

Michael Valenzuela<sup>1,2</sup>, Kuldip Sidhu<sup>3</sup>, Sophia Dean<sup>1,3</sup>, Perminder Sachdev<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>School of Psychiatry, University of New South Wales, Sydney, Australia

<sup>2</sup>Neuropsychiatric Institute, The Prince of Wales Hospital, Sydney, Australia

<sup>3</sup>Diabetes Transplant Unit, The Prince of Wales Hospital, Sydney, Australia

# Nerwowe komórki macierzyste w leczeniu zaburzeń neuropsychiatrycznych

## Neural stem cell therapy for neuropsychiatric disorders

Przedrukowano za zgodą z: Acta Neuropsychiatrica 2007; 19: 11–26

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Blackwell Munksgaard

Tłumaczenie: lek. Beata Godlewska

### Abstract

**Introduction.** To conduct a comprehensive literature review of the area of neural stem cells and neuropsychiatry.

**Methods.** Neural stem cells' (NSCs) and 'neurogenesis' were used as key words in Medline (1966 — November 2006) to identify relevant papers in the areas of Alzheimer's disease (AD), depression, schizophrenia and Parkinson's disease (PD). This list was supplemented with papers from reference lists of seminal reviews.

**Results.** The concept of a 'stem cell' continues to evolve and is currently defined by operational criteria related to symmetrical renewal, multipotency and functional viability. In vivo adult mammalian neurogenesis occurs in discrete niches in the subventricular and subgranular zones — however, functional precursor cells can be generated in vitro from a wide variety of biological sources. Both artificial and physiological microenvironment is therefore critical to the characteristics and behaviour of neural precursors, and it is not straightforward how results from the laboratory can be extrapolated to the living organism. Transplant strategies in PD have shown that it is possible for primitive neural tissue to engraft into neuropathic brain areas, become biologically functional and lead to amelioration of clinical signs and symptoms. However, with long-term follow-up, significant problems related to intractable side-effects and potential neoplastic growth have been reported. These are therefore the potentials and pitfalls for NSC technology in neuropsychiatry. In AD, the physiology of amyloid precursor protein may directly interact with NSCs, and a role in memory function has been speculated. The role of endogenous neurogenesis has also been implicated in the etiology of depression. The significance of NSCs and neurogenesis for schizophrenia is still emerging.

**Conclusions.** There are a number of technical and conceptual challenges ahead before the promise of NSCs can be harnessed for the understanding and treatment of neuropsychiatric disorders. Further research into fundamental NSC biology and how this interacts with the neuropsychiatric disease processes is required.

**key words:** neural stem cells, neuropsychiatry, neurogenesis, neurorestoration

Adres do korespondencji: Michael Valenzuela, BSc (Psychol.)  
Hons, MBBS Hons, PhD Neuropsychiatric Institute  
The Prince of Wales Hospital, Sydney, NSW 2031, Australia  
tel.: 61 2 9382 2712, faks: 61 2 9382 3774  
e-mail: michaelv@unsw.edu.au

### Czym są nerwowe komórki macierzyste?

Nerwowe komórki macierzyste (NSC, *neural stem cells*) to pierwotne komórki cechujące się nieograniczoną zdolnością do samopowieliania, a następnie różnicowania i funkcjonowania pod postacią jednej z trzech linii komórkowych, obejmujących neurony, oligodendrocyty i astrocyty.

Obowiązująca biologiczna definicja NSC jest zawodna, ponieważ nie wydaje się, aby istniała stała cecha wspólna dla wszystkich NSC. Innymi słowy, żadna z cech komórki nie daje gwarancji, że stanie się ona w przyszłości komórką pnia. Bardziej właściwe jest prawdopodobnie określenie „spektrum komórek macierzystych”, w przypadku którego głównym czynnikiem determinującym jest otaczające komórkę mikrośrodowisko — w jednym otoczeniu może ona wyglądać i zachowywać się jak zwykła komórka, w innym nabywać właściwości komórki macierzystej [1]. Dlatego w mózgu komórki macierzyste stanowią płynną i dynamiczną jednostkę. To, co dokładnie rozumie się pod pojęciem „nerwowych komórek macierzystych”, zależy także od etapu rozwoju układu nerwowego, na którym się je rozpatruje. Ponadto w warunkach *in vivo* między NSC i ich zróżnicowanym potomstwem istnieje ważny stan przejściowy — typ komórek niewiążąco nazwanych „komórkami neuroprogenitorowymi”. Komórki te cechuje bardziej ograniczona zdolność do samopowieliania, mogą też wykazywać większą tendencję do różnicowania się w jeden typ komórek niż w inny. Z tego powodu wprowadzono alternatywny termin „komórka prekursorowa układu nerwowego”, który obejmuje zarówno NSC, jak i komórki neuroprogenitorowe.

Ze względów praktycznych jest więc ważne, aby NSC spełniały kilka kryteriów operacyjnych. Pierwsze i najważniejsze kryterium stanowi ich zdolność do *symetrycznych podziałów*, przez co rozumie się ich stałe samopowielianie się pod postacią takich samych komórek. Najlepszym sposobem wykazania, że komórki spełniają to kryterium, jest ocena ich zdolności do tworzenia *klonów* [2], czyli zdolności pojedynczej komórki do utworzenia całej populacji takich samych komórek. Ostatnio zasugerowano, że NSC i komórki neuroprogenitorowe można odróżnić *in vitro* na podstawie zachowania przez pierwotną populację komórek zdolności do symetrycznego podziału powyżej pięciu pasaży [3]. „Pasażowanie” oznacza proces podziału populacji na dwie lub więcej subpopulacji, po pewnym czasie zasiedlających naczynia hodowlane, a następnie ich ponowny podział itd. Drugie kluczowe kryterium to *multipotencjalność* komórek. Można ją stwierdzić, gdy po przeniesieniu komórek z medium służącego

do ekspansji do medium różnicującego stwierdzi się ich zdolność do różnicowania się w co najmniej dwa różne typy komórek. Oba kryteria zwykle ocenia się w warunkach *in vitro*. Trzecim testem dla NSC, często stanowiącym największe wyzwanie, jest wykazanie ich przeżycia, różnicowania i żywotności *in vivo*.

W celu dokonania charakterystyki kolonii komórek NSC oraz ich oczyszczenia wykorzystuje się antygeny powierzchniowe i inne wskaźniki. Jak wspomniano, ani na podstawie pojedynczego wskaźnika, ani kombinacji wskaźników nie można jednoznacznie zidentyfikować komórek macierzystych w mózgu. Powszechnie wykorzystywane wskaźniki przedstawiono w tabeli 1. Najczęściej stosowanym „wskaźnikiem” NSC jest nestyna. Jej ekspresja zachodzi jednak także w komórkach neuroprogenitorowych [1]. Tak samo dużo informacji może przynieść wykluczenie wskaźników, ponieważ w NSC nie powinno dochodzić do ekspresji białek powierzchniowych obecnych na dojrzałych, zróżnicowanych neuronach, takich jak hydroksylaza tyrozyny (TH, *tyrosine hydroxylase*), NeuN lub synaptofizyna (patrz ryc. 1).

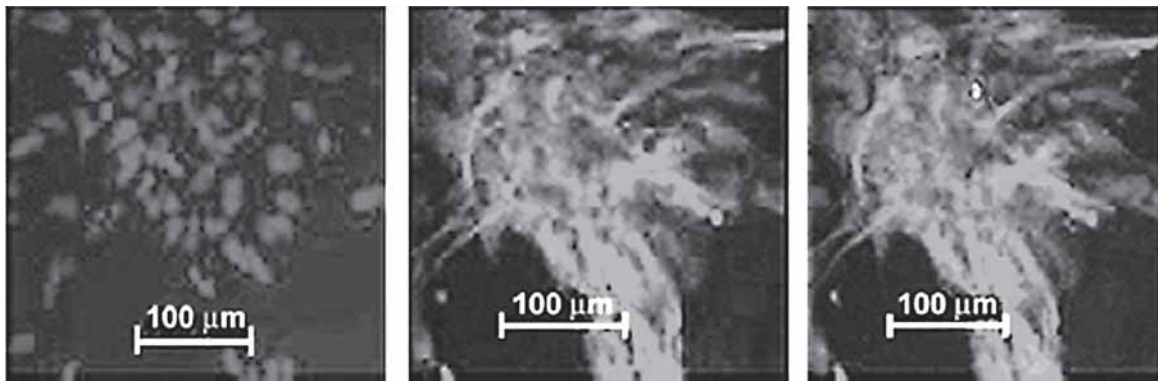
### Neurogeneza i biologiczne cechy endogennych NSC

Mózg ludzki rozwija się z zewnętrznej warstwy ektodermy, wywodzącej się z pierwotnego węzła zarodkowego blastocysty. Podczas pierwszych tygodni życia na rozwój układu nerwowego istotnie wpływa kilka sygnałów biologicznych. Czynniki wzrostu fibroblastów (FGF, *fibroblast growth factor*) i Wnt odgrywają rolę na pierwszym etapie indukcji nerwowej, dzięki czemu powstająca ektoderma zostaje skierowana na szlak neuroepitelialny [4]. Krok ten prawdopodobnie wymaga też supresji morfogenetycznego białka kostnego [5]. Gdy szlak neuroepitelialny zostanie zdeteminowany, płytka nerwowa zwija się i tworzy cewę nerwową. Ta tymczasowa struktura wyraźnie układa się w osiach głowowo-ogonowej i grzbietowo-brzuszej, wyznaczając rodzaj „osi koordynacyjnej” dla formującego się mózgu noworodka. Znaczącą rolę w tworzeniu pierwszej z tych osi odgrywa kwas retinowy, a białka *Sonic hedgehog* [rodzina białek mająca znaczenie w różnicowaniu komórek macierzystych, przyp. tłum.] — w powstawaniu drugiej. Oba te czynniki współpracują, na przykład w celu skierowania rozwijających się neuronów na szlak neuronów ruchowych. Jak dalej przedstawiono, powyższe czynniki sygnalizujące gromadzi się w celu sztucznej indukcji i wytworzenia populacji komórek NSC w warunkach laboratoryjnych [6]. Poglądy na temat wykształcania się NSC w trakcie rozwoju niemowlęcia i dziecka są sprzeczne. Zgodnie z klasycznym schematem, neurony dojrzewają

**Tabela 1.** Powszechnie stosowane wskaźniki NSC, komórek neuroprogenitorowych i neuronów  
**Table 1.** Commonly used markers for NSCs, neuroprogenitors and neurons

Wskaźnik	Hipotetyczna rola	Piśmiennictwo
NCS		
Nestyna	Filament pośredni klasy VI, ulegający ekspresji w komórkach rozwijającego się OUN we wczesnych embrionalnych neuroepitelialnych komórkach macierzystych; jego ekspresja zachodzi także w niektórych komórkach neuroprogenitorowych	Hockfield i wsp. [7]
NCAM	Niezbędny dla właściwego ustanowienia połączeń synaptycznych; regulator plastyczności hipokampa	Rutishauser i wsp. [8]
CD133/ /prominina-1	Ulega ekspresji na wypustkach błony komórkowej na powierzchni szczytowej komórek neuroepitelialnych	Uchida i wsp. [9]
Komórki neuroprogenitorowe		
GFAP	Filament pośredni klasy III; odgrywa rolę w cytoszkielecie, ulega też ekspresji w NSC i astrocytach; komórki progenitorowe wykazujące ekspresję GFAP są głównym źródłem komórek dla neurogenezy w wieku dorosłym	Garcia i wsp. [10]
Mash1	Reguluje neurogenezę w ukierunkowanych komórkach prekursorowych układu nerwowego; jego wczesna ekspresja aktywuje rodzinę genów specyficznych dla neuronów pobudzających różnicowanie	McNay i wsp. [11]
Sox1, Sox2, Sox3	Czynniki transkrypcyjne najwcześniej ulegające ekspresji w rozwijającej się cewie nerwowej, biorące też udział w neurogenezie; utrzymują komórki neuroprogenitorowe w stanie niezróżnicowanym; stosowane także jako wskaźniki NSC	Bylund i wsp. [12], Brazel i wsp. [13]
Receptor FGF-2	FGF-2 promuje proliferację NSC; receptor FGF-2 zidentyfikowano w wielu wczesnych komórkach neuroprogenitorowych, a także w linii oligodendrocytów i astrocytów	Reimers i wsp. [14]
Olig2	Sugerowany jako czynnik hamujący neurogenezę w komórkach odpowiadających na uszkodzenie mózgu	Buffo i wsp. [15]
Niedojrzałe neurony		
$\beta$ -tubulina III/Tuj1	Powszechna w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym; w tkankach osób dorosłych $\beta$ -tubulina III występuje niemal wyłącznie w neuronach (przykład — patrz ryc. 1)	Fanarraga i wsp. [16]
Niedojrzałe oligodendrocyty		
GalC	Galaktocerebrozyd — podstawowy glikolipid mieliny odgrywający rolę w mielinizacji; wykorzystywany jako specyficzny wskaźnik komórek wytwarzających mielinę, takich jak oligodendrocyty	Dupree i Popko [17]
Niedojrzałe astrocyty		
GFAP	Jak wyżej	
Dojrzałe neurony		
MAP2	Niezbędny w rozwoju i podtrzymaniu budowy neuronów; jego związek z neurofilamentami i mikrofilamentami aktynowymi może kierować jego interakcjami z mikrotubulami, innymi elementami cytoszkieletu i organellami cytoplazmatycznymi	Binder i wsp. [18]
NeuN	Obecny w większości rodzajów neuronów ośrodkowego i obwodowego układu nerwowego; pojawia się po raz pierwszy w okresach rozwoju odpowiadających wycofaniu się neuronów z cyklu komórkowego oraz/lub rozpoczęciu końcowego różnicowania neuronów	Mullen i wsp. [19]
TH	Bierze udział w konwersji fenyloalaniny w dopaminę; powszechnie wykorzystywany jako wskaźnik neuronów dopaminowych	Pickel i wsp. [20]
Synaptofizyna	Integralne białko błony pęcherzyków zawierających przekaźniki w synapsach; może uczestniczyć w regulacji egzocytozy oraz/lub endocytozy neuroprzekaźników	Wiedenmann i Franke [21]

NSC (*neural stem cells*) — nerwowe komórki macierzyste; OUN — ośrodkowy układ nerwowy; NCAM (*neural cell adhesion molecule*) — nerwowa cząsteczka adhezyjna; GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) — kwaśne włókniste białko glejowe; FGF (*fibroblast growth factor*) — czynnik wzrostu fibroblastów; TH (*tyrosine hydroxylase*) — hydroksylaza tyrozyny

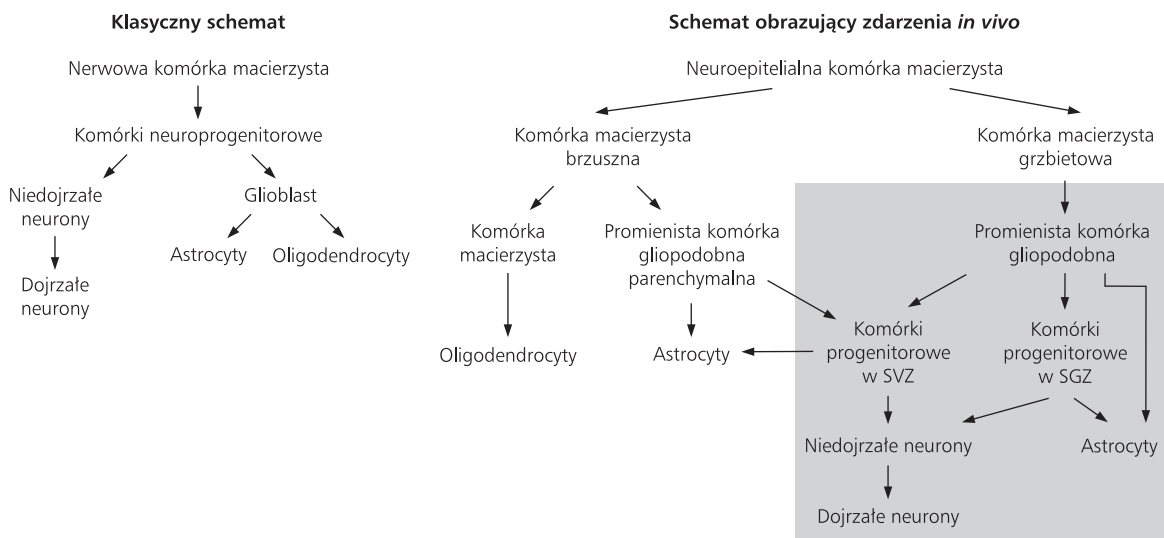


**Rycina 1.** Zróżnicowane neurony pochodzące z komórek macierzystych uzyskanych z ludzkich embrionów: ciemnoszare punkty wskazują na DAPI (wskaźnik jądra komórki), kolor jasnoszary (pośrodku) — na  $\beta$ -III tubulinę, natomiast na ostatniej rycinie przedstawiono obydwie wskaźniki. Na podstawie Sidhu i wsp. (praca niepublikowana)

**Figure 1.** Differentiated neurons derived from human embryonic stem cells. Dark grey staining (left) is for DAPI (a cell nucleus marker), light grey (middle) is for  $\beta$ -III tubulin and the far right figure shows the overlap. From Sidhu et al. (unpublished work)

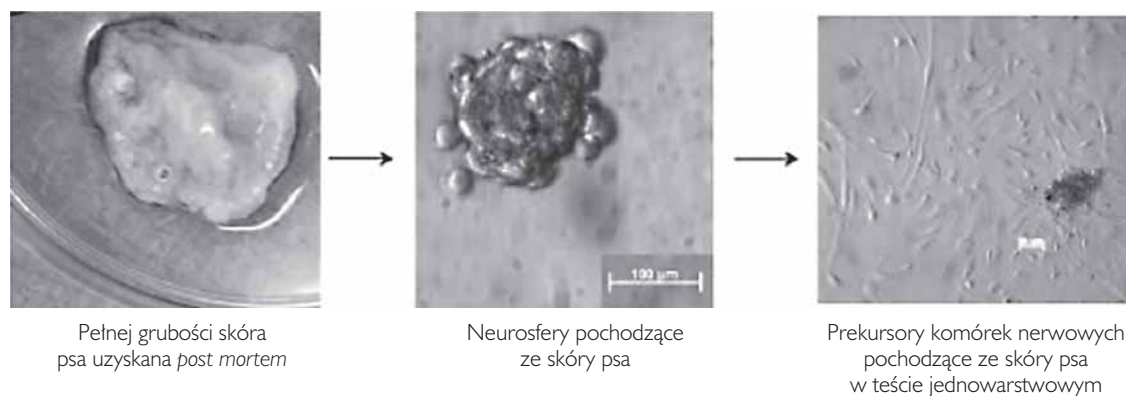
z jednej, jak dotąd niezidentyfikowanej, komórki macierzystej, z której powstaje sekwencja NCS, komórek neuroprogenitorowych oraz niedojrzałych neuronów (ryc. 2). Ten schemat w znacznym stopniu naśladuje szlak rozwojowy komórek układu krwiotwórczego, w przypadku którego związek między komórkami macierzystymi, progenitorowymi i różnorodnymi komórkami blastycznymi jest dobrze udokumentowany

i zachodzi także w wieku dorosłym. Niedawno naukowcy zaproponowali, że rolę utajonych (potencjalnych) komórek macierzystych mogą odgrywać promieniste komórki gliopodobne (*radial glial-like cells*), które w pewnych warunkach mogą się przekształcać w lokalne prekursorzy komórek nerwowych, a także stanowić szkielet architektoniczny przy ich mobilizacji (praca przeglądowa na ten temat, *patrz* Kempermann [1]).



**Rycina 2.** Schematy rozwojowe neurogenезы ssaków (na podstawie Kempermann [1]). Klasyczny schemat naśladuje swój hematologiczny odpowiednik, którego odzwierciedlenie w mózgu jest mało prawdopodobne. Schemat *in vivo* jest wstępny i stanowi wyzwanie doświadczalne, ponieważ rozwój *in vitro* w niewielkim stopniu przypomina przebieg zdarzeń *in vivo*. Szary obszar przedstawia hipotetyczne etapy istotne dla neurogenезы u dorosłych osobników. SGZ — strefa podziarnista zakrętu zębatego; SVZ — strefa okołokomorowa

**Figure 2.** Ontogenetic schemas for mammalian neurogenesis (adapted from Kempermann [1]). The classical scheme draws heavily from parallels in hematology, which is unlikely to be reflected in the brain. The *in vivo* scheme is highly preliminary and is empirically challenging because *in vitro* development shares little resemblance to the course of events *in vivo*. The gray area represents the hypothetical steps relevant to adult neurogenesis; SGZ — subgranular zone of dentate gyrus; SVZ — subventricular zone



**Rycina 3.** Prekursory komórek nerwowych uzyskane ze skóry psa w teście jednowarstwowym po wzbudzeniu tworzenia neurosfer

**Figure 3.** Neural precursors derived from canine skin using the monolayer assay after induction of neurospheres

W ciągu ostatnich 10 lat doszło do swoistej rewolucji w zakresie poglądów na temat neurogenezy zachodzącej u dorosłych ssaków — stwierdzono, że może ona mieć miejsce nawet w bardzo późnym wieku [22–24]. Badania te sprawiły, że dogmat „braku nowych neuronów”, stworzony niemal 100 lat temu przez Ramona y Cajala, trafił do lamusa. Co ciekawe, techniki wykorzystujące radioznaczniki dla nowo dzielących się komórek pozwoliły na uwidocznienie nowo powstałych neuronów w mózgu ssaków już w latach 60. XX wieku [25], ale wyniki te dopiero niedawno poznało szersze audytorium.

Wiedza dotycząca istnienia dwóch głównych szlaków endogennej neurogenezy w mózgu dorosłych ssaków jest coraz szersza. Pierwszy szlak wiąże się z komórkami neuroprogenitorowymi zlokalizowanymi w strefie okołokomorowej, z których powstają prekursorzy komórek nerwowych, migrujące wzdłuż strumienia rostralnego i zasiedlające węchowe obwody nerwowe w korze oczodołowo-czołowej. Drugi szlak neurogenezy dotyczy komórek warstwy podziarnistej hipokampa, które ostatecznie różnicują się do warstwy ziarnistej, a następnie integrują się z polem CA3 w zakręcie zębatym [26]. Znaczenie funkcjonalne neurogenezy w hipokampie dorosłych osobników stanowi obecnie temat burzliwych dyskusji, przy czym istnieją przesłanki wskazujące na jej rolę w funkcjach pamięci [1, 27], ale też sprzeczne doniesienia na temat braku jej roli w tych funkcjach oraz czynnościach poznawczych [28].

### Wyzwania stojące przed generowaniem komórek NSC

#### Homogenność i metodologia

Reynolds i Weiss [29] pierwsi opisali metodę zawieszania, polegającą na hodowli tkanki mózgowej do-

rosłej myszy w butelce hodowlanej zawierającej wysokie stężenia substancji neurotroficznej, czynnika wzrostu naskórka (EGF, *epidermal growth factor*), przy nieobecności osocza. Po kilku dniach większość komórek ginęła, powstawały jednak koła złożone z kilkuset komórek, które przemieściły się na powierzchnię zawiesziny, tworząc *neurosferę* (patrz ryc. 3). Jak następnie wykazano, komórki te spełniały kryteria funkcjonalne NSC. Znalazły one szerokie zastosowanie w badaniach doświadczalnych z zakresu transplantologii ze względu na szybkie i bezproblemowe namnażanie się w warunkach *in vitro*, co ma istotne znaczenie w przypadku chorób, w przebiegu których może dochodzić do utraty wielu milionów neuronów.

Choć dzięki metodzie wykorzystującej neurosferę uzyskano wiele ważnych danych na temat biologicznych cech NSC, jej ograniczeniem jest heterogenność — jej nieodłączna cecha. Neurosfera składa się z mieszaniny rzeczywistych NSC, komórek neuroprogenitorowych oraz niedojrzałych neuronów [30]. Neurosfera same w sobie stanowią wysoce złożone systemy biologiczne, w których w tym samym czasie zachodzą procesy mitozy, apoptozy, a nawet fagocytozy [31]. Szacunki dotyczące „rzeczywistego” odsetka NSC w neurosferach wskazują, że jest ich 0,1–0,6% [3]. Funkcjonalna i morfologiczna heterogenność neurosfer z dużym prawdopodobieństwem uniemożliwi ich wykorzystanie jako testu ilościowego dla NSC [2]. Oznacza to, że poszczególne przeszczepy oparte na zamplifikowanych populacjach komórek neurosfer będą wyjściowo zawierać istotnie różną liczbę NSC, co może powodować niewielką przewidywalność i małą powtarzalność wyników [32]. W trakcie opracowania jest jednak kilka metod, za pomocą których próbuje się uzyskać bardziej jednorodne mikrosfery [33].

Innym podejściem metodologicznym jest hodowla NSC na powierzchni pokrytej żelatyną, co sprawia, że poszczególne NSC rosną i dzielą się w jednej warstwie [34]. Wykazano, że przy wykorzystaniu podobnych czynników troficznych metodą tą uzyskano populację NSC o większej homogenności [35], a różnicowanie w kierunku komórek nerwowych w warunkach *in vivo* zwiększyło się z 5% do ponad 40%. Test ten jest uniwersalny, co umożliwia namnażanie komórek pochodzących z różnych źródeł (np. ludzkich embrionalnych komórek macierzystych lub komórek macierzystych pochodzących od dorosłych dawców) [36]. Główną wadą tej techniki jest jednak powolne przekształcanie się komórek [1].

### **Symetria i starzenie się**

Głównym celem hodowli NSC jest możliwość uzyskania dużych ilości komórek. Przy dostatecznych środkach, teoretycznie, możliwe byłoby wytworzenie z pojedynczej wyjściowej komórki NSC  $10^{19}$  komórek po 64 pasażach, co stanowi liczbę przewyższającą liczbę gwiazd w naszej galaktyce! Podstawą jest jednak założenie, że samo pasażowanie nie wpływa na właściwości reprodukcyjne komórek. Niestety, nie zawsze tak się dzieje. Po pierwsze, w niektórych systemach hodowli obserwowano związek przedłużonego pasażowania z odejściem od symetrycznych podziałów, z przewagą tworzenia komórek neuroprogenitorowych i niedojrzałych neuronów nad procesami samopowieliania przy późniejszych pasażach [32]. Po drugie, przy przedłużonym pasażowaniu NSC uzyskanych od dorosłych dawców obserwowano niestabilność chromosomów (starzenie się komórek) [37]. Jak to omówiono w dalszej części artykułu, powyższe procesy dotyczą wybiórczo NSC wywodzących się z określonych tkanek. Z perspektywy klinicznej jednak wolna od wszelkich ograniczeń zdolność do samopowieliania nie jest wymagana. Ważniejsze jest raczej ustalenie minimalnego poziomu symetrii i stabilności chromosomów, który pozwoli na tworzenie NSC o żywotności wystarczającej do celów przeszczepu.

### **Źródło pochodzenia tkanek i autogenność**

Jednym ze źródeł NSC jest tkanka embrionalna ssaków [38, 39]. Tkanka ta jest pluripotencjalna. Wykazano, że zastosowanie w warunkach *in vitro* kwasu retinowego, który w normalnym procesie rozwojowym stymuluje rozwój ektodermy płodu w kierunku szlaku nerwowego, doprowadza do rozwoju struktur zwanych ciałkami embrionalnymi [6]. W neurogenym środowisku o wysokim stężeniu FGF-2 oraz EGF ciałałka embrionalne można hodować w celu wykształcenia linii NSC.

Stosowanie NSC wywodzących się z tkanki embrionalnej wiąże się z wieloma korzyściami. Po pierwsze, ich chromosomy wydają się w mniejszym stopniu podlegać procesom starzenia w trakcie przedłużonego pasażowania [40], a same komórki cechują podziały symetryczne. Toczą się jednak dyskusje nad etycznymi i prawnymi skutkami wykorzystywania w terapii tkanek uzyskanych z ludzkich embrionów. Embrionalne pochodzenie NSC wiąże się ponadto z przeszczepami heterologicznymi, a tym samym — z możliwością ich odrzucenia, a w konsekwencji — immunosupresji. Mimo że w tkance embrionalnej nie dochodzi do ekspresji antygenów głównego układu zgodności tkankowej (HLA), warunkujących rozpoznawanie własnych i obcych białek, nie jest jasne, czy dalsze różnicowanie do fenotypu dojrzałych komórek doprowadziłoby do ekspresji HLA dawcy czy gospodarza. Co ciekawe, w niektórych badaniach nad allogenicznymi przeszczepami NSC u myszy i ludzi nie wykazano odrzucenia tkanek [41–43]. Ze względu na silną pluripotencjalność tkanki embrionalnej główną wadą przeszczepów komórek NSC pochodzących z tego źródła pozostaje możliwość powstawania potworniaków [38, 44].

Nerwowe komórki macierzyste pochodzące od dorosłych dawców uzyskuje się z tkanek ssaków, które przekroczyły okres dojrzewania, przy czym najczęstszym ich źródłem są fragmenty mózgu. W tej procedurze ekstrakty mózgu myszy lub ludzkiego zostają rozdzielone, a NSC — wyizolowane przez hodowlę na podłożach faworyzujących rozwój tkanki nerwowej. Prawdopodobnie najbogatszym źródłem prekursorów komórek układu nerwowego od dorosłych dawców jest strefa okołokomorowa oraz hipokamp, ze względu na zachodzącą tam neurogenezę. Istnieją jednak doniesienia na temat hodowli prekursorów komórek nerwowych z kory mózgu, istoty białej oraz innych obszarów mózgu [45]. Znaczenie i cechy komórek wywodzących się z tych obszarów są nieznanne.

Kolejnym źródłem NSC od dawców dorosłych jest szpik kostny, znany z obfitego występowania mezenchymalnych komórek macierzystych. Strategia oparta na wykorzystywaniu szpiku jest kontrowersyjna ze względu na konieczność wykazania transróżnicowania, czyli zdolności komórek do przechodzenia z jednej rozwojowej linii komórkowej (endodermy) do drugiej (ektodermy). Zachodzenie transróżnicowania *in vivo* poddawano w wątpliwość ze względu na doniesienia, które w przypadku przeszczepów NSC uzyskanych ze szpiku kostnego wskazywały raczej na fuzje komórek, a nie ich podziały i różnicowanie w kierunku komórek nerwowych [46]. Komórki, które uznawano za nowo zróżnicowane neurony, w rzeczywistości zawierały try

lub więcej zestawów chromosomów, co sugerowało endocytozę przeszczepionych komórek przez wcześniej istniejące neurony. Kwestia ta nie jest jednak jasna ze względu na to, że inne grupy badaczy obserwowały rzeczywistą pluripotencjalność komórek pochodzenia szpikowego [47].

Jak wcześniej wspomniano, w przypadku NSC uzyskiwanych od dorosłych dawców tak przedłużone pasażowanie, jak w przypadku NSC pochodzenia embrionalnego, może nie być wykonalne, możliwa jest też niestabilność chromosomów. Stosowanie NSC uzyskiwanych od osób dorosłych wiąże się także z wieloma korzystnymi cechami praktycznymi i klinicznymi. Na przykład, nie dotyczą ich etyczne kwestie odnoszące się do tkanek embrionalnych. Dostęp do źródła, jakim są tkanki samego pacjenta, oznacza, że — przynajmniej teoretycznie — możliwe są przeszczepy autologiczne. To z kolei zapobiegłoby konieczności terapii immunosupresyjnej. Wreszcie, NSC pochodzące z mózgu dorosłych dawców znajdują się już na określonym szlaku rozwoju, dlatego potencjał niekontrolowanego powstania potworniaków w ich przypadku jest mniejszy niż w przypadku embrionalnych komórek macierzystych.

Metoda oparta na wykorzystaniu autologicznych, homogenych NSC, pozwalająca na przedłużone pasażowanie bez utraty zdolności do symetrycznych podziałów oraz stabilności chromosomów, jest więc idealnym punktem wyjścia dla wszelkich form leczenia, które ma na celu odbudowę układu nerwowego. W tym kontekście obiecującym punktem wyjścia wydają się komórki macierzyste zlokalizowane w skórze ssaków. Jak omówiono wcześniej, neurony i naskórek wywodzą się z tej samej linii ektodermalnej. Z tego względu komórki macierzyste z tego regionu mogą stanowić atrakcyjne źródło NSC od dorosłych dawców, ponieważ transróżnicowanie nie byłoby wymagane. Toma i wsp. stanowili jedną z pierwszych grup, które, stosując metodę zawieszania, opisały pojawienie się podobnych do neurosfer agregatów komórek w ciągu kilku dni od rozpoczęcia hodowli komórek skóry gryzoni [48, 49]. W neurosferach wykazano ekspresję nestyny, nie stwierdzono natomiast obecności wskaźników mezenchymalnych oraz wskaźników niedojrzałych neuronów i gleju. Dowiedziono także, że dzielą się one symetrycznie przez ponad 30 pasaży, są zdolne do tworzenia klonów oraz, po usunięciu miogenów, różnicują się w równych proporcjach w kierunku neuronów i gleju. Co istotne, także w warunkach *in vivo*, po przeszczepieniu ich do jajnika kury, komórki te różnicowały się w żywotne neurony. W kolejnych badaniach wykazano, że skórę dorosłe-

go człowieka można wykorzystywać w celu uzyskania od dorosłych dawców prekursorów komórek układu nerwowego [50].

Autorzy zaadaptowali technikę, w której wywodzące się ze skóry neurosfery poddaje się testowi przylegania. Wydaje się, że, stosując tę technikę, można uzyskać homogenne hodowle prekursorów komórek nerwowych, stabilnych w ciągu wielu pasaży (patrz ryc. 3). Technika ta może być użyteczna w przyszłych badaniach klinicznych, ponieważ jako wstępne źródło tkanek konieczne jest jedynie 2–6 cm<sup>2</sup> skóry, a sama procedura wiąże się z minimalną inwazyjnością i chorobowością.

### **Przeżycie: czy to, co dzieje się *in vitro*, pozwala na przewidywanie zjawisk zachodzących *in vivo*?**

Niestety, dane statystyczne dotyczące badań nad komórkami macierzystymi wskazują, że po wielu miesiącach uważnej pracy w laboratorium w warunkach *in vitro* i wygenerowaniu około 10<sup>6</sup> NSC do celów przeszczepu jedynie mały odsetek tych komórek przeżywa choćby przez krótki okres w warunkach *in vivo*. Przeżywalność stanowi więc jedno z największych wyzwań, przed jakimi stoi terapia z udziałem tych komórek. Co więcej, nie jest jasne, które czynniki determinują przeżycie niektórych NSC, ich różnicowanie się i integrację ze strukturami nerwowymi gospodarza. Na przykład, środowisko, w którym istnieją preferencyjne warunki do rozwoju gleju, wyindukowane przez procesy zapalne i uszkodzenie tkanek, może stanowić kluczowy czynnik determinujący los przeszczepionych NSC [51]. Dlatego wciąż pozostaje otwartym podstawowe pytanie w tej dziedzinie: czy uzyskane w warunkach *in vitro* wyniki wystarczą, aby przewidzieć, co dzieje się w żywym organizmie?

Przeszczepione komórki wkraczają ponadto na „wrogie terytorium”, gdzie procesy patologiczne znacząco zmieniały mikrośrodowisko. Nie wiadomo, czy w przypadku licznych zaburzeń neurologicznych i psychicznych, omówionych niżej, takie zmiany mogą przynosić korzyść czy też negatywnie wpływać na przeżycie i integrację NSC. Sugeruje to, że w przypadku prób przeszczepiania NSC jakość komórek może być ważniejsza niż ich liczba, nie określono jednak, które cechy są najważniejsze. Substancją humoralną korzystnie wpływającą na przeszczepione NSC może być czynnik neurotrofowy pochodzenia mózgowego (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) ze względu na jego potencjalny udział w endogennej neurogeniezie, zarówno po wysiłku [52], jak i w złożonych czynnościach umysłowych [53].

## Strategie terapeutyczne z udziałem komórek NSC

### Egzogenne przeszczepy komórek NSC

Przeszczepianie prekursorów komórek nerwowych jest jedną z dwóch głównych stosowanych strategii naprawy układu nerwowego. W badaniach przeszczepiano różnorodne komórki, zarówno NSC, jak i komórki neuroprogenitorowe oraz niedojrzałe neurony. Istotnym aspektem, który należy uwzględnić, jest rodzaj badanego zaburzenia oraz teoretyczna rola przeszczepu. Komórki NSC są wysoce mobilne. Na przykład, gdy w modelu udaru zostają wszczepione do analogicznego obszaru po przeciwległej stronie mózgu, przemieszczają się przez całą szerokość mózgu, aby zaszczyć się w obszarze udarowym [54]. Do obszaru uszkodzenia mózgu NSC prawdopodobnie są kierowane na drodze chemotaksji. Nie wiadomo, która dokładnie substancja za to odpowiada, przy czym jednym z potencjalnych mediatorów tego procesu jest sekrecyjne białko prekursora amyloidu (APPs, *amyloid precursor protein secretase*), ponieważ pobudza je wiele szkodliwych bodźców [55], a samo stymuluje endogenną neurogenezę [56].

Z tego względu jest prawdopodobne, że, z jednej strony, przeszczepienie NSC (a także, w mniejszym zakresie, komórek neuroprogenitorowych) będzie bardziej korzystne w przypadku rozległych uszkodzeń mózgu, a także wtedy, gdy trudno uzyskać do nich dostęp stereotaktyczny. Z drugiej strony, przeszczep dużej liczby niedojrzałych neuronów, wykazujących niewielką mobilność poza obszar, do którego je dostarczono, może być bardziej odpowiedni w przypadku niewielkiego uszkodzenia, na przykład ostrego uszkodzenia rdzenia kręgowego, oraz przy względnie łatwym dostępie chirurgicznym.

### Stymulacja endogennych NSC

Inną metodą ocenianą w badaniach jest sztuczna stymulacja endogennej neurogenety. Badania takie stały się możliwe dzięki coraz pełniejszemu zrozumieniu udziału czynników regulatorowych w fizjologicznej neurogenety. Jednak bezpośrednie przełożenie procedur doświadczalnych na zjawiska zachodzące w czasie zmienionej neurogenety jest prawdopodobnie nadmiernym uproszczeniem. Układ regulacyjny *in vivo* wydaje się wielowymiarowy i zależny od licznych wewnętrznych interakcji [1].

Do czynników środowiskowych powodujących nasilenie neurogenety należą wzbogacenie środowiska [57] oraz aktywność fizyczna [52], zmniejsza ją natomiast długotrwały stres [58]. Częsteczki sygnałowe związane z regulacją obejmują, między innymi,

czynnik wzrostu śródbłonna naczyń [59], FGF-2 [45] oraz BDNF [60]. Wyniki badań nad terapią z udziałem egzogennych czynników wzrostu w przypadku chorób neurodegeneracyjnych zwięźle przedstawiono w innym opracowaniu [61]. W wielu spośród tych badań oceniano rolę czynnika neurotropowego wywodzącego się z linii glijowych — czynnika troficznego, którego rolę postuluje się w zwiększeniu przeżycia rozwijających się neuronów [62]. Ogólnie rzecz biorąc, dotychczas uzyskane wyniki przynoszą rozczarowanie, ponieważ sugerują, że w przypadku powyższej strategii bardziej realistycznym celem może być neuroprotekcja, a nie naprawa układu nerwowego.

## Znaczenie w chorobach neurologicznych i psychicznych

### Jaki jest cel?

Pierwsze, a być może najważniejsze, pytanie, jakie należy postawić, rozważając terapię z udziałem NSC w zaburzeniach neurologicznych i psychicznych, dotyczy wskazań i dokładnego określenia pożądanego wyniku. Samo przeszczepienie NSC do obszaru objętego procesem chorobowym i pełne nadziei oczekiwanie na najlepszy wynik jest oczywiście niewystarczające. Potencjalnie znaczenie może mieć wiele mechanizmów terapeutycznych i każdy z nich trzeba uwzględnić, oceniając skuteczność.

Jednym z tych mechanizmów może być przejściowy efekt humoralny. Wtedy przeszczepione NSC przeżywają przez krótki okres, w czasie którego są zdolne do wydzielania neuroprzekazników, czynników wzrostu oraz innych cząsteczek sygnałowych, zwiększających funkcjonalną skuteczność lokalnie utworzonych obwodów neuronalnych. W takim przypadku obserwowane korzyści behawioralne lub kliniczne mogą być krótkotrwałe.

Inny mechanizm działania przeszczepu to migracja komórek do miejsca patologicznego uszkodzenia, gdzie zwykle nie integrują się funkcjonalnie, lecz różnicują się w głąb lub elektrofizjologicznie bezwładne neurony. W takim przypadku ich znaczenie polega głównie na wsparciu metabolicznym, regulatorowym albo anatomicznym. Mimo to ich wpływ może się wiązać z poprawą kliniczną. Rozróżnienie między przeszczepem pomocniczym i funkcjonalnym jest więc istotne.

Badacze zwykle mają nadzieję na pewnego stopnia integrację funkcjonalną. Aby osiągnąć ten cel, trzeba sprostać kilku istotnym wyzwaniom. Po pierwsze, przeszczepione komórki muszą dotrzeć do właściwego miejsca. W migracji do patologicznego miejsca komórkom



prawdopodobnie pomaga chemotaksja. Nie musi to jednak być najlepsze miejsce przeznaczenia, jeżeli lokalne mikrośrodowisko nie pozwala na wzrost, różnicowanie oraz integrację NSC. Po drugie, konieczna jest właściwa liczba komórek. W chorobie Parkinsona (PD, *Parkinson's disease*) 80% neuronów istoty czarnej zwykle zanika przed pojawieniem się objawów klinicznych, co może stanowić deficyt rzędu  $10^7$  neuronów. Ponadto, nie tylko wystarczająca liczba komórek musi przeżyć w pobudzająco-toksycznym i apoptotycznym środowisku, ale także muszą one rozpocząć różnicowanie się w kierunku lokalnej klasy wyspecjalizowanych neuronów. Wreszcie, w miarę dojrzewania neurony muszą wytworzyć wystarczającą liczbę połączeń synaptycznych w obrębie lokalnych obwodów, osiągnąć funkcjonalność elektrofizjologiczną i rozpocząć uczestnictwo w przerwanym dynamicznym procesach lokalnej i ogólnoustrojowej dystrybucji informacji. Ponadto, wszystkie te procesy muszą właściwie przebiegać samoistnie! Jest to test stanowiący wyzwanie dla każdej strategii terapeutycznej. W dalszej części artykułu krótko opisano badania nad wykorzystaniem powyższej metody w różnych zaburzeniach neurologicznych i psychicznych i oceniono, czy leki oparte na NSC są realistycznym celem.

### **Choroba Alzheimera**

Choroba Alzheimera (AD, *Alzheimer's disease*) zasadniczo rozpoczyna się w przyśrodkowym płacie skroniowym (MTL, *medial temporal lobe*), obejmującym korę węchową oraz hipokampa, a następnie rozszerza się na wielofunkcyjną korę nową, a w końcu — na cały mózg [63]. Nie jest jasne, w jaki dokładnie sposób zmiany patologiczne zachodzące w przebiegu AD, do których należy tworzenie się płytek starczych złożonych z pozakomórkowych agregatów beta-amyloidu oraz wewnątrzkomórkowych splotów neurofibrilarnych, zbudowanych z nadmiernie ufosforylowanego białka *tau*, wywołują początkowy zespół amnestyczny we wczesnym otępieniu. Utrata synaps i neuronów w hipokampie jest rozległa i przekracza rozmiar lokalnego zaburzenia [64]. Biorąc pod uwagę kluczową rolę tych obszarów w funkcjach pamięci, pojawienie się zaburzeń pamięci nie budzi zaskoczenia. W badaniach kliniczno-patologicznych wykazano jednak, że ze stanem funkcji poznawczych w otępieniu najsilniej są skorelowane nie uszkodzenia neuropatologiczne ani liczba synaps w MTL, ale gęstość synaps w płacie czołowym [65, 66]. Dlatego indywidualne różnice w kompensacyjnej reorganizacji funkcjonalnej płata czołowego, zachodzącej w odpowiedzi na przerwanie obwodów pamięci w MTL, mogą

mieć istotne znaczenie dla ekspresji objawów klinicznych w AD [67, 68].

W jaki sposób pierwotne zmiany neuropatologiczne w przyśrodkowym płacie skroniowym wpływają na neurogenezę i biologię komórek NSC? W tej dziedzinie jest to podstawowe pytanie, a ostateczne odpowiedzi dopiero się pojawią. W badaniach molekularnych nad niezmiernie rzadką rodzinną postacią AD o wczesnym początku skupiono się na szlakach związanych z produkcją beta-amyloidu. U chorych stwierdzono mutacje w genach zlokalizowanych na chromosomie 21 (gen APP) i 14 (gen preseniliny). Białko prekursora amyloidu to naturalnie występujące białko przezbłonowe, które zostaje następnie pocięte na beta-amyloid wewnątrz- i zewnątrzkomórkowy oraz APPs. Aktywacja tego szlaku może nastąpić w odpowiedzi na wiele szkodliwych bodźców, włącznie z niedokrwieniem, drgawkami i uszkodzeniem mózgu [55]. Przeprowadzone *in vitro* badania sugerują, że APPs może wykazywać wpływ neurotroficzny — istnieją doniesienia na temat nasilenia wzrostu neurytów i proliferacji komórek pod jego wpływem [56]. Związek APP z tymi procesami może jednak mieć charakter nieliniowy, zależny od dawki, ponieważ w niższych stężeniach APPs pobudza *in vitro* różnicowanie NSC zarówno w kierunku neuronów, jak i gleju, a przy wyższych ( $> 25$  ng/ml) — preferencyjne różnicowanie w kierunku astrocytów [69]. Myszy transgeniczne, którym brakuje APP, cechują się znacząco niższą migracją NSC po przeszczepie, co sugeruje także jego rolę jako sygnału tropicznego [69]. Na dużą uwagę zasługuje również możliwość, że egzogenne przeszczepy NSC w mikrośrodowisku charakterystycznym dla AD mogą preferencyjnie różnicować się w kierunku gleju, a nie NSC. Nie jest jasne, jak beta-amyloid wpływa na endogenną neurogenezę. Haughey i wsp. [70] przeprowadzili usystematyzowaną analizę wpływu tego białka na proliferację i różnicowanie NSC. U myszy transgenicznych, cechujących się nadmierną ekspresją APP, proliferacja komórek układu nerwowego w zakręcie zębatym była istotnie mniejsza niż u myszy z grupy kontrolnej. Podobnie, kiedy neurosfery uzyskane z ludzkich płodów stymulowano *in vitro* beta-amyloidem w stężeniach powyżej  $1 \mu\text{M}$ , proliferacja znacząco się obniżyła. Wzrosła także apoptoza komórek neuroprogenitorowych, prawdopodobnie na skutek przerwania właściwej homeostazy komórkowej wapnia. Powyższe wyniki uzyskano jednak w przypadku stężeń beta-amyloidu przewyższających 1000 razy stężenia spotykane w klinicznych postaciach AD, w których utrzymują się na poziomie nanomolarnym [55]. Przy takich stężeniach nie odnotowywano zauważalnego wpływu beta-

-amyloidu na komórki NSC. Może to tłumaczyć, dlaczego w pojedynczym doniesieniu na temat dokonanej *post mortem* analizy neurogenezy w AD obserwowano znaczący wzrost stężenia prekursorów komórek nerwowych w zakręcie zębatym w porównaniu z grupą kontrolną dobraną pod względem wieku i płci [71]. Duże nasilenie atrofii, która ma miejsce w płacie skroniowym przyśrodkowym w AD, wiąże się z ryzykiem sztucznego podwyższenia stężenia białek ze względu na zajęcie objętości. W powyższym doniesieniu nie odnotowano jednak podobnej zmiany w przypadku białek kontrolnych komórek nerwowych. Autorzy sugerują, że w przypadku AD patologiczne, neurotoksyczne procesy mogą wyzwać kompensacyjną neurogenezę przez szlak APP. Ostatecznie jednak nie są one w stanie podtrzymać funkcji pamięciowych ze względu na rozległą utratę neuronów i synaps. Czy więc potencjalizacja neurogenezy przez suplementację egzogennymi NSC może się do czegośkolwiek przydać? Wyniki nielicznych dotychczas przeprowadzonych badań nad przeszczepami są zachęcające. W jednym z nich, z udziałem starzejących się szczurów, wykazano znaczące zmniejszenie upośledzenia behawioralnego po przeszczepieniu NSC pochodzenia ludzkiego do komory bocznej; uzyskano przy tym dowody na zasiedlenie się przeszczepu w MTL i korze mózgu [41]. W innym badaniu zniesiono unerwienie cholinergiczne MTL przez pobudzeniowo-toksyczne uszkodzenie jądra podstawnego Meynerta, w celu symulacji niektórych cech neurotoksycznych i behawioralnych AD [72]. Porównano wpływ, jaki miało bezpośrednie przeszczepienie neurosfer do kory czołowej myszy z uszkodzonym jądrem Meynerta z wynikami uzyskanymi u zdrowych myszy z grupy kontrolnej. W grupie z uszkodzeniami w jądrze Meynerta stwierdzono znaczącą poprawę procesów poznawczych, któremu towarzyszyło różnicowanie w kierunku neuronów cholinododatnich i serotoninododatnich dookoła miejsca przeszczepu. Co ciekawe, u myszy z grupy kontrolnej rozwinęły się potworniaki, a ich funkcje poznawcze były gorsze niż u nieleczonych myszy z uszkodzonym jądrem Meynerta.

Wykazanie na zwierzęcych modelach starzenia się i neurotoksyczności neuroprotektynnego wpływu czynnika wzrostu nerwów (NGF, *nerve growth factor*) spowodowało, że w AD podjęto badanie kliniczne nad pojedynczymi komórkami pod kątem terapii genowej z udziałem genu NGF [73]. Autologiczne fibroblasty poddano obróbce genetycznej *in vitro* tak, aby wydzielaly NGF i przeszczepiono je bezpośrednio do jądra Meynerta 8 pacjentom. Jeden pacjent zmarł w wyniku powikłań pooperacyjnych, u innego wystąpiły

liczne choroby. U pozostałych 6 chorych głównym efektem było spowolnienie pogorszenia funkcji poznawczych w ciągu 2-letniego okresu obserwacji. Szybkość pogorszenia tych funkcji, ocenianych za pomocą *Mini Mental State Examination* (MMSE), zmniejszyła się z 6 punktów w roku poprzedzającym leczenie do 3 punktów w ciągu kolejnego roku. Nie obserwowano zmian w rocznych wahaniami punktacji mierzonej z użyciem *Alzheimer's Disease Assessment Scale — Cognitive Subscale* (ADAS-cog). Co ciekawe, w seriach skanów uzyskanych metodą pozytronowej tomografii emisyjnej (PET, *positron emission tomography*) u 4 pacjentów wykazano zwiększony wychwyty fluorodeoksyglukozy (FDG, *fludeoxyglucose*) w neuronach cholinergicznym przodomózgowia. U pacjenta, u którego po 4 tygodniach po zabiegu wykonano autopsję, stwierdzono znaczącą przeżywalność przeszczepu i jego nasiloną penetrację przez neurony cholinergiczne. Jednym z głównych ograniczeń terapii komórkowych AD jest brak odpowiedniego modelu zwierzęcego. Wykorzystuje się ponad 50 szczepów transgenicznych myszy, z których każdy cechuje się różnym układem mutacji genów związanych z obróbką beta-amyloidu lub regulacją białek *tau* [74]. Podstawą w tych modelach są procesy, których rolę postulują się w dziedzicznej postaci AD o wczesnym początku, ale znaczenie tych mechanizmów w sporadycznej formie AD, która obejmuje 95% wszystkich przypadków tej choroby, nie jest jeszcze ustalone. Na przykład, niedawno zaproponowano model AD, który odwzorowuje poznawcze, neuropatologiczne i neurotoksyczne cechy tego schorzenia, przy czym opiera się jedynie na usunięciu genu NGF [75], poddając w ten sposób w wątpliwość, czy defekty obróbki beta-amyloidu są niezbędnymi i wystarczającymi czynnikami wyzwalającymi. Podstawą obecnie stosowanych modeli AD z udziałem transgenicznych myszy są więc w znacznym stopniu teoretyczne założenia dotyczące neurotoksycznego wpływu beta-amyloidu i, jak dotąd, nie wykazano, aby cechowały się dużą rzetelnością w przełożeniu na warunki *in vivo*. Na przykład, podanie amyloidu transgenicznym myszom stanowiącym model AD doprowadziło do poprawy w zakresie deficytów poznawczych, a w czasie autopsji wykazano zmniejszenie ilości amyloidu [76]. Badania kliniczne trzeba było jednak przedwcześnie przerwać z powodu zagrożenia zgonem z powodu zapalenia mózgu. U myszy tych nie stwierdzono również spójności między utratą neuronów i synaps [74], będącą mikrostrukturalną oznaką klinicznej progresji choroby [77]. Co więcej, jak wspomniano w odniesieniu do komórek NSC, transgeniczne myszy, które były modelem AD, cechowały się

upośledzoną neurogenezę [70]. U chorych z AD wykazywano jednak nasilenie neurogenezy [71].

Uwagi te uwidaczniają, jak niewielka jest wiedza na temat fizjologii amyloidu [55, 78]. Jak krótko przedstawiono, szlak APP-beta amyloidu, przez indukcję i mobilizację NSC, może odgrywać ważną rolę w plastycznej odpowiedzi mózgu na różnego rodzaju uszkodzenia. Z tego względu postęp w komórkowej terapii AD wymaga stworzenia nowych modeli o podwyższonej rzetelności w przełożeniu danych doświadczalnych na warunki *in vivo*.

### Depresja

Depresję często, choć nie zawsze, wywołują silny stres. Do powszechnych stresorów należą problemy w pracy, w relacjach, nierealistyczne osobiste oczekiwania lub negatywne postrzeganie siebie. Od lat wiadomo, że pobudzone przez stres glukokortykoidy toksycznie wpływają na neurony hipokampa [79]. Biorąc pod uwagę, że hipokamp jest jednym z głównych obszarów endogennej neurogenezy, obserwacje te wskazują na związek między hormonami stresu, depresją i natywnymi NSC [80, 81].

Na podstawie behawioralnych modeli depresji, zazwyczaj polegających na ekspozycji gryzoni na niemożliwe do uniknięcia nieprzyjemne sytuacje, uzyskano wiele spójnych informacji. Po pierwsze, depresja obrazowana przez modele zwierzęce wiąże się ze zmniejszeniem endogennej neurogenezy [82]. Jednym z mediatorów w tym związku może być zwiększona produkcja kortyzolu, ponieważ zahamowanie jego syntezy przy działającym stresie podtrzymuje tworzenie i przeżywanie nowych neuronów w zakręcie zębatym [83]. Po drugie, silny ostry lub długotrwały stres prowadzi do wzrostu stężenia układowego kortyzolu, co z kolei powoduje powstawanie nadmiaru glutamianu w przestrzeni zewnątrzkomórkowej, który jest nie tylko neurotoksyczny, ale też niekorzystnie wpływa na neurogenezę [84].

Innym kluczowym odkryciem było stwierdzenie związku między różnymi lekami przeciwdepresyjnymi i produkcją neuronów *de novo*. Serotonina wykazuje silne działanie mitogenne w organizmie i w czasie rozwoju neuronów [85]. Niedawno wykazano, że agoniści receptorów serotoninowych znacząco zwiększają neurogenezę u osób dorosłych [80]. Na przykład, 2 tygodnie leczenia fluoksetyną (5 mg/kg mc.) u dorosłych szczurów zwiększało proliferację nowych neuronów o ponad 35% [86], a także niwelowało szkodliwy wpływ, wywierany przez niemożliwy do uniknięcia stres na proliferację komórek [87]. Duże znaczenie wydaje się mieć zwłaszcza receptor 5-HT<sub>1A</sub>, ponieważ

jego blokada zmniejsza proliferację komórek w zakręcie zębatym [88]. Sugerowano ponadto, że neurogeneza jest procesem niezbędnym do działania leków przeciwdepresyjnych; dowiedziono też, że jej zniesienie przez naświetlenie neutralizowało terapeutyczny wpływ fluoksetyny w modelu depresji [89]. Co ciekawe, nasilenie neurogenezy stwierdzano w przypadku stosowania noradrenaliny, klasycznych trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych [86], a nawet terapii elektrowstrząsowej [90]. Skuteczne okazało się także leczenie depresji w modelach zwierzęcych za pomocą czynników neurotroficznych, takich jak BDNF, nawet po zastosowaniu pojedynczej dawki [91].

W jaki jednak sposób obrót nowych neuronów w hipokampie może wpływać na nastrój człowieka? Odpowiedź na to pytanie stanowi największe wyzwanie przy uzasadnianiu leczenia dużej depresji za pomocą NSC. Zgodnie z jedną z hipotez impulsacja z kory węchowej do zakrętu zębatego pochodzi częściowo z przedniej części zakrętu obręczy, który uczestniczy w percepcji i regulacji nastroju. Hipokamp łączy się także z ciałem migdałowatym — obszarem związanym z obróbką negatywnych emocji. Wiadomo także, że hipokamp odgrywa kluczową rolę w tworzeniu pamięci i jej podtrzymywaniu. Zasugerowano, że zaburzenie biologii NSC u osób z depresją powoduje „zamknięcie” nieprzyjemnych wspomnień w powtarzającym się cyklu, co jeszcze bardziej podwyższa związane ze stresem stężenie kortyzolu i zmniejsza potencjał neurogenezy. „ (...) Chorzy nie potrafią uciec przed psychologicznym wpływem pierwotnych czynników wywołujących i pozostają zanurzeni w długotrwałym stanie depresyjnym” (Jacobs i wsp., str. 264) [80]. Dlatego sugeruje się, że kluczowym czynnikiem w zdrowieniu z depresji jest przywrócenie prawidłowej neurogenezy. Jako kolejny dowód na poparcie tej tezy zaproponowano 4–6-tygodniowy okres upływający do zadziałania leków przeciwdepresyjnych, ponieważ odpowiada on czasowi, w jakim neurony dzielą się, różnicują, a następnie włączają w funkcjonalne obwody w MTL.

Dane uzyskane w badaniach z udziałem ludzi są jednak mniej spójne i trudniejsze do interpretacji ze względu na brak zgody dotyczącej pośmiertnych immunohistochemicznych wskaźników neurogenezy. W pojedynczym badaniu *post mortem* osób z dużą depresją nie wykazano różnic w zakresie parametrów niedojrzałych proliferujących komórek w hipokampie w porównaniu w osobami z grupy kontrolnej, dobranymi pod względem wieku, czasu, który upłynął od zgonu, rasy i płci [92]. Nie stwierdzono także związku między przyjmowaniem leków przeciwdepresyjnych w mo-

mencie śmierci z proliferacją komórek w tym regionie z tendencją do mniejszego nasilenia proliferacji u osób leczonych (czyli odwrotnie do oczekiwań).

Inny wątpliwy aspekt hipotezy dotyczącej roli NSC w depresji to fakt, że zależy ona od nieliniowego zjawiska „punktu granicznego” (*tipping point*), które zachodzi w warstwie podziarnistej zakrętu zębatego. Dzieje się tak, ponieważ normalna produkcja neuro-nów w tym obszarze wynosi około 2000–3000 komórek dziennie, co stanowczo nie wystarcza do zrównoważenia neurotoksycznego wpływu wysokich stężeń kortyzonu. Aby zmiany nasilenia endogennej neurogenezy wykazywały funkcjonalny wpływ na znacznie obszerniejsze, złożone i rozległe sieci odpowiadające za nastrój, obejmujące obszary limbiczne i korowe, należy rozważyć wpływ tych nowych neuronów. Co ciekawe, mimo braku danych doświadczalnych na poparcie tego założenia, istnieją modele statystyczne dla nieliniowego „efektu motyla” (*butterfly effect*) utworzone na podstawie układów dynamicznych [93] i teorii złożoności [94].

### Schizofrenia

Hipoteza neurorozwojowej etiopatogenezy schizofrenii zakłada, że urazy, do których doszło w okresie ciąży i okołoporodowym, mogą wpływać na właściwy rozwój mózgu. Szczególną rolę miałby odgrywać hipokamp ze względu na spójne obserwacje kliniczne na temat atrofii w tej strukturze [95]. Teoria ta może obejmować komórki macierzyste, ponieważ, z definicji, w trakcie rozwoju wszystkie neurony wywodzą się z NSC. Co ciekawe, białko relina, występujące w macierzy zewnątrzkomórkowej, a którego deficyt wykazano w mózgach osób chorych na schizofrenię i które, jak się uważa, odgrywa rolę w migracji neuronów w trakcie rozwoju [96], może być zaangażowane w sygnalizowanie migracji przeszczepionych NSC [97]. Znaczenie NSC pochodzących od dorosłych dawców w schizofrenii jest dopiero we wstępnej fazie eksploracji. Za zwierzęcy model schizofrenii uznaje się stan, w jakim znajdują się gryzonie po wlewie ketaminy w stanie częściowego znieczulenia, ze względu na zmianę zachowań społecznych, zaburzenie mechanizmu utajonego hamowania oraz zmiany w zakresie wiązania i metabolizmu dopaminy, glutaminy i serotoniny [98]. Wykorzystując ten model, jedna z grup badaczy wykazała zwiększoną neurogenezę w strefie podziarnistej hipokampa, przeciwnie do oczekiwań wynikających z obecności atrofii w próbkach klinicznych pochodzenia ludzkiego. Co interesujące, w jedynym dotychczas przeprowadzonym badaniu *post mortem* dotyczącym neurogenezy u chorych na schizofrenię

także wykazano nasilenie tego procesu [92]. W badaniach z udziałem gryzoni haloperidol zdawał się zwiększać neurogenezę przez specyficzną blokadę receptorów dopaminowych na prekursorach komórek nerwowych [99]. Powyższe dane wskazują na możliwość, że uzyskane w badaniach *post mortem* wyniki są rezultatem leczenia, a nie procesów patofizjologicznych.

### Choroba Parkinsona

Ambitne plany dotyczące zastosowania leków opartych na NSC w terapii zaburzeń nerwowych i psychicznych mogą wiele zyskać dzięki badaniom nad zastosowaniem przeszczepów w chorobie Parkinsona (PD, *Parkinson's disease*) ze względu na 10-letnie doświadczenie z przeszczepami tkanek płodowych w tej chorobie. Na pierwszy rzut oka PD wydaje się idealnym „kandydatem” do terapii komórkowej — jest częstą i upośledzającą chorobą, dostępne jest leczenie objawowe, ale jego skuteczność zmniejsza się z czasem, mechanizmy patogenetyczne są dobrze poznane, a uszkodzenia neuropatologiczne i deficyty komórek nerwowych — względnie ograniczone. Wyniki uzyskane w badaniach klinicznych, w których stosowano terapię komórkową PD, wskazują, jakie mogą być realne oczekiwania dotyczące efektów stosowania tej metody w leczeniu chorób nerwowych i psychicznych. We wczesnych badaniach nad przeszczepami do prądkowia chorych z lekooporną postacią PD wstrzykiwano nietknięte fragmenty śródmózgowia płodu [100]. Rezultaty były zachęcające, a u niektórych chorych objawy motoryczne uległy spektakularnej redukcji. Uzyskane wyniki trudno było jednak zinterpretować ze względu na brak grupy kontrolnej. Freed i wsp. [42] w 2001 roku przedstawili wyniki pierwszego randomizowanego badania z udziałem grupy kontrolnej nad zastosowaniem przeszczepów tkanki płodowej w leczeniu ciężkich postaci PD. Wydzielili oni komórki mózgu embrionu i hodowali je w laboratorium przez 4 tygodnie, po czym, w warunkach miejscowego znieczulenia, dokonywali obustronnego przeszczepu do skorupy z wykorzystaniem chirurgii stereotaktycznej. W grupie, w której zamarkowano zabieg chirurgiczny, wywiercono dziury w czaszce, ale nie przewiercono opony twardej. Pod koniec pierwszego roku okresu obserwacji stwierdzono, że terapia zdawała się przynosić korzyść chorym poniżej 60. roku życia, przy znaczącej poprawie wyników klinicznych, gdy pacjentów badano w godzinach porannych (pomiar stężeń lewodopy). Co więcej, u 17 spośród 20 chorych z przeszczepem, u których porównano skany PET wykonane przed leczeniem i po leczeniu, stężenia <sup>18</sup>F-fluorodopy w zwojach podstawy były zmiernie podwyższone.

Te obiecujące wstępne zmiany zanikały jednak w trakcie nieco dłuższego okresu obserwacji. U około 15% osób z przeszczepem, włącznie z tymi, u których po roku stwierdzono poprawę, między 1. a 3. rokiem okresu obserwacji wystąpiły ciężkie dystonie lub dyskinezy. Jeszcze bardziej niepokojące było to, że nieprawidłowe ruchy utrzymywały się mimo przerywania stosowania wszelkich leków przeciwparkinsonowskich. Czego więc można się dowiedzieć na podstawie piśmiennictwa dotyczącego przeszczepów płodowych w PD? Po pierwsze, wydaje się, że komórki prekursorowe mogą przeżyć i zasiedlić ludzki mózg, włącznie z obszarami, w których mikrośrodowisko mogło ulec zmianom neuropatologicznym. Po drugie, przynajmniej niektóre z tych komórek wydają się funkcjonalne, co udowodniono w oparciu o wzrost przekazywalności dopaminergicznego. Po trzecie, wyraźnie możliwa jest poprawa czynnościowa, na co wskazują doniesienia dotyczące poprawy klinicznej zachodzącej w trakcie randomizowanych badań z udziałem grup kontrolnych. Po czwarte, trudno jest przewidzieć, kto odpowie, a kto nie odpowie na leczenie. Wreszcie, wydaje się, że komórki prekursorowe pochodzące z ludzkich płodów mogą się nieprawidłowo zaszczepić w obwodach motorycznych związanych z jądrami podstawy, co w perspektywie długoterminowej może spowodować więcej problemów niż korzyści. Zatem ocena każdej terapii z udziałem NSC będzie wymagała dłuższego okresu obserwacji, trwającego ponad 1–2 lata. Jedną z przyczyn, dla których przeszczepy komórek pochodzenia płodowego w PD mogą dać tak zróżnicowane wyniki u poszczególnych pacjentów, z siejącymi spustoszenie działaniami niepożądanymi niektórych z nich, może być wysoce heterogenny skład tkanek. Przeszczepy bardziej homogenne NSC powinny się wiązać z większą przewidywalnością efektów terapii. Przeprowadzono kilka badań nad przeszczepami NSC z wykorzystaniem zwierzęcych modeli PD (patrz tab. 2). Ogólnie rzecz biorąc, wykazano w nich różnego stopnia poprawę w zakresie objawów ruchowych, połączoną ze skutecznym zasiedleniem się przeszczepu. Zagadnienie wystarczającej liczby i jakości NSC pozostaje jednak dużym wyzwaniem, ponieważ leczenie PD wymaga nie tylko zadowalającej liczby NSC — muszą być one także w stanie zróżnicować się w kierunku wysoce wyspecjalizowanych neuronów dopaminergicznych.

Z tego względu wiele informacji wnosi badanie przeprowadzone niedawno przez Roya i wsp. [44]. Wykorzystując ludzkie płodowe komórki macierzyste, badali oni zagadnienie objętości, odtwarzając dopaminergiczne środowisko rozwijającego się płodu na dro-

dze hodowli tych komórek wspólnie z unieśmiertelnionymi astrocytami pochodzącymi z brzusznej części śródmózgowia płodu. Przy zastosowaniu tej techniki udało im się zwiększyć liczbę neuronów dopaminergicznych z 12% do ponad 65%. Gdy przeszczepiono te komórki w modelu z uszkodzeniem skorupy, który — jak się uważa — wiernie naśladuje wiele spośród behawioralnych cech PD, deficyty ruchowe niemal całkowicie się cofnęły. Dokonana *post mortem* w 10. tygodniu procesu zdrowienia analiza wykazała jednak, że *in situ* neurony dopaminergiczne stanowiły mniej niż 20% przeszczepu, a większość z nich lokalizowała się na obwodzie (czyli bliżej tkanek gospodarza), gdzie obserwowano także liczne zaktywowane komórki glejowe. Nie stwierdzono więc korelacji między przeżyciem przeszczepów dopaminergicznych a poprawą behawioralną. Największy problem sprawiło jednak odkrycie, że w samym jądrze przeszczepu pozostało wiele niezróżnicowanych komórek prekursorowych, mimo że upłynął tydzień od przeszczepu, a co więcej — intensywnie się rozrastały. Zatem, mimo braku dowodów na istnienie potworniaka lub zmian anaplastycznych, z upływem czasu istnieje możliwość przekształcenia się jądra przeszczepu w masę nowotworową.

### Wnioski

Terapia komórkowa PD wskazuje, że w zasadzie można odwrócić niektóre spośród behawioralnych efektów procesów neurodegeneracyjnych, przeszczepiając prymitywną tkankę nerwową do dotkniętego obszaru. Dlatego w przypadku istnienia możliwych do zidentyfikowania uszkodzeń terapia zaburzeń nerwowych i psychicznych jest realistyczna. Potrzebnych jest jednak wiele innowacyjnych pomysłów i technik. Obecnie badacze przypominają Odysuseusza nawigującego w przesmyku między Scyllą a Charybdą — z jednej strony istnieje ryzyko niedostatecznego przeżycia i integracji komórek do ocalałych obwodów nerwowych, czego konsekwencją będzie niemal niezauważalny efekt kliniczny, z drugiej strony nadmierne podziały komórek i ich różnicowanie stwarzają groźbę wystąpienia ciężkich działań niepożądanych lub powstania potworniaka. Badania kliniczne nad przeszczepianiem NSC u chorych byłyby przedwczesne przed rozstrzygnięciem tych zagadnień na modelach zwierzęcych. Wiele pracy będzie wymagało dokładniejsze charakteryzowanie i oczyszczenie zagadkowej nerwowej komórki prekursorowej.

Jest też jasne, że największy postęp uzyskano w tych zaburzeniach neurologicznych i psychicznych, w odniesieniu do których istnieją odpowiednie modele

**Tabela 2.** Wyniki badań nad przeszczepami prekursorów komórek nerwowych w modelach choroby Alzheimera (AD, Alzheimer's disease) i choroby Parkinsona (Parkinson's disease)

**Table 2.** Results from transplant studies of neural precursors in models of aging, AD and PD

Zaburzenie i autor	Model	Strategia komórkowa	Efekt behawioralny	Okres	Histologia obserwacji
Choroba Alzheimera i starzenie Wang i wsp. [93]	Mysz C57BL/6 z uszkodzeniem jądra Meynerta przez kwas ibotenowy	Przeszczep neurosfer utworzonych z komórek macierzystych embrionów myszy ( $1-5 \times 10^4$ komórek/ $\mu$ l) do czolowej kory asocjacyjnej i obszaru S1 pola baryłkowego kory ( <i>barrel cortex</i> ); grupa kontrolna obejmowała zwierzęta bez uszkodzeń, u których dokonano przeszczepu. Przeszczep $10^5$ hNSC oznakowanych BrdU do prawej komory; hNSC uzyskano z kory mózgowej ludzkiego płodu	Zmniejszenie upośledzenia pamięci operacyjnej dzięki zastosowaniu 8-ramiennego testu promienistego labiryntu 8 tygodni po przeszczepie	12 tygodni	Acetylocholinododatnie i serotonindodatnie neurony w obrębie i dookoła przeszczepu; przeszczep u zwierząt z grupy kontrolnej spowodował powstanie potworników i znaczne pogorszenie funkcji pamięci
Kwak i wsp. [90]	Mysz z usuniętym na drodze knockoutu genem APP	Przeszczep $10^5$ hNSC oznakowanych BrdU do prawej komory; hNSC uzyskano z kory mózgowej ludzkiego płodu	Nie oceniano	4 tygodnie	Silniejsze różnicowanie przeszczepionych hNSC w kierunku gleju niż neuronów; ich migracja i różnicowanie zmniejszone u myszy, u których dokonano knockoutu genu APP, co sugeruje rolę APP jako regulatora NSC w mózgu dorosłych osobników; zmieniony metabolizm APP w AD może mieć znaczenie w fizjopatologii tej choroby
Qu i wsp. [41]	Porównanie szczurów rasy Fisher 344 w wieku 6 miesięcy i 24 miesięcy	Przeszczep $10^5$ hNSC oznakowanych BrdU do prawej komory, grupę kontrolną uzyskano przez dokomorową iniekcję soli	Znacząca poprawa w teście labiryntu wodnego Morrisa, zarówno u młodszych, jak i u starszych zwierząt z upośledzoną pamięcią; nie obserwowano poprawy u starszych zwierząt, których funkcje wykonawcze przed przeszczepem były takie, jak u młodszych zwierząt	30 dni	Współwystępowanie neuronów z $\beta$ III tubulina i BrdU, wskazujących na różnicowanie się hNSC, po obu stronach zakrętu obręczy, kory ociemieniowej i hipokampa (CA1, CA3 i zakręt zębaty); w polach hipokampa wykazano także obecność astrocytów dawcy
Choroba Parkinsona Harrower i wsp. [101]	Szczury Sprague-Dawley z jednostronnym uszkodzeniem prawego przyśrodkowego szlaku przedmózgowia przez 6-OHDA	Przeszczep pierwotnych komórek neuroprogenitorowych świni i świnińskich komórek prekursorowych układu nerwowego, które uległy ekspansji ( $\sim 10^6$ ) do prądkowia szczurów; immunosupresja z użyciem cyklosporyny	Brak istotnych zmian w rotacji ciała wzbudzonej amfetaminą w badanych grupach zwierząt	19 tygodni	Dobra integracja przeszczepu pochodzących od świni, pierwotnych komórek neuroprogenitorowych, których wypustki rozciągnęły wypustki gospodarza, włącznie z istotą białą, tworząc synapsy; przeżywalność przeszczepu pierwotnej tkanki nerwowej świni była istotnie mniejsza; przeszczepy, które przeżyły, były znacząco zinfiltrowane przez limfocyty CD8+ i makrofagi;

cd. →

Zaburzenie i autor	Model	Strategia komórkowa	Efekt behawioralny	Okres	Histologia obserwacji
Takagi i wsp. [102]	Mały <i>Cynomolgus</i> z uszkodzeniami skorupy przez MPTP	Przeszczep wzbudzonych neuronów dopaminergicznych z neurosfer utworzonych z embrionalnych komórek macierzystych małpy (300 000–600 000 komórek) bezpośrednio do skorupy; immunosupresja z użyciem cyklosporyny	Znamienna poprawa w zakresie punktacji neurologicznej po 10 tygodniach od przeszczepu; odzyskiwanie postawy i ruchliwość uległy znacznej poprawie; brak istotnych zmian w ruchu sprawdzania położenia głowy; u żadnego z badanych zwierząt nie powstały dyskiinezy	14 tygodni	mimo dłuższego czasu przeżycia przeszczepu u tych zwierząt, u których doszło do jego integracji i dojrzewania, nie wykazano jego znaczenia funkcjonalnego ze względu na niemożność wykazania neuronów DA w przeszczepie wykryto nieco większy odsetek komórek GABA-dodatnich niż TH-dodatnich, zaobserwowano natomiast niewiele komórek serotonino-dodatnich; liczba przeżywających neuronów DA była jednak bardzo niska, na poziomie 1–3% komórek; w wykonanym w 14. tygodniu po przeszczepie badaniu PET wykazano wzrost wychwytu fluorodopu w skorupie biorców zwierzęcych, co wskazywało, że przeszczepione komórki funkcjonowały jako neurony DA
Roy i wsp. [44]	Szczury Sprague-Dawley z uszkodzeniami prążków przez 6-OHDA	Przeszczep 500 000 niedojrzałych neuronów dopaminergicznych uzyskanych z hESC, które hodowano z unieśmiertnionymi astrocytami ze śródmózgowia mózgu płodu (czyli ukierunkowanej pożywki) w celu zwiększenia liczby powyższych neuronów; przeszczepiane bezpośrednio do <i>neostriatum</i> ; w jednej grupie kontrolnej podano sól, w drugiej dokonano przeszczepu hESC hodowanych na nieukierunkowanej pożywkę; immunosupresja z użyciem cyklosporyny	Wzbudzona apomorfina rotacja ciała nasiliła się w grupie kontrolnej po 8 tygodniach obserwacji; jej zniesienie obserwowano w grupie, której przeszczepiono hESC hodowane na ukierunkowanym podłożu; w grupie, w której dokonano przeszczepów hESC hodowanych na nieukierunkowanym podłożu, nastąpiło tak duże pogorszenie, że nie dokończono testów behawioralnych	10 tygodni	Zastosowanie protokołu opartego na pozytywce kierunkującej spowodowało wzrost odsetka uzyskanych neuronów dopaminowych z 12% do 65%; analiza <i>post-mortem</i> wykazała, że przeszczep hESC hodowanych na pozytywce kierunkującej zawierał poniżej 20% neuronów dopaminergicznych, przy czym większość z nich znajdowała się na powierzchni styku komórek gospodarza i przeszczepu, gdzie obserwowano także wiele zaktywowanych astrocytów; w grupie tej nie stwierdzono korelacji między poprawą funkcjonalną a poziomem unerwienia dopaminergicznego w przeszczepie; ponadto jądro przeszczepu było zdominowane przez nieodróżniewane prekursor komórek nerwowych, które intensywnie się dzieliły, co wskazywało na możliwość rozwoju nowotworów; przeszczep hESC hodowanych na pozytywce niekierunkującej były odmienne — transformacja w guzy anaplastyczne nastąpiła u wszystkich zwierząt

APP (amyloid precursor protein) — białko prekursorowe amyloidu; OHDA (6-hydroxydopamine) — 6-hydroksydopamina; MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) — 1-metylo-4-fenylotetrahydropirydyna; BrdU (bromodeoksyuryna; hESC (human embryonic stem cells) — ludzkie embrionalne komórki macierzyste; NSC (neural stem cells) — nerwowe komórki macierzyste; GABA (gamma-aminobutyric acid) — kwas gamma-aminomasłowy; TH (tyrosine hydroxylase) — hydroksylaza tyrozyny; PET (positron emission tomography) — pozytonowa tomografia emisyjna

zwierzęce. Istnieją korzyści w zakresie PD i depresji związane z istnieniem modeli o zadowalającym poziomie rzetelności przy przeniesieniu wyników doświadczalnych na warunki *in vivo*, dlatego poczyniono znaczący postęp w badaniach nad przeszczepami w PD, a w przypadku depresji rola neurogenezy w jej etiologii jest lepiej poznana. Jednak transgeniczny model AD cechuje ograniczona rzetelność, a przełożenie wyników doświadczalnych na badania kliniczne jest sporne. Modele schizofrenii dopiero zaczynają się pojawiać i muszą zostać udoskonalone w celu dalszego zrozumienia roli NSC pozyskanych

od dorosłych dawców w fizjopatologii i leczeniu tego zaburzenia.

Aby terapia z udziałem NSC stała się główną opcją kliniczną, konieczne są dalsze badania nad tymi komórkami i dokładniejsze zrozumienie interakcji między związanymi z nimi procesami a podstawowymi chorobami neuropsychiatrycznymi.

#### Podziękowania

Pracę sfinansowano z grantu programowego *National Health and Medical Research Council of Australia* (ID#350833).

#### Streszczenie

**Wstęp.** W niniejszej pracy przeprowadzono wszechstronny przegląd piśmiennictwa na temat nerwowych komórek macierzystych oraz zaburzeń neurologicznych i psychicznych.

**Metody.** W celu odnalezienia odpowiednich prac dotyczących choroby Alzheimera, depresji, schizofrenii i choroby Parkinsona jako słowa kluczowe w bazie Medline (1966 — listopad 2006) zastosowano wyrażenia „nerwowe komórki macierzyste” (NSC, neural stem cells) i „neurogeneza” (neurogenesis). Uzyskaną listę uzupełniono pracami z wykazu piśmiennictwa prac przeglądowych.

**Wyniki.** Koncepcja „komórek macierzystych” stale ewoluuje i obecnie opiera się na kryteriach operacyjnych związanych z symetrycznym powielaniem się komórek, ich multipotencjalnością i funkcjonalną żywotnością. W warunkach *in vivo* neurogeneza u dorosłych ssaków zachodzi w niewielkich niszach w strefie okołokomorowej i podziarnej. Funkcjonalne komórki prekursorowe można jednak uzyskiwać *in vitro* z różnych źródeł biologicznych. Z tego powodu, zarówno mikrośrodowisko fizjologiczne, jak i sztuczne, ma podstawowe znaczenie dla rozwoju określonych cech i czynności prekursorów komórek nerwowych, a przeniesienie wyników uzyskanych w laboratorium na żywe organizmy nie jest łatwe. Na podstawie strategii z wykorzystaniem przeszczepów w chorobie Parkinsona wykazano, że prymitywna tkanka nerwowa może się zaszczepić w patologicznych obszarach mózgu i uzyskać biologiczną funkcjonalność, co może prowadzić do poprawy w zakresie objawów klinicznych. W trakcie dłuższego okresu obserwacji pojawiły się jednak istotne problemy związane z niepodatnymi na leczenie działaniami niepożądanymi; zgłaszano także niebezpieczeństwo rozwoju nowotworów. Stanowi to o możliwościach i pułapkach stosowania technologii opartych na NSC w neurologii i psychiatrii. W przypadku choroby Alzheimera białko prekursorowe amyloidu może wchodzić w bezpośrednie interakcje z NSC, spekulowano też nad ich znaczeniem w funkcjach pamięci. Rolę endogennej neurogenezy postuluje się także w etiologii depresji. Znaczenie NSC i neurogenezy w schizofrenii jest wciąż odkrywane.

**Wnioski.** Przed wykorzystaniem NSC do zrozumienia i leczenia zaburzeń neurologicznych i psychicznych należy sprostać wielu technicznym i koncepcyjnym wyzwaniom. Konieczne są dalsze badania nad podstawami biologii NSC i interakcjami tych komórek z procesami zachodzącymi w przebiegu zaburzeń neurologicznych i psychicznych.

**słowa kluczowe:** nerwowe komórki macierzyste, neuropsychiatria, neurogeneza, odbudowa układu nerwowego

#### PIŚMIENICTWO

1. Kempermann G. Adult neurogenesis. Oxford University Press, New York 2006.
2. Singec I., Knoth R., Meyer R. i wsp. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat. Methods* 2006; 3: 801–806.
3. Reynolds B., Rietze R. Neural stem cells and neurospheres — re-evaluating the relationship. *Nat. Methods* 2005; 2: 333–336.
4. Wilson S., Edlund T. Neural induction: toward a unifying mechanism. *Nat. Neurosci.* 2001; 4 (supl.): 1161–1168.
5. Munoz-Sanjuan I., Brivanlou A. Neural induction, the default model and embryonic stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 271–280.
6. Lim U., Sidhu K., Tuch B. Derivation of motor neurons from three clonal human embryonic stem cell lines. *Curr. Neurovasc. Res.* 2006; 3: 281–288.



7. Hockfield S., McKay R. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 1985; 5: 3310–3328.
8. Rutishauser U., Acheson A., Hall A., Mann D., Sunshine J. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 1988; 240: 53–57.
9. Uchida N., Buck D., He D. i wsp. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 14 720–14 725.
10. Garcia A., Doan N., Imura T., Bush T., Sofroniew M. GFAP-expressing progenitors are the principal source of constitutive neurogenesis in adult mouse forebrain. *Nat. Neurosci.* 2004; 7: 1233–1241.
11. McNay D., Pelling M., Claxton S., Guillemot F., Ang S. Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells. *Mol. Endocrinol.* 2006; 20: 1623–1632.
12. Bylund M., Andersson E., Novitsch B., Muhr J. Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1–3 activity. *Nat. Neurosci.* 2003; 6: 1162–1168.
13. Brazel C., Limke T., Osborne J. i wsp. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 2005; 4: 197–207.
14. Reimers D., Lopez-Toledano M., Mason I. i wsp. Developmental expression of fibroblast growth factor (FGF) receptors in neural stem cell progeny. Modulation of neuronal and glial lineages by basic FGF treatment. *Neurosci. Res.* 2001; 23: 612–621.
15. Buffo A., Vosko M., Ertuck D. i wsp. Expression pattern of the transcription factor Olig2 in response to brain injuries: implications for neuronal repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 18 183–18 188.
16. Fanarraga M., Avila J., Zabala J. Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11: 517–527.
17. Dupree J., Popko B. Genetic dissection of myelin galactolipid function. *Neurocytology* 1999; 28: 271–279.
18. Binder L., Frankfurter A., Rebhun L. Differential localization of MAP-2 and tau in mammalian neurons in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 466: 145–166.
19. Mullen R., Buck C., Smith A. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992; 116: 201.
20. Pickel V. Immunocytochemical localization of neuronal antigens: tyrosine hydroxylase, substance P, [Met5]-enkephalin. *Fed. Proc.* 1979; 38: 2374–2380.
21. Wiedenmann B., Franke W. Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell* 1985; 41: 1017–1028.
22. Kempermann G., Gast D., Gage F.H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment [see Comments]. *Ann. Neurol.* 2002; 52: 135–143.
23. Eriksson P., Bjork-Eriksson T., Alborn A., Nordborg C., Peterson D., Gage F. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 1998; 4: 1313–1317.
24. Kuhn H., Dickinson-Anson H., Gage F. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J. Neurosci.* 1996; 16: 2027–2033.
25. Altman J., Das G. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 1965; 124: 319–335.
26. Ming G., Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Ann. Rev. Neurosci.* 2005; 28: 223–250.
27. Shors T., Miesegaes G., Beylin A. i wsp. Neurogenesis in the adult is involved in the formation of trace memories. *Nature* 2001; 410: 372–376.
28. Meshi S., Drew M., Saxe M. i wsp. Hippocampal neurogenesis is not required for behavioural effects of environmental enrichment. *Nat. Neurosci.* 2006; 9: 729–731.
29. Reynolds B., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707–1710.
30. Gottlieb D. Large scale sources of neural stem cells. *Ann. Rev. Neurosci.* 2002; 25: 381–407.
31. Bez A., Corsini E., Curti D. i wsp. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res.* 2003; 993: 18–29.
32. Seaberg R., van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 125–131.
33. Nagato M., Heike T., Kato T. i wsp. Prospective characterisation of neural stem cells by flow cytometry analysis using a combination of surface markers. *J. Neurosci. Res.* 2005; 80: 456–466.
34. Cattaneo E., McKay R. Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor. *Nature* 1990; 347: 762–765.
35. Conti L., Pollard S., Gorba T. i wsp. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol.* 2005; 3: e283.
36. Pollard S., Conti L., Sun Y., Goffredo D., Smith A. Adherent neural stem (NS) cells from foetal and adult forebrain. *Cereb. Cortex* 2006; 16: i112–i120.
37. Ostenfield T., Caldwell M., Prowse K., Linskens M., Jauniaux E., Svendsen C. Human neural precursor cells express low levels of telomerase in vitro and show diminishing cell proliferation with extensive axonal outgrowth following transplantation. *Exp. Neurol.* 2000; 164: 226.
38. Thomson J., Marshall V., Trojanowski J. Neural differentiation of rhesus embryonic stem cells. *APMIS* 1998; 106: 149–157.
39. Bain G., Ray W., Yao M., Gottlieb D. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 223: 691–694.
40. Suda Y., Suzuki M., Ikawa Y., Aizawa S. Mouse embryonic stem cells exhibit indefinite proliferative potential. *J. Cell. Physiol.* 1987; 133: 197–201.
41. Qu T., Brannen H., Kim H., Sugaya K. Human neural stem cells improve cognitive functions of aged brain. *Neuroreport* 2001; 12: 1127–1132.
42. Freed C., Greene P., Breeze R. i wsp. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 710–719.
43. Muotri A., Nakashima K., Toni N., Sandler V., Gage F. Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 18 644–18 648.
44. Roy N., Cleren C., Singh S., Yang L., Beal M., Goldman S. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalised mid-brain astrocytes. *Nat. Med.* 2006; 2: 1259–1268.
45. Palmer T., Markakis E., Willhoite A., Safar F., Gage F. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* 1999; 19: 8487–8497.
46. Kozorovitskiy Y., Gould E. Stem cell fusion in the brain. *Nat. Cell Biol.* 2003; 5: 952–954.
47. Jiang Y., Jahagirdar B., Reinhardt R. i wsp. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41–49.
48. Toma J., Akhavan M., Fernandes K. i wsp. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3: 778–784.
49. Fernandes K., McKenzie I., Mill P. i wsp. A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. *Nat. Cell Biol.* 2004; 6: 1082–1093.
50. Joannides A., Gaughwin P., Schwiening C., Majed H., Compston A., Chandran S. Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells. *Lancet* 2004; 364: 172–178.
51. Rossi F., Cattaneo E. Neural stem cell therapy for neurological diseases: dreams and reality. *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 401–409.
52. van Praag H., Christie B., Sejnowski T., Gage F. Running enhances neurogenesis, learning and long-term potentiations in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 13 427–13 431.
53. Ickes B., Pham T., Sanders L., Albeck D., Mohammed A., Granholm A. Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Exp. Neurol.* 2000; 164: 45–52.
54. Aboudy K., Brown A., Rainov N. i wsp. Neural stem cells display extensive tropism for pathology in adult brain: evidence from intracranial gliomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 12 846–12 851.

55. Pearson H., Peers C. Physiological roles for amyloid  $\beta$  peptides. *J. Physiol.* 2006; 575: 5–10.
56. Hayashi M., Kashiwagi S., Ohta H., Nakajima M., Kawashima T., Yoshikawa K. Alzheimer's amyloid protein precursor enhances proliferation of neural stem cells from fetal rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994; 205: 936–943.
57. Nithianantharajah J., Hannan A. Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006; 7: 697–709.
58. Gould E., Tanapat P., McEwen B., Flugge G., Fuchs E. Proliferation of granule cell precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 3168–3171.
59. Jin K., Zhu Y., Sun Y., Mao X., Xie L., Greenberg D. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 11946–11950.
60. Pencea V., Bingaman K., Wiegand S., Luskin M. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci.* 2001; 21: 6706–6717.
61. Kotzbauer P., Holtzman D. Expectations and challenges in the therapeutic use of neurotrophic factors. *Ann. Neurol.* 2006; 59: 444–447.
62. Lin L., Doherty D., Lile J. i wsp. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130–1132.
63. Braak H., Braak E. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 1991; 82: 239–259.
64. Kril J., Patel S., Harding A., Halliday G.M. Neuron loss from the hippocampus of Alzheimer's disease exceeds extracellular neurofibrillary tangle formation. *Acta Neuropathol.* 2002; 103: 370–376.
65. DeKosky S., Scheff S. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity. *Ann. Neurol.* 1990; 27: 457–464.
66. Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P. i wsp. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Ann. Neurol.* 1991; 30: 572–580.
67. Grady C., McIntosh A., Beig S., Keightley M., Burian H., Black S. Evidence from functional neuroimaging of a compensatory prefrontal network in Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 2003; 23: 986–993.
68. Valenzuela M., Sachdev P. Brain reserve and dementia: a systematic review. *Psychol. Med.* 2006; 36: 441–454.
69. Kwak Y., Brannen C., Qu T. i wsp. Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells. *Stem. Cells. Dev.* 2006; 15: 381–389.
70. Haughey J., Nath A., Chan S., Borchard A., Rao M., Mattson M. Disruption of neurogenesis by amyloid  $\beta$ -peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 2002; 83: 1509–1524.
71. Jin K., Peel A., Xiao O.M. i wsp. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 343–347.
72. Wang Q., Matsumoto Y., Shindo T. i wsp. Neural stem cells transplantation in cortex in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Med. Invest.* 2006; 53: 61–69.
73. Tuszynski M., Thal L., Pay M. i wsp. A phase I clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 2005; 11: 551–555.
74. Alzheimer Research Forum. <http://www.alzforum.org/res/for/journal/ashford/default.asp> (accessed 1 stycznia 2006 r.).
75. De Rosa R., Garcia A., Braschi C. i wsp. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 3811–3816.
76. Schenk D., Barbour R., Dunn W. i wsp. Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 1999; 400: 173–177.
77. Scheff S., Price D.A. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol. Aging* 2003; 24: 1029–1046.
78. Robinson S., Bishop G. Ab as a bioflocculant: implications for the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2002; 23: 1051–1072.
79. Sapolsky R. Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death. MIT Press, Cambridge 1992.
80. Jacobs B., van Praag H., Gage F. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry* 2000; 5: 262–269.
81. Duman R., Heninger G., Nestler E. A molecular and cellular theory of depression. *Am. J. Psychiatry* 1997; 54: 597–606.
82. Gould E., McEwen B., Tanapat P., Galea L., Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 1997; 17: 2492–2498.
83. Gould E., Cameron H., Daniels D., Wooley C., McEwen B. Adrenal hormones suppress cell division in the adult dentate gyrus. *J. Neurosci.* 1992; 12: 3642–3650.
84. Moghaddam B., Bolinao M., Stein-Behrens B., Sapolsky R. Glucocorticoids mediate the stress-induced extracellular accumulation of glutamate. *Brain Research* 1994; 655: 251–254.
85. Fanburg B., Lee S. A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *Am. J. Physiol.* 1997; 16: L795–L806.
86. Malberg J., Eisch A., Nestler E., Duman R. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 2000; 20: 9104–9110.
87. Malberg J., Duman R. Cell proliferation in adult hippocampus is decreased by inescapable stress: reversal by fluoxetine treatment. *Neuropsychopharmacology* 2003; 28: 1562–1571.
88. Radley J., Jacobs B. 5-HT<sub>1A</sub> receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus. *Brain Res.* 2002; 995: 264–267.
89. Santarelli L., Saxe M., Gross C. i wsp. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioural effects of antidepressants. *Science* 2003; 301: 805–809.
90. Madsen T., Treschow A., Bengzon J., Bolwig T., Wortwein G. Increased neurogenesis in a model of electroconvulsive therapy. *Neuroscience* 2000; 119: 635–642.
91. Shirayama Y., Chen A., Nakagawa S., Russell D., Duman R. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioural models of depression. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3251–3261.
92. Reif A., Finger M., Strobel A., Lauer M., Schmitt A., Lesch K. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol. Psychiatry* 2006; 11: 514–522.
93. Hilborn R. Sea gulls, butterflies, and grasshoppers: a brief history of the butterfly effect in nonlinear dynamics. *Am. J. Physics.* 2004; 72: 425–427.
94. Casti J. Complexification: explaining a paradoxical world through the science of surprise. Harper Collins, New York 1994.
95. Heckers S., Konradi C. Hippocampal neurons in schizophrenia. *J. Neural. Transm.* 2002; 109: 891–905.
96. Guidotti A., Auta J., Davis J. i wsp. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 2000; 57: 1061–1069.
97. Kim H., Qu T., Lacor V. i wsp. Reelin function in neural stem cell biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 4020–4025.
98. Becker A., Peters B., Schroeder H. i wsp. Ketamine-induced changes in rat behaviour: a possible animal model of schizophrenia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2003; 27: 687–700.
99. Kippin T., Kapur S., van der Kooy D. Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J. Neurosci.* 2005; 25: 5815–5823.
100. Lindvall O., Brundin P., Widner H. i wsp. Grafts of fetal dopamine neurons survive and improve motor function in Parkinson's disease. *Science* 1990; 247: 574–577.
101. Harrower T., Tyers P., Hooks Y., Barker R. Long-term survival and integration of porcine expanded neural precursor cell grafts in a rat model of Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 2006; 197: 56–69.
102. Takagi Y., Takahashi J., Saiki H. i wsp. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 102–109.