

ROLA KOMÓREK MACIERZYSTYCH W PROCESIE ENDOGENNEJ REGENERACJI OŚRODKOWEGO UKŁADU NERWOWEGO NA PRZYKŁADZIE WYBRANYCH SCHORZEŃ NACZYNIOWYCH*

THE ROLE OF STEM CELLS IN THE PROCESS OF ENDOGENIC REGENERATION OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM BASED ON SELECTED VASCULAR DISEASES

Bogusław MACHALIŃSKI¹, Anna MACHALIŃSKA², Edyta PACZKOWSKA¹

¹Zakład Patologii Ogólnej Katedry Fizjopatologii, ²Katedra i Zakład Histologii i Embriologii, Pomorska Akademia Medyczna, Szczecin

Streszczenie: Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) postrzegany jest jako nadrzędny układ w organizmie, który pełni kluczową rolę regulacyjną i decyzyjną na poziomie wieloukładowym i behawioralnym. Rozpowszechnienie schorzeń obejmujących OUN, przy jednoczesnym braku skutecznej terapii, rodzi pytania o możliwość zachowania lub odtworzenia funkcji nerwowych siłami organizmu. Obecność heterogenicznej populacji komórek macierzystych (KM) i progenitorowych w różnych obszarach siatkówki oka i mózgu jest dobrze udokumentowana. Potwierdzono także związek mobilizacji KM ze szpiku kostnego do krwi obwodowej z uszkodzeniem struktur nerwowych. Niedawne odkrycia wykazujące obecność w siatkówce oka oraz mobilizowanej krwi obwodowej bardzo małych, podobnych do embrionalnych komórek o cechach pluripotencjalnych wskazują na teoretycznie nieograniczone potencjalne możliwości naprawcze organizmu. Niemniej jednak, mechanizm działania KM w procesie regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej wymaga dalszych badań.

Słowa kluczowe: ośrodkowy układ nerwowy (OUN), komórki macierzyste (KM), regeneracja, siatkówka oka, szpik kostny, VSEL SCs.

Summary: Central nervous system (CNS) is seen as crucial in the organism and plays critical role in regulation and decision making processes on multisystem and behavioral level. The variety of diseases affecting CNS, and lack of effective therapy raises a question of chance of maintenance or recovery of the nervous function within the organism own forces. The presence of heterogenic population of stem (SCs) and progenitor cells in various regions of the retina and brain is well documented. It has been also proved an association between SC mobilization from bone marrow into peripheral blood with nervous tissue injury. The recent discoveries indicating presence of very small embryonic-like, pluripotential stem cells

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2009-2011 jako projekt badawczy Nr N N402 172137.

within retina and mobilized peripheral blood suggest theoretically unlimited potential for self-repair of the organism. Nevertheless, the mechanism of SC action in the process of self regeneration of damaged nervous tissue remains to be elucidated.

Key words: central nervous system, stem cells, regeneration, retina, bone marrow, VSEL SCs.

WPROWADZENIE

W pełni wykształcony organizm, narząd oraz poszczególne tkanki powstają z komórek macierzystych (KM). KM utrzymują w równowadze kompartmenty komórek somatycznych w organizmie i są odpowiedzialne za procesy odnowy i regeneracji narządów i tkanek w przypadku ich uszkodzenia. Heterogenną populację komórek macierzystych cechuje zdolność do samoodnowy i potencjał do różnicowania w dojrzałe komórki określonych linii rozwojowych. KM dają początek bardziej zróżnicowanym komórkom progenitorowym wykazującym znacznie większą aktywność proliferacyjną, lecz zdecydowanie niższy potencjał do samoodnowy. W populacjach komórek macierzystych widoczna jest hierarchia [22]. W zależności od zdolności do różnicowania w określone spektrum komórek potomnych, różne rodzaje KM można sklasyfikować w kilka subpopulacji, począwszy od totipotencjalnych, zdolnych do utworzenia całego organizmu wraz z tkankami płodu (łożysko, pępowina, owodnia) po KM ukierunkowane tkankowo. Te ostatnie, jak nazwa wskazuje, potrafią odtwarzać komórki w obrębie danej tkanki, np. nabłonkowej, nerwowej, łącznej [23].

Ośrodkowy układ nerwowy (OUN) postrzegany jest jako najważniejszy układ w organizmie, który stanowi o jego istocie i indywidualności, a zarazem pełni kluczową rolę regulacyjną i decyzyjną na poziomie wieloukładowym i behawioralnym. Wszelkie uszkodzenia w obrębie tkanki nerwowej, narządów zmysłów mogą doprowadzić do szczególnie odczuwalnego upośledzenia komfortu życia. Rozpowszechnienie szerokiej gamy schorzeń obejmujących OUN, przy jednoczesnym braku skutecznej terapii, rodzi pytania o możliwość zachowania lub odtworzenia funkcji nerwowych siłami samego organizmu.

KOMÓRKI MACIERZyste W SIATKÓWCE OKA

Siatkówka oka stanowi część centralnego układu nerwowego i zbudowana jest z dwóch warstw: zewnętrznej, utworzonej przez zawierający melaninę nabłonek barwnikowy – RPE (ang. *retinal-pigment epithelium*) oraz wewnętrznej, nerwowej części siatkówki – NR (ang. *neural retina*). RPE stanowi pojedynczą warstwę komórek sześciennych, której integralność odgrywa zasadniczą rolę w zachowaniu funkcji siatkówki i prawidłowym widzeniu. Komórki nabłonka barwnikowego siatkówki podtrzymują funkcje życiowe fotoreceptorów pełniąc rolę w transporcie jonów i składników odżywczych, tworzą barierę krew-siatkówka oraz uczestniczą w absorpcji światła. Odpowiedzialne są także za fagocytozę zewnętrznych segmentów pręcików i czopków, który to proces ma istotne znaczenie dla prawidłowej odnowy błon fotoreceptorów.

Część nerwowa siatkówki złożona jest z różnych typów komórek nerwowych, w tym fotoreceptorów tworzących wysoce zróżnicowane struktury umożliwiające przekaz oraz transformację światła w impulsy elektryczne. Ich stan funkcjonalny zależy zarówno od naczyń krwionośnych, jak i RPE, które pozostają w ścisłej interakcji z fotoreceptorami siatkówki.

W licznych doniesieniach wykazano, iż wiele schorzeń nabytych prowadzących do uszkodzenia siatkówki oka, m.in. zwyrodnienie plamki związane z wiekiem – AMD (ang. *age-related macular degeneration*), jak również chorób wrodzonych, uwarunkowanych genetycznie, np. choroba Stargardta czy zwyrodnienie barwnikowe siatkówki (*retinitis pigmentosa*), związanych jest z dysfunkcją nabłonka barwnikowego siatkówki. Brak skutecznego jak dotąd leczenia tych chorób rodzi potrzebę poszukiwania alternatywnych metod terapii.

Dotychczasowy stan wiedzy wskazuje, iż OUN wraz z siatkówką oka ma bardzo ograniczoną zdolność do samonaprawy, zwłaszcza u osób dorosłych. Z drugiej strony jednak, obecność prymitywnych komórek o cechach komórek macierzystych w obrębie RPE i NR sugeruje, iż obszary te wykazują pewien potencjał do regeneracji. W niezależnie opublikowanych doniesieniach opisano obecność komórek o cechach komórek macierzystych (KM) w siatkówce oka.

Wiele badań wskazuje, iż po urodzeniu obszar obwodowej siatkówki, nabłonek ciała rzęskowego i tęczówki zachowuje potencjał do neurogenezy i zawiera spoczynkową populację multipotencjalnych KM, zdolnych do różnicowania się w komórki nerwowe siatkówki, komórki glejowe, a także komórki nabłonka barwnikowego [27]. Komórki te, izolowane z ludzkich gałek ocznych i hodowane w odpowiednich warunkach *in vitro*, mają zdolność do samoodnawiania się, proliferacji i różnicowania się we wszystkie typy komórek siatkówki [4].

Potencjał do różnicowania się w kierunku komórek nerwowych wykazano także w odniesieniu do komórek izolowanych z nabłonka barwnikowego. Ludzkie linie komórek nabłonka barwnikowego, poddane hodowli w odpowiednich warunkach, wykazują ekspresję antygenów swoistych dla neuronów, jak i zyskują charakterystyczną dla nich morfologię. Znacznie mniejszy potencjał do różnicowania wykazano jednak w przypadku komórek izolowanych z nabłonka barwnikowego osób w wieku starszym w porównaniu z tą samą populacją komórkową pozyskiwaną od osób młodych [1].

Obecność KM i progenitorowych w obszarze części nerwowo-czuciowej siatkówki zarówno u niższych ssaków, jak i u ludzi potwierdzają badania dokumentujące ich potencjał do tworzenia neurosfer, proliferacji i różnicowania w kierunku komórek siatkówki w warunkach *in vitro* [26]. Wykazano ponadto, iż komórki glejowe Müllera, obecne w siatkówce dorosłych osobników, mają cechy komórek progenitorowych [6]. Badania te wnoszą nowe spojrzenie na procesy odnowy komórek nerwowych w siatkówce i wskazują na istnienie potencjalnych mechanizmów umożliwiających jej regenerację [22].

Jak wynika z powyższego, obecność tkankowo-ukierunkowanych KM i progenitorowych w różnych obszarach oka jest dobrze udokumentowana, niemniej jednak ich rzeczywisty udział w procesie regeneracji uszkodzonej tkanki siatkówki wymaga dalszych badań.

KOMÓRKI MACIERZyste SZPIKU KOSTNEGO W REGENERACJI USZKODZONEJ SIATKÓWKI

W ostatnich latach pojawiły się liczne doniesienia opisujące szeroki potencjał KM szpiku kostnego (SK) do odbudowy uszkodzonych tkanek i narządów. W tym nurcie podjęto również ekstensywne badania nad wykorzystaniem KM SK w regeneracji nabłonka barwnikowego siatkówki. Zastosowanie jodanu sodu (NaIO_3), który po dożylniej iniekcji selektywnie uszkadza RPE, pozwoliło skonstruować użyteczny model badawczy m.in. do oceny endogennych mechanizmów naprawczych nabłonka barwnikowego siatkówki. Wykazano, iż uszkodzony jodanem sodu RPE wydziela wiele chemokin i czynników wzrostu, m.in. czynnik pochodzenia podścieliskowego 1 – SDF-1 (ang. *stromal derived factor 1*), czynnik wzrostu hepatocytów – HGF (ang. *hepatocyte growth factor*), czynnik hamujący białaczkę – LIF (ang. *leukemia inhibitory factor*) czy składową C3 dopełniacza [20]. Cząsteczki te odgrywają kluczową rolę w regulacji migracji i wszczepiania/zasiedlania komórek macierzystych w miejscu uszkodzenia, co potwierdzono w licznych testach chemotaktycznych przeprowadzonych w warunkach *in vitro*. Li Y et al. opisał komórki izolowane z mysiego SK, wykazujące ekspresję wczesnych markerów siatkówkowych (MITF, Pax-6, Otx, Six-3), które migrowały w kierunku nadsącza pochodzącego z uszkodzonego RPE. Wyniki tego eksperymentu jednoznacznie sugerują, iż tkankowo-ukierunkowane KM i progenitorowe siatkówki obecne są w SK dorosłych osobników i mogą być przyciągane przez uszkodzony nabłonek barwnikowy siatkówki.

W celach terapeutycznych wykorzystywana jest niekiedy możliwość sztucznego zwiększenia puli krążących KM we krwi obwodowej za pomocą farmakologicznych środków indukujących mobilizację (np. G-CSF, cyklofosfamid, etc.) [5,38]. W niedawno opublikowanych badaniach wykazano, iż tak wywołany proces mobilizacji komórek SK do krwi obwodowej, połączony z jednoczasowym uszkodzeniem RPE, prowadził do zasiedlenia przestrzeni podsiatkówkowej przez komórki szpikowe mające ekspresję liniowych markerów typowych dla nabłonka barwnikowego siatkówki. Mechanizm odpowiedzialny za protekcję uszkodzonej siatkówki oka przy udziale komórek SK nie został jednak do tej pory precyzyjnie wyjaśniony [11].

Pula komórek SK rekrutowana do uszkodzonej siatkówki oka zawiera oprócz KM również pewne spektrum komórek progenitorowych zdolnych do różnicowania się m.in. w komórki mikrogleju. W mysim modelu wrodzonego zwyrodnienia barwnikowego siatkówki, którego istota polega na stopniowej degeneracji pręcików, opisano, iż komórki pochodzące ze szpiku kostnego rekrutowane były do zmienionej siatkówki oka, w obrębie której różnicowały się następnie w komórki mikrogleju. Promowało to z kolei istotnie dłuższe przeżycie pręcików [35]. Efekt ten tłumaczy hipoteza wskazująca, że komórki mikrogleju mogą syntetyzować i wydzielać czynniki neurotroficzne odpowiedzialne za protekcję istniejących i wciąż funkcjonujących komórek pręcikonosnych. Wykazano ponadto, iż podawanie czynnika wzrostu granulocytów – G-CSF (ang. *granulocyte-colony stimulating factor*), czy erytropoetyny oraz następcza mobilizacja KM i progenitorowych ze szpiku do krwi obwodowej prowadzi do istotnego

spowolnienia procesu zwyrodnieniowego siatkówki [35]. Opisane doświadczenia pośrednio dowodzą obecności patofizjologicznych mechanizmów endogennej regeneracji, które ulegają uruchomieniu w warunkach uszkodzenia tkanki nerwowej.

KOMÓRKI MACIERZyste A NEOWASKULARYZACJA

Większość schorzeń narządu wzroku prowadzących do utraty widzenia związana jest z nieprawidłowym tworzeniem naczyń krwionośnych zarówno w obrębie siatkówki, jak i naczyniówki w odpowiedzi na epizody niedokrwienne. Do najczęstszych chorób objawiających się patologiczną neowaskularyzacją zalicza się zwyrodnienie plamki związane z wiekiem, retinopatię cukrzycową, zakrzepicę żył siatkówki oraz retinopatię wcześniaczą – ROP (ang. *retinopathy of prematurity*). W licznych modelach doświadczalnych wykazano udział krążących progenitorów śródbłonkowych – EPC (ang. *endothelial progenitor cells*) w procesie patologicznego nowotworstwa naczyniowego na skutek uszkodzenia siatkówki. Wyniki tych badań podważyły tradycyjny paradygmat angiogenezy, zgodnie z którym elementy morfotyczne dla nowotworzenia naczyń pochodzić mogą jedynie z komórek obecnych w ścianach istniejącej sieci naczyń krwionośnych.

W wywołanej w eksperymentalnym modelu zwierzęcym neowaskularyzacji naczyniówkowej KM mobilizowane ze szpiku są zdolne do różnicowania w komórki śródbłonkowe, astrocyty, komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych oraz nabłonka barwnikowego siatkówki [3,9,10]. Stwierdzono również, że nie tylko endogenne EPC biorą aktywny udział w procesach nowotworzenia naczyń, ale także progenitory pochodzenia egzogenego podawane doszklitkowo w przeprowadzonych dotychczas próbach terapii komórkowej [28].

Retinopatia wcześniacza charakteryzuje się zaburzeniem fizjologicznego rozwoju unaczynienia siatkówki, co może w następstwie doprowadzić do uszkodzenia tej tkanki w postaci wtórnej proliferacji naczyń na tle niedokrwinnym. W przeprowadzonych przez nasz zespół badaniach stwierdzono istotny wzrost populacji komórek o fenotypie $CD34^+CD133^+CD144^+$, definiowanych jako wczesne progenitory śródbłonkowe, [32] u przedwcześnie urodzonych dzieci w szczególności ze zdiagnozowaną retinopatią wcześniaczą. Odnotowano ponadto, iż zwiększonej koncentracji EPC towarzyszył istotny wzrost stężeń VEGF (ang. *vascular endothelial growth factor*) i HGF w surowicy [manuskrypt w przygotowaniu]. Wyniki te sugerują, że sygnały generowane przez niedokrwioną siatkówkę w postaci wydzielanych do krążenia czynników wzrostu mogą stymulować mobilizację EPC ze szpiku do krwi obwodowej, a następnie nakierowywać je do ognisk niedokrwienia. Podobne zjawisko zostało opisane przez inną grupę badawczą w odniesieniu do pacjentów z retinopatią cukrzycową w fazie proliferacyjnej, u których stwierdzono podwyższoną koncentrację komórek wykazujących ekspresję markerów charakterystycznych dla EPC w krwi obwodowej [2,19].

Zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za formowanie nowych naczyń i dokładne poznanie wszystkich czynników regulacyjnych zaangażowanych w ten proces może doprowadzić do skutecznego powstrzymania lub co najmniej kontrolowania patologicznej neowaskularyzacji. Szczególnie istotne wydaje się rozpoznanie roli i skali zjawiska endogennej odpowiedzi regeneracyjnej zależnego od reakcji szpikowych komórek macierzystych i progenitorowych.

POTENCJALNA ROLA KOMÓREK O FENOTYPIE ZBLIŻONYM DO VSEL W PREWENCJI ROP

Wyodrębnienie w szpiku dorosłych myszy populacji bardzo małych podobnych do embrionalnych komórek macierzystych – VSEL SCs (ang. *very small embryonic-like stem cells*) o cechach komórek pluripotencjalnych, zdolnych do różnicowania w dojrzałe komórki pochodzące z trzech listków zarodkowych, okazało się być pionierskim odkryciem ostatnich lat [18]. Wskazuje się, że VSEL SCs mogą być pochodnymi komórek epiblastu, które podczas embriogenezy deponowane są w rozwijających się narządach [34]. Można je stosunkowo łatwo izolować ze szpiku kostnego młodych osobników, jednak ich liczba zmniejsza się wraz z wiekiem. Wykazują ekspresję embrionalnych/pluripotencjalnych czynników transkrypcyjnych, takich jak: Oct-4, Nanog oraz Rex-1. W hodowlach komórkowych dają początek neurosferom, z których powstają następnie linie komórek o fenotypie charakterystycznym dla wczesnych komórek nerwowych: β -III-tubulin⁺Nestin⁺Oct-4⁺MBP⁺ (ang. *major basic protein*). VSEL SCs ulegają ponadto indukowanej stresem lub za pomocą G-CSF mobilizacji do krwi obwodowej, skąd mogą migrować w kierunku gradientu stężeń czynników chemotaktycznych (SDF-1, HGF i in.) uwalnianych przez uszkodzone tkanki [18]. Komórki o fenotypie VSEL SCs zidentyfikowano m.in. w siatkówce oka u dorosłych myszy. Stanowią one ok. 0,4% wszystkich komórek nabłonka barwnikowego i 0,06% komórek części nerwowej siatkówki [21,24].

Od chwili opisanego VSEL SCs przez zespół prof. Ratajczaka, obecność analogicznych komórek wykazano także u ludzi w różnych narządach (m.in. w szpiku kostnym, sercu) oraz w ludzkiej krwi pępowinowej, w którym to odkryciu aktywnie partycypowała nasza grupa badawcza [15]. Obserwacje naszego zespołu wskazują, iż komórki zbliżone fenotypowo do VSEL SCs mogą odgrywać ważną rolę w rozwoju, różnicowaniu oraz dojrzewaniu narządów/tkanek płodu i noworodka. Proces ten obejmuje również rozwijającą się siatkówkę oka we wczesnych etapach wzrostu człowieka. Hipoteza nasza poparta jest wynikami badań, w których zaobserwowano znacząco większe stężenia komórek o fenotypie Oct-4⁺lin⁻CXCR4⁺CD45⁻ u przedwcześnie urodzonych dzieci w porównaniu z dziećmi urodzonymi w terminie z prawidłową masą ciała. Odnotowano także istotnie niższą ekspresję markerów pluripotencjalnych (Oct-4) oraz wczesnych nerwowych na poziomie mRNA u dzieci przedwcześnie urodzonych z rozwiniętą retinopatią wcześniaczą w porównaniu z wcześniakami bez ROP. Na tej podstawie wysunęliśmy hipotezę, iż przedwcześnie

urodzone dzieci, mające pewną krytyczną koncentrację krążących prymitywnych KM o pochodzeniu i charakterystyce nerwowej, mogą być lepiej chronione przed ewentualnością rozwoju ROP oraz być może także innych powikłań wcześniaczych, zwłaszcza związanych z zaburzeniami rozwoju układu nerwowego, obserwowanymi często u przedwcześnie urodzonych dzieci. Nasze obserwacje sugerują, iż prawidłowy wzrost i rozwój niedojrzałych tkanek i narządów, nie wyłączając siatkówki oka, wymaga znaczącego udziału krążących KM. Pełne wyjaśnienie mechanizmu takiego udziału w procesie dojrzewania siatkówki wymaga jednak dalszych perspektywnych badań.

KOMÓRKI MACIERZyste SZPIKU KOSTNEGO W REGENERACJI OUN U PACJENTÓW Z UDAREM NIEDOKRWIENNYM MÓZGU

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy, nerwowe tkankowo-ukierunkowane KM zlokalizowane są w ośrodkowym układzie nerwowym, oprócz siatkówki oka, głównie w wyściółce oraz nabłonku węchowym, jednak proces samoistnej regeneracji uszkodzonej tkanki nerwowej z ich udziałem uważa się za względnie ograniczony. Wykazano, iż neurogeneza zachodzi przede wszystkim w zakręcie zębatym hipokampa – DG (ang. *dentate gyrus*) oraz strefie przykomorowej komór bocznych mózgu – SVZ (ang. *subventricular zone*) [8]. Dane z doświadczeń na zwierzętach wskazują, że nowopowstałe neurony mogą w niewielkim stopniu migrować do miejsca uszkodzenia w obrębie tkanki nerwowej i uczestniczyć w jej endogennej regeneracji. W przebiegu ostrego lub podostrego uszkodzenia tkanki nerwowej w obrębie OUN dochodzi zatem do patofizjologicznego „uruchomienia” w mechanizmie chemotaksji zdeponowanej puli KM w celach regeneracyjnych [13, 16].

Względnie częstym powikłaniem obserwowanym u dzieci przedwcześnie urodzonych z niską masą ciała oraz dzieci z obciążonym wywiadem okołoporodowym jest encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna (ENN). Główną przyczyną niedotlenienia jest w tym przypadku zmniejszone ciśnienie parcjalne tlenu we krwi prowadzące do jego niedoboru w tkankach. Niedokrwienie może być spowodowane natomiast zmniejszoną perfuzją tkanek w wyniku hipowolemii lub zwiększonej pojemności łożyska naczyniowego [37]. U wcześniaków z niską masą ciała objętość krwi obwodowej traconej bezpowrotnie z łożyskiem i pępowiną jest szczególnie duża i może sięgać ponad 50% całej krążącej krwi przed urodzeniem dziecka. Taka nagła utrata części krwi wraz z krążącymi komórkami macierzystymi może prowadzić do niekorzystnych następstw klinicznych. U dzieci, u których objawy niedokrwienia trwały nie dłużej niż pięć dni, można spodziewać się jednak pomyślnego rokowania [37]. Ewentualna rola, jaką mogłyby w procesie regeneracji odgrywać mobilizowane ze szpiku kostnego KM, wymaga jednak przeprowadzenia pogłębionych analiz.

Obserwacja dotycząca efektywniejszej naprawy uszkodzonych struktur u noworodków lub małych dzieci w porównaniu do ludzi w podeszłym wieku mogłaby

przemawiać za wyczerpywaniem się potencjału regeneracyjnego organizmu na skutek starzenia i zmniejszania się populacji KM. Niemniej jednak, u pacjentów w starszym wieku z udarem niedokrwiennym mózgu widoczna jest zazwyczaj znaczna poprawa stanu klinicznego nawet bez istotnej interwencji terapeutycznej. Nie można do końca wykluczyć, iż może to świadczyć także m.in. o wciąż zachodzącej neurogenezie u ludzi w wieku podeszłym.

W badaniach, w których uczestniczył nasz zespół, wykazaliśmy znaczący wzrost stężenia komórek o fenotypie CD34⁺ w krwi obwodowej dorosłych pacjentów we wczesnej fazie udaru niedokrwiennego mózgu – IS (ang. *ischemic stroke*) wraz z towarzyszącym zwiększeniem liczby klonogennych GM-CFU (ang. *granulocyte-macrophage colony-forming unit*) oraz BFU-E (ang. *erythrocyte burst-forming unit*) [30]. Liczba progenitorów CD34⁺ wzrastała już w ciągu 24 h po przebytych IS osiągając szczyt w 6. dobie [25]. Wyniki tych badań potwierdzone zostały przez Dunaca i wsp., którzy ocenili, iż mobilizacja komórek CD34⁺ u pacjentów w ostrej fazie IS jest porównywalna do wyników mobilizacji wzbudzonej farmako-logicznie [7].

Kucia i wsp. opisali, iż szpik kostny myszy zawiera pulę komórek wykazujących ekspresję wczesnych liniowych markerów nerwowych (beta-III-tubulin, Nestin, NeuN), tworzących neurosfery w hodowli *in vitro* [16], które mogą podlegać mobilizacji w eksperymentalnym modelu udaru niedokrwiennego mózgu [18]. Było to pierwsze doniesienie dokumentujące, że szpik kostny dorosłych myszy zawiera populację niehematopoetycznych, tkankowo-ukierunkowanych KM mającą markery typowe dla neurogenezy. Niedawno ten sam zespół zidentyfikował i wyizolował na poziomie pojedynczej komórki w szpiku dorosłych myszy pluripotencjalne VSEL SCs [17]. Wykazano, iż VSEL SCs podlegają mobilizacji zarówno po zastosowaniu G-CSF, jak i w sytuacji toksycznego uszkodzenia wątroby i mięśni szkieletowych [33].

Badania, w których brała udział nasza grupa badawcza, wykazały, iż liczba krążących we krwi obwodowej KM, mających ekspresję markerów pluripotencjalnych, jak również nerwowo-specyficznych, istotnie wzrasta u chorych we wczesnej fazie udaru niedokrwiennego mózgu. W wyniku szczegółowej analizy, u tych pacjentów stwierdzono znaczący wzrost stężenia krążących małych VSEL SCs o fenotypie CD45⁻lin⁻CXCR4⁺, z jednoczesną zwiększoną ekspresją na poziomie mRNA markerów pluripotencjalnych (Oct4, Nanog) oraz wczesnych nerwowych (Nestin, beta-III-tubulin, Olig1, Olig2, Sox2, Musashi-1) we krwi obwodowej. Koncentracja VSEL SCs zwiększała się w ciągu 24 h od wystąpienia objawów niedokrwienia mózgu osiągając maximum w 3. dobie i ulegając stopniowo zmniejszeniu w dobie 7. Kinytyce zmian stężenia KM towarzyszył podobny wzorzec podwyższonych stężeń SDF-1 w surowicy u tych chorych [29].

Jung i wsp. w swoich badaniach opisali rosnącą subpopulację komórek o fenotypie nerwowym w hodowli długoterminowej komórek jednojądrzastych krwi obwodowej [12]. Wyodrębnił ponadto w testach hodowlanych, oprócz komórek nerwowych, również śródblonkowe, zgodnie z charakterystyką morfologiczną oraz profilem ekspresji genów na poziomie mRNA i białka. Zdecydowanie największy wzrost tych populacji komórkowych odnotował w krwi pacjentów z IS porównywanych z grupą pacjentów obciążonych jedynie czynnikami ryzyka i osobami zdrowymi.

Wykazano, iż wielkość mobilizowanej puli komórek CD34 pozytywnych we wczesnej fazie IS koreluje z lepszą i szybszą rehabilitacją pacjentów w trakcie rekonwalescencji [7]. W badaniach przeprowadzonych przez Taguchi i wsp. stwierdzono zależność pomiędzy liczbą krążących komórek CD34⁺ u pacjentów we wczesnej fazie IS a stanem naczyniowo-mózgowym ocenianym za pomocą emisyjnej, pozytronowej tomografii obrazowej [39]. Sobrino i wsp. zaobserwowali, iż mobilizacja EPC w odpowiedzi na IS związana była z lepszą poprawą kliniczną pacjentów i ograniczeniem obszaru niedokrwienia [36]. Wyniki te potwierdzone zostały przez Yip i wsp. przez ocenę stężenia krążących EPC 48 h od wystąpienia epizodu IS. Wykazano, że zwiększona koncentracja EPC we wczesnej fazie IS może być traktowana jako niezależny czynnik prognostyczny poprawy klinicznej pacjentów. Z drugiej strony, obniżony poziom EPC w krwi obwodowej pacjentów ze świeżym udarem niedokrwinnym stanowić może niezależną prognozę niekorzystnego rokowania odnośnie ich stanu neurologicznego [40]. Pozytywną korelację pomiędzy rozległością IS a liczbą mobilizowanych VSEL SCs potwierdziliśmy w naszych badaniach [29].

Warto zasygnalizować, iż liczne ośrodki badawcze i kliniczne oceniają efekty farmakologicznej mobilizacji KM we wczesnej i późnej fazie IS. Wstępne dane sugerują, że podawanie G-CSF czy SCF (ang. *stem cell factor*) jest względnie dobrze tolerowane przez pacjentów, aczkolwiek u osób nadwrażliwych na działanie cytokin i czynników wzrostu odnotowano przypadki mieloproliferacji. Wyniki wskazują na udział mobilizowanych w ten sposób komórek szpikowych w procesach angiogenezy i neurogenezy [13,14,31].

Pomimo uwidocznienia ewidentnego związku mobilizacji KM pluripotencjalnych, tkankowo-ukierunkowanych i komórek progenitorowych z wczesną fazą udaru niedokrwinnego mózgu i przebiegiem klinicznym, ich bezpośredni udział w naprawie uszkodzonych struktur mózgowia wymaga dalszych badań.

PODSUMOWANIE

Precyzyjne ustalenie fenotypów subpopulacji KM bezpośrednio uczestniczących w tworzeniu naczyń krwionośnych, a zwłaszcza struktur nerwowych siatkówki i innych obszarów OUN mogłoby przyczynić się nie tylko do lepszego poznania mechanizmu procesu endogennej regeneracji, ale umożliwiłoby dynamiczny rozwój strategii wzmacniania efektywnej odpowiedzi naprawczej organizmu. Zgromadzona dotychczas wiedza i nowe odkrycia w obszarze fizjopatologii progenitorów endotelialnych, KM tkankowo-ukierunkowanych, a szczególnie pluripotencjalnych VSEL SCs skłaniają do optymizmu i nadziei, iż w przewidywalnej przyszłości wypracowany zostanie skuteczny model terapeutyczny oparty na wykorzystaniu potencjału regeneracyjnego KM pochodzących z rezerwarów tkankowych pacjenta w leczeniu wielu schorzeń naczyniowych i degeneracyjnych narządu wzroku i innych struktur OUN.

PIŚMIENNICTWO

- [1] AMEMIYA K, HARUTA M, TAKAHASHI M, KOSAKA M, EGUCHI G. Adult human retinal pigment epithelial cells capable of differentiating into neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **316**: 1–5.
- [2] BRUNNER S, SCHERNTHANER GH, SATLER M, ELHENICKY M, HOELLERL F, SCHMID-KUBISTA KE, ZEILER F, BINDER S, SCHERNTHANER G. Correlation of different circulating endothelial progenitor cells to stages of diabetic retinopathy: first *in vivo* data. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 392–398.
- [3] CHAN-LING T, BAXTER L, AFZALA, SENGUPTA N, CABALLERO S, ROSINOVA E, GRANT MB. Hematopoietic stem cells provide repair functions after laser-induced Bruch's membrane rupture model of choroidal neovascularization. *Am J Pathol* 2006; **168**: 1031–1044.
- [4] COLES BL, ANGÉNIEUX B, INOUE T, DEL RIO-TSONIS K, SPENCE JR, MCINNES RR, ARSENIJEVIC Y, VAN DER KOOY D. Facile isolation and the characterization of human retinal stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 15772–15777.
- [5] COTTLER-FOX MH, LAPIDOT T, PETIT I, KOLLET O, DIPERSIO JF, LINK D, DEVINE S. Stem cell mobilization. *Hematology* 2003: 419–437.
- [6] DAS AV, MALLYA KB, ZHAO X, AHMAD F, BHATTACHARYA S, THORESON WB, HEGDE GV, AHMAD I. Neural stem cell properties of Müller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 2006; **299**: 283–302.
- [7] DUNAC A, FRELIN C, POPOLO-BLONDEAU M, CHATEL M, MAHAGNE MH, PHILIP PJ. Neurological and functional recovery in human stroke are associated with peripheral blood CD34⁺ cell mobilization. *J Neurol* 2007; **254**: 327–332.
- [8] ERIKSSON PS, PERFILIEVA E, BJÖRK-ERIKSSON T, ALBORN AM, NORDBORG C, PETERSON DA, GAGE FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; **4**: 1313–1317.
- [9] ESPINOSA-HEIDMANN DG, CAICEDO A, HERNANDEZ EP, CSAKY KG, COUSINS SW. Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; **44**: 4914–4919.
- [10] ESPINOSA-HEIDMANN DG, REINOSO MA, PINA Y, CSAKY KG, CAICEDO A, COUSINS SW. Quantitative enumeration of vascular smooth muscle cells and endothelial cells derived from bone marrow precursors in experimental choroidal neovascularization. *Exp Eye Res* 2005; **80**: 369–378.
- [11] HARRIS JR, BROWN GA, JORGENSEN M, KAUSHAL S, ELLIS EA, GRANT MB, SCOTT EW. Bone marrow-derived cells home to and regenerate retinal pigment epithelium after injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 2108–2113.
- [12] JUNG KH, CHU K, LEE ST, SONG EC, SINN DI, KIM JM, KIM SJ, KIM JH, KANG KM, PARK HK, LEE SH, KIM M, LEE SK, ROH JK. Identification of neuronal outgrowth cells from peripheral blood of stroke patients. *Ann Neurol* 2008; **63**: 312–322.
- [13] KAWADA H, TAKIZAWA S, TAKANASHI T, MORITA Y, FUJITA J, FUKUDA K, TAKAGI S, OKANO H, ANDO K, HOTTA T. Administration of hematopoietic cytokines in the subacute phase after cerebral infarction is effective for functional recovery facilitating proliferation of intrinsic neural stem/progenitor cells and transition of bone marrow-derived neuronal cells. *Circulation* 2006; **113**: 701–710.
- [14] KLOCKE R, KUHLMANN MT, SCOBIOALA S, SCHÄBITZ WR, NIKOL S. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for cardio- and cerebrovascular regenerative applications. *Curr Med Chem* 2008; **15**: 968–977.
- [15] KUCIA M, HALASA M, WYSOCZYŃSKI M, BASKIEWICZ-MASIUK M, MOLDENHAWER S, ZUBA-SURMA E, CZAJKAR, WOJAKOWSKI W, MACHALINSKI B, RATAJCZAK MZ. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4(+) SSEA-4(+) Oct-4(+) very small embryonic-like cells purified from human cord blood – preliminary report. *Leukemia* 2007; **21**: 297–303.
- [16] KUCIA M, RATAJCZAK J, RECA R, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK MZ. Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood Cells Mol Dis* 2004; **32**: 52–57.
- [17] KUCIA M, RECA R, CAMPBELL FR, ZUBA-SURMA E, MAJKA M, RATAJCZAK J, RATAJCZAK MZ. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4⁺ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; **20**: 857–869.

- [18] KUCIA M, ZHANG YP, RECA R, WYSOCZYNSKI M, MACHALINSKI B, MAJKA M, ILDSTAD ST, RATAJCZAK J, SHIELDS CB, RATAJCZAK MZ. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. *Leukemia* 2006; **20**: 18–28.
- [19] LEE IG, CHAE SL, KIM JC. Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Eye* 2006; **20**: 546–552.
- [20] LI Y, RECA R G, ATMACA-SONMEZ P, RATAJCZAK MZ, ILDSTAD ST, KAPLAN HJ, ENZMANN V. Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 1646–1652.
- [21] LIU Y, GAO L, ZUBA-SURMA EK, PENG X, KUCIA M, RATAJCZAK MZ, WANG W, ENZMAN V, KAPLAN HJ, DEAN DC. Identification of small Sca-1(+), Lin(-), CD45(-) multipotential cells in the neonatal murine retina. *Exp Hematol* 2009; **37**: 1096–1107.
- [22] MACHALIŃSKA A, BAUMERT B, KUPRANOWICZ L, WISZNIEWSKA B, KARCZEWICZ D, MACHALIŃSKI B. Potential application of adult stem cells in retinal repair – challenge for regenerative medicine. *Curr Eye Res* 2009; **34**: 748–760.
- [23] MACHALIŃSKA A, KARCZEWICZ D, MACHALIŃSKI B. Komórki macierzyste – nowe perspektywy w leczeniu chorób siatkówki. *Klinika Oczna* 2006; **108**: 471–474.
- [24] MACHALIŃSKA A, ZUBA-SURMA E. Komórki macierzyste siatkówki oka – istniejący stan badań, perspektywy terapeutyczne. *Klinika Oczna* 2009; **111**: 253–257.
- [25] MACHALIŃSKI B, PACZKOWSKA E, KOZIARSKA D, RATAJCZAK MZ. Mobilization of human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34⁺ cells into peripheral blood during stress related to ischemic stroke. *Folia Histochem Cytobiol* 2006; **44**: 97–101.
- [26] MAYER EJ, CARTER DA, REN Y, HUGHES EH, RICE CM, HALFPENNY CA, SCOLDING NJ, DICK AD. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol* 2005; **89**: 102–106.
- [27] MOSHIRI A, CLOSE J, REH TA. Retinal stem cells and regeneration. *Int J Dev Biol* 2004; **48**: 1003–1014.
- [28] OTANI A, KINDER K, EWALT K, OTERO FJ, SCHIMMEL P, FRIEDLANDER M. Bone marrow-derived stem cells target retinal astrocytes and can promote or inhibit retinal angiogenesis. *Nat Med* 2002; **8**: 1004–1010.
- [29] PACZKOWSKA E, KUCIA M, KOZIARSKA D, HAŁASA M, SAFRANOW K, MASIUK M, KARBICKA A, NOWIK M, NOWACKI P, RATAJCZAK MZ, MACHALIŃSKI B. Clinical evidence that very small embryonic-like (VSEL) stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke* 2009; **40**: 1237–1244.
- [30] PACZKOWSKA E, LARYSZ B, RZEUSKI R, KARBICKA A, JAŁOWIŃSKI R, KORNACEWICZ-JACH Z, RATAJCZAK MZ, MACHALIŃSKI B. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34(+) cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction. *Eur J Haematol* 2005; **75**: 461–467.
- [31] PIAO CS, GONZALEZ-TOLEDO ME, XUE YQ, DUAN WM, TERA O S, GRANGER DN, KELLEY RE, ZHAO LR. The role of stem cell factor and granulocyte-colony stimulating factor in brain repair during chronic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; **29**: 759–770.
- [32] RAFII S, LYDEN D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003; **9**: 702–712.
- [33] RATAJCZAK MZ, KUCIA M, RECA R, MAJKA M, JANOWSKA-WIECZOREK A, RATAJCZAK J. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia* 2004; **18**: 29–40.
- [34] RATAJCZAK MZ, MACHALINSKI B, WOJAKOWSKI W, RATAJCZAK J, KUCIA M. A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 2007; **21**: 860–867.
- [35] SASAHARA M, OTANI A, OISHI A, KOJIMA H, YODOI Y, KAMEDA T, NAKAMURA H, YOSHIMURA N. Activation of bone marrow-derived microglia promotes photoreceptor survival in inherited retinal degeneration. *Am J Pathol* 2008; **172**: 1693–1703.
- [36] SOBRINO T, HURTADO O, MORO MA, RODRÍGUEZ-YÁÑEZ M, CASTELLANOS M, BREA D, MOLDES O, BLANCO M, ARENILLAS JF, LEIRA R, DÁVALOS A, LIZASOAIN I, CASTILLO J. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 2007; **38**: 2759–2764.
- [37] SZEJNIAK W, SZYMANKIEWICZ M. Encefalopatia niedotlenieniowo-niedokrwienna u noworodków. *Perinatol Neonatol Ginekol* 2008; **1**: 85–93.

- [38] SZUMILAS P, BARCEW K, BASKIEWICZ-MASIUK M, WISZNIEWSKA B, RATAJCZAK MZ, MACHALIŃSKI B. Effect of stem cells mobilization with cyclophosphamide and G-CSF on morphology of hematopoietic organs in mice. *Cell Proliferation* 2005, **38**: 47–61.
- [39] TAGUCHI A, MATSUYAMA T, MORIWAKI H, HAYASHI T, HAYASHIDA K, NAGATSUKA K, TODO K, MORI K, STERN DM, SOMA T, NARITOMI H. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004; **109**: 2972–2975.
- [40] YIP HK, CHANG LT, CHANG WN, LU CH, LIOU CW, LAN MY, LIU JS, YOUSSEF AA, CHANG HW. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke* 2008; **39**: 69–74.

Bogusław Machaliński
Zakład Patologii Ogólnej Katedry Fizjopatologii
Pomorska Akademia Medyczna
Al. Powstańców Wlkp. 72, 70-111 Szczecin
e-mail: machalin@sci.pam.szczecin.pl