

# Transplantacje domózgowe – terapie naprawcze przyszłości

Urszula Sławińska i Henryk Majczyński

Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

Wprawdzie pierwszy przeszczep do mózgu wykonano ponad sto lat temu (Thompson 1890), właściwie dopiero w ostatnich 30 latach przeszczepy komórek lub tkanki nerwowej do ośrodkowego układu nerwowego (OUN) zostały poddane szczególnie wnikliwym badaniom. Punkt zwrotny w tych badaniach przyniósł lata 80-te kiedy wykazano, że transplanty neuronalne mogą utworzyć funkcjonalne połączenia z tkanką nerwową biorcy i w ten sposób sprzyjać restytucji funkcji zaburzonych w wyniku uszkodzeń mechanicznych oraz niekorzystnego działania czynników genetycznych lub patologicznych. Ponadto, podobnie jak metody uszkodzeniowe i elektrofizjologiczne, przeszczepy tkanki nerwowej stały się nową metodą badania czynników decydujących o rozwoju i regeneracji połączeń w OUN. W niniejszej pracy przedstawione zostaną w skrócie przykłady przeprowadzonych w ostatnich latach przeszczepów płodowej tkanki nerwowej lub komórek macierzystych, których efekty, w połączeniu z wynikami badań dotyczących działania innych mechanizmów wspomagających procesy regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej, otwierają przed medycyną bardzo obiecujące perspektywy opracowania w przyszłości skuteczniejszych terapii, które pozwolą pokonać niekorzystne następstwa urazów tkanki nerwowej. Należy jednak pamiętać, że streszczone w niniejszej pracy metody postępowania są ciągle jeszcze metodami testowanymi w badaniach na zwierzętach i nie mogą być uważane za praktyczne rozwiązanie problemu leczenia pacjenta z zaburzeniami wywołanymi urazem rdzenia kręgowego.

## Przeszczepy nerwowej tkanki płodowej

Szereg doświadczeń przeprowadzonych w ostatnich latach pokazało, że domózgowe przeszczepy płodowej tkanki nerwowej przeżywają i mogą w wyniku utworzonych połączeń funkcjonalnych wpływać na tkankę

nerwową biorcy sprzyjając restytucji funkcji zaburzonych w wyniku uszkodzeń. Wykazano, że największe szanse przeżycia ma tkanka nerwowa pobrana z płodu, przy czym optymalny wiek płodu jest zróżnicowany ze względu na rodzaj pobieranej tkanki (Björklund i wsp. 1983). Wprawdzie przeszczepy wycinków dorosłej tkanki nerwowej również mają szansę na częściowe przeżycie, jednakże komórki tkanki nerwowej pobranej z płodu zachowują możliwości dalszego rozwoju i różnicowania w środowisku biorcy. Wykazano, że optymalny wiek płodu, z punktu widzenia przeżycia przeszczepu zależy od rodzaju tkanki nerwowej zastosowanej w danej terapii. Okres przeżycia tkanki znacząco spada, gdy jest ona pobierana ze starszych płodów. W tabeli 1 przedstawiono przykładowe struktury OUN i optymalny wiek płodu, w którym powinno się pobierać materiał do przeszczepów tkanki nerwowej u szczura. Optymalny wiek tkanek płodowych przeznaczonych do transplantacji jest zależny od stopnia jej rozwoju.

Tabela 1

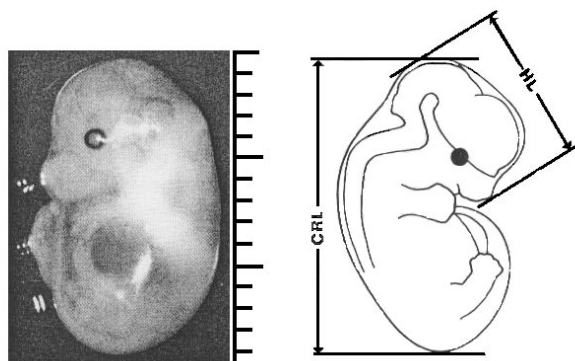
Przykłady optymalnego wieku różnych nerwowych tkanek płodowych przeznaczonych do transplantacji u szczura

Obszar	Wiek płodu (w dniach)	CRL (w mm)	Przyrost tkanki (w %)
Kora ciemieniowa	17-19	18-24	200-500
Kora śródwęczowa	15-19	14-25	200-400
Hipokamp	19-21	26-34	200-600
Mózdzek	14-15	11-13	400-800
Opuszki węchowce	17-19	19-25	0-100
Rdzeń kręgowy	15-17	14-20	100-400
Istota czarna	14-15	10-14	100-200
Miejsce sinawe	14-15	10-14	50-200
Jądro szwu	14-15	10-14	100-200

Z przeprowadzonych badań wynika, że komórki tkanki przeznaczonej do transplantacji powinny być pobierane od dawcy we wczesnej fazie ich różnicowania się. Wówczas ich wypustki aksonalne dopiero zaczynają się kształtować i są mniej narażone na zniszczenie. W związku z tym komórki dojrzewające wcześniej w rozwoju embrionalnym np. z jąder szwu powinny być pobierane wcześniej (E14-E15) niż komórki struktur kory ciemieniowej (E17-E19) czy hipokampa (E19-E21). Widać więc, że w przypadku prowadzenia tego typu prac badawczych krytyczne jest określenie wieku płodu, z którego pobierana jest tkanka. U wielu gatunków ssaków, w tym i u szczurów, u samic obserwuje się regularny cykl z wyraźnymi objawami bliskiej owulacji, co pozwala na zaplanowanie i przeprowadzenie kontrolowanego zapłodnienia z dokładnym podaniem dnia inseminacji (E0).

Inną metodą jest określenie wieku płodu na podstawie jego wielkości. U wszystkich ssaków, w tym i u szczurów istnieje ścisła korelacja między etapami rozwoju płodu a jego wielkością. U szczurów wielkość płodu podawana jest w milimetrach od czubka głowy do pośladków (CRL – od ang. *crown-rump length*). Na Ryc. 1 pokazano schematycznie sposób wyznaczenia długości CRL w linii prostej. W literaturze metodą alternatywną określania wielkości płodu jest badanie *in utero* ciężarnej samicy metodą palpacyjną. Z zasady w publikacjach podaje się zarówno wiek płodu jak i długość jego ciała.

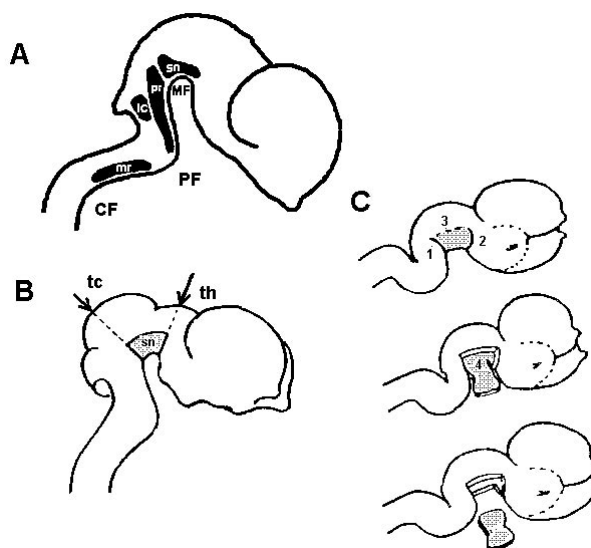
Głęboko uśpione ciężarne samice szczurze poddaje się cięciu cesarskiemu w celu pobrania płodów w od-



Ryc. 1. Długość płodu od głowy do pośladków (CRL – od ang. *crown-rump length*) – została zdefiniowana jako długość płodu mierzona od głowy do pośladków w linii prostej, ze szczególnym zwróceniem uwagi w trakcie pomiaru na zachowanie naturalnych kształtów płodu. W szczególnych przypadkach podaje się również wielkość głowy (HL – od ang. *head length*). Na rycinie przedstawiono 14-dniowy płód szczurza (E14) z umieszczoną obok skalą milimetrową. (zmodyfikowane; König i wsp. 1989)

powiednim wieku zgodnie z wymogami wieku tkanki przeznaczonej do transplantacji. W skrócie protokół tego zabiegu jest następujący:

1. samica ciężarna powinna być poddana głębokiej narkozie (np.: barbituranowa)
2. skóra brzucha powinna być wysterylizowana alkoholem i przykryta sterylnym prześcieradłem chirurgicznym
3. po wykonaniu pionowego cięcia skóry, przecięte mięśnie brzucha należy ostrożnie rozciągnąć przy użyciu sterylnych peanów
4. rogi macicy zawierające płody należy ostrożnie, aczkolwiek pewnym ruchem wyjąć z wnętrza i po odcięciu przenieść do sterylnej szalki Petriego wypełnionej płynem Hanksa (Gibco) z dodatkiem glukozy (6 g/l) (uwaga: należy unikać dotykania preparowaną tkanką do skóry operowanej samicy czy nawet do prześcieradła chirurgicznego!)
5. pojedyncze płody wypreparowane z rogów macicy należy przenieść do następnej szalki Petriego wypełnionej płynem Hanksa z dodatkiem glukozy



Ryc. 2. (A) Lokalizacja różnicujących się neuronów monoaminergicznymi w mózgu płodu u szczura: noradrenergicznych w jądrze miejsca sinawego (lc - *locus coeruleus*); serotonergicznymi w pniu mózgu (pr - *pontine raphe n.*) i opuszcze (mr - *medullary raphe n.*); dopaminergicznymi w istocie czarnej (sn - *substantia nigra*). Inne oznaczenia: zgięcie śródmózgowiowe (MF - *mesencephalic flexure*), zgięcie mostowe (PF - *pontine flexure*), zgięcie szyjne (CF - *cervical flexure*); (B) Preparacja istoty czarnej z brzuszego śródmózgowia płodu szczurzego wielkości 12 mm (E14); na rycinie zaznaczono punkty orientacyjne pomocne w trakcie preparatyki: pokrywę (tc - *tectum*), wzgórze (th - *thalamus*); (C) Bocznym widokiem na wskazane kolejne cięcia (1, 2, 3, 4) idące według strzałek zaznaczonych w części B dające łatwe dojście do preparowanych neuronów dopaminergicznymi istoty czarnej. (zmodyfikowane; Dunnett i Björklund 1992)

6. natychmiast po pobraniu płodów samicę należy uśpić letalną dawką narkozy.

Preparacja tkanki płodowej przeznaczonej do transplantacji wymaga szczególnej dokładności. Generalnie, należy kierować się następującymi zasadami:

1. tkanka płodowa powinna być zawsze całkowicie zanurzona w sterylnym płynie Hanksa z dodatkiem glukozy (6 g/l); takie postępowanie zapewnia tkance odpowiednie warunki dla jej przeżycia, jak również zabezpiecza tkankę płodu przed zniekształceniami co ułatwia preparację tkanki pod mikroskopem

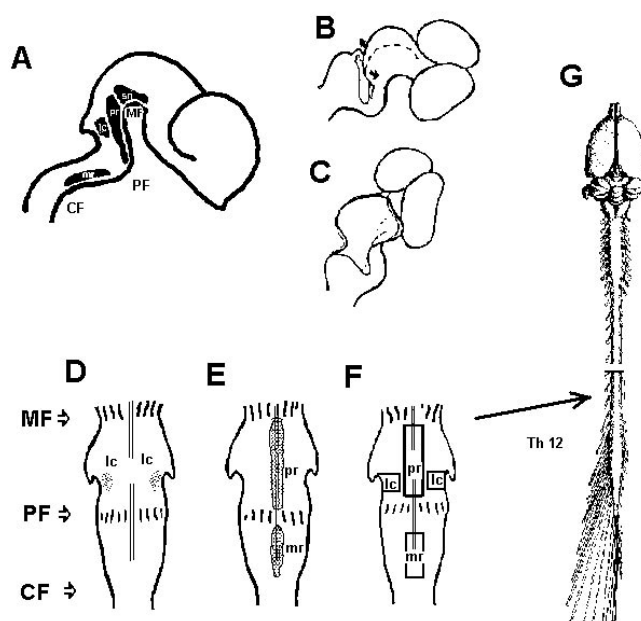
2. preparacja tkanki powinna być prowadzona w naczyniach sterylnych z użyciem sterylnych narzędzi

3. należy zwracać szczególną uwagę by wypreparowana z płodu tkanka układu nerwowego była oczyszczona z otaczających ją opon i wyściółek, które nie powinny być przeniesione wraz z transplantem do biorcy; u płodów powyżej E12 (CRL: 8-9 mm) tkanka ta różni się wyraźnie od tkanki nerwowej, jest całkowicie przezroczysta i dość łatwo daje się odizolować

4. należy unikać nakłuwania, ściskania czy też naciągania preparowanej tkanki płodowej, gdyż może to prowadzić do obumierania preparowanych wycinków

5. wypreparowane wycinki tkanki nerwowej należy przenieść do następnej szalki Petriego z płynem Hanksa wzbogaconym w glukozę i do momentu transplantacji przechowywać w lodówce w temperaturze +4 °C.

Wybór tkanki nerwowej przeznaczonej do transplantacji zależy od rodzaju i miejsca uszkodzenia OUN biorcy. Jedne z pierwszych prób transplantacji wycinka tkanki płodowej dotyczyły obszaru istoty czarnej części zwartej zawierającej neurony dopaminergiczne. Neurony dopaminergiczne pojawiają się w układzie nerwowym szczura pomiędzy E12 a E15 dniem życia płodowego. Na Ryc. 2. przedstawiono sposób preparacji istoty czarnej. Preparatykę tkanki istoty czarnej prowadzi się w mózgu płodu ułożonym na boku. Komórki dopaminergiczne znajdują się w brzusznej śródmózgowiu na poziomie zgięcia śródmózgowiowego (*mesencephalic flexure*). Cięcie rostralne i caudalne wykonywane jest na podstawie znaków szczególnych ograniczających powierzchnie pokrywy i wzgórze (strzałki na Ryc. 2B). Od precyzji wykonanego cięcia tylnego zależeć będzie czy w wypreparowanym wycinku będą znajdowały się wyłącznie neurony dopaminergiczne, czy też obecne będą również neurony serotoninerdyczne. Wprawdzie te ostatnie mogą być z wycinka tkanki usunięte przez dodanie do płynu inkubacji 5,7-dihydroxytrypta-



Ryc. 3. Schemat głównych etapów pozyskania wycinka płodowej tkanki nerwowej zawierającego neurony serotoninerdyczne i (G) jego transplantacji do rdzenia kręgowego biorcy poniżej całkowitego przecięcia. (A) Po wypreparowaniu tkanki mózgu i rdzenia przedłużonego 14-dniowego płodu szczura (E14) kolejne etapy preparatyki polegają na wykonaniu przecięcia podłużnego pokrywy (B) i otwarciu komory IV (C). Następnie wypreparowany pień mózgu rozkłada się delikatnie zwracając uwagę na położenie charakterystycznych zgięć: śródmózgowiowego (MF – *mesencephalic flexure*), mostowego (PF – *pontine flexure*) i szyjnego (CF – *cervical flexure*) (D, E, F). Należy również zwrócić uwagę na lokalizację jąder szwu (pr – *pontine raphe n.*; mr – *medullar raphe n.*) i jądra miejsca sinawego (lc – *locus coeruleus n.*), które łatwo wypreparować pod kontrolą mikroskopu (F). (zmodyfikowane; Dunnet i Björklund 1992)

miny będącej substancją toksyczną dla neuronów serotoninerdycznych.

W naszych badaniach przeprowadziliśmy transplantację tkanki płodowej zawierającej neurony serotoninerdyczne (Sławińska i wsp. 2000). Terapię tę stosowaliśmy u dorosłych szczurów miesiąc po całkowitym przecięciu rdzenia kręgowego w celu wspomaganie restytucji utraconych funkcji ruchowych tylnych kończyn. Zaburzenia ruchowe tylnych kończyn są wynikiem odcięcia wpływów ze struktur nadrdzeniowych przekazywanych za pośrednictwem m. in. serotoniny. U szczura jedynym źródłem serotoniny w OUN są neurony znajdujące się w jądrach szwu pnia mózgu. W wyniku całkowitego przecięcia rdzenia kręgowego aksony tych neuronów zostają przerwane i w rdzeniu poniżej uszkodzenia brakuje serotoniny - neurotransmitera, który dostarczany był tymi aksonami. W naszych ba-

daniach, do części rdzenia kręgowego poniżej uszkodzenia przeszczepiamy wycinek płodowej tkanki nerwowej, pobrany z pnia mózgu, obejmujący jądra szwu i zawierający neurony serotonergiczne. Zgodnie z opisaną wyżej procedurą płody pobierane są u głęboko uśpionych ciężarnych samic szczurzych w 14 dniu ciąży. W tym okresie ciąży (E14-E15) płody osiągają długość CRL około 10-14 mm. Pobrane w tym okresie neurony serotonergiczne są już zróżnicowane i występują w typowych dla siebie obszarach pnia mózgu a ich aksony dopiero zaczynają się kształtować (Dunnet i Björklund 1992).

Na Rycinie 3 przedstawiono schematycznie główne etapy pozyskania wycinka płodowej tkanki nerwowej i jego transplatacji do rdzenia kręgowego biorcy poniżej przecięcia. Do dalszych etapów preparatyki z użyciem mikroskopu sekcyjnego pozostawia się tylko części płodu zawierające górne części rdzenia kręgowego, pnia mózgu i śródmózgowia. Następnie z pnia mózgu preparuje się wycinek tkanki nerwowej obejmujący jądra szwu (zawierające komórki serotonergiczne). Przed przeprowadzeniem transplatacji wybrane wycinki płodowej tkanki nerwowej przechowuje się w płynie Hanksa wzbogaconym w glukozę w temperaturze +4 °C. W naszych badaniach wypreparowane wycinki tkanki płodowej przeszczepiane były do rdzenia kręgowego poniżej uszkodzenia u szczurów, u których przecięcie rdzenia przeprowadzono miesiąc wcześniej. Pojedynczy wycinek tkanki nerwowej transplantowany był do grzbietowej części rdzenia kręgowego na poziomie jednego segmentu poniżej miejsca całkowitego przecięcia. Transplant wprowadzany był do rdzenia kręgowego biorcy przyśrodkowo 1 mm poniżej powierzchni przy pomocy strzykawki typu Hamiltonówki etapami, w czasie około 3 minut by minimalizować uszkodzenie tkanki gospodarza. Igła wprowadzana była do rdzenia kręgowego przy pomocy mikromanipulatora. Po podaniu transplantu igłę pozostawiano nieruchomo w rdzeniu przez około 10 minut, po czym wy-suwano ją stopniowo. Po przeprowadzonej transplatacji przez okres około 1 tygodnia szczurom podawano codziennie antybiotyki. W naszym przypadku nie było potrzeby stosowania immunosupresji ze względu na wybór wsobnego szczepu szczurów (WAG), co zapewniło zgodność transplantowanej tkanki z tkanką biorcy.

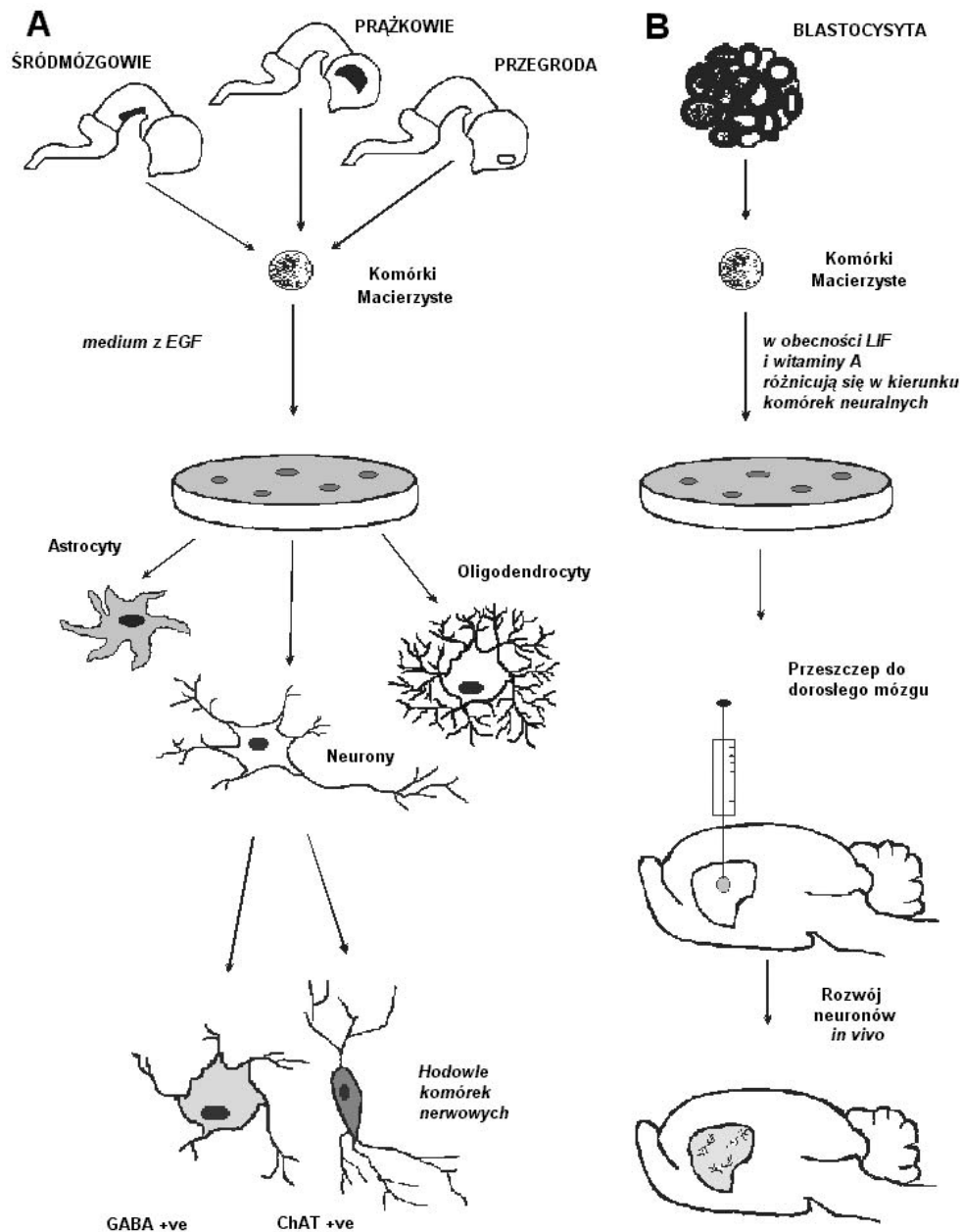
Po przeprowadzonej transplatacji dordzeniowej szczury były starannie pielęgnowane i badane w trakcie cotygodniowych sesji doświadczalnych polegających na prowadzeniu wielu różnych testów behawioralnych.

Okazało się, że po zastosowaniu transplantów tkanki płodowej zawierającej komórki serotonergiczne obserwowano znaczną poprawę funkcji ruchowych badanych w czasie lokomocji tylnych kończyn na ruchomym bieżniku i wywołanej uciskiem ogona.

### Przeszczepy komórek macierzystych

Innym sposobem prowadzącym do poprawy funkcji ruchowych kończyn po uszkodzeniach OUN jest transplatacja komórek macierzystych w miejsce uszkodzenia. Przeprowadzone w ostatnich latach badania dały bardzo obiecujące wyniki. Komórki macierzyste zdefiniowane są jako komórki, które w wyniku podziału mogą wyprodukować: 1/ dwie identyczne komórki potomne, które są zdolne dalej się dzielić (podział symetryczny) lub 2/ identyczną komórkę macierzystą i komórkę progenitorową, która jest częściowo zróżnicowana z ograniczonym potencjałem mitogenicznym (podział asymetryczny) (Svensdsen i Rosser 1995). Ogromny potencjał komórek macierzystych wynika, między innymi, z ich nieograniczonego potencjału proliferacyjnego i zdolności do przekształcania się zarówno w komórki nerwowe, jak i w każdy inny typ komórek (Anderson 2001). Wśród komórek macierzystych, ze względu na różnorodność wytwarzanych przez nie komórek potomnych, wyróżnia się komórki totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne i unipotencjalne. Komórki totipotencjalne to komórki zygoty, z których mogą powstać komórki wszystkich organów ciała. Komórki pluripotencjalne mogą różnicować się w komórki różnych listków zarodkowych. Komórki multipotencjalne dają początek komórkom jednego listka zarodkowego, a więc ich potencjał różnicowania jest ograniczony i np. z komórek macierzystych ektodermy powstaną neurony, komórki nabłonka i komórki gruczołowe. Komórki unipotencjalne to takie, które w wyniku różnicowania zdolne są wytworzyć tylko jeden typ komórek potomnych.

Początkowo alternatywnymi drogami pozyskiwania komórek macierzystych były metody izolacji komórek macierzystych bezpośrednio z blastocysty lub z układu nerwowego płodu (Ryc. 4). Komórki macierzyste (Ryc. 4A) pobrane z różnych obszarów mózgu płodu, takich jak śródmózgowie, prążkowie lub przegroda, rozwijają się w obecności naskórkowego czynnika wzrostu (EGF- epidermal growth factor). Innymi mitogenami są transformujący czynnik wzrostu (TGF- $\alpha$ ) i zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF). Po



Rys. 4. Różne drogi pozyskiwania komórek macierzystych jako źródła komórek nerwowych przeznaczonych do transplantacji. (A) Komórki macierzyste pobrane z różnych obszarów mózgu płodu dzielą się w hodowli w obecności naskórkowego czynnika wzrostu (EGF- epiderma growth factor). Komórki te w następnych etapach hodowli poddane oddziaływaniu odpowiednich czynników różnicują się w neurony, astrocyty lub oligodendrocyty. Wiele neuronów wytwarza GABA, a niektóre cholinową acetylotransferazę (ChAT). (B) Totipotencjalne komórki macierzyste pobrane z blastocysty mogą się rozwijać w hodowli w obecności czynnika hamującego białaczki (LIF – leukemia inhibitory factor) i różnicują się w kierunku komórek neuralnych lub innych tkanek w obecności witaminy A. (zmodyfikowany; Svendsen i Rosser, 1995)

wycofaniu tych czynników w następnych etapach hodowli komórki te poddane oddziaływaniu innych odpowiednich czynników różnicują się w neurony, astrocyty lub oligodendrocyty. Stwierdzono, że wiele neuronów wytwarza kwas aminomasłowy (GABA), a niektóre nawet hydroxylazę tyrozynową lub acetylotransferazę

cholinową (ChAT). Również pobrane z blastocysty totipotencjalne komórki macierzyste (Ryc. 4B) rozwijają się w hodowli w obecności czynnika hamującego białaczki (LIF – leukemia inhibitory factor) i różnicują się w kierunku komórek neuralnych lub komórek innych tkanek w obecności witaminy A (Svendsen i Rosser,

1995). Podstawową różnicą pomiędzy komórkami macierzystymi pobranymi z płodu w porównaniu z tymi pobranymi z blastocysty jest to, że komórki płodowe są już zdeterminowane i w wyniku różnicowania będą generowały komórki neuralne: neurony, astrocyty, oligodendrocyty, natomiast komórki z blastocysty mogą być źródłem różnych typów komórek (nie tylko neuralnych). Obie te metody są równoważne pod względem przydatności do produkcji wybranych populacji komórek neuralnych stosowanych do transplantacji domózgowych. Kolejne badania wykazały, że komórki macierzyste mogą być pozyskiwane np. z krwi pępowinowej (Bużańska i wsp. 2002, Toma i wsp. 2001) lub szpiku kostnego (Moore i wsp. 1997). Obecnie opisywane są metody pozyskiwania komórek macierzystych u osobników dorosłych (Nunes i wsp. 2003) i pojawiają się doniesienia o możliwości pobierania komórek macierzystych *post mortem* (Schwartz i wsp. 2003, Xu i wsp. 2003). Dojrzałe komórki macierzyste odnaleziono w szpiku kostnym, krwi obwodowej, rogówce, siatkówce, miążdże zębowej, wątrobie, skórze, trzustce i przewodzie jelitowym. Udowodniono, że komórka macierzysta jednej tkanki może różnicować się w dojrzałą komórkę innej tkanki *in vitro* (Poulsom i wsp. 2002). I tak, komórki macierzyste krwi pochodzenia mezodermalnego mogą utworzyć mezodermalne miocyty, a także wywodzące się z ektodermy, neurony (Abkowicz 2002, Poulsom i wsp. 2002). Z drugiej strony, dojrzałe komórki macierzyste układu nerwowego mogą różnicować się w komórki krwi (Bjorson i wsp. 1999). Wynika z tego, że nie tylko embrionalne komórki macierzyste są zdolne do różnicowania się w komórki różnych rodzajów tkanek.

Jednakże, jak do tej pory nie udało się znaleźć prostszej metody pozyskiwania komórek macierzystych niż pochodzących z wczesnych embrionów. Embrionalne komórki macierzyste można pozyskiwać z kilkudniowych płodów, tworzących w tym okresie rozwoju blastocystę. Komórki zewnętrzne blastocysty tworzą łożysko. Natomiast komórki wewnętrzne (pochodzące z epiblastu blastocysty), które dadzą początek wszystkim narządom i tkankom, są właśnie embrionalnymi komórkami macierzystymi. Komórki te posiadają największe możliwości *toti-* i *pluripotencjalne*. Są zdolne do nieskończonej liczby symetrycznych podziałów bez różnicowania się, wykazując długi okres samoodnowy. Kolejną ważną cechą embrionalnych komórek macierzystych jest klonogenność, co oznacza, że pojedyncza komórka może być początkiem kolonii genetycznie

identycznych komórek potomnych mających identyczne cechy. Ponadto w przypadku zastosowania metod klonowania mogą one stać się komórkami immunologicznie zgodnymi z dawcą jądra. Oznacza to, że w takim przypadku przeprowadzenie przeszczepu nie wymaga pokonania bariery zgodności tkankowej u biorcy, który jest zarazem dawcą jądra komórek macierzystych uzyskanych metodą klonowania.

Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w ostatnich kilku latach wskazują, że nerwowe komórki macierzyste umieszczone w mózgu gryzoni przeżywają, przekształcają się w neurony i wytwarzają połączenia właściwe dla obszaru, w którym się znajdują (Brustle i McKay 1996). Ponadto potrafią migrować do miejsca uszkodzenia mózgu i przekształcić się w takie komórki, jakie w tym obszarze są pożądane (Sinden i wsp. 1997). Badania ostatnich lat pokazały (McDonald i wsp. 1999), że transplantacja mysich komórek macierzystych może być obiecującą terapią w przypadku uszkodzeń rdzenia kręgowego u szczura. Najczęściej wykorzystywana obecnie metoda hodowli komórek macierzystych *in vitro* obejmuje tworzenie ciał embrioidalnych. Komórki macierzyste w hodowli tworzą tzw. ciała embrioidalne, czyli konglomeraty złożone z szerokiej gamy zróżnicowanych komórek różnych typów. Ciała embrioidalne z mysich komórek macierzystych hodowane były w obecności czynnika hamującego białaczki (LIF; Life Technologies). Takie właśnie konglomeraty mysich komórek macierzystych, hodowanych następnie przez 4 dni bez i 4 dni z dodatkiem witaminy A (all-trans-RA, 500 nM; Sigma), przeszczepiono w miejsce uszkodzenia rdzenia kręgowego u szczurów (9 dni po urazie). Na dzień przed transplantacją ciała embrioidalne zostały przeniesione do medium komórkowego (Bain i wsp. 1995). W celu zmniejszenia ryzyka odrzucenia przeszczepu konglomeratów mysich komórek, szczury, które zaopatrzone były w transplant otrzymywały codziennie cyklosporynę (10 mg/kg, podskórnie). Histologiczna weryfikacja przeprowadzona 2-5 tygodni po zastosowaniu takiej terapii wykazała, że transplantowane komórki macierzyste przetrwały w nowym środowisku i przyjęły zróżnicowaną formę astrocytów, oligodendrocytów lub neuronów, migrując na odległość 8 mm od miejsca podania. Analiza funkcji lokomotorycznych tylnych kończyn wykazała wyższy poziom restytucji funkcji ruchowych u zwierząt zaopatrzonych w transplant komórek macierzystych. W porównaniu do zwierząt kontrolnych, które zostały zaopatrzone w transplant po uszkodzeniu rdzenia

kręgowego, szczury poddane terapii transplantacji komórkami macierzystymi odzyskiwały funkcje podporowe w tylnych kończynach i ich ruchy lokomocyjne charakteryzowały się lepszą koordynacją. Badania te muszą być kontynuowane, gdyż właściwie nie wiadomo, jakie mechanizmy uruchomione transplantem populacji różnorodnych neuralnych komórek progenitorowych przyczyniły się podwyższonej restytucji funkcji ruchowych u tych szczurów. Jedną z możliwości jest remielinizacja prowadząca do podwyższonego przewodnictwa aksonalnego, która nastąpiła dzięki transplantowanym oligodendrocytom lub ich komórkom progenitorowym. Aby potwierdzić tę hipotezę należy przeprowadzić następne badania z wykorzystaniem transplantów jednorodnych linii komórek progenitorowych.

Wiele obecnie prowadzonych badań koncentruje się na opracowaniu metod kontrolowanych procesów prowadzących do różnicowania płodowych komórek macierzystych w kierunku ściśle określonych linii komórkowych. Otrzymanie swoistej linii komórkowej z płodowych komórek macierzystych w celu wykorzystania jej do naprawy uszkodzonej tkanki wymaga spełnienia szeregu warunków i w szczególności należy:

1. pobrać płodowe komórki macierzyste
2. otrzymać czyste kultury jednego typu komórek
3. wyselekcjonować linie poprzez sortowanie komórek
4. wyindukować różnicowanie w wyniku oddziaływania odpowiednich czynników wzrostowych lub komórek indukujących
5. przetestować funkcje fizjologiczne *in vitro* otrzymanej tkanki
6. sprawdzić wydajność i bezpieczeństwo przeszczepu na modelu zwierzęcym
7. ocenić stopień integracji z tkanką biorcy przeszczepu
8. wykazać brak powstania nowotworu.

Ta sama grupa naukowców pod kierunkiem McDonalda, która transplantowała ciała embrioidalne mysich komórek macierzystych do rdzenia kręgowego szczura, stosując wspomniane wyżej reguły przeprowadziła prace badawcze nad skutecznością transplantacji bardziej specjalistycznych linii komórkowych - oligodendrocytów (Liu i wsp. 2000). Wiadomo, że proces demielinizacji może być przyczyną utraty funkcji np. na poziomie rdzenia kręgowego. Wydaje się więc, że transplantacja w miejsce uszkodzenia komórek, które spowodują remielinizację aksonów może przyczynić się do odtworzenia utraconych funkcji. W tych badaniach, podobnie jak poprzednio wykorzystano ciała embrioidalne z mysich komórek macierzystych, które

hodowano przez 4 dni bez i 4 dni z dodatkiem witaminy A (all-trans-RA, 500 nM; Sigma) i następnie poddano dysocjacji. Powstałą zawiesinę hodowano dalej w odpowiednio zmodyfikowanym medium SATO (medium Dulbecco zawierające albuminę surowicy krwi bydlęcej, pirogronian wapnia, progesteron, putrescynę, tyrozynę, prostoglandynę E1, insulinę, transferynę, selenin sodu, aminokwasy, neurotrofinę 3, rzęskowy czynnik neurotroficzny, Hepes) z dodatkiem 5% serum końskiego i 5% płodowej surowicy cielęcej. Po 4 dniach dalszej hodowli, kolbę z zawiesiną lekko wstrząsano by unieść słabo trzymające się podłoża komórki (głównie oligodendrocyty), podczas gdy astrocyty pozostały przyłączone do podłoża. Zawiesina komórek po przeniesieniu do następnej kolby hodowana była przez następne dwa dni. Część tak otrzymanej zawiesiny komórek progenitorowych oligodendrocytów została użyta do badań w hodowlach komórkowych w celu wykazania w warunkach *in vitro* możliwości powstania osłonek mielinowych. Inna część zawiesiny komórek progenitorowych oligodendrocytów została transplantowana w miejsce zdmielinizowanej tkanki rdzenia kręgowego u szczura. Autorzy opracowali więc metodę produkcji oligodendrocytów z płodowych komórek macierzystych i pokazali, że komórki te potrafią utworzyć osłonkę mielinową aksonów w hodowli *in vitro*. Następnie sprawdzili, że zmodyfikowane w hodowli komórki w obecności witaminy A po transplantacji do układu nerwowego biorcy różnicują się głównie w oligodendrocyty w miejscu, w którym doszło wcześniej do demielinizacji, a następnie remielinizują aksony w tym miejscu.

Wyniki przytoczonych badań sugerują, że remielinizacja przy użyciu specjalnie wyhodowanych linii komórkowych oligodendrocytów może okazać się nową wielce obiecującą metodą, która przyczyni się do restytucji funkcji ruchowych utraconych w wyniku uszkodzenia tkanki nerwowej nie tylko w wyniku urazu mechanicznego, ale również w przypadkach uszkodzeń patologicznych prowadzących do demielinizacji włókien nerwowych jak np. stwardnienie rozsiane czy leukodystrofia.

### **Etyczne problemy przeszczepów domózgowych**

W transplantologii stykamy się bezpośrednio z problemami etycznymi związanymi głównie ze stosowaną w tej terapii tkanką płodową lub komórkami macierzy-

stymi. Już w 1987 roku w związku z zastosowaniem transplantów z tkanki płodowej u pacjentów z chorobą Parkinsona powstała idea opracowania reguł, których spełnienie dopuszczałoby badanie i stosowanie takich metod w klinice. Zestaw takich reguł został opracowany przez amerykańską agendę rządową - The Human Fetal Tissue Transplantation Research Panel i opublikowany 1988 roku (US Department of Health i Human Services, Public Health Services, National Institutes of Health, Report of the Human Fetal Tissue Transplantation Research Panel, US Government Printing Office).

Jest oczywiste, że niezależnie od badań prowadzonych z wykorzystaniem tkanki płodowej do przeszczepów należy szukać alternatywnych źródeł tkanki przeznaczonej do transplantacji. Temu celowi służą szerokie badania w dziedzinie hodowli komórkowych z zastosowaniem technik inżynierii genetycznej i z zastosowaniem metod pozyskiwania, hodowli i transplantowania komórek macierzystych. Dziedzina ta rozwija się w bardzo szybkim tempie. Wprawdzie większość wiedzy na temat komórek macierzystych pochodzi z badań laboratoryjnych *in vitro* to jednak wydaje się, że już w najbliższej przyszłości będzie możliwe poznanie przebiegu tych samych procesów w organizmach żywych.

### Podziękowania

Praca była finansowana z funduszy na działalność statutową Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego.

### Bibliografia

- Abkowitz JL (2002) Can human hematopoietic stem cells become skin, gut or liver? *N Engl J Med* 346: 770-771.
- Anderson DJ (2001) Stem cells and pattern formation in the nervous system: possible versus the actual. *Neuron* 30: 19-35.
- Bain G, Kitchens D, Yao M, Gottlieb DI (1995) Embryonic stem cells express neuronal properties *in vitro*. *Dev Biol* 168: 342-357.
- Björklund A, Stenevi U, Schmidt RH, Dunnett SB, Gage FH (1983) Introduction and general methods of preparation. *Acta Physiol Scand Suppl* 522: 1-9.
- Björson CR, Reitze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vercovi AL (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283: 534-537.
- Brustle O, McKay RD (1996) Neural progenitors as tools for cell replacement in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 6: 688-695.
- Bużanska L, Machaj EK, Zabłocka B, Pojda Z, Domańska-Janik K (2002) Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J Cell Sci* 115: 2131-8.
- Dunnett SB, Björklund A (1992) Neural Transplantation. In: *A Practical Approach*. (Dunnett SB, Björklund V, eds.). Oxford University Press, New York
- König N, Wilkie MB, Lauder J (1989) In: *A dissection and tissue culture manual of the nervous system*. (ed. A. Shahar, J. de Vellis, A. Vernadakis, B. Haber) pp. 26-9. A. R. Liss, New York.
- Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW (2000) Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *PNAS* 97: 6126-6131.
- McDonald JW, Liu X-Z, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Med* 5: 1410-1412.
- Moore KA, Ema H, Lemischka IR (1997) *In vitro* maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. *Blood* 89: 4337-4347.
- Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G 2nd, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA (2003) Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 9: 439-47.
- Poulsen R, Alison MR, Forbers SJ, Wright NA (2002) Adult stem cells plasticity. *J Pathol* 197: 441-456.
- Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ, Su H, O'Dowd DK, Klassen H. (2003) Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res* 74: 838-51.
- Sinden JD, Rashid-Doubell F, Kershaw TR, Nelson A, Chadwick A, Jat PS, Noble MD, Hodges H, Gray JA (1997) Recovery of spatial learning by grafts of a conditionally immortalized hippocampal neuroepithelial cell line into the ischemia-lesioned hippocampus. *Neuroscience* 81: 599-608.
- Sławińska U, Majczyński H, Djavadian R (2000) The recovery of hindlimb motor function after spinal cord transection is enhanced by grafts of embryonic raphe nucleus. *Exp Brain Res* 132: 27-38.
- Svendsen CN, Rosser AE (1995) Neurons from stem cells? *TINS* 18: 465-467.
- Thompson G (1890) Successful brain grafting. *N Y Med J* 51: 701-702.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology* 3: 778-784.
- Xu Y, Kimura K, Matsumoto N, Ide C (2003) Isolation of neural stem cells from the forebrain of deceased early postnatal and adult rats with protracted post-mortem intervals. *J Neurosci Res* 74: 533-40.