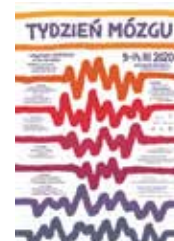


36. Travica N., Ried K., Sali A., Hudson I. L., Scholey A., Pipingas A. (2019). Plasma Vitamin C Concentrations and Cognitive Function: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in aging neuroscience*, 11:72.
37. Vollmer, W. M., Sacks, F. M., Ard, J., Appel, L. J., Bray, G. A., Simons-Morton, D. G., Karanja, N. (2001). Effects of diet and sodium intake on blood pressure: subgroup analysis of the DASH-sodium trial. *Annals of internal medicine*, 135:1019–1028.
38. White D. J., Camfield D. A., Maggini S., Pipingas A., Silberstein R., Stough C., Scholey A. (2017). The effect of a single dose of multivitamin and mineral combinations with and without guaraná on functional brain activity during a continuous performance task. *Nutritional neuroscience*. 20: 8–22.
39. Wilde M. C., Vellas B., Girault E., Yavuz A. C., Sijben J. W. (2017). Lower brain and blood nutrient status in Alzheimer's disease: Results from meta-analyses. *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions*, 3:416–431.
40. Witte A. V., Kerti L., Hermannstädter H. M., Fiebach J. B., Schreiber S. J., Schuchardt J. P., Flöel A. (2014). Long-chain omega-3 fatty acids improve brain function and structure in older adults. *Cerebral cortex*, 24:3059–3068.
41. Zhang Y., Hodgson N. W., Trivedi M. S., Abdolmaleky H. M., Fournier M., Cuenod M., Deth R. C. (2016). Decreased brain levels of vitamin B12 in aging, autism and schizophrenia. *PloS one*, 11:23–29.
42. Zimmerman C. A., Leib D. E., Knight Z. A. (2017). Neural circuits underlying thirst and fluid homeostasis. *Nature Reviews Neuroscience*, 18:459.
43. www.journals.lww.com/colipidology/Citation/2016/06000/Association_of_the_MIND_diet_with_cognition.

Joanna Chlopicka, Zakład Bromatologii, Collegium Medicum, Uniwersytet Jagielloński, Kraków. E-mail: joanna.chlopicka@uj.edu.pl

KOMÓRKI MACIERZyste W NAPRAWIE URAZÓW RDZENIA KRĘGOWEGO – AKTUALNY STAN WIEDZY

*Małgorzata Zawadzka, Anna Kwaśniewska,
Krzysztof Miazga, Urszula Sławińska (Warszawa)*



Streszczenie

Urazy rdzenia kręgowego bardzo często prowadzą do nieodwracalnych dysfunkcji ruchowych, paraliżu, zniesienia czucia, zakłócenia czynności układów oddechowego, krążenia i trawienego oraz wielu zespołów bólowych. Zapobieganie następstwom urazów rdzenia jest wciąż wielkim wyzwaniem dla współczesnej medycyny. Oczekuje się, że nowoczesne strategie terapeutyczne powinny być skierowane z jednej strony na hamowanie reakcji zapalnej oraz śmierci komórek nerwowych, a z drugiej w kierunku wspomagania regeneracji aksonów, procesu remielinizacji oraz odbudowy i aktywacji sieci neuralnych rdzenia kręgowego poniżej miejsca uszkodzenia. Wyniki badań nad wykorzystaniem przeszczepów komórek o różnym pochodzeniu i potencjale regeneracyjnym, prowadzonych na wystandaryzowanych modelach zwierzęcych, pokazują ich dużą efektywność w rekonstrukcji rdzenia i promowaniu odzyskiwania utraconych funkcji.

Abstract

Spinal cord injuries very often lead to irreversible motor dysfunctions, paralysis, sensory abolition, disruption of the functions of the respiratory, circulatory and digestive systems, and many pain syndromes. Preventing these traumatic consequences of spinal cord injuries is still a great challenge for modern medicine. It is expected that modern therapeutic strategies should be focused on inhibition of inflammatory response and death of neurons on the one hand, and towards supporting axonal regeneration, remyelination as well as

reconstruction and activation of the neural networks below the lesion site on the other hand. The results of recent studies on experimental therapies employing transplantation of cells of various origins and regenerative potential, carried out on highly standardized animal models, show their high efficiency in spinal cord reconstruction and promoting the recovery of lost functions.

Uszkodzenie rdzenia kręgowego (ang. *spinal cord injury*, SCI) jest silnie traumatycznym urazem neurologicznym, który prowadzi do wielu zaburzeń, takich jak: dysfunkcje ruchowe, paraliż, zniesienie czucia, zakłócenie czynności układów oddechowego, krążenia i trawiennego oraz wielu zespołów bólowych. Zapobieganie skutkom uszkodzenia rdzenia kręgowego jest jednocześnie jednym z wyzwań dla współczesnej medycyny, ponieważ pomimo znacznego postępu nauki, jedyną formą leczenia, jaką można obecnie zaproponować pacjentom, jest rehabilitacja.

Rdzeń kręgowy jest częścią ośrodkowego układu nerwowego, a jego rolą jest przewodzenie bodźców nerwowych między mózgiem a resztą ciała. Uszkodzony rdzeń kręgowy, w przeciwieństwie do innych części ciała czy narządów, nie regeneruje się samistnie – organizm nie potrafi odtworzyć przerwanych włókien nerwowych, co w konsekwencji prowadzi do trwałego inwalidztwa. Połowa wszystkich uszkodzeń kręgosłupa przypada na część szyjną i w 50% z nich dochodzi do porażenia czterech kończyn (tetraplegii), złamania części lędźwiowej skutkują w 50% powikłaniami w postaci porażenia kończyn dolnych (paraplegii). Jednak najniebezpieczniejsze dla rdzenia kręgowego są urazy w części piersiowej, które aż w 70% powodują rozległe deficyty neurologiczne. Całkowite uszkodzenie rdzenia skutkuje zniesieniem wszystkich rodzajów czucia (powierzchnowego, głębokiego, bólu i temperatury) i paraliżem wszystkich grup mięśniowych poniżej miejsca urazu.

Według statystyk Światowej Organizacji Zdrowia (ang. WHO), każdego roku średnio 350 tysięcy osób na świecie doznaje mniejszego lub większego uszkodzenia rdzenia kręgowego. W ok. 90% przypadków uraz rdzenia jest następstwem wypadku komunikacyjnego lub aktu przemocy, a zaledwie 10% jest efektem przewlekłych chorób bądź zmian zwyrodnieniowych. Globalny wskaźnik częstości urazu rdzenia kręgowego szacuje się na 23 przypadki na milion osób (tj. 180 tys. przypadków rocznie) i jest związany głównie z rozwojem przemysłu motoryzacyjnego. Najwięcej, bo ok. 54 przypadków na milion osób, tj. 17 tys. nowych przypadków rocznie, odnotowuje się w Stanach Zjednoczonych. W Polsce nie podaje się dokładnej liczby urazów kręgosłupa

i rdzenia kręgowego, szacunkowe dane mówią o 600–700 przypadków rocznie. Średnio przyjmuje się, że jest to 25–35 osób na 1 milion populacji. 5–6 razy częściej niż kobiety urazów tego typu doznają mężczyźni i w 90% są to osoby poniżej 40. roku życia. Najczęstszą przyczyną takich zdarzeń są wypadki komunikacyjne (samochodowe, motocyklowe, potrącenia pieszych i rowerzystów), następną grupę pod względem liczebności stanowią upadki z wysokości.

Zmiany patologiczne zachodzące w rdzeniu kręgowym po mechanicznym urazie

Uraz powoduje szereg zmian patologicznych w rdzeniu kręgowym. Mechaniczne uszkodzenie tkanki nerwowej prowadzi do zniszczenia włókien nerwowych i naczyń krwionośnych biegnących wzdłuż rdzenia kręgowego, a także do uszkodzenia komórek nerwowych i glejowych. Z uszkodzonych komórek nerwowych do przestrzeni pozakomórkowej w sposób niekontrolowany uwalniany jest neurotransmiter – glutaminian. Patologicznie wysokie stężenie glutaminianu powoduje przedłużoną depolaryzację kolejnych neuronów i prowadzi do ich śmierci. Uwalnianie dużych ilości glutaminianu do przestrzeni pozakomórkowej niszczy również oligodendrocyty (komórki wytwarzające osłonkę mielinową wokół aksonów), co powoduje demielinizację, a następnie degenerację pozbawianych osłonki aksonów. Kaskada patologicznych procesów prowadzi ponadto do wtórnych uszkodzeń, które są następstwem zmian w pozakomórkowym stężeniu jonów potasu, sodu i wapnia oraz rozwoju reakcji zapalnej [7]. Niedokrwienie tkanek i niedotlenienie komórek spowodowane uszkodzeniem naczyń krwionośnych prowadzi do zaburzeń metabolizmu komórkowego i zwiększonej produkcji wolnych rodników. Wszystkie te zmiany przyczyniają się do dalszej śmierci komórek na drodze martwicy lub apoptozy i dodatkowo zwiększają rozmiar uszkodzenia spowodowanego pierwotnym urazem. Wkrótce po urazie rdzenia kręgowego w miejscu uszkodzenia tkanki powstaje blizna glejowa zawierająca reaktywne astrocyty, a także fibroblasty i tkankę łączną. Blizna glejowa wspiera odbudowę bariery krew–rdzeń kręgowy i chroni

zdrową, nienaruszoną tkankę rdzenia. Z drugiej jednak strony blizna stanowi fizyczną i molekularną barierę dla regeneracji włókien nerwowych [28]. Komórki tworzące bliznę glejową produkują i uwalniają wiele substancji, takich jak proteoglikany, białko Nogo-A lub MAG (glikoproteina związana z mieliną), które mogą aktywować liczne receptory zlokalizowane na komórkach nerwowych, co prowadzi do aktywacji szlaku RhoA/ROCK, który powoduje niekorzystne zmiany w komórce, w tym rozpad cytoszkieletu stożka wzrostu aksonu [14].

Strategie terapeutyczne w leczeniu skutków urazów rdzenia kręgowego

Ze względu na bardzo ograniczoną skuteczność tradycyjnych strategii terapeutycznych w leczeniu skutków urazu rdzenia kręgowego wciąż poszukuje się nowych rozwiązań. Zapobieganie i/lub potencjalne, odwracanie skutków patologicznych zmian zachodzących w uszkodzonym rdzeniu jest celem prowadzonych obecnie na szeroką skalę badań naukowych nastawionych na opracowanie nowych strategii leczenia skutków SCI. W perspektywie terapeutycznej strategii takie powinny być skierowane z jednej strony w kierunku hamowania reakcji zapalnej oraz śmierci komórek nerwowych, a z drugiej w kierunku wspomagania regeneracji aksonów, procesu remielinizacji oraz odbudowy i aktywacji sieci neuralnych rdzenia kręgowego poniżej miejsca uszkodzenia. Gwałtowny rozwój biotechnologii, biologii molekularnej i komórkowej spowodował, że obecnie coraz więcej nadziei pokłada się w stosowaniu terapii komórkowych.

Na świecie stale prowadzone są liczne prace eksperymentalne mające na celu testowanie skuteczności i bezpieczeństwa potencjalnego zastosowania w terapii SCI wielu różnych rodzajów komórek z użyciem ściśle wystandaryzowanych modeli zwierzęcych. Testuje się przydatność i mechanizmy działania m.in. w pełni zróżnicowanych komórek Schwanna [18], komórek nabłonka węchowego [22,31,33], neuronów [12] oraz komórek macierzystych, w tym: neuronalnych komórek macierzystych (NSC) [35], mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC), komórek macierzystych miazgi zęba itd. Przeważnie komórki przeszczepia się bezpośrednio do uszkodzonego rdzenia kręgowego, bardzo często w rusztowaniach zawierających różne substancje ułatwiające przeżycie przeszczepionych komórek. Próbuje się również podawać komórki macierzyste dożylnie. Jednak te metody aplikacji mają pewne wady, takie jak konieczność poważnej interwencji chirurgicznej czy

niebezpieczeństwo wystąpienia zatorowości mózgowej po dożylnym podaniu zawiesiny komórkowej, dlatego poszukiwane są bardziej precyzyjne metody dostarczania komórek do miejsca uszkodzenia. Jedną z najbardziej nowatorskich koncepcji jest wykorzystanie opisanych ostatnio struktur, nanobotów, które są zdolne do dostarczania komórki dokładnie do miejsca uszkodzenia [8]. Aby uniknąć niedogodności związanych z podawaniem całych komórek, takich jak: niski wskaźnik przeżycia spowodowany niedokrwieniem, niekontrolowane różnicowanie komórek, odrzucenie przeszczepu przez organizm gospodarza i tworzenie nowotworów, podejmowane są również próby zastosowania pęcherzyków pozakomórkowych, naturalnie produkowanych przez komórki w celu komunikowania się z innymi komórkami. Jedną z ich form są egzosomy, rodzaj pęcherzyków o wielkości 50–100 nm, które są uwalniane z komórek w różnych procesach patologicznych zachodzących w organizmie. Pęcherzyki mogą dostarczać wiele substancji (takich jak regulujące ekspresję genów miRNA i białka) bezpośrednio do komórek i wpływać na ich aktywność. Dożylnie podanie egzosomów pochodzących ze zmodyfikowanych komórek macierzystych zawierających regulatorowe mikroRNA u szczurów po kompresji rdzenia kręgowego prowadzi do zwiększenia regeneracji aksonów i poprawy zdolności poruszania się badanych zwierząt [15].

W dalszej części artykułu omówione zostaną wybrane wyniki badań prowadzonych z wykorzystaniem odpowiednich modeli zwierzęcych (najczęściej gryzoni), nakierowanych na zbadanie możliwości stosowania komórek macierzystych i komórek z nich uzyskanych podczas różnicowania *in vitro* w leczeniu SCI w aspekcie przeciwdziałania niekorzystnym zmianom w uszkodzonym rdzeniu kręgowym.

Hamowanie reakcji zapalnej następującej po uszkodzeniu rdzenia kręgowego

Zapalenie jest naturalną odpowiedzią układu odpornościowego na uraz, prowadzącą do usunięcia uszkodzonej tkanki, jej naprawy, a ostatecznie do przywrócenia i utrzymania homeostazy organizmu. Pierwszą reakcją immunologiczną po SCI jest aktywacja rezydujących w tkance komórek glejowych – mikrogleju i astrocytów, produkujących i uwalniających do mikrośrodowiska uszkodzenia liczne cytokiny prozapalne, co prowadzi do aktywacji obwodowych komórek odpornościowych (neutrofile, makrofagi, limfocyty T i B). Rozwijający się stan zapalny zwykle przyczynia się do powstawania wtórnych uszkodzeń. Aktywacja komórek glejowych

powoduje bowiem uwalnianie proteaz, reaktywnych form tlenu i enzymów lizosomalnych, tym samym nasilając uszkodzenie. Ta szkodliwa odpowiedź zapalna skutkuje osłabieniem możliwości regeneracyjnych aksonów, demielinizacją, śmiercią komórek nerwowych i ostatecznie dalszą utratą funkcji.

Jedną z potencjalnych strategii terapii komórkowych w leczeniu skutków SCI jest próba modulowania odpowiedzi zapalnej mikrogleju i monocytów [13]. Po uszkodzeniu mikroglej i monocyty krwi obwodowej infiltrują miejsce uszkodzenia i przekształcają się w makrofagi. Mikroglej i makrofagi wczesnego typu (M1) działają prozapalnie. Rolą makrofagów M1 jest usuwanie resztek tkanki i drobnoustrojów z miejsca uszkodzenia. W późniejszych etapach odpowiedzi tkanki na uszkodzenie pojawiają się makrofagi typu przeciwzapalnego (M2), które wspierają przemodelowanie tkanek i ich naprawę. Te fazy aktywacji makrofagów są zaburzone po SCI, co odzwierciedla m.in. podwyższone stężenie markerów prozapalnych typu M1 [7]. Dlatego prowadzi się badania nad przekierowaniem aktywacji makrofagów w kierunku fenotypu M2 poprzez przeszczepy komórek macierzystych. Wykazano, że przeszczepianie mezenchymalnych komórek macierzystych prowadzi do zwiększenia liczby makrofagów typu M2 i obniżenia liczby makrofagów typu M1 u szczurów [20]. Natomiast neuralne komórki prekursorowe przeszczepione w przewlekłych stadiach SCI u szczurów i myszy powodują obniżenie poziomu M1 bez znaczącego wpływu na aktywność makrofagów M2 [23]. Podobnie zastosowanie pęcherzyków komórkowych pochodzących z neuralnych komórek macierzystych powoduje zmniejszenie aktywacji mikrogleju i zmniejszone wytwarzanie cytokin prozapalnych: TNF- α , IL-1 β i IL-6 [25]. Przeszczepienie komórek macierzystych moduluje profil odpowiedzi zapalnej nie tylko makrofagów, ale także innych rodzajów komórek układu odpornościowego. Wykazano, że przeszczep neuronalnych komórek macierzystych powoduje wzrost produkcji limfocytów T, przy zmniejszonej ilości limfocytów B i neutrofilii u myszy z SCI [2]. Odpowiedź zapalną można również modulować poprzez zahamowanie efektu kaskadowej produkcji cytokin prozapalnych przez reaktywne astrocyty w wyniku przeszczepu mezenchymalnych komórek macierzystych i neuralnych komórek prekursorowych [23,32].

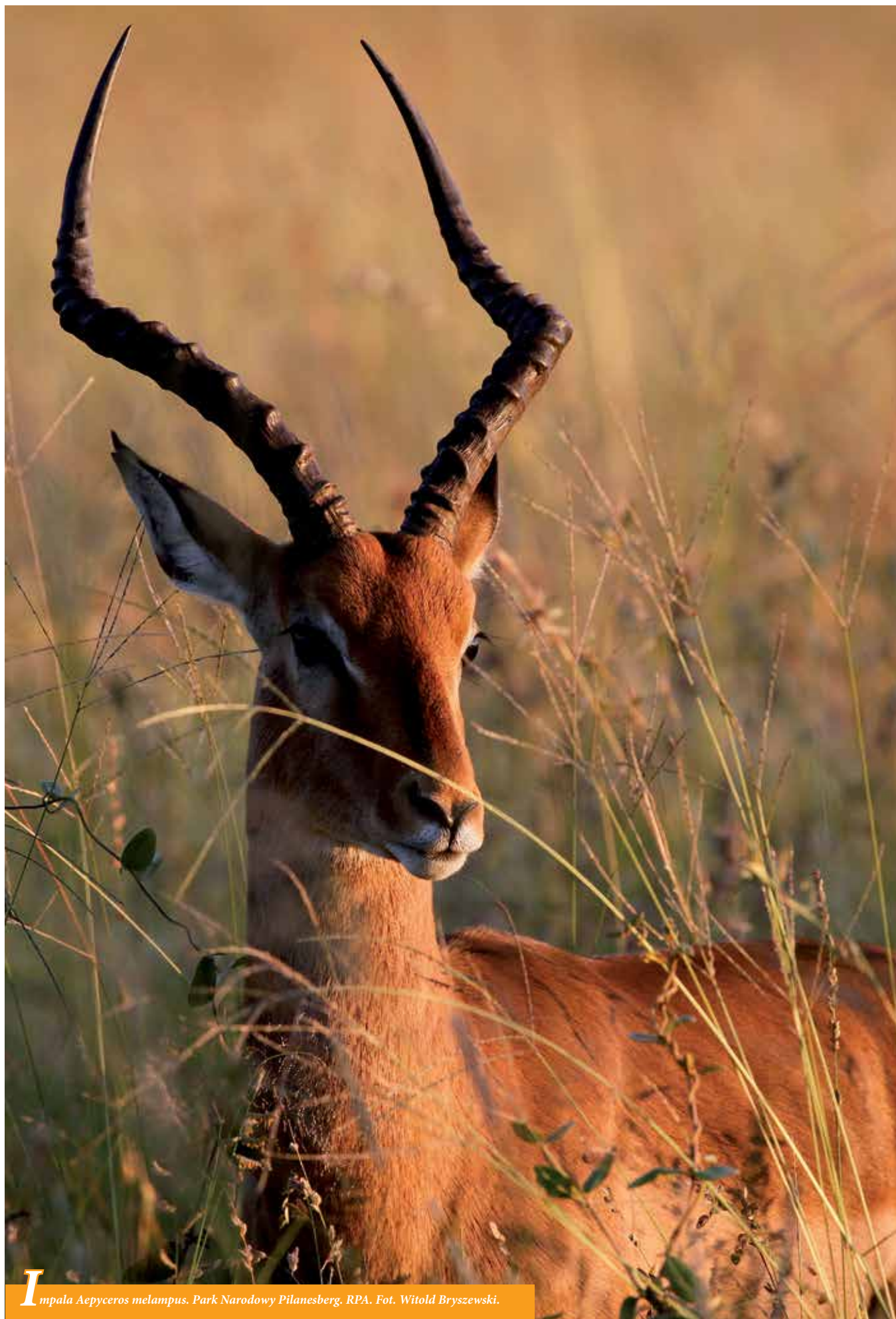
Wspieranie regeneracji aksonów

Zwykle podczas silnego urazu siły mechaniczne działające na kręgosłup powodują zmiążdżenie lub

rozerwanie tkanki nerwowej, co skutkuje między innymi przerwaniem ciągłości włókien nerwowych biegnących wzdłuż rdzenia kręgowego, a następnie ich postępującą dezintegracją, demielinizacją, a w konsekwencji zanikiem wielu komórek nerwowych. Ponadto uszkodzenie tkanki nerwowej z powodu rozwoju reakcji zapalnej i powstawania blizny glejowej stwarza niekorzystne środowisko dla odrastu i regeneracji uszkodzonych aksonów. W związku z powyższym prowadzone są intensywne badania nad mechanizmami zwiększania regeneracji aksonów po SCI, oparte z jednej strony na zapobieganiu i usuwaniu istniejącej blizny glejowej, która stanowi mechaniczną i molekularną barierę dla jego regeneracji, a z drugiej strony zapewnieniu optymalnego środowiska dla wzrostu i regeneracji aksonów.

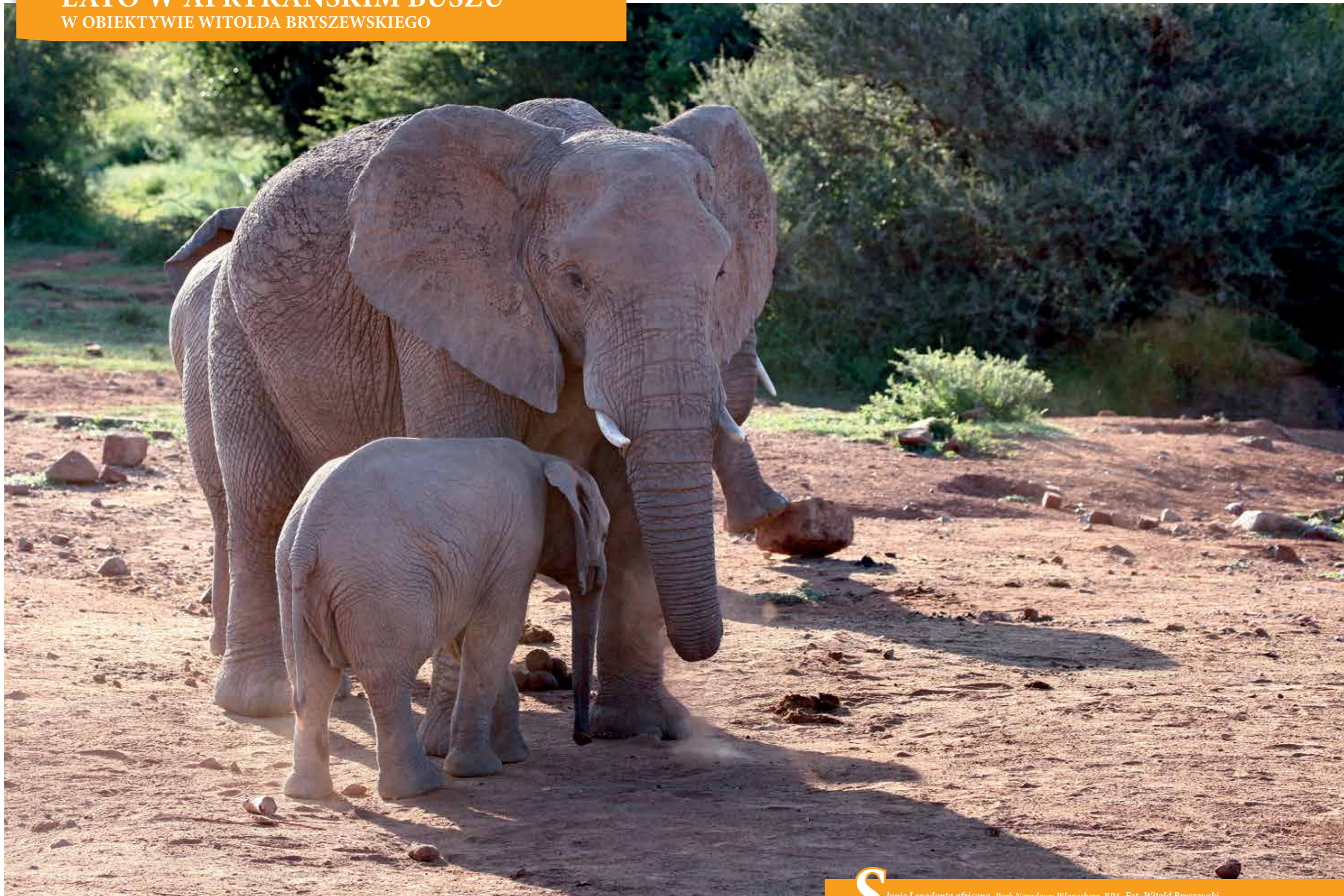
W celu usunięcia blizny glejowej w wielu laboratoriach prowadzi się badania z wykorzystaniem enzymu chondroitynazy ABC trawiącego siarczan chondroityny, który jest głównym składnikiem blizny glejowej. Zastosowanie tego enzymu daje dobre wyniki, zwłaszcza w połączeniu z innymi metodami, takimi jak: jednoczesne przeszczepianie nerwów obwodowych, tlenoterapia hiperbaryczna, napromienianie laserowe, trening na bieżni lub przeszczep różnego rodzaju komórek. Podawanie chondroitynazy ABC przez tydzień przed przeszczepem neuralnych komórek macierzystych uzyskanych *in vitro* z indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPS-NSC) u myszy po urazie rdzenia kręgowego spowodowało zmniejszenie blizny glejowej i znacznie poprawiło przeżycie przeszczepionych komórek i ich różnicowanie. Wykazano, że neurony powstałe z iPS-NSC integrują się z obwodami rdzenia kręgowego, tworząc funkcjonalne synapsy z neuronami gospodarza. Zwierzęta ponadto wykazywały powrót funkcji, przejawiający się większą siłą chwytu kończyn i lepszą zdolnością poruszania się [26]. Jednak chondroitynaza bardzo szybko traci aktywność w temperaturze ciała, co jest poważnym ograniczeniem jej zastosowania w terapii klinicznej SCI u ludzi, dlatego opracowano zmodyfikowane komórki, stale uwalniające ten enzym [1, 11]. Przeszczepienie komórek nabłonka węchowego produkujących w sposób ciągły chondroitynazę ABC u szczurów doprowadziło do zwiększenia regeneracji aksonów i wzrostu liczby połączeń korowo-rdzeniowych [1].

W leczeniu skutków doświadczalnego SCI próbuje się także stosować komórki macierzyste miążgi zęba. Komórki te można bardzo łatwo pozyskać z różnych tkanek zęba podczas rutynowych zabiegów dentystycznych i można inicjować ich różnicowanie *in vitro* w kierunku różnych typów komórek, takich



Impala *Aepyceros melampus*. Park Narodowy Pilanesberg, RPA. Fot. Witold Bryszewski.

LATO W AFRYKAŃSKIM BUSZU
W OBIEKTYWIE WITOLDA BRYSZEWSKIEGO



Loxodonta africana. Park Narodowy Pilanesberg, RPA. Fot. Witold Bryszewski.



W

iklacz *Ploceus velatus*. Park Narodowy Pilanesberg, RPA. Fot. Witold Bryszewski.

jak: komórki wątroby, komórki β trzustki, kardiomyocyty, chondrocyty, osteoblasty i neurony, dlatego mają duże możliwości wykorzystania w medycynie regeneracyjnej. Transplantacja śródrzeniowa tych komórek z użyciem czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor*, FGF 2) u szczurów bezpośrednio po uszkodzeniu rdzenia kręgowego prowadzi do znacznej poprawy funkcji ruchowych badanych zwierząt. Dodatkowa analiza wykazała, że użycie FGF 2 zwiększyło liczbę wszczepianych komórek w uszkodzonym rdzeniu kręgowym, chroniąc je przed śmiercią wywołaną przez reaktywne formy tlenu. Przeżywające komórki aktywowały regenerację aksonów i przywracanie funkcji ruchowych prawdopodobnie przez wydzielanie czynników neurotroficznych w miejscu uszkodzenia [19]. Komórki są często wprowadzane do uszkodzonego rdzenia kręgowego łącznie z różnego typu rusztowaniami, które z jednej strony tworzą korzystne mikrośrodowisko dla przeszczepionych komórek z drugiej tworzą mostek do regeneracji aksonów i fizycznego blokowania tworzenia blizn glejowych. Do produkcji takich rusztowań wykorzystuje się wiele różnych substancji, głównie biomateriałów, takich jak: kolagen, hydrożel, fibroina jedwabna, specjalnie przygotowane tkanki (rusztowania bezkomórkowe rdzenia kręgowego) lub gąbka żelatynowa. Komórki i rusztowania przeszczepione jednocześnie do uszkodzonego rdzenia kręgowego działają synergistycznie i bardzo często prowadzą do lepszego efektu niż przeszczepianie komórek lub samego rusztowania.

Wspieranie procesu remielinizacji

Mielina jest bogatą w lipidy i białka strukturą produkowaną przez dwa rodzaje komórek: oligodendrocyty (w ośrodkowym układzie nerwowym) i komórki Schwanna (w obwodowym układzie nerwowym). Główną rolą osłonki mielinowej jest ochrona aksonów i umożliwienie szybkiego przekazywania impulsów nerwowych. Zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu i azotu w tkance po urazie prowadzi do uszkodzenia oligodendrocytów i ich apoptozy. Konsekwencją śmierci oligodendrocytów jest postępująca demielinizacja, czyli utrata osłonki mielinowej nieuszkodzonych aksonów, które następnie degenerują, co istotnie zaburza przekazywanie impulsów nerwowych. Utracona mielina jest co prawda spontanicznie regenerowana po SCI przez nowopowstałe oligodendrocyty i migrujące komórki Schwanna, jednak najczęściej remielinizacja nie jest wystarczająco efektywna. U szczurów nawet w kilka miesięcy po urazie obserwuje się obecność niezmielinizowanych i degenerujących aksonów. Dla-

tego postuluje się, że zwiększenie mielinizacji poprzez przeszczepianie komórek ją wytwarzających może być dobrą strategią terapeutyczną w zapobieganiu skutkom uszkodzenia rdzenia kręgowego. Potencjalne strategie terapeutyczne mogą opierać się na użyciu różnych rodzajów komórek: dojrzałych komórek mielinizujących (oligodendrocytów) lub ich prekursorów komórek macierzystych pochodzących z tkanek zarodkowych lub dorosłych i komórek iPS. Jedną z obiecujących strategii może okazać się przeszczepianie prekursorów oligodendrocytów (OPC) różnego pochodzenia. Jest to bezpośrednia metoda zastępowania oligodendrocytów utraconych podczas urazu. OPC pochodzące z ludzkich embrionalnych komórek macierzystych różnicują do dojrzałych oligodendrocytów i skutecznie mielinizują aksony po przeszczepieniu do uszkodzonego rdzenia u szczurów. Jednak ze względu na rozwijającą się równolegle astrogliozę, blokującą migrację i różnicowanie OPC, przeszczepy są skuteczne tylko krótko po urazie [27]. Pośrednim sposobem na zwiększenie liczby oligodendrocytów po urazie jest wszczepienie nerwowych komórek progenitorowych/macierzystych, które można uzyskać zarówno z iPS, jak i z tkanek dorosłych. W celu zwiększenia różnicowania w kierunku oligodendrocytów, komórki można preprogramować *in vitro* np. poprzez nadekspresję czynnika transkrypcyjnego Olig2, odpowiedzialnego za różnicowanie OPC z neuralnych komórek macierzystych [10].

Wykazano, że bardzo skuteczne w mielinizacji aksonów rdzenia kręgowego są komórki produkujące mielinę w obwodowym układzie nerwowym, komórki Schwanna. Biorąc pod uwagę fakt, że trudno jest uzyskać dojrzałe komórki Schwanna, podejmuje się próby ich różnicowania *in vitro* z komórek macierzystych szpiku kostnego i tkanki tłuszczowej. Wykazano, że komórki Schwanna zmodyfikowane tak, aby produkowały duże ilości glejowego czynnika troficznego GDNF i chondroitinazy, przeszczepione do miejsca uszkodzenia mielinizują aksony i zwiększają ich przeżywalność [4,11]. Skutecznym sposobem wszczepienia komórek jest połączenie ich z matrycą hydrożelową, ponieważ komórki wykazują w takim układzie znacznie wyższą przeżywalność. Co więcej, również endogenne komórki Schwanna chętnie migrują do hydrożelu peptydowego, wzmacniając mielinizację w miejscu pierwotnego uszkodzenia.

Hamowanie śmierci komórek

Apoptoza po SCI dotyczy różnych typów komórek, między innymi neuronów, oligodendrocytów, mikrogleju i astrocytów. Apoptotyczna śmierć komórek jest

regulowana głównie przez kaskadę kaspaz, które mogą być kontrolowane przez wiele czynników, między innymi białka Bax, p53, Bcl-2, TNF- α lub Fas. Poziom ekspresji tych czynników zmienia się wraz ze zmianami mikrośrodowiska uszkodzenia – stres oksydacyjny i specyficzne cząsteczki wydzielane po urazie mogą powodować efekt patofizjologiczny. Zapobieganie utracie neuronów w wyniku apoptozy jest jednym z oczekiwanych rezultatów przeszczepów komórek po uszkodzeniu rdzenia kręgowego. Wykazano, że zmniejszenie aktywności kaspazy 3 jest głównym mechanizmem ochronnego działania neuronalnych komórek prekursorowych [23], ludzkich owodniowych mezenchymalnych komórek macierzystych [36] oraz szczerzych komórek szpiku kostnego [3,34]. Również transplantacje egzosomów pochodzących z mezenchymalnych komórek macierzystych skutkują niższą ekspresją kaspazy 9 [17]. Ponadto wykazano, że egzosomy pochodzące z mezenchymalnych komórek macierzystych zmniejszają poziom ekspresji proapoptotycznego czynnika Bax, jednocześnie wzmacniając ekspresję antyapoptotycznego Bcl-2 szczerzym modelu SCI [9,17].

Homeostaza układu nerwowego jest kontrolowana przez różne ścieżki sygnałowe, m.in. proces zwany autofagią, polegający na usuwaniu dysfunkcyjnych lub niepotrzebnych składników komórek i pozostający w ścisłym związku z apoptozą. Oba mechanizmy, autofagia i apoptoza, mogą być odpowiedzialne na podobne czynniki stresowe i mogą wzajemnie się regulować: wykazano bowiem, że indukowanie autofagii hamuje apoptozę, a z kolei jej zablokowanie może prowadzić do indukcji apoptozy, zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Indukowanie autofagii jest proponowanym mechanizmem anty-apoptotycznego działania pęcherzyków pozakomórkowych pochodzących z neuronalnych komórek macierzystych. Podawanie pęcherzyków nie tylko zwiększa poziom czynników zaangażowanych w przebieg autofagii – LC3B i beclin-1, ale także zmniejsza ekspresję proapoptotycznego czynnika Bax [24,25].

Innym możliwym mechanizmem działania anty-apoptotycznego przeszczepionych komórek mezenchymalnych jest transfer mitochondriów z komórek macierzystych do neuronów ruchowych w uszkodzonym rdzeniu kręgowym. Taka internalizacja mitochondrialna, wykazana *in vitro* i *in vivo*, poprawia bioenergetykę neuronów, co może prowadzić do blokowania szlaków apoptotycznych [16].

Odbudowa i aktywacja sieci rdzenia kręgowego

Wśród wielu niekorzystnych zmian zachodzących w uszkodzonym rdzeniu kręgowym niezwykle istotne dla funkcjonowania organizmu są zakłócenia, a nawet zniesienie unerwienia sieci rdzenia kręgowego zlokalizowanych poniżej miejsca uszkodzenia przez wyższe struktury nadrdzeniowe, które aktywują i modulują aktywność tych sieci. W związku z tym badania naukowe koncentrują się również na opracowaniu strategii terapeutycznych wzmacniających integrację przeszczepianych komórek z siecią rdzenia kręgowego i zastępowanie komórek utraczonych w wyniku urazu. Obiecujące wyniki odnotowano w doświadczeniach, w których komórki nerwowe różnicowane *in vitro* z ludzkich komórek macierzystych tkanki tłuszczowej przeszczepione do uszkodzonego rdzenia kręgowego myszy znacząco poprawiały zdolności motoryczne zwierząt. Dokładne analizy tkanek wykazały, że komórki te posiadały charakterystyczne cechy dojrzałych neuronów i były funkcjonalnie zintegrowane z siecią rdzenia kręgowego gospodarza [6].

SCI bardzo często prowadzi do zakłócenia unerwienia GABAergicznego, prowadząc do zwiększonej pobudliwości neuronów, które przetrwały uraz rdzenia kręgowego i powstawania zespołu bólu neuropatycznego. W związku z tym przeszczep neuronów GABAergicznych w celu przywrócenia właściwego unerwienia jest jedną z postulowanych metod leczenia bólu neuropatycznego. Dordzeniowa transplantacja neuronów GABAergicznych, różnicowanych z mysich komórek macierzystych wężła zarodkowego, do szczerów po uszkodzeniu rdzenia prowadzi do zmniejszenia bólu neuropatycznego, co objawia się zniesieniem nadwrażliwości na dotyk i nadpobudliwości [12].

Wiele danych doświadczalnych wykazuje, że unerwienie noradrenergiczne (NA) i serotoninowe (5-HT) rdzenia kręgowego odgrywa bardzo ważną rolę w kontroli ruchów. Uraz rdzenia kręgowego bardzo często prowadzi do zniszczenia tego typu unerwienia, dlatego przeszczep przywracających unerwienie monoaminergiczne (tzn. NA, 5-HT, dopaminowe) sieci rdzenia kręgowego odpowiedzialnych za generację połączeń ruchowych, które przetrwały poniżej miejsca uszkodzenia, jest jedną z postulowanych koncepcji leczenia skutków urazu. Wykazano, że wyizolowane z odpowiednich struktur fragmenty zarodkowej tkanki mózgowej zawierające neurony noradrenergiczne [21] lub serotoninowe [5] są zdolne do przetrwania w tkance gospodarza i unerwiają właściwe obszary rdzenia kręgowego. Wszczepienie fragmentu zarodkowej tkanki pnia mózgu szczura,

zawierającej komórki serotoninowe, do uszkodzonego rdzenia dorosłych szczurów powoduje poprawę zdolności ruchowych zwierząt [29,30]. W badaniach opisanych powyżej jako przeszczep wykorzystano tkankę zarodkową zawierającą komórki serotoninowe, jednak przeszczep fragmentów tkanek ma ograniczenia etyczne, dlatego do badania roli komórek serotoninowych w przywracaniu funkcji ruchowych po SCI potrzebne są bardziej precyzyjne narzędzia. W naszym laboratorium uzyskaliśmy neuralne komórki prekursorowe, które mają zdolność różnicowania w kierunku neuronów serotoninowych w hodowli *in vitro* oraz różnicowania i integrowania się w tkance gospodarza *in vivo*. Obecnie prowadzimy badania nad możliwością modulowania różnicowania prekursorów neuralnych w kierunku innych typów neuronów o potencjalnym zastosowaniu w terapiach uszkodzonego rdzenia kręgowego.

Podsumowanie

Zaprezentowane tutaj wyniki badań nad eksperymentalnymi terapiami komórkowymi w leczeniu skutków urazu rdzenia kręgowego pokazują ich ogromny potencjał w rekonstrukcji rdzenia i promowaniu odzyskiwania funkcji. Jednak wciąż pozostaje wiele problemów do rozwiązania przed klinicznym

zastosowaniem tych strategii. Zarodkowe komórki macierzyste mają ograniczone zastosowanie kliniczne ze względu na kwestie etyczne dotyczące ich pochodzenia oraz możliwości nowotworzenia po przeszczepie. Natomiast stosowanie indukowanych komórek pluripotencjalnych, pochodzących z reprogramowania komórek autologicznych, mimo że nie budzi zastrzeżeń związanych z etyką ich pozyskiwania, jest kwestionowane z uwagi na brak bezpieczeństwa w zastosowaniu klinicznym.

Ze względu na złożoność i zmienną dynamikę patologicznych procesów zachodzących w uszkodzonym rdzeniu kręgowym oraz wielość potencjalnych mechanizmów działania przeszczepów komórkowych wydaje się, że w przyszłych strategiach terapeutycznych klinicyści będą kompleksowo rozważali szczególne warunki jednostkowego urazu i wybierali odpowiednią strategię leczenia lub strategię połączone, aby osiągnąć najlepszy efekt terapeutyczny. Aby przybliżyć osiągnięcie tego celu niezbędne jest stale analizowanie możliwie największej ilości danych pochodzących z różnych modeli doświadczalnych i prób klinicznych. Proces ten wydaje się niewystarczająco szybki w kontekście potrzeb pacjentów, ale jest niezbędny dla skutecznego i bezpiecznego transferu nowych technologii do kliniki.

Bibliografia

1. Carwardine D., Prager J., Neeves J., Muir E. M., Uney J., Granger N., Wong L. F. (2017) Transplantation of canine olfactory ensheathing cells producing chondroitinase ABC promotes chondroitin sulphate proteoglycan digestion and axonal sprouting following spinal cord injury. *PLoS One*, 12: e0188967.
 2. Cusimano, M., Bizziato D., Brambilla E., Donegà M., Alfaro–Cervello C., Snider S., Salani G., Pucci F., Comi G., Garcia–Verdugo J. M., De Palma M., Martino, Pluchino S. (2012) Transplanted neural stem/precursor cells instruct phagocytes and reduce secondary tissue damage in the injured spinal cord. *Brain*, 135: 447–460.
 3. Dasari, V. R., Spomar D. G., Cady C., Gujrati M., Rao J. S., Dinh D. H. (2007) Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase–3–mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. *Neurochem Res*, 32: 2080–2093.
 4. Deng, L. X., Deng P., Ruan Y., Xu Z. C., Liu N. K., Wen X., Smith G. M., Xu X. M. (2013) A novel growth–promoting pathway formed by GDNF–overexpressing Schwann cells promotes propriospinal axonal regeneration, synapse formation, and partial recovery of function after spinal cord injury. *J Neurosci*, 33: 5655–5667.
 5. Foster, G. A., Roberts M. H. T., Wilkinson L. S., Bjorklund A., Gage F. H., Hokfelt T., Schultzberg M., Sharp T. (1989) Structural and functional of raphe neuron implants into denervated rat spinal cord. *Brain Research Bulletin*, 22: 131–137.
 6. Gao, S., Guo X., Zhao S., Jin Y., Zhou F., Yuan P., Cao L., Wang J., Qiu Y., Sun C., Kang Z., Gao F., Xu W., Hu X., Yang D., Qin Y., Ning K., Shaw P. J., Zhong G., Cheng L., Zhu H., Gao Z., Chen X., Xu J. (2019) Differentiation of human adipose–derived stem cells into neuron/motoneuron–like cells for cell replacement therapy of spinal cord injury. *Cell Death Dis*, 10: 597.
-

7. Gensel, J. C., Zhang B. (2015) Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res*, 1619: 1–11.
 8. Gyak, K. W., Jeon S., Ha L., Kim S., Kim J. Y., Lee K. S., Choi H., Kim D. P. (2019) Magnetically actuated SiCN-based ceramic microrobot for guided cell delivery. *Adv Healthc Mater*, e1900739.
 9. Huang, J. H., Yin X. M., Xu Y., Xu C. C., Lin X., Ye F. B., Cao Y., Lin F. Y. (2017) Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells attenuates apoptosis, inflammation, and promotes angiogenesis after spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*, 34: 3388–3396.
 10. Hwang, D. H., Kim B. G., Kim E. J., Lee S. I., Joo I. S., Suh–Kim H., Sohn S., Kim S. U. (2009) Transplantation of human neural stem cells transduced with Olig2 transcription factor improves locomotor recovery and enhances myelination in the white matter of rat spinal cord following contusive injury. *BMC Neurosci*, 10: 117.
 11. Kanno, H., Pressman Y., Moody A., Berg R., Muir E. M., Rogers J. H., Ozawa H., Itoi E., Pearse D. D., Bunge M. B. (2014) Combination of engineered Schwann cell grafts to secrete neurotrophin and chondroitinase promotes axonal regeneration and locomotion after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, 34: 1838–1855.
 12. Kim, D. S., Jung S. J., Nam T. S., Jeon Y. H., Lee D. R., Lee J. S., Leem J. W., Kim D. W. (2010) Transplantation of GABAergic neurons from ESCs attenuates tactile hypersensitivity following spinal cord injury. *Stem Cells*, 28: 2099–2108.
 13. Kong, X., Gao J. (2017) Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *J Cell Mol Med*, 21: 941–954.
 14. Kopp, M. A., Liebscher T., Niedeggen A., Laufer S., Brommer B., Jungehulsing G. J., Strittmatter S. M., Dirnagl U., Schwab J. M. (2012) Small-molecule-induced Rho-inhibition: NSAIDs after spinal cord injury. *Cell and Tissue Research*, 349: 119–132.
 15. Li, D., Zhang P., Yao X., Li H., Shen H., Li X., Wu J., Lu X. (2018) Exosomes derived from miR-133b-modified mesenchymal stem cells promote recovery after spinal cord injury. *Front Neurosci*, 12: 845.
 16. Li, H., Wang C., He T., Zhao T., Chen Y. Y., Shen Y. L., Zhang X., Wang L. L. (2019) Mitochondrial transfer from bone marrow mesenchymal stem cells to motor neurons in spinal cord injury rats via gap junction. *Theranostics*, 9: 2017–2035.
 17. Liu, W., Wang Y., Gong F., Rong Y., Luo Y., Tang P., Zhou Z., Xu T., Jiang T., Yang S., Yin G., Chen J., Fan J., Cai W. (2019) Exosomes derived from bone mesenchymal stem cells repair traumatic spinal cord injury by suppressing the activation of A1 neurotoxic reactive astrocytes. *J Neurotrauma*, 36: 469–484.
 18. Mousavi, M., Hedayatpour A., Mortezaee K., Mohamadi Y., Abolhassani F., Hassanzadeh G. (2019) Schwann cell transplantation exerts neuroprotective roles in rat model of spinal cord injury by combating inflammasome activation and improving motor recovery and remyelination. *Metab Brain Dis*, 34: 1117–1130.
 19. Nagashima, K., Miwa T., Soumiya H., Ushiro D., Takeda–Kawaguchi T., Tamaoki N., Ishiguro S., Sato Y., Miyamoto K., Ohno T., Osawa M., Kunisada T., Shibata T., Tezuka K. I., Furukawa S., Fukumitsu H. (2017) Priming with FGF2 stimulates human dental pulp cells to promote axonal regeneration and locomotor function recovery after spinal cord injury. *Sci Rep*, 7: 13500.
 20. Nakajima, H., Uchida K., Guerrero A. R., Watanabe S., Sugita D., Takeura N., Yoshida A., Long G., Wright K. T., Johnson W. E., Baba H. (2012) Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 29: 1614–1625.
 21. Nygren, L. G., Olson L., Seiger A. (1977) Monoaminergic reinnervation of transected spinal cord by homologous fetal brain grafts. *Brain Research*, 129: 227–235.
 22. Raisman, G., Barnett S. C., Ramon–Cueto A. (2012) Repair of central nervous system lesions by transplantation of olfactory ensheathing cells. *Handb Clin Neurol*, 109: 541–9.
 23. Riemann, L., Younsi A., Scherer M., Zheng G., Skutella T., Unterberg A. W., Zweckberger K. (2018) Transplantation of Neural Precursor Cells Attenuates Chronic Immune Environment in Cervical Spinal Cord Injury. *Front Neurol*, 9: 428.
 24. Rong, Y., Liu W., Lv C., Wang J., Luo Y., Jiang D., Li L., Zhou Z., Zhou W., Li Q., Yin G., Yu L., Fan J., Cai W. (2019a) Neural stem cell small extracellular vesicle-based delivery of 14–3–3t reduces apoptosis and neuroinflammation following traumatic spinal cord injury by enhancing autophagy by targeting Beclin-1. *Aging (Albany NY)*, 11: 7723–7745.
-

25. Rong, Y., Liu W., Wang J., Fan J., Luo Y., Li L., Kong F., Chen J., Tang P., Cai W. (2019b) Neural stem cell-derived small extracellular vesicles attenuate apoptosis and neuroinflammation after traumatic spinal cord injury by activating autophagy. *Cell Death Dis*, 10: 340.
26. Sarvezad, A., Babahajian A., Bakhtiari M., Soleimani M., Behnam B., Yari A., Akbari A., Yousefifard M., Janzadeh A., Amini N., Agah S., Fallah A., Joghataei M. T. (2017) The combined application of human adipose derived stem cells and Chondroitinase ABC in treatment of a spinal cord injury model. *Neuropeptides*, 61: 39–47.
27. Sharp, J., Frame J., Siegenthaler M., Nistor G., Keirstead H. S. (2010) Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants improve recovery after cervical spinal cord injury. *Stem Cells*, 28: 152–163.
28. Silver, J., Miller J. H. (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nature Reviews Neuroscience*, 5: 146–156.
29. Sławińska, U., Majczyński H., Djavadian R. (2000) Recovery of hindlimb motor functions after spinal cord transection is enhanced by grafts of the embryonic raphe nuclei. *Exp Brain Res*, 132: 27–38.
30. Sławińska, U., Miazga K., Jordan L. M. (2014) The role of serotonin in the control of locomotor movements and strategies for restoring locomotion after spinal cord injury. *Acta Neurobiol Exp*, 74: 172–187.
31. Tabakow, P., Jarmundowicz W., Czapiga B., Fortuna W., Miedzybrodzki R., Czyz M., Huber J., Szarek D., Okurowski S., Szewczyk P., Gorski A., Raisman G. (2013) Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplantation*, 22: 1591–1612.
32. Wilcox, J. T., Satkunendrarajah K., Zuccato J. A., Nassiri F., Fehlings M. G. (2014) Neural precursor cell transplantation enhances functional recovery and reduces astrogliosis in bilateral compressive/contusive cervical spinal cord injury. *Stem Cells Transl Med*, 3: 1148–1159.
33. Yamamoto, M., Raisman G., Li D., Li Y. (2009) Transplanted olfactory mucosal cells restore paw reaching function without regeneration of severed corticospinal tract fibres across the lesion. *Brain Research*, 1303: 26–31.
34. Yin, F., Guo L., Meng C. Y., Liu Y. J., Lu R. F., Li P., Zhou Y. B. (2014) Transplantation of mesenchymal stem cells exerts anti-apoptotic effects in adult rats after spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Brain Res*, 1561: 1–10.
35. Zhao, X. M., He X. Y., Liu J., Xu Y., Xu F. F., Tan Y. X., Zhang Z. B., Wang T. H. (2019) Neural stem cell transplantation improves locomotor function in spinal cord transection rats associated with nerve regeneration and IGF-1 R expression. *Cell Transplant*, 28: 1197–1211.
36. Zhou, H. L., Zhang X. J., Zhang M. Y., Yan Z. J., Xu Z. M., Xu R. X. (2016) Transplantation of human amniotic mesenchymal stem cells promotes functional recovery in a rat model of traumatic spinal cord injury. *Neurochem Res*, 41: 2708–2718.

Małgorzata Zawadzka, Anna Kwaśniewska, Krzysztof Miazga, Urszula Sławińska, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa. E-mail: m.zawadzka@nencki.edu.pl

NEUROMODULACJA – MAGNETYCZNA I ELEKTRYCZNA INGERENCJA W PRACĘ MÓZGU

Małgorzata Kossut (Warszawa)



Streszczenie

Nieinwazyjna modulacja pobudliwości mózgu to nowa gałąź badań neuronaukowych i nowa możliwość działań terapeutycznych. W artykule opisane są dwie metody: przezczaszkowa stymulacja magnetyczna i przezczaszkowa stymulacja prądowa, prądem stałym lub zmiennym. Opisane są w skrócie sposoby działania stymulatorów i wpływ obu rodzajów stymulacji na aktywność mózgu. Podane są najpopularniejsze sposoby zastosowania neuromodulacji w leczeniu chorób układu nerwowego i we wzmacnianiu procesów pamięciowych. Na koniec rozważane są możliwe ujemne strony stosowania długotrwałych terapii neuromodulacyjnych.