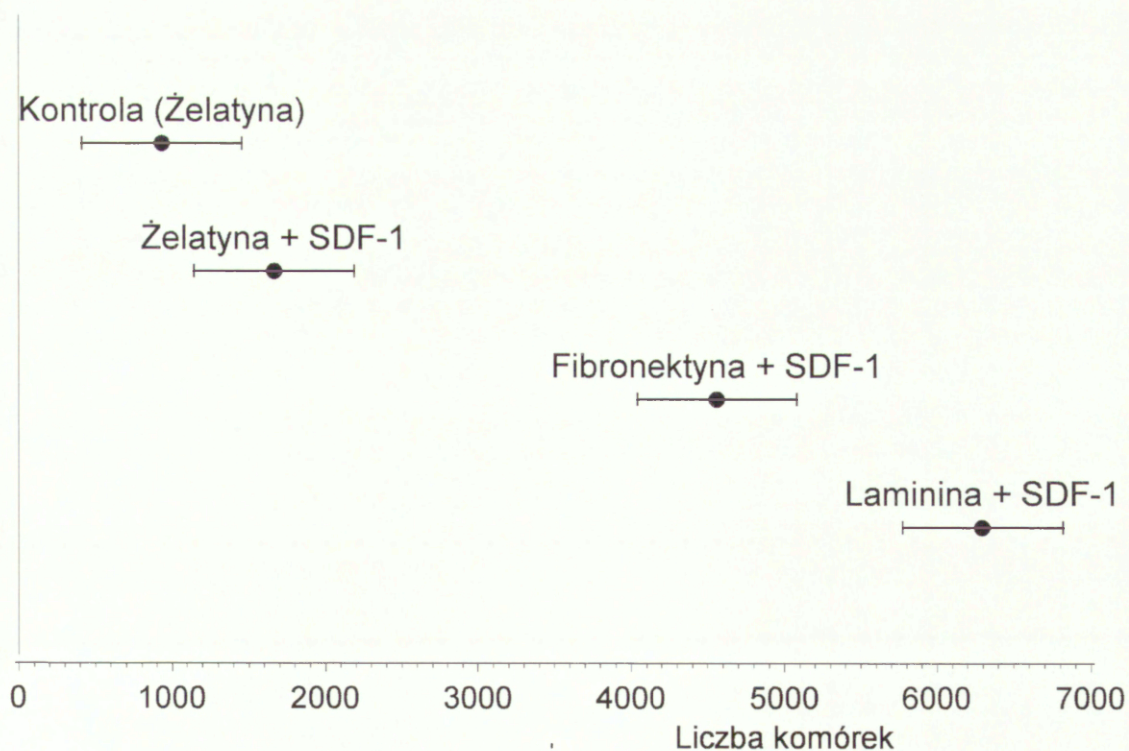
Ryc. 31 Migracja nieadherentnych komórek HUCB-NSC w kierunku SDF-1. Czarne punkty oznaczają średnią, natomiast poziome linie przedziały ufności, $n=6$ (SAS, PROC MIXED, LMS, $p<0,05$).

W pierwszym eksperymencie porównano wpływ różnych stężeń SDF-1 na migrację komórek HUCB-NSC stosując jako macierz zewnątrzkomórkową 0,5% żelatynę. Podobnie jak w przypadku komórek pływających uzyskano statystyczny wzrost migracji w kierunku wyższych stężeń SDF-1 (10 i 100ng). Należy jednak zwrócić uwagę, że komórki HUCB-NSC adherentne migrują znacząco szybciej aniżeli nieadherentne. Ma to odniesienie zarówno do kontroli jak i próbek eksperymentalnych (ryc. 32).

W drugim eksperymencie porównano wpływ różnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej na migrację komórek HUCB-NSC w kierunku SDF-1 w dawce 10 ng/ml. Badanie wykazało zależność nasilenia migracji tych komórek od użycia poszczególnych białek macierzy zewnątrzkomórkowej. Migracja komórek HUCB-NSC w kierunku SDF-1 była znacząco największa, jeżeli błona porowata była pokryta lamininą ($p<0,001$). Pokrycie błony fibronektyną powodowało, że migracja w kierunku SDF-1 była mniejsza ($p<0,001$). Jednak zdecydowanie najmniejszą migrację komórek HUCB-NSC obserwowano w przypadku zastosowania żelatyny (ryc. 33).

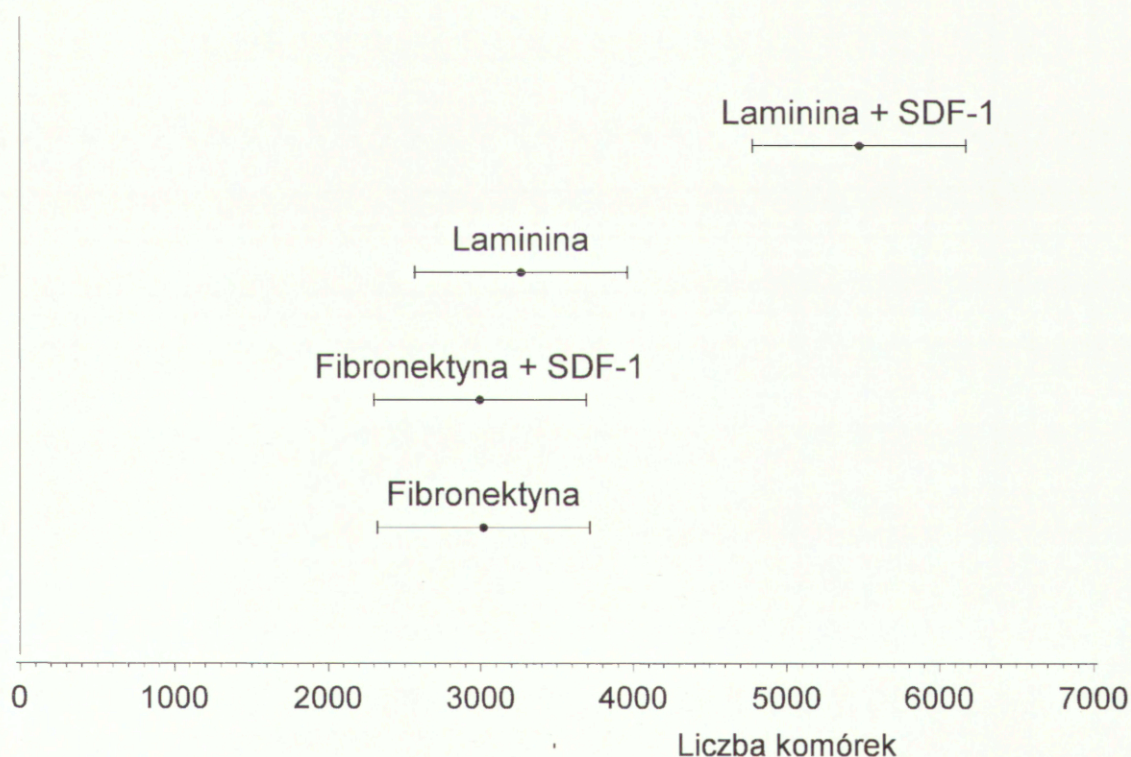


Ryc. 32 Migracja adherentnych komórek HUCB-NSC w kierunku SDF-1. Czarne punkty oznaczają średnią, natomiast poziome linie przedziały ufności, $n=6$ (SAS, PROC MIXED, LMS, $p<0,05$).



Ryc. 33 Migracja adherentnych komórek HUCB-NSC w kierunku SDF-1 (10 ng/ml). Czarne punkty oznaczają średnią, natomiast poziome linie przedziały ufności, $n=6$ (SAS, PROC MIXED, LMS, $p<0,05$).

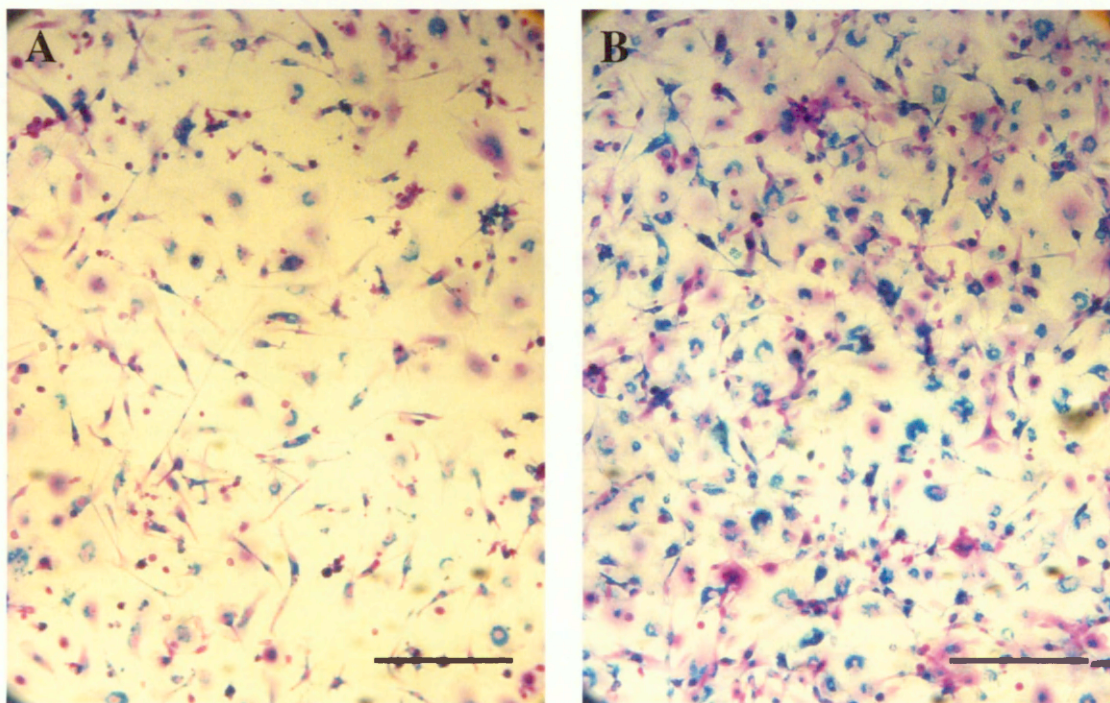
W trzecim eksperymencie porównano migrację komórek HUCB-NSC w kierunku SDF-1 oraz pożywki kontrolnej używając do pokrycia błony odpowiadających sobie macierzy zewnątrzkomórkowych w grupie kontrolnej i eksperymentalnej. W badaniu stwierdzono zwiększenie migracji tych komórek w kierunku SDF-1, jeżeli zastosowano lamininę do pokrycia błony porowatej, podczas gdy nie stwierdzono takiego efektu, jeżeli w miejsce lamininy zastosowano fibronektynę. Jednak najbardziej zwraca uwagę bardzo duża migracja komórek HUCB-NSC przez błonę okrytą macierzą zewnątrzkomórkową w sytuacji braku chemoatraktanta (ryc. 34). To świadczy o bardzo dużej roli haptotaksji, czyli roli białek macierzy zewnątrzkomórkowej w procesie migracji komórek. Może się okazać, że w procesie migracji komórek indukowanej udarem ważniejszą rolę odgrywa rearanżacja macierzy zewnątrzkomórkowej, aniżeli udział rozpuszczalnych molekuł.



Ryc. 34 Migracja adherentnych komórek HUCB-NSC w kierunku SDF-1 (10 ng/ml) w przypadku pokrycia błony porowatej lamininą lub fibronektyną. Czarne punkty oznaczają średnią, natomiast poziome linie przedziały ufności, n=6 (SAS, PROC MIXED, LMS, $p<0,05$).

OBRAZOWANIE NEURALNYCH KOMÓREK PROGENITOROWYCH Z KRWI PĘPOWINOWEJ METODĄ REZONANSU MAGNETYCZNEGO

Wykazano, że HUCB-NP można przyżyciowo wyznakować tlenkiem żelaza. Zastosowana procedura charakteryzuje się wysoką wydajnością pod względem liczby wyznakowanych komórek (82%, 89%, 93% całej populacji, po odpowiednio 24, 48, 72 godz. inkubacji) i nie wpływa na ich przeżywalność (94%, 91%, 90% żywych komórek po odpowiednio 24, 48, 72 godz. inkubacji). Stwierdzono zależność intensywności wyznakowania tym znacznikiem od czasu inkubacji komórek HUCB-NP w zawieszynie żelaza. Potwierdzono to cytochemicznie (ryc. 35) oraz w

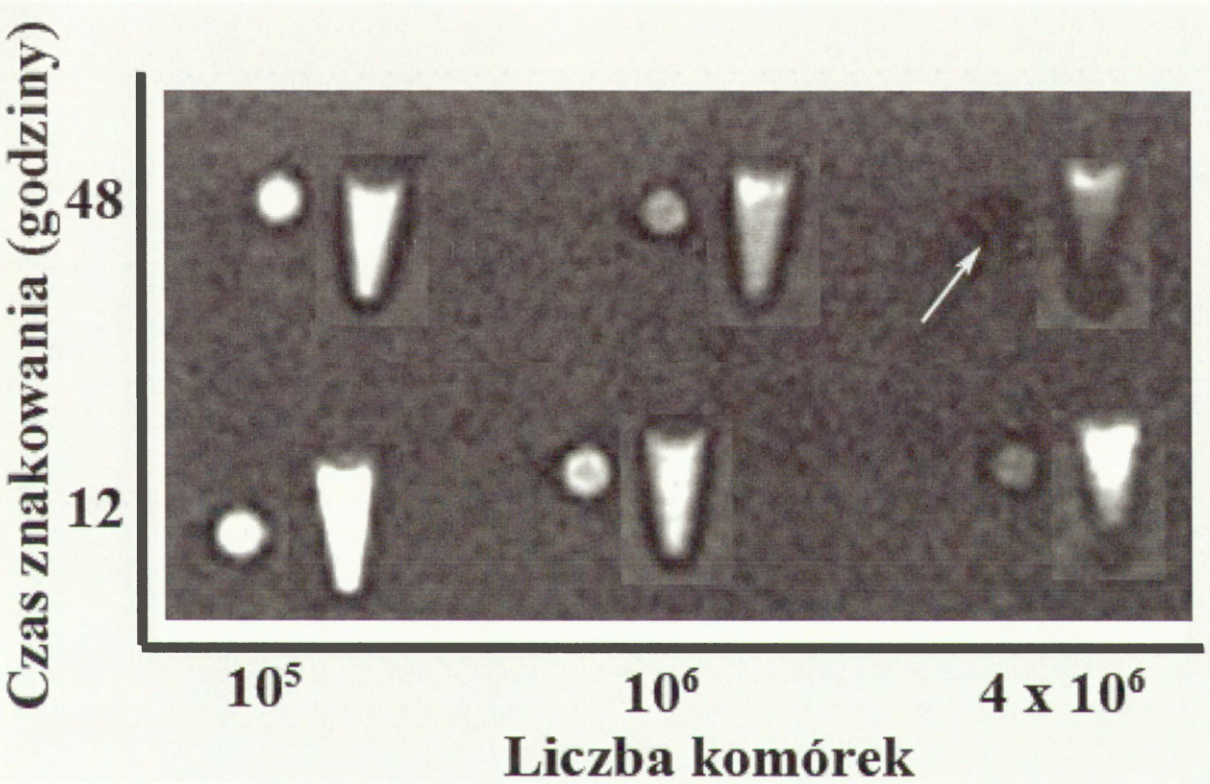


Ryc. 35 Zależność intensywności wyznakowania komórek HUCB-NP żelazem od czasu inkubacji komórek w preparacie Endorem: A 12h, B 48h. Barwienie metodą Perla. Podziałka 100 μm .

obrazowaniu przy użyciu rezonansu magnetycznego na fantomie *in vitro* (ryc. 36). Wyznaczono czas inkubacji konieczny do optymalnego znakowania oraz najmniejszą liczbę komórek niezbędną do otrzymania sygnału przy pomocy posiadanego sprzętu. Wyraźny sygnał w rezonansie magnetycznym uzyskano w wyniku obrazowania komórek o gęstości 4×10^6 komórek/ml znakowanych przez 48 godz. znacznikiem SPIO. Inkubacja tej samej gęstości komórek HUCB-NP, ale tylko przez okres 12 godz. lub obrazowanie zawiesiny o mniejszej gęstości komórek (10^6) dawało słabszy sygnał w MRI. Mniejsza liczba komórek HUCB-NP lub krótszy czas ich znakowania

powodowały brak możliwości detekcji komórek w dostępnym klinicznym aparacie rezonansu magnetycznego (1,5 T).

Przeprowadzone badania *in vitro* posłużyły do wykorzystania opracowanej metody znakowania komórek HUCB-NP cząsteczkami SPIO do wykonania pierwszej próby klinicznej terapii komórkowej uszkodzonego mózgu.



Ryc. 36: Możliwości detekcji komórek HUCB-NP metodą rezonansu magnetycznego umieszczonych w fantomie w zależności od liczby komórek oraz długości inkubacji w preparacie Endorem.

DYSKUSJA

POTRZEBA ROZWOJU NOWYCH PROCEDUR BADAWCZYCH W DZIEDZINIE NEUROTRANSPLANTACJI

Od czasu pierwszych neurotransplantacji fragmentów mózgów płodowych w leczeniu choroby Parkinsona obserwuje się narastanie liczby publikacji ukierunkowanych na naprawę lub odtwarzanie struktury i funkcji OUN. Ostatnie odkrycia w dziedzinie komórek macierzystych znacząco przyspieszyły ten proces. Badaniami objęto wiele innych chorób neurologicznych, m.in. chorobę Huntingtona, udar mózgu, urazy mózgu i rdzenia, stwardnienie boczne zanikowe i inne (Delcroix i wsp., 2009; Hess i Borlongan, 2008; Paczkowska i wsp., 2009; Shihabuddin i Aubert, 2010). Poszerzenie zakresu wskazań do terapii komórkowej wymaga rozwoju nowych procedur badawczych.

Podanie komórek do zbiornika wielkiego w mysim modelu ALS

Jedną z chorób, która przyciągnęła szczególną uwagę badaczy z dziedziny neurotransplantacji jest ALS. Ma to związek z niepomyślnym rokowaniem (Gil i wsp., 2009) oraz brakiem jakichkolwiek skutecznych metod leczenia poza postępowaniem paliatywnym (Sathasivam, 2009). Ostatnie randomizowane próby kliniczne z zastosowaniem leków będących substancjami chemicznymi także nie przyniosły przełomu (Kaufmann i wsp., 2009; Piepers i wsp., 2009). W tej sytuacji każda alternatywna propozycja terapii spotyka się z zainteresowaniem zarówno pacjentów, jak i podmiotów finansujących badania naukowe.

Wykazano nieznaczny, pozytywny wpływ zarówno systemowej (Chen i Ende, 2000; Ende i wsp., 2000; Garbuzova-Davis i wsp., 2003) jak i miejscowej, dordzeniowej terapii komórkowej (Willing i wsp., 2001) w mysim modelu ALS. Ze względu na charakterystykę tego schorzenia (brak przerwania bariery krew-mózg oraz rozsiany proces patologiczny) można było uznać obydwie powyższe drogi aplikacji komórek za suboptymalne. W związku z tym przetestowano alternatywną drogę podania komórek – do płynu mózgowo-rdzeniowego w powyższym modelu tej choroby. Już wcześniej wykazano jednak w otwartej próbie klinicznej, że

transplantacja komórek autologicznych metodą nakłucia lędźwiowego nie jest skuteczna (Janson i wsp., 2001). W związku z tym wybrano bardziej proksymalne miejsce podania w odniesieniu do krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego. Ponieważ podanie dokomorowe wymagałoby nakłucia mózgu wybrano mniej inwazyjną drogę dostarczenia komórek do OUN przez zbiornik wielki. W literaturze nie istniał dokładny opis tej procedury, a wykonanie jej według dotychczas opublikowanej instrukcji (Vogelweid i Kier, 1988) powodowało masywny wsteczny wypływ komórek obserwowany także przez innych autorów (Ohta i wsp., 2004). W związku z tym odpowiadając na zapotrzebowanie badawcze opracowałem procedurę podania komórek do zbiornika wielkiego u myszy (Janowski i wsp., 2008b). Jej skuteczność została potwierdzona we wczesnym okresie po transplantacji dzięki opracowanej przeze mnie metodzie dysekcji całego OUN wraz z nieuszkodzoną oponą twardą. Wykazano dobrą penetrację komórek do przestrzeni płynowych OUN. Po transplantacji komórki znajdowały się na całej podstawie mózgu począwszy od okolicy nerwów węchowych po zbiorniki kątów mostowo-mózdkowych i zbiornik przedrdzeniowy, a także w komorze IV oraz wokół rdzenia kręgowego, szczególnie w odcinku szyjnym. Jednak dalsza obserwacja losu przeszczepu nie wykazała długotrwałego przeżycia komórek w tej lokalizacji i tylko pojedyncze komórki zostały znalezione po 10 dniach w warstwie komórek Purkiniego w mózdku (Habisch i wsp., 2007). Nie wykazano także pozytywnego wpływu na przebieg choroby. W badaniach uwzględniono zarówno szybkość postępowania deficytów neurologicznych jak i okres przeżycia zwierząt.

Ostatnio ukazała się praca, w której także nie wykazano efektu pojedynczej iniekcji komórek do płynu mózgowo-rdzeniowego w mysim modelu, podczas gdy wielokrotne powtarzanie procedury wpłynęło pozytywnie na przebieg choroby (Zhang i wsp., 2009a). Kliniczna aplikacja allogenicznych, hematopoetycznych komórek macierzystych u pacjentów po ablacji szpiku napromienieniem nie wydłużyła czasu przeżycia (Appel i wsp., 2008). Natomiast wczesna ocena transplantacji autologicznych, hematopoetycznych komórek macierzystych bezpośrednio do rdzenia przedłużonego u chorych z opuszkową postacią ALS przyniosła zachęcające wyniki (Deda i wsp., 2009).

Wcześniejsze doniesienia na temat losu komórek przeszczepionych do zbiornika wielkiego u szczura dotyczyły chorób przebiegających z nagłym początkiem i masywną martwicą, np. udaru mózgu (Zhang i wsp., 2003) i urazów: mózgu (Hu i

wsp., 2004) i rdzenia kręgowego (Wu i wsp., 2002). W obu przypadkach wykazano obecność autologicznych komórek w obrębie lezji w terminie odległym, jednak nie można było ocenić obecności komórek w przestrzeni podpajęczynówkowej ze względu na brak zachowania ciągłości opony twardej podczas preparatyki OUN.

Z uwagi na dynamiczny rozwój inżynierii genetycznej powstaje coraz więcej transgenicznych modeli chorób OUN. A ponieważ gatunkiem najczęściej używanym do manipulacji genetycznych jest mysz (Rosenfeld i wsp., 1988; Westphal, 1991), to opracowanie technik operacyjnych w celu chirurgicznego leczenia modelowanych chorób wydaje się być szczególnie użyteczne. Początkowo opracowano transgeniczne modele chorób neurologicznych powstałych na bazie mutacji punktowych, m.in. choroba Lesch-Nyhana (Williamson i wsp., 1992), chorób prionowych, m.in. choroba Gertsmana-Strausslera-Scheinkera (Hsiao i Prusiner, 1991) oraz mutacji dynamicznych, m.in. choroba Huntingtona (Mangiarini i wsp., 1996). Ostatnio rozpoczęto wprowadzanie wielu transgenów w celu bardziej precyzyjnego odtwarzania pozostałych chorób neurologicznych, m.in. choroby Alzheimera (Vale i wsp., 2009) i choroby Parkinsona (Yasuda i wsp., 2009). Modele transgeniczne wykorzystuje się do testowania terapii komórkowej w chorobach neurologicznych głównie wykorzystując miejscowe podanie intraparenchymalne (Chintawar i wsp., 2009; Lee i wsp., 2010). Przedstawiona w niniejszej pracy metoda transplantacji komórek do zbiornika wielkiego u myszy może więc okazać się alternatywnym, małoinwazyjnym (bez naruszania integralności tkanki nerwowej) sposobem przeszczepiania komórek do OUN znajdując w przyszłości szersze zastosowanie.

Nowy model udaru mózgu z zastosowaniem ouabainy

Nowy model udaru mózgu przedstawiony w niniejszej pracy dotyczy wybiórczego uszkodzenia struktur głębokich mózgu (Janowski i wsp., 2008a). Stosunkowo niewielka lezja tej okolicy prowadzi do wystąpienia znaczących objawów klinicznych. Ograniczona objętość uszkodzenia zmniejsza ryzyko wystąpienia obrzęku mózgu, co pozwala na bardziej precyzyjną ocenę wpływu terapii komórkowej na poprawę funkcjonalną zwierząt po udarze.

Pod względem charakterystyki morfologicznej i topograficznej lezja ta może być rozpatrywana jako model udaru lakunarnego. Jednak, pomimo że wielkość

uszkodzenia jest stosunkowo mała, bo wynosi 1-2% całego mózgowia, to i tak znacząco przewyższa udar lakunarny, który wg. definicji obejmuje zaledwie ok. 0,1-0,2% całego mózgowia (Adams i wsp., 1993; Bamford i wsp., 1987). U szczurów opisywane dotychczas modele pojedynczego udaru lakunarnego powodują jednak deficyty neurologiczne dotyczące tylko sfery czuciowo-ruchowej (Frost i wsp., 2006; Lecrux i wsp., 2008), podczas gdy opisany model udaru mózgu prezentuje znacznie szerszy wachlarz zaburzeń behawioralnych **włączając** w to zaburzenia pamięci, co bardziej odpowiada obrazowi klinicznemu.

Obserwowany klinicznie lakunarny udar mózgu powstaje w wyniku przerwania/ograniczenia przepływu krwi przez tętnice przeszywające (Lastilla, 2006). Ze względu na bezpośrednie odejście tych tętnic od dużych naczyń panuje w nich zazwyczaj wysokie ciśnienie w stosunku do ich średnicy, co sprzyja powstawaniu zmian miażdżycowych. Ponieważ są to tętnice anatomicznie końcowe to nie wytwarza się w nich krążenie oboczne. Zmiany niedokrwienne powstające w obrębie unaczynienia tętnic przeszywających są więc znacznie częstsze niż wynikałoby z ich procentowego udziału we wszystkich naczyniach mózgowia (Sato i wsp., 2009) i dotyczą głównie pacjentów z nadciśnieniem tętniczym (Chen i wsp., 2009b). Oprócz tej populacji pacjentów istnieje grupa chorych, u których niedokrwienie struktur głębokich powstało na skutek niezamierzonego zamknięcia tętnic przeszywających podczas procedur zabiegowych. Z ryzykiem w tym zakresie wiążą się operacje naczyniowe (szczególnie tętniaków), chirurgia podstawy czaszki oraz zabiegi wewnątrznaczyniowe. Pacjenci w okresie pooperacyjnym są zazwyczaj poddani szczegółowemu monitoringowi, co umożliwia bardzo wczesne wykrycie zmian oraz szybkie wdrożenie odpowiedniej terapii. Jednak obecnie nie istnieją w pełni skuteczne metody leczenia takich powikłań, a podanie rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rtPa) najbardziej skuteczne w tradycyjnym udarze jest przeciwwskazane w okresie pooperacyjnym. Tak więc pacjenci doświadczający powikłań niedokrwienych po zabiegach operacyjnych mogą stanowić szczególną grupę do wdrożenia terapii komórkowej.

Zastosowany przeze mnie model udaru mózgu u szczura z użyciem ouabainy charakteryzuje się szybkością i prostotą wykonania, co przyczynia się do oszczędności czasu eksperymentatora. Procedura należy do małoinwazyjnych oraz zapewnia łatwość kontroli wielkości uszkodzenia poprzez sterowanie dawką podanej ouabainy. Uzyskany w ten sposób udar mózgu charakteryzuje się względnie wysoką

powtarzalnością (współczynnik wariancji 14%), co ma znaczenie w przypadku zastosowania do badań przedklinicznych.

U większych zwierząt udary lakunarne są modelowane na drodze selektywnego cewnikowania odpowiednich naczyń (Sato i wsp., 2009) lub koagulacji naczyń po wykonaniu kraniotomii (Tanaka i wsp., 2008). Próby wywoływania udaru na drodze selektywnego odcięcia unaczynienia do struktur głębokich zostały także podjęte u szczurów (He i wsp., 1999). Jednak sukces został osiągnięty tylko w ok. 2/3 przypadków, przy czym została tu stwierdzona znaczna osobnicza zmienność unaczynienia (He i wsp., 2000), co wykluczyło ten model do zastosowania w badaniach przedklinicznych.

Inną substancją chemiczną stosowaną do wywołania eksperymentalnego udaru u gryzoni jest ET-1. Jej podanie metodą stereotaktyczną w bezpośrednie sąsiedztwo tętnicy środkowej mózgu (MCA) powoduje powstanie udaru mózgu poprzez wykorzystanie naczyniozwiązujących właściwości tej substancji (Robinson i wsp., 1990). Jednak stwierdzono duży rozrzut wielkości wywoływanego tak uszkodzenia (Biernaskie i wsp., 2004). Intraparenchymalne podanie ET-1 skutkuje leżą podobną do opisaną przeze mnie (Hughes i wsp., 2003). Ostatnio opisano bardzo konkurencyjny do przedstawionego przeze mnie udar fotochemiczny struktur głębokich mózgu uzyskany dzięki stereotaktycznemu wprowadzeniu światłowodu do mózgu (Kuroiwa i wsp., 2009).

NEUROGENEZA INDUKOWANA UDAREM

Pierwszy dowód powstawania nowych neuronów w OUN w okresie poporodowym został przedstawiony u gryzoni dopiero w połowie lat 60-tych (Altman i Das, 1965). Zidentyfikowano też struktury, w których ten proces zachodzi najbardziej aktywnie (Altman i Das, 1966). W dalszych badaniach wskazano w obrębie mózgowia obszary proliferacji komórkowej aktywne w ciągu całego życia osobniczego: strefę okołokomorową oraz warstwę podziarnistą zakrętu zębatego. Powstałe tam komórki migrują do miejsc przeznaczenia, odpowiednio do: opuszki węchowej i warstwy ziarnistej zakrętu zębatego (Altman, 1969; Kaplan i Hinds, 1977; Seress, 1977).

W tym samym czasie w Rosji dostrzeżono wzmożenie proliferacji komórkowej w tych okolicach w odpowiedzi na uraz mózgu (Reznikov, 1975a; Reznikov, 1975b).

Dalsze badania wykazały, że komórki powstające w obrębie warstwy podziarnistej zakrętu zębatego pod wpływem uszkodzenia mózgu posiadają zdolność do przekształcenia się w dorosłe neurony warstwy ziarnistej zakrętu zębatego. Wzorzec migracji komórek z warstwy podziarnistej do warstwy ziarnistej nie jest zaburzony w wyniku uszkodzenia mózgu (Gould i Tanapat, 1997; Liu i wsp., 1998). Natomiast komórki powstałe w strefie okołokomorowej wykazują zdolność do przemieszczania się nie tylko w kierunku opuszki węchowej, lecz także w kierunku ogniska udaru mózgu. Znaczna ich liczba ulega różnicowaniu w kierunku neuroblastów i niedojrzałych neuronów we wczesnym okresie po uszkodzeniu (Jin i wsp., 2001). Po pięciu tygodniach zaobserwowano dojrzałe neurony powstające w wyniku uszkodzenia i zlokalizowane selektywnie w obrębie prążkowie przylegającego do lezji. Nie stwierdzono obecności tych komórek w korze mózgu w bliskości ogniska niedokrwienia (Parent i wsp., 2002). Może to być związane z łatwiejszą penetracją komórek z SVZ do prążkowie niż do kory, która znajduje się po drugiej stronie uszkodzenia w stosunku do SVZ.

W eksperymentach przedstawionych w niniejszej rozprawie stwierdzono pojawianie się progenitorów neuralnych oraz migrujących neuroblastów w ouabainowym modelu udaru mózgu. Tak jak opisywano w wyżej przedstawionych pracach można je głównie znaleźć w obszarze pomiędzy lezją, a SVZ. Zostało to potwierdzone współwystępowaniem BrdU z PSA-NCAM oraz z β -tubuliną III. Natomiast stwierdzona równolegle kolokalizacja BrdU z GFAP oraz z NG2 może wskazywać na proces gliogenezy, chociaż ostatnio stwierdzono występowanie obu powyższych markerów także w multipotencjalnych progenitorach neuralnych (Platel i wsp., 2009; Sypecka i wsp., 2009). Zwrócono także uwagę, że część zaobserwowanych nowopowstałych komórek należy do mikrogleju. Wpływ aktywacji i proliferacji komórek mikroglejowych na ewolucję udaru mózgu nie jest do końca poznany. Niektórzy autorzy sugerują ich pozytywną rolę w tym procesie (Denes i wsp., 2007; Kaminska i wsp., 2009).

Początkowo uważano, że wyłącznie neuroplastyczność, a więc reorganizacja połączeń nerwowych w obrębie istniejących komórek, jest odpowiedzialna za poprawę funkcjonalną po udarze mózgu (Bach-y-Rita, 1981; Pasztor i Vajda, 1987). Ostatnio pojawia się coraz więcej danych na udział nowopowstałych komórek neuronalnych w procesie powrotu funkcji mózgu. Zaobserwowano, że aktywność

motoryczna i wzbogacone warunki środowiska powodują wzmożenie neurogenezy konstytutywnej (Brown i wsp., 2003; van Praag i wsp., 1999b), połączone z poprawą w zakresie funkcji uczenia się (van Praag i wsp., 1999a). Niezależnie zaobserwowano, że powrót funkcji po udarze mózgu jest przyspieszany przez wzbogacone środowisko (Gornicka-Pawlak i wsp., 2009) oraz aktywność i trening motoryczny (Lee i wsp., 2008). Udowodniono także, że ww. warunki wzmagają neurogenezę. Jednak zwiększenie neurogenezy poprzez manipulację genetyczną (nadekspresja VEGF) w zależności od użytego modelu może mieć różnorodne efekty funkcjonalne, tj. poprawa pamięci (Plaschke i wsp., 2008) lub nasilenie labilności emocjonalnej zwierząt (Udo i wsp., 2008). Wskazuje to na konieczność zachowania wyjątkowej ostrożności podczas ewentualnego wprowadzenia terapii stymulującej neurogenezę.

Ponieważ jednak proces neurogenezy nasila się po udarze mózgu, a dalsza jego stymulacja pod wpływem aktywności motorycznej prowadzi do szybszego powrotu funkcji wydaje się jednak, że zwiększona neurogeneza jest procesem korzystnym (Harvey i Chopp, 2003). Istotnie wykazano, że wewnątrzczaszkowe podanie czynników wzrostu u zwierząt dotkniętych udarem mózgu zwiększa neurogenezę i przyspiesza powrót funkcji (Leker i wsp., 2009). Te badania zostały potwierdzone dwoma przypadkami klinicznymi opisanymi przez włoskich autorów. Dokomorowe podanie NGF u kilkunastomiesięcznych dzieci po uogólnionym niedokrwieniu mózgu przyczyniło się do poprawy stanu klinicznego. Koreluje to ze wzrostem stężenia DCX (białka zaangażowanego w proces neurogenezy) w płynie mózgowo-rdzeniowym u tych pacjentów (Chiaretti i wsp., 2008). Ostatnio zsyntetyzowano nowy peptyd zawierający sekwencję odpowiadającą centrum aktywnemu CNTF, który po podaniu systemowym przenika barierę krew-mózg, stymuluje neurogenezę i poprawia pamięć u myszy (Chohan i wsp., 2009). Wykazano także, że statyny, popularne leki szeroko stosowane w celu obniżenia poziomu cholesterolu oraz leczenia chorób krążenia, posiadają także właściwość stymulacji neurogenezy oraz poprawiają wyniki leczenia udaru oraz urazu mózgu (Karki i wsp., 2009; Lu i wsp., 2004; Zhang i wsp., 2005). Stymulacja endogennej neurogenezy przez przeszczepione komórki jest także jednym z postulowanych mechanizmów ich działania (Bonilla i wsp., 2009; Stroemer i wsp., 2009; Tsyb i wsp., 2009).

Z drugiej strony istnieją badania pokazujące, że intensywność neurogenezy nie wpływa na funkcję OUN u zwierząt. Indukcja neurogenezy metodą dokomorowego podania kwasu retinowego nie wpływała na poprawę funkcjonalną u szczurów po udarze mózgu (Piane i wsp., 2008). Także ograniczenie neurogenezy metodą manipulacji genetycznej (mysz D2 KO) nie pogorszyło zdolności zwierząt do uczenia się (Jaholkowski i wsp., 2009).

Szybki rozwój technik obrazowania nieinwazyjnego przyczynia się do pogłębienia wiedzy w tej dziedzinie. Wykazano, że dokomorowe podanie znacznika komórkowego SPIO wraz z siarczanem protaminy (Panizzo i wsp., 2009) lub MPIO wraz z poli-L-lizyną (Vreys i wsp., 2010) pozwala na przyżyciowe wyznakowanie i obserwację migracji neuroblastów ze strefy okołokomorowej w kierunku opuszki węchowej w nieuszkodzonym mózgu. W celu oceny procesu neurogenezy poudarowej wykorzystano także spektroskopię rezonansu magnetycznego (Manganas i wsp., 2007; Romer i wsp., 2008). Najpierw wykazano *in vitro*, że w hodowli progenitorów neuralnych występuje charakterystyczne przesunięcie widma spektroskopowego o wartości 1,28 ppm. Następnie zidentyfikowano ten fragment widma przyżyciowo w badaniach mózgów zwierząt i ludzi.

TRANSPLANTACJE KOMÓREK DO MÓZGU

Najważniejsze zagadnienia odnoszące się do neurotransplantacji komórkowych obejmują kwestie przeżycia przeszczepu, reakcji immunologicznej biorcy oraz migracji i różnicowania się przeszczepionych komórek *in situ*. Dopiero w kontekście rozwiązania tych zagadnień można rozważać wpływ samych komórek na przebieg procesów patologicznych.

Czas przeżycia przeszczepionych komórek i reakcja immunologiczna gospodarza na przeszczep

W przeprowadzonych przeze mnie badaniach wykazano krótkotrwałą przeżywalność komórek HUCB-NSC/NP wszczepionych do mózgów zwierząt nieuszkodzonych oraz masywną reakcję odrzucania pod postacią aktywacji i nacieku komórek mikroglejowych, która wystąpiła pomimo zastosowania immunosupresji cyklosporynowej. Po tygodniu można było obserwować tylko pojedyncze

przeszczepione komórki (Kozłowska i wsp., 2007). W innych badaniach z zastosowaniem komórek pochodzących z krwi pępowinowej poczyniono podobne obserwacje (Walczak i wsp., 2004; Willing i wsp., 2003). Różnicą pomiędzy tymi badaniami jest stopień ukierunkowania neuralnego przeszczepianych komórek. Komórki HUCB-NSC/NP stosowane przeze mnie wykazują w większym stopniu cechy neuralnych komórek macierzystych lub progenitorowych (Buzanska i wsp., 2006a), podczas gdy inni autorzy przeszczepiali komórki jednojądrzaste krwi pępowinowej nie poddane procesowi różnicowania. Nawet zastosowanie zwierząt z upośledzeniem układu odporności nie poprawiło znacząco przeżycia komórek (Walczak i wsp., 2007a). Istnieją też badania, w których wykazano zadowalającą przeżywalność przeszczepu komórek pochodzących z krwi pępowinowej u zwierząt immunokompetentnych przez okres 14 dni (Dasari i wsp., 2007b; Pan i wsp., 2005) i 3 tygodni (Nishio i wsp., 2006) po transplantacji. Również w wyniku użycia do eksperymentów osesków zwierzęcych lub płodów jako biorców uzyskano przedłużenie przeżycia komórek pochodzących z krwi pępowinowej (Coenen i wsp., 2005; Garbuzova-Davis i wsp., 2005; Zigova i wsp., 2002). Ze względu na brak dostępności krwi pępowinowej gryzoni w ilościach wystarczających do badań istnieje konieczność prowadzenia eksperymentów w układzie ksenogenicznym. Utrudnia to wyciąganie wniosków z badań, a niezgodność gatunkowa wydaje się jedną z istotniejszych przyczyn niepowodzeń badań przedklinicznych.

W porównaniu z krwią pępowinową komórki pochodzące z innych źródeł, tj. mózg, szpik, zarodek wydają się wykazywać dłuższe przeżycia po transplantacji w układzie ksenogenicznym. Szczególnie pozytywne wyniki uzyskano po ksenotransplantacji neuralnych progenitorów pochodzących z ludzkich mózgów płodowych do OUN zwierząt (Barami i wsp., 2001; Maciacyk i wsp., 2009). Nawet długotrwała hodowla takich komórek nie wpływa negatywnie na tę właściwość (Ogawa i wsp., 2009). Nie zanotowano także tumorogenności tych komórek w ograniczonych czasowo badaniach przedklinicznych. Jednak opisano 2 przypadki kliniczne powstania nowotworu po transplantacji komórek pochodzenia płodowego. W jednym przypadku możliwe było bezpieczne dla pacjenta usunięcie powstałego guza (Amariglio i wsp., 2009), podczas gdy w drugim rozrost nowotworowy przyspieszył śmierć pacjenta chorego na HD (Keene i wsp., 2009). Nie wykazano także wzbudzania odpowiedzi immunologicznej po przeszczepie w układzie ksenogenicznym komórek hNT otrzymanych z nerwiaka płodowego, wykazujących

cechy neuronów post-mitotycznych (Bliss i wsp., 2006; Christie i wsp., 2004; Fricker-Gates i wsp., 2004). Komórki pochodzenia embrionalnego oraz indukowane komórki pluripotencjalne (iPS) wykazują przeważnie dobre przeżycie po transplantacji, jednak z czasem rozwijają się z nich potworniaki (Bjorklund i wsp., 2002; Duinsbergen i wsp., 2009; Molcanyi i wsp., 2009).

Badania nad przeszczepami komórek pochodzących z rdzenia nadnerczy przeprowadzone w układzie ksenogenicznym wykazały zróżnicowanie odpowiedzi immunologicznej w zależności od ekspresji antygenów zgodności tkankowej. Populacja komórek chromochłonnych wykazuje niską ekspresję antygenów zgodności tkankowej klasy I i brak odrzucania przeszczepu, podczas gdy komórki endotelialne charakteryzujące się wysoką ekspresją tych antygenów indukują odpowiedź immunologiczną (Czech i wsp., 1997). Może to mieć związek z wysoką immunogennością komórek wywodzących się od hemangioblastów, do których należy także krew pępowinową. Badane przez mnie komórki HUCB-NSC także wykazywały wysoką ekspresję antygenów zgodności tkankowej klasy I, jednak prawie całkowity brak HLA klasy II. Problem niezgodności tkankowej nie występuje w przypadku autotransplantacji. W związku z tym w medycynie regeneracyjnej zastosowanie krwi pępowinowej jak i komórek pochodzących z innych źródeł jest najbardziej uzasadnione i bezpieczne w układzie autogenicznym.

W moich eksperymentach transplantacja komórek w okolice uszkodzonego mózgu 2 dni po wywołaniu udaru powodowała wydłużenie przeżycia komórek w porównaniu z przeszczepem do zwierząt nieuszkodzonych. Ten fenomen był obserwowany przez innych badaczy w przypadku przeszczepu 3 dni po wywołaniu lezji (Irons i wsp., 2004). Natomiast odroczenie transplantacji do tygodnia po wywołaniu udaru mózgu powodowało zniesienie „ochronnego” czy też stymulującego wpływu uszkodzonej tkanki na przeszczepione komórki (Hicks i wsp., 2009).

Uogólniając te różnorodne obserwacje widać, że zagadnienie zadowalającego przeżycia komórek przeszczepianych do OUN nie zostało ostatecznie rozwiązane. Świadczy o tym wciąż duża liczba publikacji dotyczących strategii poprawiających przeżycie wszczepianych komórek (Chaturvedi i wsp., 2008; Jo i wsp., 2009; Johnson i wsp., 2009; Liu i Huang, 2007; Quinn i wsp., 2008).

Migracja komórek po przeszczepie do OUN

Przeżycie i zachowanie się komórek po transplantacji do układu nerwowego determinuje możliwość podejmowania przez nie funkcji naprawczych. Przemieszczanie się ich do miejsc objętych procesem chorobowym stanowi zasadniczy element tego zjawiska.

Komórki hNT otrzymane z nerwiaka płodowego wykazujące cechy neuronów postmitotycznych nie migrują po przeszczepie do mózgu zarówno u zwierząt nieuszkodzonych (Trojanowski i wsp., 1993), jak i w modelu choroby Parkinsona (Baker i Mendez, 2005) oraz udaru (Bliss i wsp., 2006), w tym także w przypadku pacjenta po udarze mózgu (Nelson i wsp., 2002). W badaniach pośmiertnych pacjentów z chorobami neurodegeneracyjnymi, którzy otrzymali przeszczepy fragmentów mózgów płodowych także nie opisywano migracji komórek z miejsca podania (Cicchetti i wsp., 2009; Kordower i wsp., 2008a; Kordower i wsp., 2008b).

Natomiast prekursorzy neuralne lub neuralne komórki macierzyste bez względu na pochodzenie wykazują po podaniu intraparenchymalnym znaczącą migrację w kierunku lezji (Guzman i wsp., 2008; Wernig i wsp., 2008; Yang i wsp., 2009b; Zhang i wsp., 2009b). Ograniczoną radialną migrację wykazano także po przeszczepie do nieuszkodzonych mózgów (Maciaczyk i wsp., 2009). W niniejszej pracy również wykazano zarówno spontaniczną, radialną jak i indukowaną udarem, kierunkową migrację neuralnych komórek macierzystych i prekursorów neuralnych pochodzących z krwi pępowinowej. Mezenchymalne (Kim i wsp., 2008) i hematopoetyczne (Sykova i Jendelova, 2006) multipotencjalne komórki macierzyste oraz pluripotencjalne komórki macierzyste pochodzenia embrionalnego (Srivastava i wsp., 2006; Sykova i Jendelova, 2007) także posiadają zdolność do migracji po przeszczepie. W dalszych badaniach stwierdzono różnicę pomiędzy dwiema głównymi populacjami komórek szpiku w zakresie zdolności do przemieszczania się po przeszczepie w kierunku obszaru mózgu objętego udarem. Również w przeciwieństwie do poprzednich badań jedynie komórki mezenchymalne cechowała kierunkowa migracja, podczas gdy komórki hematopoetyczne pozostały w miejscu podania (Shichinohe i wsp., 2009).

Nie tylko po intraparenchymalnym podaniu komórek, ale także po iniekcji do układu komorowego mózgu wykazano migrację komórek w kierunku ognisk zapalnych w zwierzęcych modelach: SM (Cohen i wsp., 2010), SCI (Fan i wsp.,

2008) i udaru mózgu (Jin i wsp., 2005). Na podstawie przeglądu literatury można stwierdzić, że komórki wraz z postępowaniem procesu różnicowania tracą zdolność do migracji, a przynajmniej dotyczy to komórek neuralnych (Park i wsp., 2009).

BADANIE CZYNNIKÓW ODDZIAŁUJĄCYCH NA MIGRACJĘ NEURALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH (HUCB-NSC) *IN VITRO*

Liczne receptory i ich ligandy są zaangażowane w proces migracji komórkowej. Jednak ten sam ligand może różnie oddziaływać na podstawowe procesy komórkowe: proliferację, migrację i różnicowanie w zależności od rodzaju komórek.

W badaniach *in vivo* wykazałem zdolność neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej do migracji w mózgu szczura pomimo zastosowania niesprzyjającego dla przeszczepu układu ksenogenicznego. Na podstawie danych literaturowych wybrałem do dalszych badań kilka receptorów, które mogą być zaangażowane w ten proces.

Oś PDGF – PDGFR

W badaniach przeprowadzonych przez mnie neuralne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej wykazują znaczącą ekspresję receptorów PDGFRA i PDGFRB. W trakcie rozwoju OUN receptory te znajdują się na prekursorach neuralnych i odgrywają rolę w ich migracji w obrębie grzebienia nerwowego (Maschhoff i Baldwin, 2000) i mózdzku (Andrae i wsp., 2004). W warunkach *in vitro* potwierdzono ich rolę w migracji neuralnych komórek macierzystych pochodzących z mózgow płodowych (Forsberg-Nilsson i wsp., 1998). Dodatkowo wykazano, że w warunkach *in vitro* PDGF jest silniejszym chemoatraktantem dla neuralnych progenitorów pochodzenia szpikowego niż SDF-1, BMP-2, VEGF i IGF-1 (Habisch i wsp., 2008).

Wzmóżona ekspresja PDGF w obrębie układu nerwowego dotkniętego niedokrwieniem u zwierząt (Ohno i wsp., 1999; Renner i wsp., 2003) i u ludzi (Krupinski i wsp., 1997) oraz obecność obu receptorów dla PDGF na przeszczepianych przeze mnie komórkach wskazuje, że oś PDGF-PDGFR może być

jednym z czynników warunkujących migrację komórek w kierunku obszaru mózgu objętego udarem.

Oś HGF – c-Met

Badane przeze mnie neuralne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej wykazują wysoką ekspresję c-Met. W trakcie całego życia osobniczego receptor c-Met jest obecny na neuroblastach powstających w obrębie SVZ i bierze udział w ich przemieszczaniu do opuszki węchowej wzdłuż przedniego strumienia migracji (RMS) (Garzotto i wsp., 2008). W warunkach *in vitro* wykazano ekspresję c-Met w neuralnych komórkach macierzystych i prekursorach neuralnych różnego pochodzenia, a także stymulację ich migracji przy użyciu liganda HGF (Kendall i wsp., 2008; Kucia i wsp., 2006; Lan i wsp., 2008; Yan i Rivkees, 2002). Poza tym wykazano wzrost ekspresji HGF w obszarze mózgu objętego niedokrwieniem u zwierząt eksperymentalnych (Nagayama i wsp., 2004; Trapp i wsp., 2008). Dodatkowo w badaniach klinicznych stwierdzono wzrost HGF we krwi pacjentów z udarem mózgu (Matsumori i wsp., 2002). To pośrednio wskazuje, że HGF – c-Met może być kolejną osią zaangażowaną w proces migracji komórek HUCB-NSC z miejsca przeszczepu w kierunku ogniska udarowego.

Oś VEGF – Flk-1

Stwierdzono ekspresję receptora Flk-1 na HUCB-NSC. Chociaż ekspresja tego receptora jest najbardziej charakterystyczna dla prekursorów endotelialnych (Hatzopoulos i wsp., 1998; Yamaguchi i wsp., 1993) to występuje on także na neuralnych komórkach macierzystych (Maurer i wsp., 2003; Schanzer i wsp., 2004) i bierze udział w regulacji procesu neurogenezy (Jin i wsp., 2002), migracji neuroblastów (Wittko i wsp., 2009) i prekursorów neuralnych (Barkho i wsp., 2008).

Kluczowym czynnikiem zwiększającym produkcję VEGF w tkance kręgowców jest hipoksja (Kremer i wsp., 1997; Yang i wsp., 2009a). W różnych modelach udaru mózgu u gryzoni potwierdzono wzrost ekspresji VEGF w obrębie uszkodzonej tkanki (Gu i wsp., 2001; Lennmyr i wsp., 1998). Receptor Flk-1 może także odpowiadać za zdolności migracyjne badanych komórek.

Oś IGF-1 – IGF-1R

Wykazano obecność IGF-1R na komórkach HUCB-NSC, a zastosowanie IGF-1 jako chemoatraktanta w badaniach *in vitro* potwierdziło zdolność komórek do migracji w kierunku tego czynnika wzrostu w sposób zależny od dawki. Jednak w porównaniu z homogenatem z mózgu szczura ta migracja jest kilkakrotnie mniejsza. To wskazuje, że oś IGF-1 – IGF-1R może być tylko jedną z wielu składowych biorących udział w stymulacji migracji komórkowej, także w odpowiedzi na niedokrwienie mózgu. W warunkach fizjologicznych IGF-1R i jego ligand są szeroko obecne w neuronach (Bondy i Lee, 1993) i progenitorach neuralnych SVZ (Yan i wsp., 2006). U ptaków śpiewających oś IGF-1 – IGF-1R bierze udział w sezonowej migracji neuroblastów z SVZ do centrum wokalnego (Jiang i wsp., 1998). W badaniach *in vitro* wykazano znaczący potencjał chemotaktyczny IGF-1 w stosunku do progenitorów mezenchymalnych (Fiedler i wsp., 2006) i neuralnych pochodzących ze szpiku (Habisch i wsp., 2008) w sposób zależny od dawki liganda.

Do znaczącego zwiększenia ekspresji IGF-1 dochodzi w obrębie obszaru mózgu objętego udarem (Lee i Bondy, 1993), w wyniku hipoksji-ichemii u osesków szczurzych (Beilharz i wsp., 1998) oraz po urazie mózgu (Kizhakke Madathil i wsp., 2010). W tym wypadku, w odróżnieniu od sytuacji fizjologicznej, najsilniejsza ekspresja IGF-1 występuje w komórkach mikroglejowych (O'Donnell i wsp., 2002).

Oś SDF-1 – CXCR4

Z moich badań wynika, iż neuralne komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej wykazują szczególnie interesujący wzorec ekspresji receptora CXCR4. Wprawdzie w stałej hodowli występuje typowy cytoplazmatyczny wzorec barwienia, to jednak po dobie od przeniesienia HUCB-NSC do pożywki bezsurowiczej wzbogaconej B27 i EGF immunoreaktywność CXCR4 można znaleźć jedynie w jądrze. Podobny jądrowy wzorec barwienia dotychczas opisywano w niektórych nowotworach. Wykazano korelację pomiędzy subkomórkową lokalizacją CXCR4, a rokowaniem w chorobach nowotworowych (Na i wsp., 2008; Speetjens i wsp., 2009; Woo i wsp., 2008; Yoshitake i wsp., 2008). Ostatnio chińscy badacze zidentyfikowali region NLS w obrębie chemokiny CXCR4 (Wang i wsp., 2010) oraz przemieszczanie się do jądra CXCR4 po ekspozycji komórek raka nerki na wysokie

stężenie SDF-1 (Wang i wsp., 2009). W odróżnieniu od tych obserwacji, w moich eksperymentach, wycofanie surowicy z pożywki, w której hodowano komórki HUCB-NSC, a nie dodanie SDF-1 powodowało przemieszczenie CXCR4 z cytoplazmy do jądra. Komórki hodowane przeze mnie w tych warunkach nie przylegały do podłoża. Natomiast ponowne dodanie surowicy do pożywki (w dużych dawkach – 10% w celu różnicowania komórek) powodowało przyleganie komórek do podłoża i stopniowe przemieszczenie CXCR4 poza jądro wraz z utratą kulistego kształtu komórek, aż do całkowitego zaniku ekspresji tego receptora w komórkach wykazujących morfologiczne cechy zaawansowanego procesu różnicowania. Dotychczas nie opisywano występowania translokacji CXCR4 do jądra w nienowotworowych komórkach macierzystych.

Wykazano obecność CXCR4 na komórkach macierzystych (Peled i wsp., 1999). Stwierdzono, że w czasie życia osobniczego SDF-1 bierze udział w migracji neuroblastów w obrębie hipokampa (Berger i wsp., 2007; Tham i wsp., 2001), a po udarze mózgu jest odpowiedzialna za migrację neuroblastów z SVZ w kierunku lezji (Ohab i Carmichael, 2008; Robin i wsp., 2006; Thored i wsp., 2006). Wykazano, że oś SDF-1 – CXCR4 odgrywa kluczową rolę w migracji komórek jednojądrzastych pochodzących z krwi pępowinowej w **kieurnku** uszkodzonego mózgu (Newman i wsp., 2005).

W wykonanych przeze mnie doświadczeniach wykazałem znaczące zwiększenie migracji badanych komórek HUCB-NSC pod wpływem SDF-1 *in vitro*. Jednak liczba migrujących komórek indukowanych tą chemokiną była kilkukrotnie niższa niż w przypadku zastosowania homogenatów ze zdrowych i uszkodzonych mózgów jako chemoatraktantów. To wskazuje, że SDF-1 podobnie jak IGF-1 może być jedynie jednym z ligandów biorących udział w procesie migracji badanych przeze mnie komórek, jednak nie wydaje się mieć kluczowego znaczenia w ukierunkowaniu ruchu komórek w kierunku lezji. Ta cecha odróżnia komórki jednojądrzaste krwi pępowinowej od neuralnych komórek macierzystych tego samego pochodzenia.

Macierz zewnątrzkomórkowa a migracja komórek

W prowadzonych przeze mnie badaniach *in vitro* wykazano bardzo duże zwiększenie migracji HUCB-NSC w odpowiedzi na pokrycie błony porowatej białkami macierzy zewnątrzkomórkowej. Dodanie chemoatraktanta do dolnej komory

powodowało dalsze, ale znacząco mniejsze zwiększenie migracji. Podobny efekt zaobserwowano w badaniach inwazyjności komórek raka okrężnicy (Pouliot i wsp., 2001). Haptotaksja stanowi istotny element warunkujący migrację komórek w rozwoju OUN (Georges-Labouesse i wsp., 1998), oraz w procesie neurogenezy w dorosłym mózgu (Murase i Horwitz, 2002), a także może wpływać na skuteczność neurotransplantacji (Prestoz i wsp., 2001). Dobrze znana jest radialna migracja progenitorów neuralnych z neurosfer obserwowana *in vitro* na podłożu lamininy (Andressen i wsp., 2005; Buzanska i wsp., 2005; Flanagan i wsp., 2006; Leone i wsp., 2005).

W innych badaniach wykazano zdolność neuralnych komórek macierzystych do ukierunkowanej odpowiedzi haptotaktycznej zgodnie z gradientem stężeń białek macierzy zewnątrzkomórkowej (Ziu i wsp., 2006).

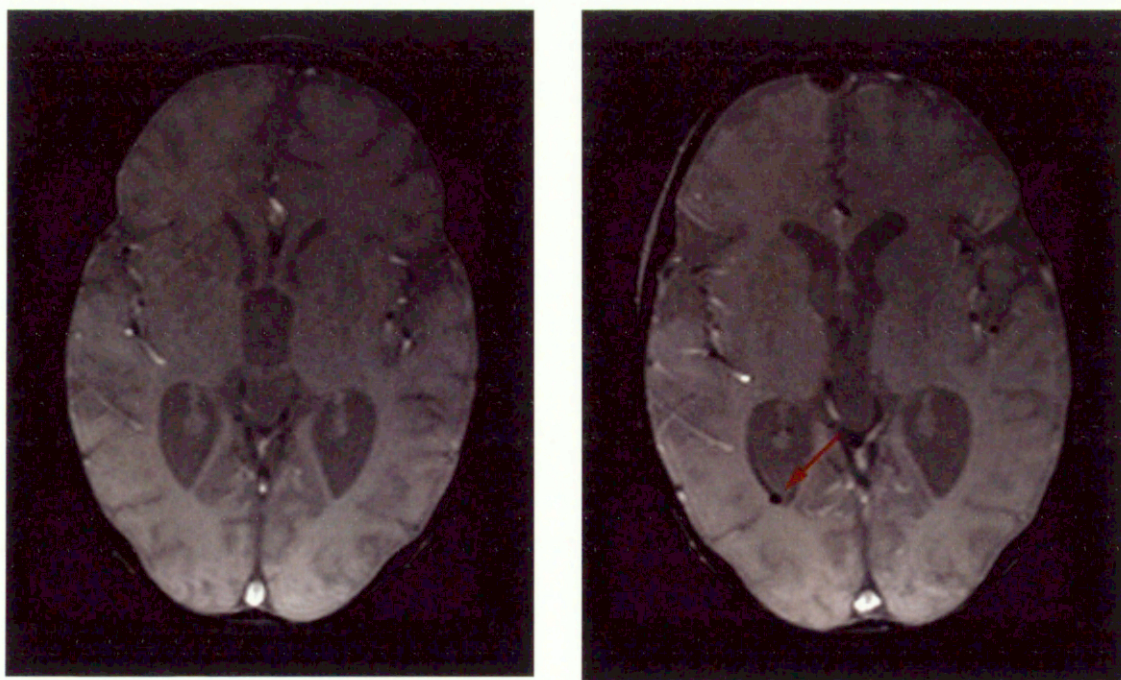
Migracja komórek indukowana homogenatami z mózgu

Opublikowano jedynie kilka prac poświęconych migracji *in vitro* komórek w kierunku homogenatów wykonanych z mózgu po udarze. Dotychczas tym badaniom poddano tylko komórki jednojądrzaste krwi pępowinowej (Jiang i wsp., 2008; Newman i wsp., 2005), nieukierunkowane komórki macierzyste pochodzące z krwi pępowinowej (USSC) (Trapp i wsp., 2008) oraz komórki podścieliska szpiku (Wang i wsp., 2002a; Wang i wsp., 2002b). Dotychczas nie oceniano migracji neuralnych komórek macierzystych indukowanej homogenatami z mózgow. W niniejszej rozprawie doktorskiej po raz pierwszy wykonano takie badania używając neuralnych komórek macierzystych pochodzących z krwi pępowinowej. W dwóch z powyższych prac badano ewolucję tego zjawiska w zależności od okresu, jaki upłynął od wywołania udaru do pobrania mózgow (Newman i wsp., 2005; Wang i wsp., 2002a). Najbardziej intensywną stymulację migracji komórek wywoływały homogenaty pozyskiwane w 24-72 godzin po udarze mózgu. Podobne wyniki zostały zaprezentowane przeze mnie w rozprawie doktorskiej.

ZNAKOWANIE I DETEKCJA NEURALNYCH KOMÓREK PROGENITOROWYCH METODĄ REZONANSU MAGNETYCZNEGO

W celu oceny czułości metody detekcji komórek w rezonansie magnetycznym wykonuje się obrazowanie na fantomie. W eksperymencie przedstawionym w tej pracy dobrą wizualizację zawieszonych komórek HUCB-NP osiągnięto po zastosowaniu gęstości 4×10^6 komórek/ml. Ponieważ w każdej probówce znajdowało się 200 μ l zawiesiny komórkowej, można uznać, że dopiero całkowita liczba 8×10^5 komórek/ml jest łatwo wykrywalna. W porównaniu do innych doniesień wykrywalność ta jest znacząco niższa, ale adekwatna do zastosowanego aparatu rezonansu magnetycznego dysponującego polem magnetycznym 1,5 T. W badaniu z zastosowaniem aparatu o polu magnetycznym 3 T wykryto obecność komórek już w liczbie 5×10^4 (Chung et al., 2009). Użycie wyższych pól dalej zwiększa czułość metody: 4,7 T - 10^3 i 9,4 T - 10^2 komórek (Magnitsky i wsp., 2005). Należy dodać, że nawet to najwyższe pole – 9,4 T jest już stosowane w klinice (Atkinson i wsp., 2007).

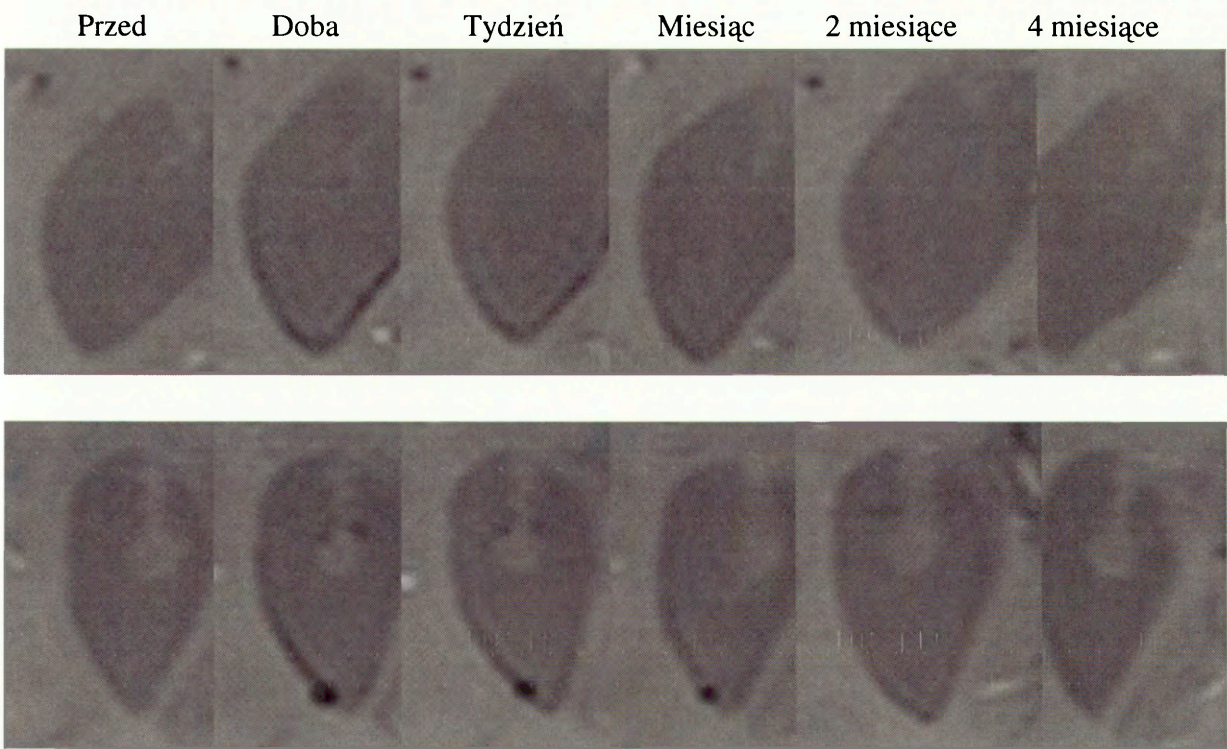
Neuralne progenitory otrzymane z krwi pępowinowej wyznakowane żelazem w sposób przedstawiony w tej pracy zostały następnie zastosowane w klinice, co jest przedmiotem osobnej wielozespołowej pracy, której jestem współautorem. U półtorarocznego dziecka po przebytych globalnym niedokrwieniu mózgu 6 miesięcy



Ryc. 37 Obrazowanie komórek HUCB-NP po przeszczepie dokomorowym. Widoczne komórki w obrębie rogu potylicznego prawego (strzałka).

wcześniej komórki (24×10^6 komórek/ml, 0,5 ml) podano dokomorowo do rogu czołowego przez dren typu zastawkowego. W celu obserwacji losu przeszczepionych komórek wykonywano badania MR w określonej sekwencji czasowej: dzień, tydzień, miesiąc, 2, i 4 miesiące po transplantacji. Użyto tych samych ustawień aparatu do rezonansu magnetycznego co do badania na fantomie. Wykazano obecność komórek w rogu potylicznym prawym po podaniu dokomorowym do prawego rogu czołowego (ryc. 37). W badaniu podłużnym wykazano stopniowe zmniejszanie się sygnału komórek w rogu potylicznym, aż do całkowitego zaniku po 4 miesiącach (ryc. 38). Kliniczne zastosowanie obrazowania przeszczepianych komórek zostało dotychczas przedstawione tylko w 4 publikacjach (Zhu i wsp., 2006; Callera i de Melo, 2007; de Vries i wsp., 2005; Toso i wsp., 2008). Dwie z nich dotyczyły układu nerwowego. W pierwszej pracy autologiczne neuralne komórki macierzyste pochodzenia mózgowego wyznakowane SPIO zostały podane domózgowo u pacjentów po ciężkich urazach mózgu. Nie stwierdzono powikłań związanych z procedurą neurotransplantacji. Komórki były widoczne wewnątrzmożgowo bezpośrednio po podaniu, a w ciągu kolejnych tygodni obserwowano stopniowy zanik sygnału. Może on być związany z proliferacją lub migracją komórek (Walczak i wsp., 2007b). W ostatnich badaniach *in vitro* potwierdzono, że stopniowe zmniejszanie się sygnału w trakcie eksperymentu świadczy o obecności żywych komórek, podczas gdy utrzymywanie się sygnału na tym samym poziomie wskazuje na bezpostaciowe złożki żelaza powstałe po obumarciu komórek (Henning i wsp., 2009). W drugiej pracy autologiczne, hematopoetyczne komórki macierzyste pochodzenia szpikowego zostały podane do kanału kręgowego drogą nakłucia lędźwiowego u pacjentów po urazach rdzenia kręgowego (Callera i de Melo, 2007). Do znakowania komórek użyto ziaren magnetycznych (magnetic beads) połączonych z przeciwciałami przeciw cząsteczce CD34. Ta formuła nie została dotychczas zaakceptowana do zastosowań klinicznych, natomiast jest rutynowo stosowana podczas procedury magnetoselekcji. Do akwizycji obrazu użyto aparatu o stosunkowo małym polu magnetycznym – 1 T. Nie wykonano eksperymentu z użyciem fantomu, wobec czego trudno jest wnioskować na temat rzeczywistej wykrywalności komórek wyznakowanych tą metodą i obrazowanych tym aparatem. Nie pokazano także miejsca iniekcji komórek bezpośrednio po transplantacji. Obrazowanie komórkowe wykonano dopiero po 3 i 5 tyg. W tych badaniach obserwowano stopniowe zwiększanie się sygnału w obrębie lezji, którego nie było u pacjentów, u których podano dokanałowo same ziarna

magnetyczne. Nie przedstawiono dalszego losu komórek ponad wyżej wymieniony przedział czasu. W odróżnieniu od pierwszej pracy, w tej obserwowano stopniowe zwiększanie sygnału w obrębie lezji. Może to świadczyć o powolnej, długotrwałej migracji komórek w kierunku uszkodzonego miejsca. Zastosowanie ziaren magnetycznych może powodować dłuższe utrzymywanie się sygnału niż w przypadku tlenku żelaza. Jednak w celu potwierdzenia wiarygodności tej pracy i użytej metody konieczne jest wykonanie szeregu badań *in vitro* i *in vivo*. W przedstawionym przeze mnie przypadku klinicznym komórki HUCB-NP wyznakowane SPIO obserwowano w rogu potylicznym po ich podaniu do rogu czołowego komory bocznej. Biorąc pod uwagę ułożenie pacjenta do operacji na plecach z pozostawieniem głowy w pozycji neutralnej oraz wykonanie diagnostyki obrazowej w pierwszej dobie po zabiegu można stwierdzić, że za tę lokalizację komórek w obrębie układu komorowego odpowiedzialny jest proces ich sedimentacji. W ten sposób potwierdzono, że podane komórki pozostają w układzie komorowym, a nie opuszczają go od razu po podaniu wraz z kierunkiem przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego. W ciągu kolejnych tygodni obserwowano stopniowe



Ryc. 38 Róg potyliczny prawej komory bocznej w badaniu MR – sekwencja badań (czasowe odniesienie do procedury transplantacji powyżej ryciny). Górny i dolny przedstawiają przekroje przebiegające na różnej wysokości mózgowia.

zanikanie sygnału bez ewidentnych cech migracji komórek. Jest to typowy obraz zachowania się sygnału pochodzącego z przeszczepionych komórek wyznakowanych SPIO. Utrzymywanie się sygnału na niezmienionym poziomie mogłoby świadczyć o obumieraniu komórek i powstawaniu bezpostaciowych złogów żelaza. Ewentualna intraparenchymalna migracja komórek może być niewidoczna w badaniu rezonansu magnetycznego ze względu na niewystarczającą gęstość migrujących komórek w stosunku do czułości zastosowanej tutaj detekcji sygnału (1.5 T).

Podsumowując uzyskane wyniki, w ramach pracy doktorskiej opracowałem dwa modele eksperymentalnego badania przeszczepów komórkowych w OUN u gryzoni, przeprowadziłem analizę czynników wpływających na migrację komórek HUCB-NSC w warunkach *in vitro* oraz ustaliłem warunki znakowania komórek HUCB-NP nanocząsteczkami żelaza (SPIO) i ich detekcji w rezonansie magnetycznym, co zostało wykorzystane w klinice do nieinwazyjnego śledzenia losu komórek po przeszczepie do komór bocznych mózgu u dziecka.



PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Opracowano dwa nowe modele doświadczalne ukierunkowane na badania neurotransplantacji komórek progenitorowych w schorzeniach OUN.
2. Określono miejscową reakcję tkanki, ze szczególnym uwzględnieniem aktywacji procesu neurogenezy w ouabainowym modelu uszkodzenia mózgu u szczura.
3. Wykazano, że domózgowa transplantacja neuralnych komórek macierzystych/progenitorowych pochodzących z krwi pępowinowej w ksenogenicznym układzie dawca(człowiek)/biorca(zwierzę), niezależnie od zastosowanej immunosupresji, skutkuje stosunkowo krótkim, kilkudniowym przeżyciem przeszczepu.
4. Przeszczepione domózgowo ludzkie neuralne komórki macierzyste/progenitorowe pochodzące z krwi pępowinowej wykazują zdolność do ukierunkowanej migracji w tkance obcogatunkowego biorcy. Zależy ona od umiejscowienia przeszczepu, stopnia zróżnicowania przeszczepianych komórek oraz towarzyszących uszkodzeń tkanek biorcy, wyraźnie stymulujących i kierujących ich migrację.
5. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że komórki macierzyste pochodzące z ludzkiej krwi pępowinowej HUCB-NSC charakteryzują się:
 - a. wysoką ekspresją (80-90% całkowitej liczby komórek) receptorów zaangażowanych w proces migracji
 - b. ligandy tych receptorów (IGF-1 i SDF-1) jak również homogenaty pochodzące z mózgów zwierząt eksperymentalnych oraz z ludzkiego materiału otrzymanego w czasie zabiegów neurochirurgicznych, wykazują wyraźny, aczkolwiek zróżnicowany wpływ stymulacyjny na przebieg migracji badanych komórek
6. Wykazano, że neuralne komórki progenitorowe pochodzące z krwi pępowinowej poddają się przyżyciowemu znakowaniu superparamagnetycznym związkiem tlenku żelaza (SPIO) z wysoką wydajnością i bez wpływu na cechy i przeżycie hodowli *in vitro*. Umożliwi to zastosowanie opracowanej techniki znakowania w monitorowanych MR, domózgowych transplantacjach tych komórek.

PIŚMIENNICTWO

- Adams, H. P., Jr., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., i Marsh, E. E., 3rd (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24, 35-41.
- Adamson, J., Beswick, A., i Ebrahim, S. (2004). Is stroke the most common cause of disability? *J Stroke Cerebrovasc Dis* 13, 171-177.
- Alper, J. (2009). Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nat Biotechnol* 27, 213-214.
- 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, 433-457.
- Altman, J., i Das, G. D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335.
- Altman, J., i Das, G. D. (1966). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. I. A longitudinal investigation of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J Comp Neurol* 126, 337-389.
- Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B. W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L., i wsp. (2009). Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 6, e1000029.
- Andrae, J., Afink, G., Zhang, X. Q., Wurst, W., i Nister, M. (2004). Forced expression of platelet-derived growth factor B in the mouse cerebellar primordium changes cell migration during midline fusion and causes cerebellar ectopia. *Mol Cell Neurosci* 26, 308-321.
- Andressen, C., Adrian, S., Fassler, R., Arnhold, S., i Addicks, K. (2005). The contribution of beta1 integrins to neuronal migration and differentiation depends on extracellular matrix molecules. *Eur J Cell Biol* 84, 973-982.
- Appel, S. H., Engelhardt, J. I., Henkel, J. S., Siklos, L., Beers, D. R., Yen, A. A., Simpson, E. P., Luo, Y., Carrum, G., Heslop, H. E., i wsp. (2008). Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 71, 1326-1334.
- Asano, T., Sasaki, K., Kitano, Y., Terao, K., i Hanazono, Y. (2006). In vivo tumor formation from primate embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 329, 459-467.
- Atkinson, I. C., Renteria, L., Burd, H., Pliskin, N. H., i Thulborn, K. R. (2007). Safety of human MRI at static fields above the FDA 8 T guideline: sodium imaging at 9.4 T does not affect vital signs or cognitive ability. *J Magn Reson Imaging* 26, 1222-1227.
- Bach-y-Rita, P. (1981). Brain plasticity as a basis of the development of rehabilitation procedures for hemiplegia. *Scand J Rehabil Med* 13, 73-83.

Backlund, E. O., Granberg, P. O., Hamberger, B., Knutsson, E., Martensson, A., Sedvall, G., Seiger, A., i Olson, L. (1985). Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg* 62, 169-173.

Baker, K. A., i Mendez, I. (2005). Long distance selective fiber outgrowth of transplanted hNT neurons in white matter tracts of the adult rat brain. *J Comp Neurol* 486, 318-330.

Bamford, J., Sandercock, P., Jones, L., i Warlow, C. (1987). The natural history of lacunar infarction: the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke* 18, 545-551.

Bang, O. Y., Lee, J. S., Lee, P. H., i Lee, G. (2005). Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 57, 874-882.

Barami, K., Hao, H. N., Lotoczky, G. A., Diaz, F. G., i Lyman, W. D. (2001). Transplantation of human fetal brain cells into ischemic lesions of adult gerbil hippocampus. *J Neurosurg* 95, 308-315.

Barkho, B. Z., Munoz, A. E., Li, X., Li, L., Cunningham, L. A., i Zhao, X. (2008). Endogenous matrix metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 promote the differentiation and migration of adult neural progenitor cells in response to chemokines. *Stem Cells* 26, 3139-3149.

Beilharz, E. J., Russo, V. C., Butler, G., Baker, N. L., Connor, B., Sirimanne, E. S., Dragunow, M., Werther, G. A., Gluckman, P. D., Williams, C. E., i Scheepens, A. (1998). Co-ordinated and cellular specific induction of the components of the IGF/IGFBP axis in the rat brain following hypoxic-ischemic injury. *Brain Res Mol Brain Res* 59, 119-134.

Berger, O., Li, G., Han, S. M., Paredes, M., i Pleasure, S. J. (2007). Expression of SDF-1 and CXCR4 during reorganization of the postnatal dentate gyrus. *Dev Neurosci* 29, 48-58.

Bible, E., Chau, D. Y., Alexander, M. R., Price, J., Shakesheff, K. M., i Modo, M. (2009). The support of neural stem cells transplanted into stroke-induced brain cavities by PLGA particles. *Biomaterials* 30, 2985-2994.

Biernaskie, J., Chernenko, G., i Corbett, D. (2004). Efficacy of rehabilitative experience declines with time after focal ischemic brain injury. *J Neurosci* 24, 1245-1254.

Bjorklund, A., Dunnett, S. B., Brundin, P., Stoessl, A. J., Freed, C. R., Breeze, R. E., Levivier, M., Peschanski, M., Studer, L., i Barker, R. (2003). Neural transplantation for the treatment of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2, 437-445.

Bjorklund, A., Johansson, B., Stenevi, U., i Svendgaard, N. A. (1975). Re-establishment of functional connections by regenerating central adrenergic and cholinergic axons. *Nature* 253, 446-448.

Bjorklund, A., i Stenevi, U. (1977). Experimental reinnervation of the rat hippocampus by grafted sympathetic ganglia. I. Axonal regeneration along the hippocampal fimbria. *Brain Res* 138, 259-270.

Bjorklund, A., i Stenevi, U. (1979). Reconstruction of the nigrostriatal dopamine pathway by intracerebral nigral transplants. *Brain Res* 177, 555-560.

Bjorklund, L. M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I. Y., McNaught, K. S., Brownell, A. L., Jenkins, B. G., Wahlestedt, C., Kim, K. S., i Isacson, O. (2002).

Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2344-2349.

Bliss, T. M., Kelly, S., Shah, A. K., Foo, W. C., Kohli, P., Stokes, C., Sun, G. H., Ma, M., Masel, J., Kleppner, S. R., *i wsp.* (2006). Transplantation of hNT neurons into the ischemic cortex: cell survival and effect on sensorimotor behavior. *J Neurosci Res* 83, 1004-1014.

Bondy, C. A., i Lee, W. H. (1993). Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci* 692, 33-43.

Bonilla, C., Zurita, M., Otero, L., Aguayo, C., i Vaquero, J. (2009). Delayed intralesional transplantation of bone marrow stromal cells increases endogenous neurogenesis and promotes functional recovery after severe traumatic brain injury. *Brain Inj* 23, 760-769.

Borlongan, C. V., Koutouzis, T. K., Freeman, T. B., Cahill, D. W., i Sanberg, P. R. (1995). Behavioral pathology induced by repeated systemic injections of 3-nitropropionic acid mimics the motoric symptoms of Huntington's disease. *Brain Res* 697, 254-257.

Borlongan, C. V., Tajima, Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., i Sanberg, P. R. (1998a). Cerebral ischemia and CNS transplantation: differential effects of grafted fetal rat striatal cells and human neurons derived from a clonal cell line. *Neuroreport* 9, 3703-3709.

Borlongan, C. V., Tajima, Y., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., i Sanberg, P. R. (1998b). Transplantation of cryopreserved human embryonal carcinoma-derived neurons (NT2N cells) promotes functional recovery in ischemic rats. *Exp Neurol* 149, 310-321.

Brown, J., Cooper-Kuhn, C. M., Kempermann, G., Van Praag, H., Winkler, J., Gage, F. H., i Kuhn, H. G. (2003). Enriched environment and physical activity stimulate hippocampal but not olfactory bulb neurogenesis. *Eur J Neurosci* 17, 2042-2046.

Brundin, P., Nilsson, O. G., Strecker, R. E., Lindvall, O., Astedt, B., i Bjorklund, A. (1986). Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 65, 235-240.

Brundin, P., Pogarell, O., Hagell, P., Piccini, P., Widner, H., Schrag, A., Kupsch, A., Crabb, L., Odin, P., Gustavii, B., *i wsp.* (2000). Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarets in Parkinson's disease. *Brain* 123 (Pt 7), 1380-1390.

Brundin, P., Strecker, R. E., Widner, H., Clarke, D. J., Nilsson, O. G., Astedt, B., Lindvall, O., i Bjorklund, A. (1988). Human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease: immunological aspects, spontaneous and drug-induced behaviour, and dopamine release. *Exp Brain Res* 70, 192-208.

Buhmann, C., Scholz, A., Bernreuther, C., Malik, C. Y., Braun, H., Schachner, M., Reymann, K. G., i Dihne, M. (2006). Neuronal differentiation of transplanted embryonic stem cell-derived precursors in stroke lesions of adult rats. *Brain* 129, 3238-3248.

Buzanska, L., Habich, A., Jurga, M., Sybecka, J., i Domanska-Janik, K. (2005). Human cord blood-derived neural stem cell line--possible implementation in studying neurotoxicity. *Toxicol In Vitro* 19, 991-999.

Buzanska, L., Jurga, M., i Domanska-Janik, K. (2006a). Neuronal differentiation of human umbilical cord blood neural stem-like cell line. *Neurodegener Dis* 3, 19-26.

Buzanska, L., Jurga, M., Stachowiak, E. K., Stachowiak, M. K., i Domanska-Janik, K. (2006b). Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev* 15, 391-406.

Buzanska, L., Machaj, E. K., Zablocka, B., Pojda, Z., i Domanska-Janik, K. (2002). Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro. *J Cell Sci* 115, 2131-2138.

Caldwell, M. A., He, X., i Svendsen, C. N. (2005). 5-Bromo-2'-deoxyuridine is selectively toxic to neuronal precursors in vitro. *Eur J Neurosci* 22, 2965-2970.

Callera, F., i de Melo, C. M. (2007). Magnetic resonance tracking of magnetically labeled autologous bone marrow CD34+ cells transplanted into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with chronic spinal cord injury: CD34+ cells' migration into the injured site. *Stem Cells Dev* 16, 461-466.

Cameron, H. A., i McKay, R. D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J Comp Neurol* 435, 406-417.

Chaturvedi, R. K., Shukla, S., Seth, K., i Agrawal, A. K. (2008). Zuckerkandl's organ improves long-term survival and function of neural stem cell derived dopaminergic neurons in Parkinsonian rats. *Exp Neurol* 210, 608-623.

Chen, B., Gao, X. Q., Yang, C. X., Tan, S. K., Sun, Z. L., Yan, N. H., Pang, Y. G., Yuan, M., Chen, G. J., Xu, G. T., i wsp. (2009a). Neuroprotective effect of grafting GDNF gene-modified neural stem cells on cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1284, 1-11.

Chen, J., Li, Y., Wang, L., Lu, M., Zhang, X., i Chopp, M. (2001). Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *J Neurol Sci* 189, 49-57.

Chen, R., i Ende, N. (2000). The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice. *J Med* 31, 21-30.

Chen, X., Wen, W., Anstey, K. J., i Sachdev, P. S. (2009b). Prevalence, incidence, and risk factors of lacunar infarcts in a community sample. *Neurology* 73, 266-272.

Chiaretti, A., Antonelli, A., Genovese, O., Fernandez, E., Giuda, D., Mariotti, P., i Riccardi, R. (2008). Intraventricular nerve growth factor infusion improves cerebral blood flow and stimulates doublecortin expression in two infants with hypoxic-ischemic brain injury. *Neurol Res* 30, 223-228.

Chintawar, S., Hourez, R., Ravella, A., Gall, D., Orduz, D., Rai, M., Bishop, D. P., Geuna, S., Schiffmann, S. N., i Pandolfo, M. (2009). Grafting neural precursor cells promotes functional recovery in an SCA1 mouse model. *J Neurosci* 29, 13126-13135.

Chohan, M. O., Li, B., Blanchard, J., Tung, Y. C., Heaney, A. T., Rabe, A., Iqbal, K., i Grundke-Iqbal, I. (2009). Enhancement of dentate gyrus neurogenesis, dendritic and synaptic plasticity and memory by a neurotrophic peptide. *Neurobiol Aging*, w druku

Christie, S. D., Sadi, D., i Mendez, I. (2004). Intraspinal transplantation of hNT neurons in the lesioned adult rat spinal cord. *Can J Neurol Sci* 31, 87-96.

- Chung, J., Yamada, M., i Yang, P. C. (2009). Magnetic resonance imaging of human embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol Chapter 5*, Unit 5A 3.
- Cicchetti, F., Saporta, S., Hauser, R. A., Parent, M., Saint-Pierre, M., Sanberg, P. R., Li, X. J., Parker, J. R., Chu, Y., Mufson, E. J., i *wsp.* (2009). Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 12483-12488.
- Clelland, C. D., Barker, R. A., i Watts, C. (2008). Cell therapy in Huntington disease. *Neurosurg Focus* 24, E9.
- Coenen, M., Kogler, G., Wernet, P., i Brustle, O. (2005). Transplantation of human umbilical cord blood-derived adherent progenitors into the developing rodent brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 681-688.
- Cohen, M. E., Muja, N., Fainstein, N., Bulte, J. W., i Ben-Hur, T. (2010). Conserved fate and function of ferumoxides-labeled neural precursor cells in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 88, 936-944.
- Coyle, J. T., i Schwarcz, R. (1976). Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. *Nature* 263, 244-246.
- Czech, K. A., Ryan, J. W., Sagen, J., i Pappas, G. D. (1997). The influence of xenotransplant immunogenicity and immunosuppression on host MHC expression in the rat CNS. *Exp Neurol* 147, 66-83.
- Daadi, M. M., Lee, S. H., Arac, A., Grueter, B. A., Bhatnagar, R., Maag, A. L., Schaar, B., Malenka, R. C., Palmer, T. D., i Steinberg, G. K. (2009). Functional Engraftment of the Medial Ganglionic Eminence Cells in Experimental Stroke Model. *Cell Transplant* 18, 815-826.
- Daadi, M. M., Maag, A. L., i Steinberg, G. K. (2008). Adherent self-renewable human embryonic stem cell-derived neural stem cell line: functional engraftment in experimental stroke model. *PLoS ONE* 3, e1644.
- Das, G. D., i Altman, J. (1971). Transplanted precursors of nerve cells: their fate in the cerebellums of young rats. *Science* 173, 637-638.
- Dasari, V. R., Spomar, D. G., Cady, C., Gujrati, M., Rao, J. S., i Dinh, D. H. (2007a). Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res* 32, 2080-2093.
- Dasari, V. R., Spomar, D. G., Gondi, C. S., Sloffer, C. A., Saving, K. L., Gujrati, M., Rao, J. S., i Dinh, D. H. (2007b). Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 24, 391-410.
- de Vries, I. J., Lesterhuis, W. J., Barentsz, J. O., Verdijk, P., van Krieken, J. H., Boerman, O. C., Oyen, W. J., Bonenkamp, J. J., Boezeman, J. B., Adema, G. J., i *wsp.* (2005). Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol* 23, 1407-1413.
- Deda, H., Inci, M. C., Kurekci, A. E., Sav, A., Kayihan, K., Ozgun, E., Ustunsoy, G. E., i Kocabay, S. (2009). Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up. *Cytotherapy* 11, 18-25.

Delcroix, G. J., Schiller, P. C., Benoit, J. P., i Montero-Menei, C. N. (2010). Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering. *Biomaterials* 31, 2105-2020.

Denes, A., Vidyasagar, R., Feng, J., Narvainen, J., McColl, B. W., Kauppinen, R. A., i Allan, S. M. (2007). Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1941-1953.

Dhar, S., Yoon, E. S., Kachgal, S., i Evans, G. R. (2007). Long-term maintenance of neuronally differentiated human adipose tissue-derived stem cells. *Tissue Eng* 13, 2625-2632.

Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., i wsp. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-1221.

Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., i Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.

Domanska-Janik, K., Kotulska, K., Habich, A., Kmiec, T., Sarnowska. A., Janowski, M., Oldak. T., Kropiwnicki, T., Jurkiewicz, E., Litwin, M., i wsp. (2009). Intraventricular transplantation of autologous umbilical cord blood (UCB)-derived cells for global hypoxic-ischemic brain injury - a case report. 2nd International Congress on Responsible Stem Cell Research, Monaco, November 26-28, 2009

Drummond, J. C., Piyash, P. M., i Kimbro, J. R. (2000). Neuroprotection failure in stroke. *Lancet* 356, 1032-1033.

Duinsbergen, D., Salvatori, D., Eriksson, M., i Mikkers, H. (2009). Tumors originating from induced pluripotent stem cells and methods for their prevention. *Ann N Y Acad Sci* 1176, 197-204.

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

Fan, L., Du, F., Cheng, B. C., Peng, H., i Liu, S. Q. (2008). Migration and distribution of bone marrow stromal cells in injured spinal cord with different transplantation techniques. *Chin J Traumatol* 11, 94-97.

Fiedler, J., Brill, C., Blum, W. F., i Brenner, R. E. (2006). IGF-I and IGF-II stimulate directed cell migration of bone-marrow-derived human mesenchymal progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 1177-1183.

Fink, J. S., Schumacher, J. M., Elias, S. L., Palmer, E. P., Saint-Hilaire, M., Shannon, K., Penn, R., Starr, P., VanHorne, C., Kott, H. S., i wsp. (2000). Porcine xenografts in Parkinson's disease and Huntington's disease patients: preliminary results. *Cell Transplant* 9, 273-278.

Flanagan, L. A., Rebaza, L. M., Derzic, S., Schwartz, P. H., i Monuki, E. S. (2006). Regulation of human neural precursor cells by laminin and integrins. *J Neurosci Res* 83, 845-856.

Forsberg-Nilsson, K., Behar, T. N., Afrakhte, M., Barker, J. L., i McKay, R. D. (1998). Platelet-derived growth factor induces chemotaxis of neuroepithelial stem cells. *J Neurosci Res* 53, 521-530.

Freed, C. R., Greene, P. E., Breeze, R. E., Tsai, W. Y., DuMouchel, W., Kao, R., Dillon, S., Winfield, H., Culver, S., Trojanowski, J. Q., i wsp. (2001). Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 344, 710-719.

Freed, W. J., Cannon-Spoor, H. E., i Krauthamer, E. (1986). Intrastriatal adrenal medulla grafts in rats. Long-term survival and behavioral effects. *J Neurosurg* 65, 664-670.

Fricker-Gates, R. A., Muir, J. A., i Dunnett, S. B. (2004). Transplanted hNT cells ("LBS neurons") in a rat model of huntington's disease: good survival, incomplete differentiation, and limited functional recovery. *Cell Transplant* 13, 123-136.

Frost, S. B., Barbay, S., Mumert, M. L., Stowe, A. M., i Nudo, R. J. (2006). An animal model of capsular infarct: endothelin-1 injections in the rat. *Behav Brain Res* 169, 206-211.

Garbuzova-Davis, S., Willing, A. E., Desjarlais, T., Davis Sanberg, C., i Sanberg, P. R. (2005). Transplantation of human umbilical cord blood cells benefits an animal model of Sanfilippo syndrome type B. *Stem Cells Dev* 14, 384-394.

Garbuzova-Davis, S., Willing, A. E., Zigova, T., Saporta, S., Justen, E. B., Lane, J. C., Hudson, J. E., Chen, N., Davis, C. D., i Sanberg, P. R. (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, 255-270.

Garzotto, D., Giacobini, P., Crepaldi, T., Fasolo, A., i De Marchis, S. (2008). Hepatocyte growth factor regulates migration of olfactory interneuron precursors in the rostral migratory stream through Met-Grb2 coupling. *J Neurosci* 28, 5901-5909.

Georges-Labouesse, E., Mark, M., Messaddeq, N., i Gansmuller, A. (1998). Essential role of alpha 6 integrins in cortical and retinal lamination. *Curr Biol* 8, 983-986.

Gil, J., Vazquez, M. C., Ketzoian, C., Perna, A., Marin, B., Preux, P. M., i Couratier, P. (2009). Prognosis of ALS: Comparing data from the Limousin referral centre, France, and a Uruguayan population. *Amyotroph Lateral Scler*, 10, 355-360

Goetz, C. G., Stebbins, G. T., 3rd, Klawans, H. L., Koller, W. C., Grossman, R. G., Bakay, R. A., i Penn, R. D. (1991). United Parkinson Foundation Neurotransplantation Registry on adrenal medullary transplants: presurgical, and 1- and 2-year follow-up. *Neurology* 41, 1719-1722.

Gornicka-Pawlak, E., Jablonska, A., Chylinski, A., i Domanska-Janik, K. (2009). Housing conditions influence motor functions and exploratory behavior following focal damage of the rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 69, 62-72.

Gould, E., i Tanapat, P. (1997). Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80, 427-436.

Green, C. J., i Allison, A. C. (1978). Extensive prolongation of rabbit kidney allograft survival after short-term cyclosporin-A treatment. *Lancet* 1, 1182-1183.

Gu, W., Brannstrom, T., Jiang, W., Bergh, A., i Wester, P. (2001). Vascular endothelial growth factor-A and -C protein up-regulation and early angiogenesis in a rat

photothrombotic ring stroke model with spontaneous reperfusion. *Acta Neuropathol* 102, 216-226.

Guzman, R., Bliss, T., De Los Angeles, A., Moseley, M., Palmer, T., i Steinberg, G. (2008). Neural progenitor cells transplanted into the uninjured brain undergo targeted migration after stroke onset. *J Neurosci Res* 86, 873-882.

Habich, A., Jurga, M., Markiewicz, I., Lukomska, B., Bany-Laszewicz, U., i Domanska-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.

Habisch, H. J., Fiedler, J., Ludolph, A. C., Storch, A., i Brenner, R. E. (2008). Altered migration and adhesion potential of pro-neurally converted human bone marrow stromal cells. *Cytotherapy* 10, 824-833.

Habisch, H. J., Janowski, M., Binder, D., Kuzma-Kozakiewicz, M., Widmann, A., Habich, A., Schwalenstocker, B., Hermann, A., Brenner, R., Lukomska, B., i *wsp.* (2007). Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *J Neural Transm* 114, 1395-1406.

Harrower, T. P., i Barker, R. A. (2004). The emerging technologies of neural xenografting and stem cell transplantation for treating neurodegenerative disorders. *Drugs Today (Barc)* 40, 171-189.

Harvey, R. L., i Chopp, M. (2003). The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 14, S143-151.

Hatzopoulos, A. K., Folkman, J., Vasile, E., Eiselen, G. K., i Rosenberg, R. D. (1998). Isolation and characterization of endothelial progenitor cells from mouse embryos. *Development* 125, 1457-1468.

Hauser, R. A., Furtado, S., Cimino, C. R., Delgado, H., Eichler, S., Schwartz, S., Scott, D., Nauert, G. M., Soety, E., Sossi, V., i *wsp.* (2002). Bilateral human fetal striatal transplantation in Huntington's disease. *Neurology* 58, 687-695.

Hayashi, J., Takagi, Y., Fukuda, H., Imazato, T., Nishimura, M., Fujimoto, M., Takahashi, J., Hashimoto, N., i Nozaki, K. (2006). Primate embryonic stem cell-derived neuronal progenitors transplanted into ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 906-914.

He, Z., Yamawaki, T., Yang, S., Day, A. L., Simpkins, J. W., i Naritomi, H. (1999). Experimental model of small deep infarcts involving the hypothalamus in rats: changes in body temperature and postural reflex. *Stroke* 30, 2743-2751.

He, Z., Yang, S. H., Naritomi, H., Yamawaki, T., Liu, Q., King, M. A., Day, A. L., i Simpkins, J. W. (2000). Definition of the anterior choroidal artery territory in rats using intraluminal occluding technique. *J Neurol Sci* 182, 16-28.

Henning, T. D., Wendland, M. F., Golovko, D., Sutton, E. J., Sennino, B., Malek, F., Bauer, J. S., McDonald, D. M., i Daldrup-Link, H. (2009). Relaxation effects of ferucarbotran-labeled mesenchymal stem cells at 1.5T and 3T: discrimination of viable from lysed cells. *Magn Reson Med* 62, 325-332.

Hess, D. C., i Borlongan, C. V. (2008). Stem cells and neurological diseases. *Cell Prolif* 41 Suppl 1, 94-114.

Hicks, A. U., Lappalainen, R. S., Narkilahti, S., Suuronen, R., Corbett, D., Sivenius, J., Hovatta, O., i Jolkonen, J. (2009). Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. *Eur J Neurosci* 29, 562-574.

Higuchi, T., Anton, M., Dumler, K., Seidl, S., Pelisek, J., Saraste, A., Welling, A., Hofmann, F., Oostendorp, R. A., Gansbacher, B., i *wsp.* (2009). Combined Reporter Gene PET and Iron Oxide MRI for Monitoring Survival and Localization of Transplanted Cells in the Rat Heart. *J Nucl Med* 50, 1881-1886.

Hoffmann, O., Mahrhofer, C., Rueter, N., Freyer, D., Bert, B., Fink, H., i Weber, J. R. (2007). Pneumococcal cell wall-induced meningitis impairs adult hippocampal neurogenesis. *Infect Immun* 75, 4289-4297.

Hofmeijer, J., Veldhuis, W. B., Schepers, J., Nicolay, K., Kappelle, L. J., Bar, P. R., i van der Worp, H. B. (2004). The time course of ischemic damage and cerebral perfusion in a rat model of space-occupying cerebral infarction. *Brain Res* 1013, 74-82.

Hsiao, K., i Prusiner, S. B. (1991). Molecular genetics and transgenic model of Gertsmann-Straussler-Scheinker disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 5, 155-162.

Hu, D. Z., Zhou, L. F., i Zhu, J. H. (2004). Marrow stromal cells administrated intracisternally to rats after traumatic brain injury migrate into the brain and improve neurological function. *Chin Med J (Engl)* 117, 1576-1578.

Hughes, P. M., Anthony, D. C., Ruddin, M., Botham, M. S., Rankine, E. L., Sablone, M., Baumann, D., Mir, A. K., i Perry, V. H. (2003). Focal lesions in the rat central nervous system induced by endothelin-1. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1276-1286.

Irons, H., Lind, J. G., Wakade, C. G., Yu, G., Hadman, M., Carroll, J., Hess, D. C., i Borlongan, C. V. (2004). Intracerebral xenotransplantation of GFP mouse bone marrow stromal cells in intact and stroke rat brain: graft survival and immunologic response. *Cell Transplant* 13, 283-294.

Jablonka, J. A., Witte, O. W., i Kossut, M. (2007). Photothrombotic infarct impairs experience-dependent plasticity in neighboring cortex. *Neuroreport* 18, 165-169.

Jackson, J., Chapon, C., Jones, W., Hirani, E., Qassim, A., i Bhakoo, K. (2009). In vivo multimodal imaging of stem cell transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *J Neurosci Methods* 183, 141-148.

Jaholkowski, P., Kiryk, A., Jedynak, P., Ben Abdallah, N. M., Knapska, E., Kowalczyk, A., Piechal, A., Blecharz-Klin, K., Figiel, I., Lioudyno, V., i *wsp.* (2009). New hippocampal neurons are not obligatory for memory formation; cyclin D2 knockout mice with no adult brain neurogenesis show learning. *Learn Mem* 16, 439-451.

Janowski, M. (2009). Functional diversity of SDF-1 splicing variants. *Cell Adh Migr* 3, 243-249.

Janowski, M., i Date, I. (2009). Systemic neurotransplantation - a problem-oriented systematic review. *Rev Neurosci* 20, 39-60.

Janowski, M., Gornicka-Pawlak, E., Kozłowska, H., Domanska-Janik, K., Gielecki, J., i Lukomska, B. (2008a). Structural and functional characteristic of a model for deep-seated lacunar infarct in rats. *J Neurol Sci* 273, 40-48.

Janowski, M., Kmiec, T., Jurkiewicz, E., Kropiwnicki, T., Habich, A., Kotulska, K., Jelonek, E., Sarnowska, A., Litwin, M., Boruckowski, D., *i wsp.* (2009). Human umbilical cord blood-derivatives for treatment of global cerebral ischemic injury in one year old child – a case study” 19th Annual Meeting of NECTAR (Network of European CNS Transplantation and Restoration), Cardiff, UK, November 26-28, 2009

Janowski, M., Kuzma-Kozakiewicz, M., Binder, D., Habisch, H. J., Habich, A., Lukomska, B., Domanska-Janik, K., Ludolph, A. C., i Storch, A. (2008b). Neurotransplantation in mice: the concorde-like position ensures minimal cell leakage and widespread distribution of cells transplanted into the cisterna magna. *Neurosci Lett* 430, 169-174.

Janowski, M., Walczak, P., i Date, I. (2010) Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem Cells Dev* 19, 5-16.

Janson, C. G., Ramesh, T. M., During, M. J., Leone, P., i Heywood, J. (2001). Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J Hematother Stem Cell Res* 10, 913-915.

Jiang, J., McMurtry, J., Niedzwiecki, D., i Goldman, S. A. (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, 1-15.

Jiang, L., Newman, M., Saporta, S., Chen, N., Sanberg, C., Sanberg, P. R., i Willing, A. E. (2008). MIP-1alpha and MCP-1 Induce Migration of Human Umbilical Cord Blood Cells in Models of Stroke. *Curr Neurovasc Res* 5, 118-124.

Jin, K., Minami, M., Lan, J. Q., Mao, X. O., Batteur, S., Simon, R. P., i Greenberg, D. A. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 4710-4715.

Jin, K., Sun, Y., Xie, L., Mao, X. O., Childs, J., Peel, A., Logvinova, A., Banwait, S., i Greenberg, D. A. (2005). Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol Dis* 18, 366-374.

Jin, K., Zhu, Y., Sun, Y., Mao, X. O., Xie, L., i Greenberg, D. A. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 11946-11950.

Jo, A. Y., Kim, M. Y., Lee, H. S., Rhee, Y. H., Lee, J. E., Baek, K. H., Park, C. H., Koh, H. C., Shin, I., Lee, Y. S., i Lee, S. H. (2009). Generation of dopamine neurons with improved cell survival and phenotype maintenance using a degradation-resistant nurr1 mutant. *Stem Cells* 27, 2238-2246.

Johnson, P. J., Tatara, A., Shiu, A., i Sakiyama-Elbert, S. E. (2010). Controlled release of neurotrophin-3 and platelet derived growth factor from fibrin scaffolds containing neural progenitor cells enhances survival and differentiation into neurons in a subacute model of SCI. *Cell Transplant* 19, 89-101.

Jordan, P. M., Ojeda, L. D., Thonhoff, J. R., Gao, J., Boehning, D., Yu, Y., i Wu, P. (2009). Generation of spinal motor neurons from human fetal brain-derived neural stem cells: role of basic fibroblast growth factor. *J Neurosci Res* 87, 318-332.

Jurga, M., Lipkowski, A. W., Lukomska, B., Buzanska, L., Kurzepa, K., Sobanski, T., Habich, A., Coecke, S., Gajkowska, B., i Domanska-Janik, K. (2009). Generation of Functional Neural Artificial Tissue from Human Umbilical Cord Blood Stem Cells. *Tissue Eng Part C Methods* 15, 365-372.

Kaminska, B., Gozdz, A., Zawadzka, M., Ellert-Miklaszewska, A., i Lipko, M. (2009). MAPK signal transduction underlying brain inflammation and gliosis as therapeutic target. *Anat Rec (Hoboken)* 292, 1902-1913.

Kaplan, M. S., i Hinds, J. W. (1977). Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197, 1092-1094.

Kaplan, R. N., Psaila, B., i Lyden, D. (2007). Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med* 13, 72-81.

Karki, K., Knight, R. A., Han, Y., Yang, D., Zhang, J., Ledbetter, K. A., Chopp, M., i Seyfried, D. M. (2009). Simvastatin and atorvastatin improve neurological outcome after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 40, 3384-3389.

Kassis, I., Grigoriadis, N., Gowda-Kurkalli, B., Mizrachi-Kol, R., Ben-Hur, T., Slavin, S., Abramsky, O., i Karussis, D. (2008). Neuroprotection and immunomodulation with mesenchymal stem cells in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Arch Neurol* 65, 753-761.

Kaufmann, P., Thompson, J. L., Levy, G., Buchsbaum, R., Shefner, J., Krivickas, L. S., Katz, J., Rollins, Y., Barohn, R. J., Jackson, C. E., i *wsp.* (2009). Phase II trial of CoQ10 for ALS finds insufficient evidence to justify phase III. *Ann Neurol* 66, 235-244.

Ke, Y. Q., Hu, C. C., Jiang, X. D., Yang, Z. J., Zhang, H. W., Ji, H. M., Zhou, L. Y., Cai, Y. Q., Qin, L. S., i Xu, R. X. (2009). In vivo magnetic resonance tracking of Feridex-labeled bone marrow-derived neural stem cells after autologous transplantation in rhesus monkey. *J Neurosci Methods* 179, 45-50.

Keene, C. D., Chang, R. C., Leverenz, J. B., Kopyov, O., Perlman, S., Hevner, R. F., Born, D. E., Bird, T. D., i Montine, T. J. (2009). A patient with Huntington's disease and long-surviving fetal neural transplants that developed mass lesions. *Acta Neuropathol* 117, 329-338.

Kelly, C. M., Precious, S. V., Scherf, C., Penketh, R., Amso, N. N., Battersby, A., Allen, N. D., Dunnett, S. B., i Rosser, A. E. (2009). Neonatal desensitization allows long-term survival of neural xenotransplants without immunosuppression. *Nat Methods* 6, 271-273.

Kelly, S., Bliss, T. M., Shah, A. K., Sun, G. H., Ma, M., Foo, W. C., Masel, J., Yenari, M. A., Weissman, I. L., Uchida, N., i *wsp.* (2004). Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11839-11844.

Kendall, S. E., Najbauer, J., Johnston, H. F., Metz, M. Z., Li, S., Bowers, M., Garcia, E., Kim, S. U., Barish, M. E., Aboody, K. S., i Glackin, C. A. (2008). Neural stem cell targeting of glioma is dependent on phosphoinositide 3-kinase signaling. *Stem Cells* 26, 1575-1586.

Kim, D., Chun, B. G., Kim, Y. K., Lee, Y. H., Park, C. S., Jeon, I., Cheong, C., Hwang, T. S., Chung, H., Gwag, B. J., *i wsp.* (2008). In vivo tracking of human mesenchymal stem cells in experimental stroke. *Cell Transplant* 16, 1007-1012.

Kim, H. M., Hwang, D. H., Lee, J. E., Kim, S. U., i Kim, B. G. (2009a). Ex vivo VEGF delivery by neural stem cells enhances proliferation of glial progenitors, angiogenesis, and tissue sparing after spinal cord injury. *PLoS One* 4, e4987.

Kim, S. J., Shin, Y. W., Yang, K. H., Kim, S. B., Yoo, M. J., Han, S. K., Im, S. A., Won, Y. D., Sung, Y. B., Jeon, T. S., *i wsp.* (2009b). A multi-center, randomized, clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast(Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord* 10, 20.

Kizhakke Madathil, S., Evans, H. N., i Saatman, K. E. (2010). Temporal and regional changes in IGF-1/IGF-1R signaling in the mouse brain following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 27:95-107.

Kleppner, S. R., Robinson, K. A., Trojanowski, J. Q., i Lee, V. M. (1995). Transplanted human neurons derived from a teratocarcinoma cell line (NTera-2) mature, integrate, and survive for over 1 year in the nude mouse brain. *J Comp Neurol* 357, 618-632.

Kokaia, Z., i Lindvall, O. (2003). Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol* 13, 127-132.

Kondziolka, D., Steinberg, G. K., Wechsler, L., Meltzer, C. C., Elder, E., Gebel, J., Decesare, S., Jovin, T., Zafonte, R., Lebowitz, J., *i wsp.* (2005). Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 103, 38-45.

Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Meltzer, C., Thulborn, K. R., Gebel, J., Jannetta, P., DeCesare, S., Elder, E. M., McGrogan, M., *i wsp.* (2000). Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 55, 565-569.

Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., i Olanow, C. W. (2008a). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14, 504-506.

Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Olanow, C. W., i Freeman, T. B. (2008b). Transplanted dopaminergic neurons develop PD pathologic changes: a second case report. *Mov Disord* 23, 2303-2306.

Kozłowska, H., Jablonka, J., Janowski, M., Jurga, M., Kossut, M., i Domanska-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, 481-488.

Kremer, C., Breier, G., Risau, W., i Plate, K. H. (1997). Up-regulation of flk-1/vascular endothelial growth factor receptor 2 by its ligand in a cerebral slice culture system. *Cancer Res* 57, 3852-3859.

Krupinski, J., Issa, R., Bujny, T., Slevin, M., Kumar, P., Kumar, S., i Kaluza, J. (1997). A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke* 28, 564-573.

Kuci, S., Kuci, Z., Schmid, S., Seitz, G., Muller, I., Dufke, A., Leimig, T., Murti, G., Jurecic, R., Schumm, M., *i wsp.* (2008). Efficient in vitro generation of adult multipotent cells from mobilized peripheral blood CD133+ cells. *Cell Prolif* 41, 12-27.

Kucia, M., Wysoczynski, M., Ratajczak, J., i Ratajczak, M. Z. (2008). Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res* 331, 125-134.

Kucia, M., Zhang, Y. P., Reca, R., Wysoczynski, M., Machalinski, B., Majka, M., Ildstad, S. T., Ratajczak, J., Shields, C. B., i Ratajczak, M. Z. (2006). Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. *Leukemia* 20, 18-28.

Kuroiwa, T., Xi, G., Hua, Y., Nagaraja, T. N., Fenstermacher, J. D., i Keep, R. F. (2009). Development of a rat model of photothrombotic ischemia and infarction within the caudoputamen. *Stroke* 40, 248-253.

Lajtha, L. G. (1979). Haemopoietic stem cells: concept and definitions. *Blood Cells* 5, 447-455.

Lan, F., Xu, J., Zhang, X., Wong, V. W., Li, X., Lu, A., Lu, W., Shen, L., i Li, L. (2008). Hepatocyte growth factor promotes proliferation and migration in immortalized progenitor cells. *Neuroreport* 19, 765-769.

Lastilla, M. (2006). Lacunar infarct. *Clin Exp Hypertens* 28, 205-215.

Lavdas, A. A., Papastefanaki, F., Thomaidou, D., i Matsas, R. (2008). Schwann cell transplantation for CNS repair. *Curr Med Chem* 15, 151-160.

Lecrux, C., McCabe, C., Weir, C. J., Gallagher, L., Mullin, J., Touzani, O., Muir, K. W., Lees, K. R., i Macrae, I. M. (2008). Effects of magnesium treatment in a model of internal capsule lesion in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 39, 448-454.

Lee, J. K., Jin, H. K., Endo, S., Schuchman, E. H., Carter, J. E., i Bae, J. S. (2010). Intracerebral Transplantation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reduces Amyloid-Beta Deposition and Rescues Memory Deficits in Alzheimer's Disease Mice by Modulation of Immune Responses. *Stem Cells* 28, 329-343.

Lee, J. P., Tsai, D. J., In Park, K., Harvey, A. R., i Snyder, E. Y. (2009). The dynamics of long-term transgene expression in engrafted neural stem cells. *J Comp Neurol* 515, 83-92.

Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L., i Chen, T. H. (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 103, 1669-1675.

Lee, S. H., Kim, Y. H., Kim, Y. J., i Yoon, B. W. (2008). Enforced physical training promotes neurogenesis in the subgranular zone after focal cerebral ischemia. *J Neurol Sci* 269, 54-61.

Lee, W. H., i Bondy, C. (1993). Insulin-like growth factors and cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci* 679, 418-422.

Leker, R. R., Lasri, V., i Chernoguz, D. (2009). Growth factors improve neurogenesis and outcome after focal cerebral ischemia. *J Neural Transm* 116, 1397-1402.

Lennmyr, F., Ata, K. A., Funa, K., Olsson, Y., i Terent, A. (1998). Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors (Flt-1 and Flk-1) following permanent and transient occlusion of the middle cerebral artery in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol* 57, 874-882.

Leone, D. P., Relvas, J. B., Campos, L. S., Hemmi, S., Brakebusch, C., Fassler, R., French-Constant, C., i Suter, U. (2005). Regulation of neural progenitor proliferation and survival by beta1 integrins. *J Cell Sci* 118, 2589-2599.

Li, Y., Chen, J., i Chopp, M. (2001). Adult bone marrow transplantation after stroke in adult rats. *Cell Transplant* 10, 31-40.

Li, Y., Chen, J., Zhang, C. L., Wang, L., Lu, D., Katakowski, M., Gao, Q., Shen, L. H., Zhang, J., Lu, M., i Chopp, M. (2005). Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia* 49, 407-417.

Li, Y., i Chopp, M. (2009). Marrow stromal cell transplantation in stroke and traumatic brain injury. *Neurosci Lett* 456, 120-123.

Li, Y., Chopp, M., Chen, J., Wang, L., Gautam, S. C., Xu, Y. X., i Zhang, Z. (2000). Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1311-1319.

Lindvall, O., Backlund, E. O., Farde, L., Sedvall, G., Freedman, R., Hoffer, B., Nobin, A., Seiger, A., i Olson, L. (1987). Transplantation in Parkinson's disease: two cases of adrenal medullary grafts to the putamen. *Ann Neurol* 22, 457-468.

Lindvall, O., Bjorklund, A., Hokfelt, T., i Ljungdahl, A. (1973). Application of the glyoxylic acid method to vibratome sections for the improved visualization of central catecholamine neurons. *Histochemie* 35, 31-38.

Lindvall, O., Brundin, P., Widner, H., Rehnström, S., Gustavii, B., Frackowiak, R., Leenders, K. L., Sawle, G., Rothwell, J. C., Marsden, C. D., i wsp. (1990). Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 247, 574-577.

Lindvall, O., Rehnström, S., Gustavii, B., Brundin, P., Astedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Bjorklund, A., Leenders, K. L., Rothwell, J. C., i wsp. (1988). Fetal dopamine-rich mesencephalic grafts in Parkinson's disease. *Lancet* 2, 1483-1484.

Liu, H., Honmou, O., Harada, K., Nakamura, K., Houkin, K., Hamada, H., i Kocsis, J. D. (2006). Neuroprotection by PIGF gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischaemia. *Brain* 129, 2734-2745.

Liu, J., i Huang, H. Y. (2007). How to improve the survival of the fetal ventral mesencephalic cell transplanted in Parkinson's disease? *Neurosci Bull* 23, 377-382.

Liu, J., Solway, K., Messing, R. O., i Sharp, F. R. (1998). Increased neurogenesis in the dentate gyrus after transient global ischemia in gerbils. *J Neurosci* 18, 7768-7778.

Liu, Z., Fan, Y., Won, S. J., Neumann, M., Hu, D., Zhou, L., Weinstein, P. R., i Liu, J. (2007). Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia. *Stroke* 38, 146-152.

Liu, Z., Li, Y., Zhang, X., Savant-Bhonsale, S., i Chopp, M. (2008). Contralateral axonal remodeling of the corticospinal system in adult rats after stroke and bone marrow stromal cell treatment. *Stroke* 39, 2571-2577.

Lu, D., Mahmood, A., Qu, C., Goussev, A., Lu, M., i Chopp, M. (2004). Atorvastatin reduction of intracranial hematoma volume in rats subjected to controlled cortical impact. *J Neurosurg* 101, 822-825.

Maciaczyk, J., Singec, I., Maciaczyk, D., Klein, A., i Nikkhah, G. (2009). Restricted spontaneous in vitro differentiation and region-specific migration of long-term expanded fetal human neural precursor cells after transplantation into the adult rat brain. *Stem Cells Dev* 18, 1043-1058.

Mackay-Sim, A., Feron, F., Cochrane, J., Bassingthwaite, L., Bayliss, C., Davies, W., Fronek, P., Gray, C., Kerr, G., Licina, P., i wsp. (2008). Autologous olfactory ensheathing cell transplantation in human paraplegia: a 3-year clinical trial. *Brain* 131, 2376-2386.

Madrazo, I., Drucker-Colin, R., Diaz, V., Martinez-Mata, J., Torres, C., i Becerril, J. J. (1987). Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med* 316, 831-834.

Magnitsky, S., Watson, D. J., Walton, R. M., Pickup, S., Bulte, J. W., Wolfe, J. H., i Poptani, H. (2005). In vivo and ex vivo MRI detection of localized and disseminated neural stem cell grafts in the mouse brain. *Neuroimage* 26, 744-754.

Makar, T. K., Bever, C. T., Singh, I. S., Royal, W., Sahu, S. N., Sura, T. P., Sultana, S., Sura, K. T., Patel, N., Dhib-Jalbut, S., i Trisler, D. (2009). Brain-derived neurotrophic factor gene delivery in an animal model of multiple sclerosis using bone marrow stem cells as a vehicle. *J Neuroimmunol* 210, 40-51.

Makar, T. K., Trisler, D., Bever, C. T., Goolsby, J. E., Sura, K. T., Balasubramanian, S., Sultana, S., Patel, N., Ford, D., Singh, I. S., i wsp. (2008). Stem cell based delivery of IFN-beta reduces relapses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 196, 67-81.

Manganas, L. N., Zhang, X., Li, Y., Hazel, R. D., Smith, S. D., Wagshul, M. E., Henn, F., Benveniste, H., Djuric, P. M., Enikolopov, G., i Maletic-Savatic, M. (2007). Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. *Science* 318, 980-985.

Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Leach, H., Davies, S. W., i Bates, G. P. (1996). Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell* 87, 493-506.

Maschhoff, K. L., i Baldwin, H. S. (2000). Molecular determinants of neural crest migration. *Am J Med Genet* 97, 280-288.

Matsumori, A., Takano, H., Obata, J. E., Takeda, S., Tsuyuguchi, N., Ono, K., Okada, M., Miyamoto, T., Ohnishi, T., Daikuhara, Y., i Sasayama, S. (2002). Circulating hepatocyte growth factor as a diagnostic marker of thrombus formation in patients with cerebral infarction. *Circ J* 66, 216-218.

Maurer, M. H., Tripps, W. K., Feldmann, R. E., Jr., i Kuschinsky, W. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci Lett* 344, 165-168.

McGuckin, C., Forraz, N., Baradez, M. O., Basford, C., Dickinson, A. M., Navran, S., i Hartgerink, J. D. (2006). Embryonic-like stem cells from umbilical cord blood and potential for neural modeling. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 66, 321-329.

Mendez, I., Dagher, A., Hong, M., Gaudet, P., Weerasinghe, S., McAlister, V., King, D., Desrosiers, J., Darvesh, S., Acorn, T., i Robertson, H. (2002). Simultaneous intrastriatal and intranigral fetal dopaminergic grafts in patients with Parkinson disease: a pilot study. Report of three cases. *J Neurosurg* 96, 589-596.

Mendez, I., Sanchez-Pernaute, R., Cooper, O., Vinuela, A., Ferrari, D., Bjorklund, L., Dagher, A., i Isacson, O. (2005). Cell type analysis of functional fetal dopamine cell suspension transplants in the striatum and substantia nigra of patients with Parkinson's disease. *Brain* 128, 1498-1510.

Mignone, J. L., Roig-Lopez, J. L., Fedtsova, N., Schones, D. E., Manganas, L. N., Maletic-Savatic, M., Keyes, W. M., Mills, A. A., Gleiberman, A., Zhang, M. Q., i Enikolopov, G. (2007). Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell Cycle* 6, 2161-2170.

Molcanyi, M., Riess, P., Haj-Yasein, N. N., Bentz, K., Loehr, M., Kuchta, J., Zivcak, J., Stenzel, W., Miletic, H., Hescheler, J., *i wsp.* (2009). Developmental potential of the murine embryonic stem cells transplanted into the healthy rat brain--novel insights into tumorigenesis. *Cell Physiol Biochem* 24, 87-94.

Molina, H., Quinones, R., Ortega, I., Alvarez, L., Munoz, J., Gonzalez, C., i Suarez, C. (1993). Computer assisted CT-guided stereotactic transplantation of foetal ventral mesencephalon to the caudate nucleus and putamen in Parkinson's disease. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 58, 17-19.

Moriyama, H., Kawawaki, J., Okina, M., Sakai, H., Notomi, T., Sawada, M., i Kuno, M. (2008). Early and late activation of the voltage-gated proton channel during lactic acidosis through pH-dependent and -independent mechanisms. *Pflugers Arch* 455, 829-838.

Moriyama, J. M., Nakamura, R. K., Freed, W. J., Mishkin, M., i Wyatt, R. J. (1984). Adrenal medulla grafts survive and exhibit catecholamine-specific fluorescence in the primate brain. *Exp Neurol* 84, 643-653.

Murase, S., i Horwitz, A. F. (2002). Deleted in colorectal carcinoma and differentially expressed integrins mediate the directional migration of neural precursors in the rostral migratory stream. *J Neurosci* 22, 3568-3579.

Na, I. K., Scheibenbogen, C., Adam, C., Stroux, A., Ghadjar, P., Thiel, E., Keilholz, U., i Coupland, S. E. (2008). Nuclear expression of CXCR4 in tumor cells of non-small cell lung cancer is correlated with lymph node metastasis. *Hum Pathol* 39, 1751-1755.

Nagayama, T., Nagayama, M., Kohara, S., Kamiguchi, H., Shibuya, M., Katoh, Y., Itoh, J., i Shinohara, Y. (2004). Post-ischemic delayed expression of hepatocyte growth factor and c-Met in mouse brain following focal cerebral ischemia. *Brain Res* 999, 155-166.

Nelson, P. T., Kondziolka, D., Wechsler, L., Goldstein, S., Gebel, J., DeCesare, S., Elder, E. M., Zhang, P. J., Jacobs, A., McGrogan, M., *i wsp.* (2002). Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am J Pathol* 160, 1201-1206.

Newman, M. B., Willing, A. E., Manresa, J. J., Davis-Sanberg, C., i Sanberg, P. R. (2005). Stroke-induced migration of human umbilical cord blood cells: time course and cytokines. *Stem Cells Dev* 14, 576-586.

Nishino, H., Koide, K., Aihara, N., Kumazaki, M., Sakurai, T., i Nagai, H. (1993). Striatal grafts in the ischemic striatum improve pallidal GABA release and passive avoidance. *Brain Res Bull* 32, 517-520.

Nishio, Y., Koda, M., Kamada, T., Someya, Y., Yoshinaga, K., Okada, S., Harada, H., Okawa, A., Moriya, H., i Yamazaki, M. (2006). The use of hemopoietic stem cells derived from human umbilical cord blood to promote restoration of spinal cord tissue and recovery of hindlimb function in adult rats. *J Neurosurg Spine* 5, 424-433.

O'Donnell, S. L., Frederick, T. J., Krady, J. K., Vannucci, S. J., i Wood, T. L. (2002). IGF-I and microglia/macrophage proliferation in the ischemic mouse brain. *Glia* 39, 85-97.

Ogawa, D., Okada, Y., Nakamura, M., Kanemura, Y., Okano, H. J., Matsuzaki, Y., Shimazaki, T., Ito, M., Ikeda, E., Tamiya, T., i *wsp*. (2009). Evaluation of human fetal neural stem/progenitor cells as a source for cell replacement therapy for neurological disorders: properties and tumorigenicity after long-term in vitro maintenance. *J Neurosci Res* 87, 307-317.

Ohab, J. J., i Carmichael, S. T. (2008). Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. *Neuroscientist* 14, 369-380.

Ohab, J. J., Fleming, S., Blesch, A., i Carmichael, S. T. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26, 13007-13016.

Ohno, M., Sasahara, M., Narumiya, S., Tanaka, N., Yamano, T., Shimada, M., i Hazama, F. (1999). Expression of platelet-derived growth factor B-chain and beta-receptor in hypoxic/ischemic encephalopathy of neonatal rats. *Neuroscience* 90, 643-651.

Ohta, M., Suzuki, Y., Noda, T., Ejiri, Y., Dezawa, M., Kataoka, K., Chou, H., Ishikawa, N., Matsumoto, N., Iwashita, Y., i *wsp*. (2004). Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp Neurol* 187, 266-278.

Okoye, G. S., Powell, E. M., i Geller, H. M. (1995). Migration of A7 immortalized astrocytic cells grafted into the adult rat striatum. *J Comp Neurol* 362, 524-534.

Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., Shannon, K. M., Nauert, G. M., Perl, D. P., Godbold, J., i Freeman, T. B. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 54, 403-414.

Ostrowski, R. P., Piotrowski, P., Pankowska, T., i Smialek, M. (1998). Evaluation of morphological changes after treatment with coenzyme Q10 (CoQ10) in endothelin-1 induced experimental ischemia in the rat. *Folia Neuropathol* 36, 185-188.

Oyamada, N., Itoh, H., Sone, M., Yamahara, K., Miyashita, K., Park, K., Taura, D., Inuzuka, M., Sonoyama, T., Tsujimoto, H., i *wsp*. (2008). Transplantation of vascular cells derived from human embryonic stem cells contributes to vascular regeneration after stroke in mice. *J Transl Med* 6, 54.

Paczkowska, E., Dabkowska, E., Nowacki, P., i Machalinski, B. (2009). [Stem cell-based therapy in central nervous system diseases.]. *Neurol Neurochir Pol* 43, 550-558.

Pan, Y., Nastav, J. B., Zhang, H., Bretton, R. H., Panneton, W. M., i Bicknese, A. R. (2005). Engraftment of freshly isolated or cultured human umbilical cord blood cells and the effect of cyclosporin A on the outcome. *Exp Neurol* 192, 365-372.

Panizzo, R. A., Kyrtatos, P. G., Price, A. N., Gadian, D. G., Ferretti, P., i Lythgoe, M. F. (2009). In vivo magnetic resonance imaging of endogenous neuroblasts labelled with a ferumoxide-polycation complex. *Neuroimage* 44, 1239-1246.

Parent, J. M., Vexler, Z. S., Gong, C., Derugin, N., i Ferriero, D. M. (2002). Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* 52, 802-813.

Park, D. H., Eve, D. J., Musso, J., 3rd, Klasko, S. K., Cruz, E., Borlongan, C. V., i Sanberg, P. R. (2009). Inflammation and stem cell migration to the injured brain in higher organisms. *Stem Cells Dev* 18, 693-702.

Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., i Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-146.

Pasztor, E., i Vajda, J. (1987). Plasticity of the brain in respect of functional restoration after subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 41, 29-40.

Peled, A., Petit, I., Kollet, O., Magid, M., Ponomaryov, T., Byk, T., Nagler, A., Ben-Hur, H., Many, A., Shultz, L., i wsp. (1999). Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 283, 845-848.

Perlow, M. J., Freed, W. J., Hoffer, B. J., Seiger, A., Olson, L., i Wyatt, R. J. (1979). Brain grafts reduce motor abnormalities produced by destruction of nigrostriatal dopamine system. *Science* 204, 643-647.

Piepers, S., Veldink, J. H., de Jong, S. W., van der Tweel, I., van der Pol, W. L., Uijtendaal, E. V., Schelhaas, H. J., Scheffer, H., de Visser, M., de Jong, J. M., i wsp. (2009). Randomized sequential trial of valproic acid in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 66, 227-234.

Plane, J. M., Whitney, J. T., Schallert, T., i Parent, J. M. (2008). Retinoic acid and environmental enrichment alter subventricular zone and striatal neurogenesis after stroke. *Exp Neurol* 214, 125-134.

Plaschke, K., Staub, J., Ernst, E., i Marti, H. H. (2008). VEGF overexpression improves mice cognitive abilities after unilateral common carotid artery occlusion. *Exp Neurol* 214, 285-292.

Platel, J. C., Gordon, V., Heintz, T., i Bordey, A. (2009). GFAP-GFP neural progenitors are antigenically homogeneous and anchored in their enclosed mosaic niche. *Glia* 57, 66-78.

Pouliot, N., Nice, E. C., i Burgess, A. W. (2001). Laminin-10 mediates basal and EGF-stimulated motility of human colon carcinoma cells via alpha(3)beta(1) and alpha(6)beta(4) integrins. *Exp Cell Res* 266, 1-10.

Prasad, V. K., i Kurtzberg, J. (2008). Emerging trends in transplantation of inherited metabolic diseases. *Bone Marrow Transplant* 41, 99-108.

Prestoz, L., Relvas, J. B., Hopkins, K., Patel, S., Sowinski, P., Price, J., i French-Constant, C. (2001). Association between integrin-dependent migration capacity of neural stem cells in vitro and anatomical repair following transplantation. *Mol Cell Neurosci* 18, 473-484.

Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.

Quinn, M., Mukhida, K., Sadi, D., Hong, M., i Mendez, I. (2008). Adjunctive use of the non-ionic surfactant Poloxamer 188 improves fetal dopaminergic cell survival and reinnervation in a neural transplantation strategy for Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 27, 43-52.

Ratajczak, M. Z., Zuba-Surma, E. K., Machalinski, B., Ratajczak, J., i Kucia, M. (2008). Very Small Embryonic-Like (VSEL) Stem Cells: Purification from Adult Organs, Characterization, and Biological Significance. *Stem Cell Rev.* 4, 89-99

Renner, O., Tsimpas, A., Kostin, S., Valable, S., Petit, E., Schaper, W., i Marti, H. H. (2003). Time- and cell type-specific induction of platelet-derived growth factor receptor-beta during cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res* 113, 44-51.

Reznikov, K. (1975a). [Incorporation of 3H-thymidine into glial cells of the parietal region and cells of the subependymal zone of two-week and adult mice under normal conditions and following brain injury]. *Ontogenez* 6, 169-176.

Reznikov, K. (1975b). [Local proliferation of cells of the granular layer of the dentate gyrus of the mouse hippocampus during postnatal ontogenesis and following brain injury]. *Ontogenez* 6, 242-250.

Rice, C., Halfpenny, C., i Scolding, N. (2004). Cell therapy in demyelinating diseases. *NeuroRx* 1, 415-423.

Risedal, A., Mattsson, B., Dahlqvist, P., Nordborg, C., Olsson, T., i Johansson, B. B. (2002). Environmental influences on functional outcome after a cortical infarct in the rat. *Brain Res Bull* 58, 315-321.

Robin, A. M., Zhang, Z. G., Wang, L., Zhang, R. L., Katakowski, M., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, C., i Chopp, M. (2006). Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 125-134.

Robinson, M. J., Macrae, I. M., Todd, M., Reid, J. L., i McCulloch, J. (1990). Reduction of local cerebral blood flow to pathological levels by endothelin-1 applied to the middle cerebral artery in the rat. *Neurosci Lett* 118, 269-272.

Romer, B., Sartorius, A., Inta, D., Vollmayr, B., i Gass, P. (2008). Imaging new neurons in vivo: a pioneering tool to study the cellular biology of depression? *Bioessays* 30, 806-810.

Rosenfeld, M. G., Crenshaw, E. B., 3rd, Lira, S. A., Swanson, L., Borrelli, E., Heyman, R., i Evans, R. M. (1988). Transgenic mice: applications to the study of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 11, 353-372.

Ruegger, A., Kuhn, M., Lichti, H., Loosli, H. R., Huguenin, R., Quiquerez, C., i von Wartburg, A. (1976). [Cyclosporin A, a Peptide Metabolite from *Trichoderma polysporum* (Link ex Pers.) Rifai, with a remarkable immunosuppressive activity]. *Helv Chim Acta* 59, 1075-1092.

Sathasivam, S. (2009). Managing patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Eur J Intern Med* 20, 355-358.

Sato, Y., Chin, Y., Kato, T., Tanaka, Y., Tozuka, Y., Mase, M., Ageyama, N., Ono, F., Terao, K., Yoshikawa, Y., i Hisatsune, T. (2009). White matter activated glial cells produce BDNF in a stroke model of monkeys. *Neurosci Res* 65, 71-78.

Savitz, S. I., Dinsmore, J., Wu, J., Henderson, G. V., Stieg, P., i Caplan, L. R. (2005). Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis* 20, 101-107.

Schanzer, A., Wachs, F. P., Wilhelm, D., Acker, T., Cooper-Kuhn, C., Beck, H., Winkler, J., Aigner, L., Plate, K. H., i Kuhn, H. G. (2004). Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14, 237-248.

Schumacher, J. M., Elias, S. A., Palmer, E. P., Kott, H. S., Dinsmore, J., Dempsey, P. K., Fischman, A. J., Thomas, C., Feldman, R. G., Kassissieh, S., i *wsp.* (2000). Transplantation of embryonic porcine mesencephalic tissue in patients with PD. *Neurology* 54, 1042-1050.

Seress, L. (1977). The postnatal development of rat dentate gyrus and the effect of early thyroid hormone treatment. *Anat Embryol (Berl)* 151, 335-339.

Shen, L. H., Li, Y., Chen, J., Zhang, J., Vanguri, P., Borneman, J., i Chopp, M. (2006). Intracarotid transplantation of bone marrow stromal cells increases axon-myelin remodeling after stroke. *Neuroscience* 137, 393-399.

Shetty, A. K., Madison, R. D., Bradley, J., i Turner, D. A. (1994). Quantitative graft integration of fetal hippocampal transplants labeled with 5' bromodeoxyuridine into normal adult hippocampus. *Exp Neurol* 126, 205-224.

Shichinohe, H., Kuroda, S., Maruichi, K., Osanai, T., Sugiyama, T., Chiba, Y., Yamaguchi, A., i Iwasaki, Y. (2009). Bone marrow stromal cells and bone marrow-derived mononuclear cells: Which are suitable as cell source of transplantation for mice infarct brain? *Neuropathology* 30 113-122.

Shihabuddin, L. S., i Aubert, I. (2010). Stem cell transplantation for neurometabolic and neurodegenerative diseases. *Neuropharmacology* 58, 845-854.

Speetjens, F. M., Liefers, G. J., Korbee, C. J., Mesker, W. E., van de Velde, C. J., van Vlierberghe, R. L., Morreau, H., Tollenaar, R. A., i Kuppen, P. J. (2009). Nuclear Localization of CXCR4 Determines Prognosis for Colorectal Cancer Patients. *Cancer Microenviron* 2, 1-7.

Srivastava, A. S., Shenouda, S., Mishra, R., i Carrier, E. (2006). Transplanted embryonic stem cells successfully survive, proliferate, and migrate to damaged regions of the mouse brain. *Stem Cells* 24, 1689-1694.

Stroemer, P., Patel, S., Hope, A., Oliveira, C., Pollock, K., i Sinden, J. (2009). The Neural Stem Cell Line CTX0E03 Promotes Behavioral Recovery and Endogenous Neurogenesis After Experimental Stroke in a Dose-Dependent Fashion. *Neurorehabil Neural Repair* 23, 895-909.

Sugaya, K., i Merchant, S. (2008). How to approach Alzheimer's disease therapy using stem cell technologies. *J Alzheimers Dis* 15, 241-254.

Sughrue, M. E., Yang, I., Kane, A. J., Rutkowski, M. J., Fang, S., James, C. D., i Parsa, A. T. (2009). Immunological considerations of modern animal models of malignant primary brain tumors. *J Transl Med* 7, 84.

Sykova, E., i Jendelova, P. (2006). Magnetic resonance tracking of transplanted stem cells in rat brain and spinal cord. *Neurodegener Dis* 3, 62-67.

Sykova, E., i Jendelova, P. (2007). In vivo tracking of stem cells in brain and spinal cord injury. *Prog Brain Res* 161, 367-383.

Sypecka, J., Sarnowska, A., i Domanska-Janik, K. (2009). Crucial role of the local micro-environment in fate decision of neonatal rat NG2 progenitors. *Cell Prolif* 42, 661-671.

Takahashi, K., i Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Tanaka, Y., Imai, H., Konno, K., Miyagishima, T., Kubota, C., Puentes, S., Aoki, T., Hata, H., Takata, K., Yoshimoto, Y., i Saito, N. (2008). Experimental model of lacunar infarction in the gyrencephalic brain of the miniature pig: neurological assessment and histological, immunohistochemical, and physiological evaluation of dynamic corticospinal tract deformation. *Stroke* 39, 205-212.

Tarasenko, Y. I., Yu, Y., Jordan, P. M., Bottenstein, J., i Wu, P. (2004). Effect of growth factors on proliferation and phenotypic differentiation of human fetal neural stem cells. *J Neurosci Res* 78, 625-636.

Tavakoli, T., Xu, X., Derby, E., Serebryakova, Y., Reid, Y., Rao, M. S., Mattson, M. P., i Ma, W. (2009). Self-renewal and differentiation capabilities are variable between human embryonic stem cell lines I3, I6 and BG01V. *BMC Cell Biol* 10, 44.

Tham, T. N., Lazarini, F., Franceschini, I. A., Lachapelle, F., Amara, A., i Dubois-Dalcq, M. (2001). Developmental pattern of expression of the alpha chemokine stromal cell-derived factor 1 in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 13, 845-856.

Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., i Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.

Thonhoff, J. R., Ojeda, L., i Wu, P. (2009). Stem Cell-Derived Motor Neurons: Applications and Challenges in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Stem Cell Res Ther* 4, 178-199.

Thored, P., Arvidsson, A., Cacci, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., i Lindvall, O. (2006). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24, 739-747.

Toso, C., Vallee, J. P., Morel, P., Ris, F., Demuylder-Mischler, S., Lepetit-Coiffe, M., Marangon, N., Saudek, F., James Shapiro, A. M., Bosco, D., i Berney, T. (2008). Clinical magnetic resonance imaging of pancreatic islet grafts after iron nanoparticle labeling. *Am J Transplant* 8, 701-706.

Toyama, K., Honmou, O., Harada, K., Suzuki, J., Houkin, K., Hamada, H., i Kocsis, J. D. (2009). Therapeutic benefits of angiogenetic gene-modified human mesenchymal stem cells after cerebral ischemia. *Exp Neurol* 216, 47-55.

Trapp, T., Kogler, G., El-Khattouti, A., Sorg, R. V., Besselmann, M., Focking, M., Buhrle, C. P., Trompeter, I., Fischer, J. C., i Wernet, P. (2008). Hepatocyte growth factor/c-MET axis-mediated tropism of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells for neuronal injury. *J Biol Chem* 283, 32244-32253.

Trojanowski, J. Q., Mantione, J. R., Lee, J. H., Seid, D. P., You, T., Inge, L. J., i Lee, V. M. (1993). Neurons derived from a human teratocarcinoma cell line establish molecular and structural polarity following transplantation into the rodent brain. *Exp Neurol* 122, 283-294.

Tsyb, A. F., Yuzhakov, V. V., Roshal, L. M., Sukhikh, G. T., Konoplyannikov, A. G., Sushkevich, G. N., Yakovleva, N. D., Ingel, I. E., Bandurko, L. N., Sevan'kaeva, L. E., i wsp. (2009). Morphofunctional study of the therapeutic efficacy of human mesenchymal and neural stem cells in rats with diffuse brain injury. *Bull Exp Biol Med* 147, 132-146.

Udo, H., Yoshida, Y., Kino, T., Ohnuki, K., Mizunoya, W., Mukuda, T., i Sugiyama, H. (2008). Enhanced adult neurogenesis and angiogenesis and altered affective behaviors in mice overexpressing vascular endothelial growth factor 120. *J Neurosci* 28, 14522-14536.

Vale, C., Alonso, E., Rubiolo, J. A., Vieytes, M. R., Laferla, F. M., Gimenez-Llort, L., i Botana, L. M. (2009). Profile for Amyloid-beta and Tau Expression in Primary Cortical Cultures from 3xTg-AD Mice. *Cell Mol Neurobiol*. DOI 10.1007/s10571-009-9482-3

van Praag, H., Christie, B. R., Sejnowski, T. J., i Gage, F. H. (1999a). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13427-13431.

van Praag, H., Kempermann, G., i Gage, F. H. (1999b). Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 266-270.

Veizovic, T., Beech, J. S., Stroemer, R. P., Watson, W. P., i Hodges, H. (2001). Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* 32, 1012-1019.

Veldhuis, W. B., van der Stelt, M., Delmas, F., Gillet, B., Veldink, G. A., Vliegenthart, J. F., Nicolay, K., i Bar, P. R. (2003). In vivo excitotoxicity induced by ouabain, a Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 62-74.

Vogelweid, C. M., i Kier, A. B. (1988). A technique for the collection of cerebrospinal fluid from mice. *Lab Anim Sci* 38, 91-92.

Vreys, R., Velde, G. V., Krylychkina, O., Vellema, M., Verhoye, M., Timmermans, J. P., Baekelandt, V., i Van der Linden, A. (2010). MRI visualization of endogenous neural progenitor cell migration along the RMS in the adult mouse brain: Validation of various MPIO labeling strategies. *Neuroimage* 49, 2094-2103.

Wadman, M. (1999). White House cool on obtaining human embryonic stem cells. *Nature* 400, 301.

Walczak, P., Chen, N., Eve, D., Hudson, J., Zigova, T., Sanchez-Ramos, J., Sanberg, P. R., Sanberg, C. D., i Willing, A. E. (2007a). Long-term cultured human umbilical cord

neural-like cells transplanted into the striatum of NOD SCID mice. *Brain Res Bull* 74, 155-163.

Walczak, P., Chen, N., Hudson, J. E., Willing, A. E., Garbuzova-Davis, S. N., Song, S., Sanberg, P. R., Sanchez-Ramos, J., Bickford, P. C., i Zigova, T. (2004). Do hematopoietic cells exposed to a neurogenic environment mimic properties of endogenous neural precursors? *J Neurosci Res* 76, 244-254.

Walczak, P., Kedziorek, D. A., Gilad, A. A., Barnett, B. P., i Bulte, J. W. (2007b). Applicability and limitations of MR tracking of neural stem cells with asymmetric cell division and rapid turnover: the case of the shiverer dysmyelinated mouse brain. *Magn Reson Med* 58, 261-269.

Walczak, P., Zhang, J., Gilad, A. A., Kedziorek, D. A., Ruiz-Cabello, J., Young, R. G., Pittenger, M. F., van Zijl, P. C., Huang, J., i Bulte, J. W. (2008). Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke* 39, 1569-1574.

Wang, L., Li, Y., Chen, J., Gautam, S. C., Zhang, Z., Lu, M., i Chopp, M. (2002a). Ischemic cerebral tissue and MCP-1 enhance rat bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Exp Hematol* 30, 831-836.

Wang, L., Li, Y., Chen, X., Chen, J., Gautam, S. C., Xu, Y., i Chopp, M. (2002b). MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology* 7, 113-117.

Wang, L., Wang, Z., Yang, B., Yang, Q., Wang, L., i Sun, Y. (2009). CXCR4 nuclear localization follows binding of its ligand SDF-1 and occurs in metastatic but not primary renal cell carcinoma. *Oncol Rep* 22, 1333-1339.

Wang, L. H., Liu, Q., Xu, B., Chen, W., Yang, Q., Wang, Z. X., i Sun, Y. H. (2010). Identification of nuclear localization sequence of CXCR4 in renal cell carcinoma by constructing expression plasmids of different deletants. *Plasmid* 63, 68-72.

Wernig, M., Zhao, J. P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., i Jaenisch, R. (2008). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 5856-5861.

Westphal, H. (1991). Mouse models of human diseases. *Curr Opin Biotechnol* 2, 830-833.

Wijeyekoon, R., i Barker, R. A. (2009). Cell replacement therapy for Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1792, 688-702.

Williamson, D. J., Hooper, M. L., i Melton, D. W. (1992). Mouse models of hypoxanthine phosphoribosyltransferase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 15, 665-673.

Willing, A. E., Garbuzova-Davis, S., Saporta, S., Milliken, M., Cahill, D. W., i Sanberg, P. R. (2001). hNT neurons delay onset of motor deficits in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* 56, 525-530.

Willing, A. E., Lixian, J., Milliken, M., Poulos, S., Zigova, T., Song, S., Hart, C., Sanchez-Ramos, J., i Sanberg, P. R. (2003). Intravenous versus intrastriatal cord blood administration in a rodent model of stroke. *J Neurosci Res* 73, 296-307.

Willing, A. E., i Pennypacker, K. R. (2007). Alternate approach to understanding the molecular mechanisms of stroke-induced injury. *Histol Histopathol* 22, 697-701.

Windrem, M. S., Nunes, M. C., Rashbaum, W. K., Schwartz, T. H., Goodman, R. A., McKhann, G., 2nd, Roy, N. S., i Goldman, S. A. (2004). Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain. *Nat Med* 10, 93-97.

Wittko, I. M., Schanzer, A., Kuzmichev, A., Schneider, F. T., Shibuya, M., Raab, S., i Plate, K. H. (2009). VEGFR-1 regulates adult olfactory bulb neurogenesis and migration of neural progenitors in the rostral migratory stream in vivo. *J Neurosci* 29, 8704-8714.

Woo, S. U., Bae, J. W., Kim, C. H., Lee, J. B., i Koo, B. W. (2008). A significant correlation between nuclear CXCR4 expression and axillary lymph node metastasis in hormonal receptor negative breast cancer. *Ann Surg Oncol* 15, 281-285.

Wu, S., Suzuki, Y., Kitada, M., Kataoka, K., Kitaura, M., Chou, H., Nishimura, Y., i Ide, C. (2002). New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat. *Neurosci Lett* 318, 81-84.

Xu, Q., Wang, S., Jiang, X., Zhao, Y., Gao, M., Zhang, Y., Wang, X., Tano, K., Kanehara, M., Zhang, W., i Ishida, T. (2007). Hypoxia-induced astrocytes promote the migration of neural progenitor cells via vascular endothelial factor, stem cell factor, stromal-derived factor-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1 upregulation in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 34, 624-631.

Yamaguchi, T. P., Dumont, D. J., Conlon, R. A., Breitman, M. L., i Rossant, J. (1993). flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118, 489-498.

Yan, H., i Rivkees, S. A. (2002). Hepatocyte growth factor stimulates the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci Res* 69, 597-606.

Yan, Y. P., Sailor, K. A., Vemuganti, R., i Dempsey, R. J. (2006). Insulin-like growth factor-1 is an endogenous mediator of focal ischemia-induced neural progenitor proliferation. *Eur J Neurosci* 24, 45-54.

Yanamoto, H., Nagata, I., Niitsu, Y., Xue, J. H., Zhang, Z., i Kikuchi, H. (2003). Evaluation of MCAO stroke models in normotensive rats: standardized neocortical infarction by the 3VO technique. *Exp Neurol* 182, 261-274.

Yang, S. L., Yan, S., Niu, R. L., i Lin, X. K. (2009a). VEGF gene silencing by cytomegalovirus promoter driven shRNA expression vector results in vascular development defects in zebrafish. *Genetika* 45, 1187-1193.

Yang, T., Tsang, K. S., Poon, W. S., i Ng, H. K. (2009b). Neurotrophism of bone marrow stromal cells to embryonic stem cells: noncontact induction and transplantation to a mouse ischemic stroke model. *Cell Transplant* 18, 391-404.

Yasuda, T., Nihira, T., Ren, Y. R., Cao, X. Q., Wada, K., Setsuie, R., Kabuta, T., Wada, K., Hattori, N., Mizuno, Y., i Mochizuki, H. (2009). Effects of UCH-L1 on alpha-synuclein over-expression mouse model of Parkinson's disease. *J Neurochem* 108, 932-944.

Yoon, S. H., Shim, Y. S., Park, Y. H., Chung, J. K., Nam, J. H., Kim, M. O., Park, H. C., Park, S. R., Min, B. H., Kim, E. Y., i *wsp*. (2007). Complete spinal cord injury treatment

using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: Phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 25, 2066-2073.

Yoshitake, N., Fukui, H., Yamagishi, H., Sekikawa, A., Fujii, S., Tomita, S., Ichikawa, K., Imura, J., Hiraishi, H., i Fujimori, T. (2008). Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer* 98, 1682-1689.

Zeng, J. S., Yu, J., Cui, C. M., Zhao, Z., Hong, H., Sheng, W. L., Tao, Y. Q., Li, L., i Huang, R. X. (2005). Cultured human embryonic neocortical cells survive and grow in infarcted cavities of adult rat brains and interconnect with host brain. *Chin Med J (Engl)* 118, 275-280.

Zhang, C., Zhou, C., Teng, J. J., Zhao, R. L., i Song, Y. Q. (2009a). Multiple administrations of human marrow stromal cells through cerebrospinal fluid prolong survival in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy* 11, 299-306.

Zhang, L., Zhang, Z. G., Ding, G. L., Jiang, Q., Liu, X., Meng, H., Hozeska, A., Zhang, C., Li, L., Morris, D., i *wsp*. (2005). Multitargeted effects of statin-enhanced thrombolytic therapy for stroke with recombinant human tissue-type plasminogen activator in the rat. *Circulation* 112, 3486-3494.

Zhang, P., Li, J., Liu, Y., Chen, X., i Kang, Q. (2009b). Transplanted human embryonic neural stem cells survive, migrate, differentiate and increase endogenous nestin expression in adult rat cortical peri-infarction zone. *Neuropathology* 29, 410-421.

Zhang, Z. G., Jiang, Q., Zhang, R., Zhang, L., Wang, L., Zhang, L., Arniego, P., Ho, K. L., i Chopp, M. (2003). Magnetic resonance imaging and neurosphere therapy of stroke in rat. *Ann Neurol* 53, 259-263.

Zhao, L. R., Duan, W. M., Reyes, M., Keene, C. D., Verfaillie, C. M., i Low, W. C. (2002). Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 174, 11-20.

Zhu, J., Zhou, L., i XingWu, F. (2006). Tracking neural stem cells in patients with brain trauma. *N Engl J Med* 355, 2376-2378.

Zigova, T., Song, S., Willing, A. E., Hudson, J. E., Newman, M. B., Saporta, S., Sanchez-Ramos, J., i Sanberg, P. R. (2002). Human umbilical cord blood cells express neural antigens after transplantation into the developing rat brain. *Cell Transplant* 11, 265-274.

Ziu, M., Schmidt, N. O., Cargioli, T. G., Aboody, K. S., Black, P. M., i Carroll, R. S. (2006). Glioma-produced extracellular matrix influences brain tumor tropism of human neural stem cells. *J Neurooncol* 79, 125-133.

Zweigerdt, R. (2009). Large Scale Production of Stem Cells and Their Derivatives. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 114, 201-235.

STRESZCZENIE PRACY

Choroby układu nerwowego są najczęstszą przyczyną ciężkiego inwalidztwa. Dotychczas stosowane strategie leczenia mające na celu zapobieganie obumieraniu komórek mózgu i rdzenia kręgowego nie przyniosły spodziewanych rezultatów. Dopiero odkrycie w ostatniej dekadzie metod pozyskiwania, hodowli i ekspansji *in vitro* ludzkich komórek macierzystych i progenitorowych przyniosło nadzieję na przełom w możliwości naprawy mózgu i rdzenia kręgowego. W Zakładzie Neurobiologii Naprawczej IMDiK PAN w Warszawie uzyskano z krwi pępowinowej ludzkie, ukierunkowane neuralnie komórki macierzyste i progenitorowe (HUCB-NSC i HUCB-NP, odpowiednio), które potencjalnie mogłyby zostać zastosowane w terapii tych chorób.

Neurotransplantacje komórek macierzystych są stosunkowo młodą gałęzią wiedzy. Wymagają rozwoju nowych narzędzi badawczych. W niniejszej pracy opracowano m.in. metodę transplantacji komórek do *cisterna magna* u myszy. Zasadniczym elementem tej procedury jest ułożenie myszy w pozycji *concorde*, rutynowo stosowanej w neurochirurgii klinicznej. W wyniku tego manewru zbiornik wielki znajduje się w najwyższym punkcie czaszki, co wraz z innymi technicznymi ulepszeniami zapobiega wstecznemu wypływowi komórek. Podane w ten sposób komórki sedymentują głównie na podstawę mózgu, a w mniejszym stopniu lokalizują się wokół rdzenia kręgowego i w komorze IV. Tę metodę transplantacji następnie wykorzystano do badań w zwierzęcym modelu stwardnienia bocznego zanikowego.

W ramach pracy doktorskiej opracowałem także nowy model uszkodzenia mózgu u szczura, posiadający wiele korzystnych cech z punktu widzenia zastosowania terapii komórkowej. Polega on na domózgowym podaniu metodą stereotaktyczną ouabainy – inhibitora pompy sodowo-potasowej. Ten sposób umożliwia selektywne uszkodzenie struktur głębokich mózgu. Ze względu na gęste upakowanie życiowo ważnych struktur nawet niewielka lezja w tej okolicy mózgu może powodować wystąpienie znaczących i stosunkowo trwałych deficytów neurologicznych. Ograniczony obszar uszkodzenia zapobiega występowaniu rozległych obszarów martwicy i obrzęku mózgu oraz wynikającego z nich efektu masy, co stwarza lepsze warunki dla przeżycia i podjęcia funkcji przez przeszczepiane komórki. Opracowany model udaru mózgu zajmuje niewielki obszar

(1-2% objętości całego mózgowia), natomiast wywołuje długotrwałe deficyty neurologiczne. Dlatego jest przydatny do przedklinicznych badań nad zastosowaniem neurotransplantacji. W celu osiągnięcia pożądanego efektu dostosowano dawkę ouabainy (5 nmol) oraz wyznaczono koordynaty dla jej aplikacji tak, że uszkodzenie dotyczy prążkowie, torebki wewnętrznej i wzgórza. Stereotaktyczna iniekcja zapewnia stosunkowo łatwe i szybkie wykonanie procedury. Powstała w ten sposób lezja cechuje się stosunkowo wysoką powtarzalnością oraz podobieństwem do tradycyjnych modeli udaru mózgu wywołanych bezpośrednio niedokrwieniem. Całość opublikowano jako model lakunarnego udaru mózgu.

Chociaż neurotransplantacje były stosowane w modelach udaru mózgu przez wiele lat oraz przeprowadzono pierwsze próby kliniczne, to wciąż brak jest przekonujących danych na temat mechanizmów działania przeszczepionych komórek. W tym kontekście szczególną uwagę zwraca się na możliwość modulacji procesu endogennej neurogenezy indukowanej uszkodzeniem mózgu. W związku z tym oceniono ten proces w ouabainowym modelu udaru mózgu. Stwierdzono masywną proliferację komórkową w obrębie mózgowia w odpowiedzi na miejscowe podanie inhibitora pompy sodowo-potasowej. Dokładna analiza fenotypu nowopowstałych komórek ujawniła występowanie współbarwienia dla BrdU, znacznika dzielących się komórek oraz PSA-NCAM i TUJ1 – markerów migrujących neuroblastów i młodych neuronów, odpowiednio. Neurogeneza jest szczególnie nasiloną w obrębie przyśrodkowej części lezji, która znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie SVZ oraz w samej SVZ. Iniekcje BrdU były przeprowadzane 6 do 8 dni po lezji, a badania immunohistochemiczne były wykonywane na mózgach pozyskanych miesiąc po uszkodzeniu. Poza neuroblastami pozostałe nowopowstałe BrdU-pozytywne komórki wykazywały cechy makro- i mikrogliu. Świadczy to o dużym reaktywnym odczynie glejowym oraz wystąpieniu reakcji zapalnej w odpowiedzi na udar mózgu. Tak więc proces neurogenezy może zostać rozpatrywany w opracowanym przeze mnie modelu udaru mózgu jako z jeden z elementów pozytywnego oddziaływania neurotransplantacji.

W następnym etapie pracy oceniono zachowanie się komórek HUCB-NSC i HUCB-NP po przeszczepie do szczurzych mózgów. Bezpośrednio po iniekcji domózgowej komórki wykazywały prawidłową morfologię, co wskazuje na dobrą tolerancję samej procedury. W przypadku mózgu nieuszkodzonego obserwowano radialną migrację podanych komórek, a po iniekcji w sąsiedztwie udaru mózgu

przeszczepione komórki migrowały w kierunku uszkodzenia. Równocześnie zachodził proces odrzucania obcych komórek eliminujący przeszczep w obrębie nieuszkodzonego mózgu w ciągu tygodnia. Udar mózgu wpływał ochronnie na przeszczepione komórki, przy czym okres ich przeżycia nie przekraczał miesiąca pomimo stosowania immunosupresji cyklosporyną. Porównując wpływ warunków hodowli na przeżycie komórek wykazano negatywny efekt obecności w niej surowicy.

W badaniach migracji komórek krwi pępowinowej *in vitro* stwierdzono stosunkowo dużą aktywację tego procesu w obecności homogenatów mózgów szczurzych. Porównanie oddziaływania homogenatów mózgów nieuszkodzonych oraz udarowo uszkodzonych wykazało większą aktywację migracji przez homogenaty wykonane z tych drugich. Już po 6 godz. od wywołania udaru mózgu uszkodzona tkanka powodowała zwiększenie migracji, a proces ten był maksymalnie nasilony po 48 godz. po udarze. Homogenaty z mózgów pobranych tydzień po uszkodzeniu wciąż indukowały większą migrację niż mózgi nieuszkodzone, ale nie osiągnięto w tym przypadku istotności statystycznej (trend, $0,05 < p < 0,1$).

W następnej serii badań wykazano, że komórki użyte w opisanych eksperymentach wykazują w warunkach *in vitro* obecność wielu receptorów zaangażowanych w procesy migracji: PDGFRA, PDGFRB, IGF-1R, CXCR4, c-Met i Flk-1. Wybrane ligandy dla dwóch z tych receptorów zastosowano w badaniach migracji komórek. Stwierdzono znamienne zwiększenie migracji w kierunku SDF-1 i IGF-1, w porównaniu z kontrolą. Jednak nasilenie migracji było znacząco mniejsze niż w kierunku homogenatów ze szczurzych mózgów. Natomiast pokrycie błon migracyjnych macierzą zewnątrzkomórkową przyczyniło się do bardzo dużego zwiększenia migracji. W porównaniu z badanymi związkami macierz zewnątrzkomórkowa wydaje się być najsilniejszym induktorem procesu migracji.

W neurotransplantologii, która wciąż jest głównie obszarem eksperymentów przedklinicznych niezbędne jest zestawianie lokalizacji i fenotypu wszczepionych komórek z ich funkcją mierzoną na poziomie biochemicznym, neurofizjologicznym i behawioralnym. W warunkach klinicznych szczególną rolę odgrywa identyfikacja i badanie losu wszczepionych komórek *in vivo*. Najbardziej przydatny w tym celu jest rezonans magnetyczny ze względu na najwyższą rozdzielczość otrzymywanych obrazów. Spośród różnych znaczników komórkowych największą siłą sygnału odznaczają się nanocząsteczki tlenku żelaza – SPIO. W warunkach *in vitro* wyznakowano nimi neuralne progenitory pochodzące z krwi pępowinowej. Przy

użyciu histochemii wykazano wysoką skuteczność i brak cytotoksyczności tej procedury. Po umieszczeniu wyznakowanych komórek w przygotowanym fantomie odwzorowującym badania komórek w mózgu przeprowadzono ich obrazowanie w rezonansie magnetycznym. Zastosowanie gęstości powyżej 4×10^6 komórek/ml generuje sygnał umożliwiający ich optymalną detekcję w aparaturze znajdującej się w naszej dyspozycji. Przeprowadzone badania *in vitro* posłużyły do wykorzystania opracowanej metody znakowania komórek HUCB-NP przy użyciu SPIO do wykonania próby klinicznej terapii komórkowej uszkodzonego mózgu u dziecka.

Podsumowując uzyskane wyniki, w ramach pracy doktorskiej opracowałem dwa modele eksperymentalnego badania przeszczepów komórkowych w OUN u gryzoni, przeprowadziłem analizę czynników wpływających na migrację komórek HUCB-NSC w warunkach *in vitro* oraz ustaliłem warunki znakowania komórek HUCB-NP nanocząsteczkami żelaza (SPIO) i ich detekcji w rezonansie magnetycznym, co zostało wykorzystane w klinice do nieinwazyjnego śledzenia losu komórek po przeszczepie do komór bocznych mózgu u dziecka.

