

**UNIwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum  
Wydział Ochrony Zdrowia**

**Szymon Pasiut**

**BADANIE PROCESU GOJENIA USZKODZONEJ KORY MÓZGOWEJ  
PO IMPLANTACJI KOMÓREK STROMALNYCH**

*Praca doktorska*

**Promotor: Prof. dr hab. Jolanta Jaworek**

**Pracę wykonano w Katedrze Rehabilitacji Klinicznej  
na Wydziale Rehabilitacji Ruchowej AWF,  
oraz w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej w Katedrze  
Fizjologii Zwierząt Instytutu Zoologii UJ**

**Kierownik Katedry Rehabilitacji Klinicznej WRR AWF  
Dr hab. Anna Marchewka**

**Kierownik Zakładu Hematologii Eksperymentalnej IZ UJ  
Prof. dr hab. Zbigniew Dąbrowski**

**Kraków, 2007**

***Pamięci prof. dr hab. Krzysztofa Spodaryka,  
pierwszego Promotora mojej pracy doktorskiej...***

***Pani prof. dr hab. Jolancie Jaworek,  
Promotorowi mojej pracy doktorskiej,  
za opiekę naukową, życzliwość oraz za  
cenne wskazówki podczas powstawania pracy***

***Panu prof. dr hab. Zbigniewowi Dąbrowskiemu,  
za pomoc i wyrozumiałość w trakcie realizacji badań***

***Składam serdeczne podziękowania***

## **Spis treści:**

<b>1. Wstęp</b>	<b>str.1</b>
<b>1.1 Ośrodkowy układ nerwowy</b>	<b>str.1</b>
Kresomózgowie	str.2
Kora mózgowa	str.3
Mózdzek	str.7
Międzymózgowie i podwzgórze	str.8
Śródmózgowie i most	str.10
Twór siatkowaty	str.10
Rdzeń przedłużony	str.11
<b>1.2 Tkanka glejowa ośrodkowego układu nerwowego</b>	<b>str.13</b>
Astrocyty	str.13
Oligodendrocyty	str.16
Ependymocyty	str.17
Mikroglej	str.18
<b>1.3 Uszkodzenie tkanki mózgowej</b>	<b>str.20</b>
<b>1.4 Komórki podścieliska szpikowego</b>	<b>str.23</b>
<b>1.5 Możliwości różnicowania komórek macierzystych szpiku</b>	<b>str.27</b>
<b>2. Cel pracy</b>	<b>str.30</b>
<b>3. Materiał i metodyka przeprowadzonych badań</b>	<b>str.31</b>
<b>3.1 Specyfikacja aparatury laboratoryjnej, narzędzi, odczynników i substancji chemicznych używanych do przeprowadzenia badań</b>	<b>str.31</b>
Aparatura i narzędzia	str.31
Odczynniki i substancje chemiczne	str.31

<b>3.2</b>	<b>Zakładanie hodowli komórkowej</b>	<b>str.32</b>
<b>3.3</b>	<b>Zwierzęta doświadczalne</b>	<b>str.35</b>
<b>3.4</b>	<b>Wykonanie uszkodzenia kory mózgowej i domózgowe podanie komórek stromalnych</b>	<b>str.37</b>
<b>3.5</b>	<b>Pobieranie tkanki mózgowej do badań</b>	<b>str.38</b>
<b>3.6</b>	<b>Badania tkanki mózgowej</b>	<b>str.38</b>
	Barwienie histologiczne	<b>str.38</b>
	Barwienie immunocytochemiczne na obecność astrocytów	<b>str.39</b>
	Barwienie histochemiczne na obecność makrofagów/mikrogleju	<b>str.40</b>
	Barwienie na obecność bromodeoksyurydyny (BrdU)	<b>str.40</b>
<b>3.7</b>	<b>Badanie mikroskopowe</b>	<b>str.41</b>
<b>3.8</b>	<b>Analiza statystyczna</b>	<b>str.41</b>
<b>4.</b>	<b>Opis wyników badań</b>	<b>str.43</b>
<b>4.1</b>	<b>Drugi dzień po urazie</b>	<b>str.43</b>
<b>4.2</b>	<b>Siódmy dzień po urazie</b>	<b>str.51</b>
<b>4.3</b>	<b>Czternasty dzień po urazie</b>	<b>str.58</b>
<b>4.4</b>	<b>Astrocyty</b>	<b>str.66</b>
<b>4.5</b>	<b>Makrofagi</b>	<b>str.68</b>
<b>4.6</b>	<b>Mikroglej</b>	<b>str.70</b>
<b>5.</b>	<b>Dyskusja</b>	<b>str.72</b>
<b>6.</b>	<b>Wnioski</b>	<b>str.85</b>
<b>7.</b>	<b>Streszczenie</b>	<b>str.86</b>
<b>8.</b>	<b>Summary</b>	<b>str.90</b>
<b>9.</b>	<b>Literatura</b>	<b>str.93</b>

## **1. Wstęp**

### **1.1 Ośrodkowy układ nerwowy**

Ośrodkowy układ nerwowy składa się z mózgowia i rdzenia kręgowego zlokalizowanych w jamie czaszki i kanale rdzenia kręgowego.

Mózgowie wypełniające jamę czaszkową jest otoczone trzema oponami mózgowymi: twardą, przylegającą do kości, następnie - pajęczą i miękką leżącą na powierzchni mózgowia. W oponie twardej znajdują się zamknięte przestrzenie zwane zatokami opony twardej, którymi płynie krew pochodząca z mózgowych naczyń żylnych. Pomiędzy oponą pajęczą i oponą miękką znajduje się jama podpajęczynówkowa tworząca zbiorniki wypełnione płynem rdzeniowo-mózgowym. Stanowią one część systemu krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego mózgowia, w układ którego oprócz jamy podpajęczynówkowej, wchodzi także wewnętrzne śródmózgowe komory: dwie obszerne komory boczne, komora trzecia i komora czwarta, oraz kanały je łączące. Wewnątrzmożgowe przestrzenie płynowe mają połączenie z takimi przestrzeniami rdzenia kręgowego. Płyn rdzeniowo-mózgowy w ilości 500 ml na dobę, jest stale produkowany przez sploty naczyniówkowe komór mózgowia. Chroni on tkankę mózgową przed urazami mechanicznymi oraz reguluje ciśnienie wewnątrzczaszkowe. Zapewnia możliwość przekazywania produktów metabolizmu serotoniny i dopaminy, jak również innych substancji, w tym mocznika, kreatyniny i jonów  $K^+$  do krwi. Granicą zapewniającą możliwość selektywnej wymiany metabolitów między płynem mózgowo-rdzeniowym a istotą międzykomórkową tkanki nerwowej jest bariera pomiędzy tkanką nerwową a płynem mózgowo-rdzeniowym, utworzona w zasadniczej części przez glejowe komórki ependymy (1).

Zaopatrzenie tętnicze mózgu odbywa się za pośrednictwem tętnic szyjnych wewnętrznych (70%) i układu kręgowo-podstawnego (30%). Tętnice szyjne wewnętrzne dają po każdej stronie początek tętnicom mózgowym przedniej i środkowej, tętnica podstawna zaś dzieli się na dwie tętnice mózgowie tylne. Tętnica łącząca przednia łączy obydwie tętnice mózgowie przednie, a tętnica łącząca tylna przebiega po obu stronach od tętnicy mózgowej tylnej do szyjnej wewnętrznej. Zespolenie to tworzy na podstawie mózgu koło tętnicze Willisa. Tętnice mózgowie przednie zaopatrują większość obszaru przyśrodkowej części półkul mózgowych, tętnice mózgowie środkowe - większość bocznych powierzchni półkul, a tętnice mózgowie tylne - potyliczne i dolne części płatów skroniowych. Pomiędzy poszczególnymi tętnicami istnieje duża liczba anastomoz (2).

### ***Kresomózgowie***

Najmłodszą częścią mózgowia jest kresomózgowie, które jak płaszcz okrywa inne, filogenetycznie starsze struktury: międzymózgowie, śródmózgowie, most i - częściowo - rdzeń przedłużony (śródmózgowie, most i rdzeń przedłużony tworzą tzw. pień mózgu). Jedyne mózdzek nie jest otoczony przez kresomózgowie, choć należy on do starszych filogenetycznie struktur mózgowia. Kresomózgowie, czyli nowa kora mózgowa przylega do sklepienia czaszki swoją powierzchnią wypukłą, zwaną inaczej powierzchnią grzbietowo-boczną. Od dołu mózg swą podstawą, czyli powierzchnią podstawną opiera się na kościach oddzielających mózgowiczaszkę od twarzoczaszki i oczodołów. Od góry widać, że mózgowie jest narządem parzystym składającym się z dwóch półkul, lewej i prawej. Pomiędzy nimi znajduje się głęboka podłużna szczelina, na dnie której znajduje się spoidło wielkie mózgu, utworzone przez liczne

szlaki nerwowe łączące obie półkule. Powierzchnia mózgu jest wyraźnie pofałdowana. Widoczne są na niej dość głębokie bruzdy, pomiędzy którymi znajdują się fałdy, zwane zakrętami mózgu. Zakręty tworzą większe anatomiczne struktury - płaty mózgu. Od przodu widoczne są dwa płaty czołowe, z lewego i prawego boku - płaty skroniowe; od góry, za płatami czołowymi, znajdują się dwa płaty ciemieniowe, a za nimi dwa płaty potyliczne. Pod widocznymi od góry płatami: czołowym, skroniowym i ciemieniowym, chowa się jeszcze jeden, piąty, parzysty płat. Jest to tzw. wyspa. Anatomiczne granice między płatami nie są bardzo wyraźne, często jeden płat przechodzi wprost w drugi (3).

### ***Kora mózgowa***

Powierzchnię zakrętów i wnętrza bruzd prawej i lewej półkuli pokrywa kora mózgu. Jej powierzchnia wynosi u człowieka ok. 2200 cm<sup>2</sup>, a grubość - do 4,5 cm. Ponad 40% kory ludzkiego mózgu przypada na płaty czołowe. Na przekroju podłużnym widać, że kora składa się z dwóch warstw: istoty szarej, utworzonej przez sieć 9 miliardów komórek nerwowych - neuronów (2/3-3/4 wszystkich komórek mózgu), tworzących w korze filogenetycznie młodszej, czyli "nowej", aż sześć warstw (w korze "starej", stanowiącej niewielką część mózgu, tych warstw jest o połowę mniej), oraz istoty białej - w skład której wchodzi przede wszystkim włókna nerwowe i tkanka glejowa oraz naczynia krwionośne. W głębi półkul znajdują się otoczone istotą białą osobne skupiska istoty szarej, nie mające bezpośredniej łączności z korą - zwane jądrami podkorowymi albo jądrami podstawnymi (1).

Na powierzchni kory mózgowej można zlokalizować pola, które różnią się między sobą pełnioną funkcją. W tylnej części płatów czołowych zlokalizowana jest

kora ruchowa, która zawiaduje ruchami dowolnymi. Z elektrofizjologicznych badań wynika, że jednostki ruchowe mięśni mają tam swoją reprezentację. Największą powierzchnię zajmują mięśnie rąk, szczególnie mięśnie poruszające palcami oraz mięśnie twarzy i języka, wyraźnie mniejszą - tułów i kończyny dolne. Z aktywnością motoryczną związane są także jądra podkorowe (jądro ogoniaste, jądro soczewkowate), których zadaniem jest, między innymi, udział w planowaniu zakresu ruchu oraz regulowanie napięcia mięśni i korygowanie czynności ruchowej inicjowanej w korze (4).

Na powierzchni kory mózgowej płatów ciemieniowych znajduje się pole czuciowe, w którym analizowane jest czucie powierzchowne i głębokie. Ośrodki percepcji słuchowej znajdują się w płatach skroniowych, a pole wzrokowe - w płatach potylicznych (5).

Węch też ma swoją reprezentację korową. Kora węchowa znajduje się w części podstawnej mózgowia (pod płatami czołowymi) i jest utworzona przez opuszkę i pasmo węchowe, oraz struktury znajdujące się wewnątrz mózgu. Kora węchowa jest najstarszą filogenetycznie częścią kresomózgowia (1).

Struktury korowe należące do kory starej (allocortex), takie jak hipokamp, część kory węchowej, a także płat gruszkowaty, zakręt obręczy, zakręt hipokampa, oraz jądra podkorowe i ciało migdałowate, tworzą układ limbiczny, który kieruje emocjami i jest miejscem powstawania popędów (mózg emocjonalny). Hipokamp jest uważany za miejsce powstawania śladów pamięci (engramów). Engramy tworzone są w określonych polach kory asocjacyjnej, tworzących osobne "wyspy pamięci", które następnie - w miarę potrzeby - są odczytywane. Uszkodzenia hipokampa powodują, że człowiek nie potrafi płynnie korzystać ze swoich zasobów pamięci.



Układ limbiczny poprzez swe oddziaływanie na podwzgórze ma wpływ na czynności narządów wewnętrznych (4).

Oprócz pól kory mózgowej, których rola jest wyraźnie określona, związana z poszczególnymi czynnościami organizmu, przede wszystkim z percepcją bodźców pochodzących z narządów zmysłów oraz z aktywnością ruchową, jest też w mózgu tzw. kora niespecyficzna, w której dokonuje się analiza zjawisk powstających wewnątrz ośrodkowego układu nerwowego. Jest to tzw. kora kojarzeniowa (asocjacyjna), zlokalizowana w płatach czołowych, a także - w mniejszym zakresie - w płatach skroniowych, ciemieniowych i potylicznych. To w niej zachodzi zjawisko integracji różnych funkcji kory, czyniąc je spójnymi, adekwatnymi do powziętych zamiarów. Tam też jest przeprowadzana analiza okoliczności zewnętrznych, poprzedzająca wydanie polecenia wykonania określonej czynności. W korze asocjacyjnej dokonywana jest analiza zasobów pamięci i tam też pamięć jest na bieżąco wykorzystywana (1).

Bardzo ważną rolę w mózgowiu odgrywają płaty czołowe. W ich obrębie, w znacznej mierze jest kształtowana nasza osobowość, to, kim jesteśmy, zdolność do myślenia i wyrażania woli. Kora jest miejscem powstawania świadomości, na którą składają się takie umiejętności, jak zdolność do myślenia abstrakcyjnego czy umiejętność wyrażenia w słowach powstałych myśli, zdolność do wąskiego ukierunkowania uwagi (1,4). Najbardziej położoną ku przodowi strefą jest nadoczodołowe pole kojarzeniowe, obejmujące swoim zasięgiem część przednią płata czołowego i okolicę oczodołową kory mózgowej. Prawidłowe funkcje tego obszaru obejmują między innymi planowanie na przyszłość, planowanie złożonych ruchów dowolnych, analizę postępowania pod kątem zgodności z normami etycznymi, przewidywanie przyszłych skutków działań, oraz możliwość skupienia

uwagi i możliwość tworzenia więzi społecznych. W przedniej części płata skroniowego znajduje się okolica skroniowa przednia, która związana jest z trwałym zapamiętywaniem. Na pograniczu płatów potylicznego, skroniowego i ciemieniowego leży okolica potyliczno-skroniowo-ciemieniowa (4,6).

Świadomość to także samoświadomość, a więc poczucie tożsamości i odrębności osobniczej. Częścią świadomości jest mowa. W mózgu człowieka w płacie czołowym kory lewej półkuli (u osób praworęcznych) znajduje się ruchowy ośrodek mowy (ośrodek Broca). Położony jest w dolnym zakręcie czołowym lewej półkuli, zajmując 44 i 45 pole wg Brodmanna. Pola czuciowe mowy to ośrodek Wernickiego. Leży częściowo w płacie ciemieniowym lewej półkuli odpowiadając polu 40 wg Brodmanna, oraz w płacie skroniowym w obszarze pola 39. Obszary te uznawane są również za drugi oprócz ośrodka Broca rejon odpowiedzialny za mowę (7,8). Funkcje powiązane ściśle z możliwością artykulacji słów oraz zrozumienia mowy to możliwość ich zapisywania i rozpoznawania w postaci pisanej. Umiejętności te związane są z bardzo rozległym obszarem kory płatów ciemieniowych i skroniowych. Ośrodki odpowiedzialne za rozróżnianie znaków pisarskich znajdują się w sąsiedztwie pola 17 i 18 wg Brodmanna. Natomiast pole 22 to funkcje słuchowe, a pole 37 funkcje wzrokowo-słuchowe mowy (4,7,8).

Istota biała kory mózgowej jest utworzona przez liczne szlaki (drogi) nerwowe, łączące poszczególne części kory ze sobą oraz z jądrami mózgu, jak również z rdzeniem kręgowym. Są to drogi korowo-rdzeniowe, korowo-jądrowe, korowo-podkorowe, itd. Struktury te określa się jako włókna projekcyjne lub rzutowe, łączące korę mózgu z strukturami położonymi na niższych poziomach układu nerwowego. Rozróżnia się włókna projekcyjne dokorowe i odkorowe. Szczególną rolę odgrywają szlaki kojarzeniowe, których sprawność określa naszą inteligencję. Człowiek

w dorosłym życiu codziennie traci określoną liczbę neuronów, co nie oznacza, że z każdym dniem jest intelektualnie słabszy. Mniej ważna jest bowiem liczba utraconych komórek niż utrzymanie prawidłowych połączeń pomiędzy pozostałymi (9).

Półkule mózgu z pozoru są jednakowe. Naprawdę - zarówno morfologicznie, a przede wszystkim - funkcjonalnie - zasadniczo się między sobą różnią. Każdej półkuli mózgu przyporządkowane są inne czynności umysłowe. Zgodnie z koncepcją uzupełniającą specjalizacji półkul mózgowych według prof. Rogera Sperry, prawa półkula mózgowa odpowiada za rytm, zmysł przestrzeni, obraz całości, wyobraźnię, marzenia oraz postrzeganie kolorów i rozmiarów (półkula rozpoznająca). Półkula lewa kontroluje słowa, liczby, myśli logiczne, analityczne, linearność oraz hierarchiczność zbiorów (półkula analizująca) (10). W tej półkuli zlokalizowane są ośrodki mowy związane z zapamiętywaniem i jej rozumieniem oraz jej odtwarzaniem, także w formie pisanej. W półkuli prawej znajdują się ośrodki zawiadujące orientacją w przestrzeni, zapamiętywaniem, odtwarzaniem i porównywaniem wrażeń wzrokowych i słuchowych. Prawej półkuli przypisywane są zdolności artystyczne.

### **Móźdżek**

Z tyłu, za półkulami mózgu, znajduje się kolejna, wyraźnie wyodrębniona część mózgowia - móźdżek. Wypełnia on tylną część dołu czaszki. Ma kształt lekko spłaszczony. Móźdżek, podobnie do mózgu, dzieli się na dwie półkule połączone tzw. robakiem, krótką walcowato wydłużoną strukturą. Półkule móźdżku mają liczne równoległe biegnące, wąskie zakręty, oddzielone szczelinami. Są podzielone na płaty i płaciki. Móźdżek, podobnie jak mózg, posiada istotę szarą, czyli korę szarą oraz znajdującą się pod nią - istotę białą, tworzącą tzw. ciało rdzenne. W istocie

białej znajdują się osobne skupiska istoty szarej. Są to tzw. jądra mózdzku. Ciekawe, że kora mózdzku jest znacznie bardziej pofałdowana niż kora mózgu. Mózdzek jest znacznie mniejszy od mózgu (stanowi 1/7 jego objętości); jego powierzchnia jednak, dzięki pofałdowaniu, osiąga aż 3/4 powierzchni półkul mózgu (3).

Kora mózdzku utworzona jest przez komórki nerwowe, neurony, zaś ciało rdzenne, z wyjątkiem jąder, jest utworzone przez włókna nerwowe. Te włókna formują drogi nerwowe, własne - wewnątrzmoźdzkowe oraz drogi doprowadzające pobudzenia do mózdzku i drogi odmóźdzkowe. Drogi grupują się, tworząc konary mózdzku: górny, środkowy i dolny, i łączą mózdzek z pniem mózgu oraz z korą mózgową (3).

Mózdzek bierze udział w planowaniu i wykonywaniu ruchów, oraz w regulacji napięcia mięśniowego. Mózdzek odgrywa zasadniczą rolę w regulacji postawy i regulacji ciała. Ma on ścisłe fizjologiczne powiązania ze zmysłem równowagi zlokalizowanym w uchu wewnętrznym. Bierze udział w programowaniu ruchów, koordynuje i usprawnia ruchy dowolne i mimowolne (poprawka mózdzkowa). Jest też "dystrybutorem mocy": siły skurczu mięśni szkieletowych (2,4,11).

### ***Międzymózgowie i podwzgórze***

Na podstawie mózgu widoczny jest fragment kolejnej odrębnej struktury mózgowia zwanej międzymózgowiem. Widziany w całości ma klinowaty kształt ostrzem skierowanym do przodu. Z przodu i z boku zrasta się z półkulami mózgu. Jego dolna, podstawna część to podwzgórze, struktura kontrolująca czynności wegetatywne i hormonalne organizmu. Podwzgórze kontroluje i reguluje pobieranie pokarmu i wody, temperaturę ciała, ma wpływ na funkcje płciowe. Integruje czynności wpływające na homeostazę środowiska wewnętrznego ustroju. Jest fizjologicznie

sprężone z układem limbicznym, który kieruje czynnością podwzgórza w zakresie zachowań związanych z odpowiedzią organizmu na stres.

W podwzgórzu wytwarzane są neurohormony, regulujące hormonalną czynność przysadki. Ich produkcja i uwalnianie są ściśle powiązane z aktualnym stanem ustroju, a aktywność podwzgórza wpływa na homeostazę hormonalną (1).

Z podwzgórzem związana jest strukturalnie i funkcjonalnie przysadka mózgowa, położona na dnie mózgowczaszki w tzw. siodełku tureckim. Z podwzgórzem łączy się za pomocą lejka. Tylony płat przysadki jest miejscem uwalniania do krwi hormonów wyprodukowanych w podwzgórzu (w jądrach nadwzrokowym i przykomorowym) wazopresyny (hormonu antydiuretycznego) i oksytocyny. W przednim płacie przysadka sama produkuje i uwalnia do krwi hormony, takie jak: ACTH, FSH, GH, LH, FSH, pozostając także pod hormonalną kontrolą podwzgórza (1,4,5).

W skład międzymózgowia wchodzi także wzgórze z ponad 100 jądrami, pasma wzrokowe, ciało kolankowate oraz szyszynka. Jądra wzgórza są stacjami przekaźnikowymi bodźców płynących z różnych struktur mózgowia. Najważniejsze z nich to jądra asocjacyjne, które czynnościowo są sprężone z korą mózgową w zakresie integracji pobudzeń czuciowych, płynących z rdzenia kręgowego. Aktywność jąder wzgórza ma także wpływ na nastroje i samopoczucie (1,4).

Szyszynka jest narządem międzymózgowia, której funkcja nie została do końca wyjaśniona. Produkuje ona indoloaminę melatoninę, który pełni rolę w regulacji rytmów okołodobowych, a także wpływa na czynności immunologiczne organizmu. Melatonina wydzielana przez szyszynkę jest antyoksydantem i chroni tkankę przed uszkodzającym działaniem wolnych rodników. Szyszynka prawdopodobnie hamuje czynność gruczołów płciowych aż do okresu dojrzewania,

ma także wpływ na dobową chronobiologię - na rytm dobowy (dzień-noc) człowieka (6).

### ***Śródmózgowie i most***

Śródmózgowie jest krótkim odcinkiem pnia mózgu utworzonym przez parzyste grube pasma istoty białej, zwane konarami mózgu, które biegną do półkul mózgu. Na schowanej (okrytej przez płaszcz kory mózgu) powierzchni grzbietowej śródmózgowia znajdują się ważne skupiska komórek nerwowych. Są to m.in. jądra niektórych nerwów czaszkowych (12).

Śródmózgowie przechodzi w most, w skład którego wchodzi zarówno "białe" włókna nerwowe, jak i istota szara, którą tworzą skupiska neuronów. Most jest uwypukleniem ku podstawie pnia mózgu z charakterystycznym zagłębieniem w środku. Ma pofalowaną powierzchnię, przechodzącą z boku w grube konary mózdzku. Znajdują się w nim, tak jak w śródmózgowiu, jądra nerwów czaszkowych, m.in. nerwu trójdzielnego i twarzowego (1).

### ***Twór siatkowaty***

Znaczną część pnia mózgu twór siatkowaty. W jego skład wchodzi liczne neurony, tworzące skupiska zwane jądrami tworu siatkowatego oraz włókna nerwowe przebiegające w różnych kierunkach ku poszczególnym częściom mózgowia (4). Obszarowo twór siatkowaty przekracza granice mostu, sięgając z jednej strony (część zstępująca) do niżej położonego rdzenia przedłużonego, a nawet szyjnej części rdzenia kręgowego, z drugiej (część wstępująca) do śródmózgowia, a nawet struktur podkorowych, usytuowanych w pobliżu kory. Układ siatkowaty wpływa na aktywność neuronów ruchowych rdzenia kręgowego, jak

również na procesy uwagi, sen i czuwanie. W związku z tym ma silne połączenia z przodomózgiem. Obszar działania tworu siatkowatego jest bardzo rozległy. Poprzez drogi zstępujące oddziałuje na czynność obwodowych neuronów ruchowych, a poprzez drogi wstępujące na czynność kory mózgowej. Twór siatkowaty w połączeniu z ośrodkami w korze mózgowej jest również zasadniczą częścią układu nieswoistego części wstępującej. W przeciwieństwie do układu swoistego jest wrażliwy na wiele rodzajów pobudzeń z dróg czuciowych i ruchowych, a posiadając wiele neuronów pośredniczących, modyfikuje wyjściową informację, odbierając i przekazując ją do różnych obszarów kory mózgowej. Część wstępująca tworu siatkowatego odpowiada za stan wzbudzenia czynnościowego (przytomność, świadomość) kory mózgowej. Część zstępująca tworu siatkowatego (część górna tworu siatkowatego) oddziałuje hamująco na ośrodki ruchowe rdzenia kręgowego (neurony alfa i gamma). Część torująca tworu siatkowatego (znajdująca się na powierzchni grzbietowej części hamującej) działa pobudzająco na ośrodki ruchowe rdzenia kręgowego. Układ siatkowaty poprzez działanie hamujące i torujące wpływa stale na napięcie mięśni i postawę ciała (4,5,11).

### ***Rdzeń przedłużony***

Najstarszą strukturą mózgowia, stanowiącą rodzaj łącznika mózgu z położonym pozaczaszkowo rdzeniem kręgowym, jest rdzeń przedłużony, zwany inaczej opuszką (3).

Ma on kształt spłaszczonego stożka łączącego się podstawą z mostem, a ściętym końcem - z rdzeniem kręgowym. Ma dwie powierzchnie: podstawną i grzbietową. Na powierzchni podstawnej widoczne są grube powrózki ciągnące się wzdłuż rdzenia, oddzielone głęboką bruzdą. Są to tzw. piramidy. W dolnej części

rdzenia przedłużonego piramidy krzyżują się. W tym miejscu umownie zaczyna się rdzeń kręgowy. Z boku piramid leżą - oddzielone od nich bruzdą - sznury boczne z obecną u ich szczytu charakterystyczną wyniosłością, zwaną oliwką. Na powierzchni grzbietowej rdzenia przedłużonego biegną pęczki włókien nerwowych. U góry rdzeń przechodzi w konary dolne mózdzku (12).

Rdzeń przedłużony zawiera zarówno istotę szarą, jak i istotę białą, jednak ich rozmieszczenie jest odmienne niż w mózgu: na zewnątrz jest istota biała, wewnątrz - szara. Istotę białą tworzą liczne drogi nerwowe, spośród których wyróżniają się wymienione już wcześniej piramidy, które są utworzone przez drogi rdzeniowo-korowe (8). W rdzeniu przedłużonym, a dokładniej w tworze siatkowatym rdzenia, znajdują się ośrodki kontrolujące podstawowe funkcje narządów wewnętrznych. Są tam zlokalizowane ośrodki oddychania, naczynioruchowe i sercowe, oraz ośrodki związane z czynnością przewodu pokarmowego (4).



## 1.2 Tkanka glejowa ośrodkowego układu nerwowego

Tkanka glejowa ośrodkowego układu nerwowego jest oprócz właściwej tkanki nerwowej jednym z głównych składników ośrodkowego układu nerwowego. Komórki gleju stanowią około 90 % wszystkich komórek w CUN. Na tkankę glejową składają się cztery najważniejsze grupy komórek: astrocyty (neuroglej gwiaździsty), oligodendrocyty (glej skąpowypustkowy), komórki wyściółki (ependymocyty) oraz komórki mikrogleju. Autochtoniczne komórki pochodzenia neuroektodermalnego w tkance glejowej to astrocyty, oligodendrocyty i ependymocyty. Charakter napływowy mają komórki mikrogleju pochodzenia mezodermalnego (13).

### **Astrocyty**

Astrocyty (neuroglej gwiaździsty) to duże komórki z licznymi wypustkami. Mają owalny lub lekko nieregularny kształt jądra komórkowego z rozproszoną chromatyną i dużą liczbą delikatnych wypustek cytoplazmatycznych. Wypustki rozchodzą się promieniście od ciała komórkowego. Bogate rozgałęzienia wytwarzają sieć przestrzenną zawierającą pozostałe elementy komórkowe ośrodkowego układu nerwowego i upodobniają komórkę do gwiazdy. Wypustki zawierają filamenty pośrednie zwane gliofilamentami, zbudowane z kwaśnego białka włókienek glejowych ( GAP – glial fibrillary acidic protein). Charakterystyczną cechą astrocytów jest tworzenie ograniczających struktur błoniastych, powstających w następstwie skupiania się buławkowatych zakończeń ich rozgałęzionych wypustek. Struktury te powstają na styku układu nerwowego z jego przestrzeniami płynowymi oraz w otoczeniu naczyń krwionośnych. Zagęszczenie wypustek astrocytów pod oponą miękką tworzy błonę graniczną powierzchowną. Tego typu struktura w okolicy układu

komorowego nosi nazwę błony granicznej okołokomorowej. Kolejna błona tworzona przez wypustki astrocytów to błona graniczna okołonaczyniowa. Ponadto wypustki astrocytów tworzą błony ograniczające styki synaptyczne, a także pokrywają nie zajęte przez nie powierzchnie perykarionów i dendrytów komórek nerwowych (8).

Rozróżnia się dwa podstawowe typy astrocytów. Są to astrocyty protoplazmatyczne i astrocyty włókniste. Astrocyty protoplazmatyczne są większe. Od ich ciała komórkowego odchodzą krótkie, obficie rozgałęziające się pod kątem rozwartym wypustki. Charakterystyczne są liczne uwypuklenia i kolce. Ich cechą charakterystyczną jest brak włókienek glejowych, zwanych gliofibrylami. Są najczęściej spotykane w istocie szarej. Astrocyty włókniste mają mniejszą liczbę wypustek cytoplazmatycznych i ich ciało komórkowe jest mniejsze. Wypustki są smuklejsze, dłuższe i rozgałęziają się pod kątem ostrym. Rozgałęzienia wtórne są mniej liczne, natomiast w przeciwieństwie do astrocytów protoplazmatycznych cytoplazma ich perykarionów i ich wypustek wypełniona jest gliofibrylami. Astrocyty włókniste występują obficie w istocie białej. Wyodrębniono również kategorię astrocytów pośrednich i nazwano astrocytami włóknisto-protoplazmatycznymi. Występują one obficie w obszarach pogranicza istoty szarej i białej w głębszych warstwach kory mózgu. Położenie astrocytów względem naczyń, pasm włókien nerwowych i komórek nerwowych wyróżnia również astrocyty (nazywane również satelitami) okołoneuralne, okołonaczyniowe i międzypęczkowe (8,13).

Rola astrocytów w ośrodkowym układzie nerwowym to przede wszystkim funkcja podporowa. Rozgałęziona sieć wypustek wytwarza zrębowy układ przestrzenny, w którym znajdują się elementy komórkowe centralnego układu nerwowego. Astrocyty stanowią również ważne ogniwo transportu substancji metabolicznych i energetycznych do neuronów oraz produktów przemiany do krwi.

Jedną z istotnych adaptacji i funkcji astrocytów jest ich połączenie z naczyniami krwionośnymi. Obecność stopki końcowej wypustki wywołuje zmiany w budowie śródbłonka mózgowych naczyń krwionośnych. Czyni go mało przepuszczalnym i uczestniczy w mechanizmie barierowym krew-mózg. Pojęcie bariera krew-mózg jest pojęciem czynnościowym, związanym z organizacją ultrastrukturalną i właściwościami metabolicznymi komórek śródbłonka naczyń włosowatych. Specyficzność budowy bariery wyraża się przez odrębność strukturalną ścian naczyń włosowatych, małe rozmiary przestrzeni międzykomórkowej oraz obecność błon glejowych utworzonych przez wypustki astrocytów otaczających włóściki. Selektywna przepuszczalność bariery krew-mózg polega na umożliwieniu na zasadzie dyfuzji biernej przechodzenia do tkanki mózgowej substancji rozpuszczalnych w tłuszczach, gazów rozpuszczalnych w wodzie (tlen lub lotne anestetyki) oraz wody. Zapewnia możliwość dostarczenia niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania neuronów glukozy oraz aminokwasów. Chroni również mózgowie przed działaniem substancji neuroaktywnych krążących we krwi (glutaminian, katecholaminy) (1).

Astrocyty odgrywają również rolę w zjawiskach związanych z rozwojem i dojrzewaniem ośrodkowego układu nerwowego. W okresie zarodkowym tworzą żrąb wskazujący kierunek wędrówki rozwijający się komórek nerwowych. Wpływają również wspomagająco na migrację neuronów i prawdopodobnie również na strukturalne i czynnościowe różnicowanie komórek nerwowych poprzez wytwarzanie białkowych czynników wzrostowych dla neuronów (neurotrofin). Komórki i włókna astrocytów pełnią również rolę reparacyjną tworząc bliznę glejową w miejscu po zniszczonych neuronach, oraz uczestniczą w procesach fagocytozy. Prawdopodobny jest udział astrocytów w procesach metabolizowania neuroprzekaźników

synaptycznych. Przykładem takiego działania jest kwas glutaminowy, który ulega w astrocytach przemianie do glutaminy, jest transportowany do komórek nerwowych, gdzie następuje włączenie go do nowej puli neuroprzekaźnika. Astrocyty wykazują również zdolność prezentacji antygenów. Uwalnianie przez astrocyty substancji o właściwościach wazoaktywnych pozwala astrocytom uczestniczyć w regulacji miejscowego przepływu krwi (8).

### ***Oligodendrocyty***

Oligodendrocyty (glej skąpowypustkowy) to komórki, które określane są mianem satelitów. W istocie szarej towarzyszą komórkom nerwowych i dlatego noszą nazwę satelitów nerwowych, natomiast w istocie białej położone są pomiędzy zmielinizowanymi włóknami nerwowymi i noszą nazwę satelitów pęczkowych. Jeśli układają się wzdłuż przebiegu naczyń noszą nazwę satelitów okołonaczyniowych. Liczba satelitów komórek nerwowych jest zmienna i waha się od jednego do ośmiu oligodendrocytów. Cechą charakterystyczną oligodendrocytów jest mała ilość wypustek cytoplazmatycznych, rozchodzących się promieniście od drobnego i okrągłego zazwyczaj perykarionu. Wypustki odchodząc szybko dzielą się na nieliczne zazwyczaj odgałęzienia wtórne zakończone kolbkowatym zgrubieniem. Zgrubienie to w istocie szarej jest elementem łączącym z dendrytem i perykarionem komórki nerwowej. Oligodendrocyty mają zaokrąglone jądro z umiarkowanie zagęszczoną chromatyną i cytoplazmą z jasną obwódką. Zawierają mało elementów cytoszkieletu (13).

Wyróżnia się cztery typy oligodendrocytów. Typ I to komórki typowe dla istoty szarej półkul mózgu i mózdzku. Są one najmniejsze z oligodendrocytów o kształcie okrągłym lub owalnym. Mają krótkie i cienkie wypustki oplatające ciała neuronów, ich

dendryty oraz ściany naczyń. Ten typ komórek jest najbardziej zbliżony do klasycznego opisu oligodendrocytu. Typ II oligodendrocytów to komórki nieco większe, charakteryzujące się wielobocznym kształtem ciała komórkowego. Są one masywne i dzielą się w charakterystyczny sposób w kształcie litery T. Posiadają mniejszą liczbę wypustek jak komórki typu I. Są licznie reprezentowane w istocie białej. Typ III to oligodendrocyty o największych rozmiarach. Są to komórki wieloboczne, posiadające pojedyncze grube i długie wypustki. Występują często jako satelity śródpęczkowe w pniu mózgu i rdzeniu kręgowym. Typ IV oligodendrocytów reprezentowane są niemal wyłącznie w pniu mózgu w śródkankowych włóknach korzeniowych i ruchowych nerwów czaszkowych. Ten typ oligodendrocytów swoją budową przypomina neurolemocyty występujące w obwodowym układzie nerwowym. Nie posiadają wypustek, a ich ciała komórkowe przylegają swoją powierzchnią do osłonek mielinowych (8).

Funkcją oligodendrocytów jest wytwarzanie osłonki mielinowej w ośrodkowym układzie nerwowym. Przypisuje się też im współdziałanie w procesach metabolicznych komórek nerwowych (1).

### ***Ependymocyty***

Ependymocyty (komórki wyściółki) to komórki przypominające komórki nabłonkowe. Pokrywają ściany komory mózgu oraz kanału środkowego rdzenia kręgowego. Kontaktują się w związku z tym z płynem mózgowo-rdzeniowym tworząc warstwę sześciennych komórek widoczną w obrazie mikroskopowym jako linijny, jednowarstwowy rozkład komórek o zróżnicowanej wysokości. Mają małe, owalne, przypodstawne jądro z zagęszczoną chromatyną. Cechą charakterystyczną jest

obecność mikrokosmków pokrywających powierzchnie komórkowe zwrócone do komór (13).

Podobnie jak w komórkach nabłonka wyróżnia się ependymocyty o różnym kształcie: płaskie, sześciennie i cylindryczne. W największej liczbie reprezentowane są ependymocyty sześciennie i cylindryczne. Wszystkie ependymocyty posiadają pojedyncze, zwrócone do granicznej błony gwałowej wypustki.

Rolą tych komórek jest uczestnictwo w transporcie substancji z płynu mózgowo-rdzeniowego do mózgu. Ważny jest też udział w przekazywaniu produktów metabolizmu tkankowego z mózgu do płynu mózgowo-rdzeniowego. Ependymocyty wraz z komórkami mikrogleju tworzą barierę między tkanką nerwową a płynem mózgowo-rdzeniowym, zapewniając selektywną wymianę substancji między płynem mózgowo-rdzeniowym a istotą międzykomórkową tkanki (1).

### ***Mikroglej***

Komórki mikrogleju (mezoglej) nazywane są komórkami odpornościowymi układu nerwowego. Występują zarówno w istocie szarej jak i istocie białej. W dojrzałym układzie nerwowym dominują w substancji szarej. Mikroglej jest elementem migrującym i w stanie aktywacji nie wykazuje jak inne opisywane komórki związku z pozostałymi elementami komórkowymi ośrodkowego układu nerwowego. W stanie spoczynku może towarzyszyć ciałom komórek nerwowych, bądź w istocie białej razem z oligodendrocytami i astrocytami układać się wzdłuż włókien nerwowych i naczyń. Barwienie immunocytochemiczne wskazuje, że ma on silnie rozbudowane, delikatne, rozgałęziające się wypustki i tworzy zespół komórek rozprzestrzeniających się w tkance mózgowej. Budowa mikrogleju wskazuje, że należy on do komórek dendrytycznych prezentujących antygeny (8).

Funkcją mikrogleju jest przede wszystkim ochrona ośrodkowego układu nerwowego. W stanach chorobowych mikroglej ulega aktywacji, komórki dzielą się i zwiększają swą objętość. W okolicach dotkniętych przez proces zapalny lub uraz dołączają do mikrogleju monocyty, wnikające do struktur mózgowych z krwi. Przekształcają się one w makrofagi. Aktywne, pobudzone komórki mikrogleju uczestniczą w większości toczących się w obrębie tkanki mózgowej procesów zapalnych poprzez proliferację, migrację i fagocytozę. Komórki mikrogleju produkują również cytokiny i neurotrofiny. Na powierzchni komórek mikrogleju znajdują się antygeny głównego kompleksu zgodności tkankowej klasy II (MHC-II). Mikroglej jest identyczny antygenowo i podobny czynnościowo do elementów układu monocytarno-makrofagowego i uznawany za sieć immunokompetentnych komórek ośrodkowego układu nerwowego. Komórki mikrogleju uczestniczą w rozwoju tkanek ośrodkowego układu nerwowego i w zachodzących w dojrzałym mózgu procesach regeneracyjnych i reparacyjnych (1,8).

### 1.3 Uszkodzenie tkanki mózgowej

Pojęcie uraz czaszkowo-mózgowy jest terminem często stosowanym w odniesieniu do osób, które odniosły obrażenia w wyniku wypadków komunikacyjnych, urazów w sporcie lub w wyniku przemocy. Podczas urazów głowy dochodzi do bezpośredniego uszkodzenia mózgu odłamkami kostnymi czaszki, oraz w wyniku gwałtownie działających na tkankę mózgową sił przyspieszenia bądź opóźnienia, które doprowadzają do traumatyzacji tkanki mózgowej zarówno w miejscu zadziałania urazu jak i po stronie przeciwnej w wyniku tzw. zjawiska *contrcoup*. Następstwem urazów głowy oprócz zranienia tkanki nerwowej, jest przerwanie struktury naczyń krwionośnych i uszkodzenie opon mózgowo rdzeniowych.

Traumatycznemu uszkodzeniu mózgu może towarzyszyć: krwawienie z przerwanych naczyń krwionośnych, obrzęk, niedotlenienie i niedokrwienie tkanki mózgowej, jak również uszkodzenia aksonalne. W miejscu mechanicznego urazu następuje przerwanie bariery krew-mózg oraz zaburzenia homeostazy elektrolitowej. Następstwem urazu mózgowo-czaszkowego mogą być ogniskowe, ubytkowe objawy neurologiczne. Rozległość urazu determinuje zakres zaburzeń neurologicznych, a ciężki stan pacjenta wymaga zastosowania leczenia neurochirurgicznego oraz intensywnej opieki medycznej (2,11,14).

Problem leczenia urazów czaszkowo-mózgowych jest obecny w historii medycyny od wielu lat. Pierwsze informacje o zabiegach neurochirurgicznych dotyczących mózgu pochodzą z okresu neolitu (Francja), a odnalezione czaszki z tego okresu świadczą, że zabiegi były wykonywane na żywym organizmie. Natomiast dzięki znaleziskom archeologicznym z okresu starożytnego Egiptu



możemy dowiedzieć się o dokonywanych w tych czasach trepanacjach (15). Informacje o następstwach urazów czaszki przynosi też Papirus Smitha, znaleziony w r. 1862 w grobowcu koło Teb przez Edwina Smitha. Pochodzi z r. 1555 p.n.e., ale zawiera też opisy znacznie wcześniejszych przypadków, m.in. czterdzieści osiem jednostek chorobowych, sposoby nastawiania i unieruchomiania złamań, zwalczanie infekcji i gorączki. Wśród przedstawionych przypadków, dwadzieścia siedem można zakwalifikować jako uszkodzenia neurologiczne. Już wtedy wiadano, że uszkodzenie głowy może spowodować paraliż członków lub zaburzenie mowy (afazja). Nowożytna historia chirurgii mózgu to prace kanadyjskiego neurologa i neurochirurga Wildera Oskara Penfielda (1891-1976), założyciela Laboratorium Neurocytologicznego w Nowym Jorku. Jego prace dotyczyły chirurgicznego leczenia padaczki, klasyfikacji jej postaci, oraz lokalizacji funkcji ruchowych w korze mózgowej, jak również elektrycznych czynności mózgu i neurocytologii. Zasługi w dziedzinie operacji na tkance mózgowej położył też antropolog, anatom i chirurg francuski Paul P. Broca (1824-1880). Jest on odkrywcą ośrodka ruchowego mowy. Na podstawie badań dwóch pacjentów z afazją określił, że tylna część zakrętu czołowego lewej półkuli mózgu jest obszarem odpowiedzialnym za koordynację skurczów mięśni biorących udział w artykulacji (15,16).

Na skutek urazu czaszkowo-mózgowego dochodzi do powstania w miejscu uszkodzenia procesu zapalnego. Uraz prowadzi do zniszczenia aksonów, śmierci komórek nerwowych i glejowych, oraz uszkodzenia bariery krew-mózg (14). Dodatkowym powikłaniem w leczeniu schorzeń mózgu, oraz w naturalnej regeneracji tkanki nerwowej, są reakcje pojawiające się w późniejszym okresie, do których należą opóźniona (drugorzędowa) śmierć neuronów, blizna glejowa, tworzenie środowiska hamującego wzrost i naprawę uszkodzonej tkanki (17,18).

Terapia urazów czaszkowo - mózgowych wymaga działań, które ukierunkowane są na ograniczenie wtórnych następstw urazu, odbudowę tkanki, która uległa urazowi oraz uzyskanie poprawy funkcji neurologicznych. Obecnie poszukiwane strategie terapeutyczne w leczeniu schorzeń centralnego układu nerwowego (CUN) uwzględniają oprócz procesów zachodzących podczas uszkodzenia, również ograniczoną zdolność tkanki nerwowej do samonaprawy (14). Duże nadzieje wiąże się z tzw. terapią komórkową, w której przeszczepione komórki mogą nie tylko produkować czynniki troficzne wspomagające regenerację i nadające procesom naprawczym prawidłowy kierunek, ale również są źródłem komórek, które zastąpiłyby te zniszczone. W tym celu przeprowadzane są w wielu laboratoriach badania nad wpływem płodowych neuronalnych komórek macierzystych i embrionalnych na możliwości regeneracyjne tkanki nerwowej (19,20). Zwrócono uwagę na inne źródło komórek, do których dostęp jest łatwy i które posiadają zdolność do szybkich podziałów i różnicowania się w komórki różnych tkanek pod wpływem odpowiednich bodźców. Są to komórki pochodzące ze szpiku kostnego.

## 1.4 Komórki podścieliska szpiku kostnego

Jama szpikowa jest wypełniona komórkami szpiku (prekursorami komórek krwi obwodowej) i komórkami tłuszczowymi, (które przybywają w miarę procesu starzenia – szpik żółty). Natomiast tzw. rusztowanie szpiku stanowi podścielisko szpikowe (ang. stromal cells), w którego skład wchodzi:

- komórki retikularne,
- komórki endotelialne,
- komórki preosteogenne,
- komórki preadipocytowe
- komórki adipocytowe.

Najliczniej reprezentowaną grupą komórek (80% populacji) jest heterogenna grupa komórek retikulanych. Określane są też jako komórki siateczki bądź jako fibroblasty szpikowe. Komórki te łączą się, tworząc sieć w jamie szpikowej pomiędzy naczyniami żylnymi szpiku, tętniczkami i ścianami zatok szpikowych. Pokrywają również wewnętrzną powierzchnię jamy szpikowej i powierzchnię beleczek kostnych komórkami śródkostnej. Rozróżnia się dwa typy komórek retikulanych.

Pierwsze z nich to komórki nie przylegające bezpośrednio do ścian zatok szpikowych, stanowiące podstawowy element rusztowania szpiku kostnego są to komórki retikularne międzyzatokowe. Ich cechą charakterystyczną są długie cytoplazmatyczne wypustki (21,22).

Komórkami mogącymi mieć powinowactwo do komórek retikulanych międzyzatokowych są komórki dendrytyczne (23). Ich cechą charakterystyczną jest rozgałęziony kształt. Podobne są do ciała komórki nerwowej posiadającej liczne wypustki nazywane dendrytami. Ich podstawową rolą jest pobudzanie aktywności

limfocytów (24). Komórki dendrytyczne uznawane są za jedyne profesjonalne komórki prezentujące antygen (APC – ang. antigen presenting cell). Są one zdolne do pobudzenia grasicozależnych limfocytów Th. Na ich powierzchni znajdują się cząsteczki białek MHC (major histocompatibility complex) klasy II i głównym zadaniem komórek spełniających taką rolę jest pobudzenie swoistych antygenowo limfocytów (25,26,27). Komórki dendrytyczne uważane są obecnie za jedyne, mogące dokonać stymulacji limfocytów (*primingu*); od tego momentu zdolnych do rozpoznawania antygenów. Spełniają podobną rolę jak limfocyty B, które mogą przyjmować na swojej powierzchni antygen i prezentować go z udziałem cząsteczek MHC klasy II i prowadzą do szybkiego rozwoju odpowiedzi odpornościowej wtórnej (24).

Istotną cechą komórek dendrytycznych jest ich zdolność do konstytutywnej ekspresji cząsteczek MHC klasy II i wytwarzanie, po rozpoznaniu sygnału niebezpieczeństwa, cząsteczek tzw. drugiego sygnału. Komórki dendrytyczne mogą pobudzać zarówno limfocyty Th, jak i limfocyty Tc na drodze prezentacji krzyżowej. Dzieje się tak, gdyż wykazują one unikalną właściwość włączania danego antygeny zarówno cząsteczki MHC klasy I, jak i klasy II (28).

Jedną z populacji komórek dendrytycznych tzw. komórki dendrytyczne grudki, mogące mieć udział w utrzymywaniu się w pamięci immunologicznej. Komórki te mogą na swojej powierzchni utrzymywać przez szereg miesięcy tzw. *icosomy*, czyli kompleksy natywnego antygeny, które są w stanie czuwać nad prawidłowo funkcjonującym systemem odpornościowym (29).

Drugim typem komórek retikularnych są komórki przydanki zatok szpikowych nazywane również komórkami przydankowo-retikularnymi (30). Rola tych komórek to wspólne z komórkami śródbłonna tworzenie zapory krew-szpik. Charakterystyczna

struktura komórek retikularnych, w szczególności fibroblastów szpikowych, ułatwia w warunkach hodowli tkankowej tworzenie heterogennej warstwy przylegającej do podłoża naczynia hodowlanego, określanej nazwą populacja komórek Stro-1 (31,32).

Inna grupa komórek tworzących podścielisko szpiku kostnego to wywodzące się z komórek retikularnych komórki preosteogenne (osteoblasty). Charakterystyczną cechą tej linii komórkowej jest zdolność wytwarzania kryształów hydroksyapatytu. Mają one wysoką aktywność alkalicznej fosfatazy, wytwarzają kolagenu typu I, posiadają zdolność syntezy specyficznego białka kostnego osteokalcyny oraz cechują się wzrostem wytwarzania cAMP będącym reakcją na stymulację parathormonem (33).

Kolejną linią komórkową są komórki tłuszczowe oraz ich prekursorzy. Określane są jako komórki adipocytowe i komórki preadipocytowe. Powstają w wyniku być może stymulacji komórek retikularnych, w procesie lipogenezy, szczególnie w trakcie starzenia się zarówno organizmu, jak i w hodowlach pozaustrojowych. Występują głównie w nieaktywnym hematopoetycznie szpiku żółtym (34).

Do komórek tworzących ściany zatok szpikowych zaliczamy komórki podścieliska szpikowego, nazywane komórkami śródbłonna (endotelialnymi). Ich rolą jest tworzenie zapory mającej oddzielić przestrzeń krwiotwórczą od przestrzeni naczyniowej, przez co biorą udział w mechanizmach regulujących procesy krwiotwórcze. Wpływają na jeszcze stosunkowo mało poznane czynność pozostałych grup komórek podścieliska szpikowego (35). Są komórkami zdolnymi do pełnienia roli komórek przekaźnikowych poprzez zjawisko endocytozy. Posiadają obfity układ mikrotubul i fenestracji co pozwala na przenoszenie i uwalnianie dojrzałych krwinek

do krwioobiegu (36). Komórki endotelialne wytwarzają również czynnik wzrostu kolonii granulocytow-makrofagowych *in vitro* (GM-CSF) (37).

Pomiędzy wszystkimi komórkami szpiku występuje substancja międzykomórkowa zwana macierzą (*matrix*). Właśnie w niej komórki retikularne wytwarzają wypełniający przestrzenie międzyszpikowe kolagen typu I i II. Charakterystycznym produktem komórek endotelialnych jest wytwarzany przez nie kolagen typu IV. Pozostałe składniki zewnątrzkomórkowe podścieliska szpiku kostnego to fibronektyna, hemonektyna, laminina, proteoglikany (m.in. siarczan chondroityny) oraz trombospodyna (30,38).

## 1.5 Możliwości różnicowania komórek macierzystych szpiku

Komórki macierzyste szpiku kostnego posiadają zdolność różnicowania się w komórki linii hematopoetycznej. Syntezują oraz uwalniają do otaczającego środowiska miejscowo działające czynniki wzrostu wpływające na komórki krwiotwórcze. Komórki podścieliska szpiku kostnego wytwarzają m.in. czynniki pobudzające powstawanie makrofagów i czynniki aktywujące granulopoezę. Produkują również czynniki wzrostowe regulujące proces limfopoezy, jak i czynniki pobudzające megakariopoezę. Uczestniczą aktywnie w procesach wytwórczych płytek krwi i czynnie pobudzają erytropoezę. Mogą wywierać również hamujący wpływ na procesy krwiotwórcze przez uwalnianie transformującego czynnika wzrostu beta (TGF $\beta$ ) (34).

Komórki podścieliska szpiku kostnego mają również możliwość różnicowania się w komórki linii mezenchymalnej. Istnieją dowody na to, że w odpowiednich warunkach (*in vivo* i *in vitro*) komórki te mogą tworzyć osteocyty, chondrocyty, adipocyty (39). Ponadto komórki macierzyste szpiku kostnego wykazują potencjał różnicowania się w hepatocyty, kardiomiocyty, komórki endotelialne i komórki układu nerwowego (40-44). Implantacja tych komórek do miejsc zmienionych chorobowo sprzyja poprawie funkcji serca i naprawie kośćca. Cechą charakterystyczną komórek podścieliska szpiku kostnego jest oprócz dużego potencjału różnicowania się do wielu linii komórkowych (hodowla *in vitro* z zastosowaniem odpowiednich czynników wzrostu) również możliwość regeneracji przez całe życie organizmu (45,46).

Perspektywa wykorzystywania komórek ze szpiku kostnego w leczeniu schorzeń centralnego układu nerwowego wydaje się coraz bliższa. Badania eksperymentalne wskazują na wiele możliwości stosowania tych komórek,

w zależności od: miejsca i czasu podania komórek szpikowych, źródła przeszczepianych komórek szpikowych, warunków hodowania komórek szpiku i ich podania do zmienionej chorobowo tkanki, oraz wykorzystywanych metod modyfikujących dla celów terapii genowej. Wyniki różnych badań doświadczalnych (47-49) przedstawiają zdolność komórek szpikowych do migracji, zasiedlania zmienionej chorobowo tkanki mózgowej, przekształcania się w komórki o cechach komórek rezydentnych. Komórki szpikowe zdają się być również ważnym materiałem dla terapii genowej, dzięki której do mózgu wprowadzane byłyby przez dłuższy okres substancje ważne dla wspierania regeneracji i naprawy uszkodzonej tkanki (50-52).

Komórki macierzyste szpiku kostnego mogą nie tylko zastąpić zniszczone komórki układu nerwowego, ale również produkować pod wpływem uszkodzonej tkanki szereg czynników wzrostowych i neurotrofin (NGF, BDNF, GDNF i NT-3) (tab. 1), które wpływają pobudzająco na procesy naprawcze neuronów. Neurotrofiny są cząsteczkami białkowymi produkowanymi przez komórki znajdujące się w układzie nerwowym i stanowią grupę czynników wzrostowych, odpowiedzialnych za sygnały regulujące proliferację, różnicowanie i przeżycie komórek neuralnych. Pojęcie komórek neuralnych obejmuje astrocyty, oligodendrocyty i neurony oraz mogące powstawać z komórek macierzystych ich prekursorzy oraz formy dojrzałe (53-56).

Komórki szpikowe mogą zatem stanowić nową strategię dla procesów naprawczych układu nerwowego. Komórki macierzyste szpiku mogą ulegać różnicowaniu we wszystkie linie komórek krwi obwodowej. Ich zdolności regeneracyjne w stosunku do innych tkanek są mało znane, ale wyodrębnione komórki podścieliska szpikowego (komórki stromalne) uzyskane na drodze hodowli



komórkowej okazały się w wielu przypadkach dobrym źródłem komórek, stosowanych w procesach naprawczych różnych uszkodzonych tkanek (57,58).

Nazwa	Skrót	Miejsce pochodzenia	Działanie
<b>czynnik wzrostu nerwu</b> ( <i>nerve growth factor</i> )	<b>NGF</b>	- struktury docelowe neuronów współczulnego układu nerwowego podczas okresu śmierci komórek	- wpływa na przeżywalność motoneuronów
<b>czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego</b> ( <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )	<b>BDNF</b>	- neurony - limfocyty	- reguluje przeżywanie i różnicowanie populacji neuronów - zapobiega degeneracji neuronów po aksonotomii i w innych typach uszkodzenia neuronalnego - hamuje migrację komórek Schwanna
<b>glejopochodny czynnik neurotrofowy</b> ( <i>glial cell-derived neurotrophic factor</i> )	<b>GDNF</b>	- komórki tkanki glejowej	- zapobiega nieprawidłowej aktywności nerwu i wyzwaniu bólu związanego z neuropatią - polepsza zaopatrzenie neuronów w dopaminę
<b>neurotrofina 3</b> ( <i>neurotrophin 3</i> )	<b>NT-3</b>	- limfocyty	- odgrywa rolę w rozwoju układu nerwowego - steruje przeżyciem neuronów - zwiększa migrację komórek Schwanna

**Tab. 1 Niektóre czynniki wzrostowe w układzie nerwowym oraz ich działanie.**

## **2. Cel pracy**

Celem przedstawionej pracy jest znalezienie odpowiedzi na następujące pytania badawcze:

1. Czy komórki stromalne mogą zostać wbudowane do uszkodzonej tkanki mózgowej?
2. Czy komórki stromalne pochodzące z szpiku kostnego wpływają na procesy gojenia uszkodzonej kory mózgowej?
3. Czy komórki stromalne mogą przyspieszyć proces gojenia uszkodzonej tkanki mózgowej?

### **3. Materiał i metodyka przeprowadzonych badań**

#### **3.1. Specyfikacja aparatury laboratoryjnej, narzędzi, odczynników i substancji chemicznych używanych do przeprowadzenia badań**

##### **Aparatura i narzędzia:**

- mikroskop Leica DMR, Leica Microsystems Wetzlar GmbH, rok prod. 2004
- mikroskop Jenamed Carl Zeis, rok prod. 1985
- wyciąg laboratoryjny (laminar) Polon, typ KC-21, nr 439
- inkubator Heraeus, typ 6000
- sterylizator HS-60
- waga WA-36, typ PRL TA, nr 123723
- wirówka Centrifuge, typ MPW-360
- aparat cyfrowy Canon Power Shot A620
- narzędzia chirurgiczne (Chifa sp. z.o.o)
- strzykawka typu Hamiltona
- narzędzia do zdrapywania komórek z pow. hodowlanej – Cell Scraper (Becton Dickinson, Falcon)
- butelki Falcon 25 cm<sup>2</sup> (Becton Dickinson, Falcon)
- filtry sterylne 0,2 mm (Spectrolab)

##### **Odczynniki i substancje chemiczne:**

- medium hodowlane - Dulbecco's Modified Eagle Medium, (Invitrogen Corporation, Gibco)
- surowica cielęca – Fetal Calf Serum, (Invitrogen Corporation, Gibco)

- penicylina, (Invitrogen Corporation, Gibco)
- PBS (Biomed, Wytwórnia Surowic I Szczepionek, Lublin)
- bromodeoksyurydyna (BrdU), (Sigma-Aldrich)
- anty-BrdU Staining Kit, (Sigma-Aldrich)
- lektyny, (Sigma-Aldrich)
- hematoksylina, (Merck)
- trypsyna (Zymed)
- 3,3'diaminobezydyna (DAB), (Sigma-Aldrich)
- DPX, Natural Mounting Medium, (Sigma-Aldrich)
- paraformaldehyd, (Sigma-Aldrich)
- parafina, Paraplast embedding media, Paraplast regular, (Sigma-Aldrich)
- methanol pure 99.8% (POCH S.A. Gliwice)
- ketamina, (Biowet Puławy Sp. z.o.o.)
- xylozyna, (Biowet Puławy Sp. z.o.o.)
- morbital, (Biowet Puławy Sp. z.o.o.)

### **3.2. Zakładanie hodowli komórkowej**

Komórki szpikowe do 14 dniowej hodowli komórkowej *in vitro* pozyskiwano z kości udowych szczurów rasy Wistar, których wiek wynosił 3 miesiące, waga 250 - 300 g. Do założenia jednorazowego cyklu hodowlanego wykorzystywano jednego osobnika (*ryc.1, str. 34*). Łącznie pozyskano materiał z 18 osobników. Przed zabiegiem izolacji szpiku kostnego zwierzętom podawano dootrzewnowo letalną dawkę morbitalu w stężeniu 2 mg/kg masy ciała. Zabiegu pozyskania szpiku kostnego i założenia hodowli komórkowej dokonywano zawsze w godzinach 14<sup>00</sup>-16<sup>00</sup>. Zabieg

wykonywano w warunkach sterylnych. Narzędzia chirurgiczne sterylizowano w temp. 140°C, w sterylizatorze HS-60.

Pożywkę przygotowywano w warunkach sterylnych pod wyciągiem.

Skład pożywki – do przygotowania 100 ml medium hodowlanego użyto: 90 ml alfa-MEM (Sigma), 10 ml Fetal Calf Serum, penicylinę (stężenie w pożywce 120 j/ml). Narzędzia oraz naczynia sterylizowano w temp. 140°C.

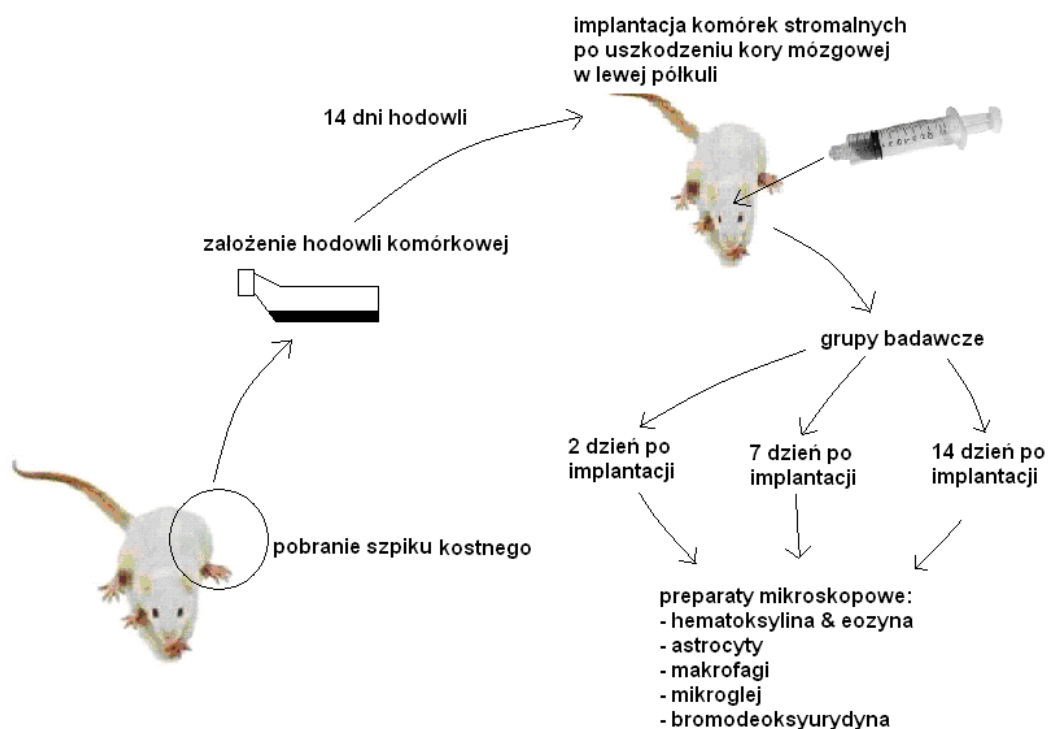
Roztwór zawiesiny komórek szpikowych z pożywką podawano po 10 ml do butelek Falcon. Hodowlę przenoszono do inkubatora. Hodowlę prowadzono w inkubatorze w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>, 98 – 99% wilgotności.

Po 48 godzinach zmieniano pożywkę. Podczas prowadzenia doświadczeń zmieniano pożywkę raz w tygodniu.

Na 48 godzin przed zakończeniem hodowli komórek dodawano do hodowli komórkowej bromodeoksyurydyny (BrdU, Sigma) w stężeniu 3 µg na 1 ml medium hodowlanego, w celu znakowania komórek podścieliska szpiku kostnego.

Po 14 dniach od założenia hodowli, po uzyskaniu jednowarstwowej struktury komórek, zdrapywano je przy pomocy narzędzia (cell scraper, BD Falcon) i przemywano naczynie hodowlane 5 ml PBS w stężeniu 0,1 M. Uzyskaną zawiesinę komórek wirowano z prędkością 2000 RPM w wirówce Centrifuge typ MPW-360. Komórki liczone w komorze Bürkera w 100 polach w powiększeniu 400-krotnym, wykorzystując mikroskop Jenamed Carl Zeis. Do przygotowania roztworu w celu podania w miejsce uszkodzenia w korze mózgowej zwierząt, stosowano rozcieńczenie komórek  $2 \times 10^6$  w 10 µl soli fizjologicznej.

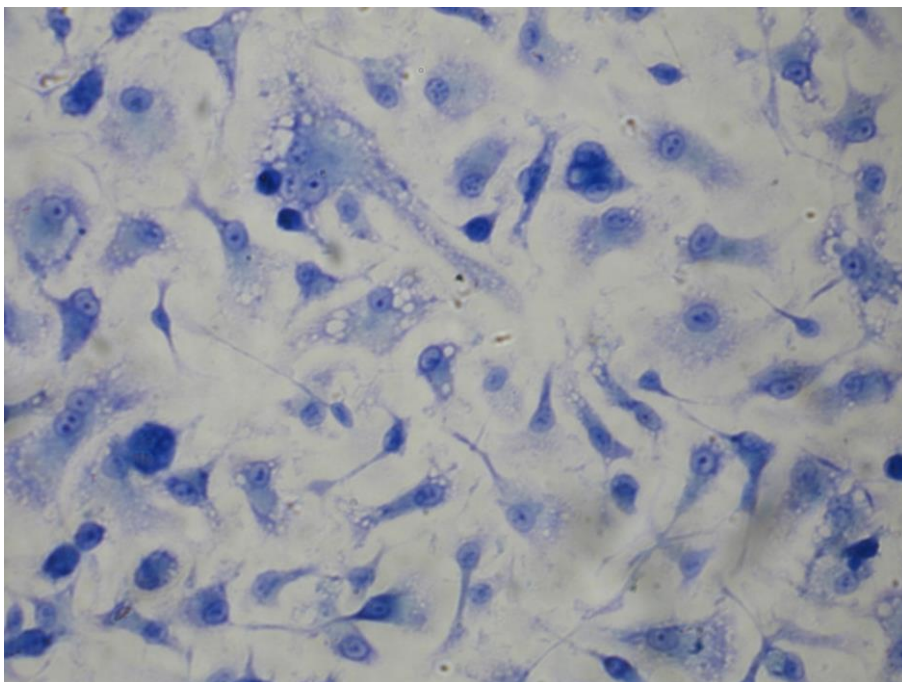
Wszystkie zabiegi wykonywano w warunkach sterylnych, wykorzystując sterylizator HS-60, oraz wyciąg Laminar POLON typ KC-21.



**Ryc.1 Schemat badania**

W celu dokumentacji hodowli komórkowej wykonano preparaty mikroskopowe z komórkami stromalnymi. Zastosowano standardowe barwienie metodą Wright-Giemsa (zdj. 1, str. 35).

Zabiegów izolacji szpiku kostnego, przygotowywania oraz prowadzenia hodowli komórkowej dokonywano w laboratorium Zakładu Hematologii Eksperymentalnej, Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego, przy ul. R. Ingardena 6 w Krakowie.



**zdjęcie nr 1**

Komórki podścieliska szpikowego w 14 dniu hodowli komórkowej (*powiększenie x 400, barwienie metodą Wright-Giemsa*).

### **3.3. Zwierzęta doświadczalne**

Do przeprowadzonych badań wykorzystywano szczury rasy Wistar, których wiek wynosił 3 miesiące, waga 250 - 300 g. Zwierzęta hodowane były ze swobodnym dostępem do wody i pożywienia w dwunastogodzinnym cyklu dnia i nocy. Zwierzęta podzielono na dwie podstawowe grupy: kontrolną i badawczą. Przebadano również tkankę mózgową nieuszkodzoną tworząc dodatkową grupę kontrolną składającą się ze zdrowych osobników.

W grupie badawczej wyodrębniono podgrupy:

**BI** – 6 osobników, którym do kory mózgowej, w miejsce uszkodzenia podane zostały komórki stromalne pochodzące z 14-dniowej hodowli *in vitro* w inkubatorze. Szczurom z tej grupy pobrano z miejsca uszkodzenia próbki tkanki mózgowej do

dalszych badań w 2 dniu od implantacji komórek stromalnych (**grupa badawcza 2-dniowa**).

**BII** - 6 osobników, którym do kory mózgowej, w miejsce uszkodzenia podane zostały komórki stromalne pochodzące z 14-dniowej hodowli *in vitro* w inkubatorze. Szczurom z tej grupy pobrano z miejsca uszkodzenia próbki tkanki mózgowej do dalszych badań w 7 dniu od implantacji komórek stromalnych (**grupa badawcza 7-dniowa**).

**BIII** - 6 osobników, którym do kory mózgowej, w miejsce uszkodzenia podane zostały komórki stromalne pochodzące z 14-dniowej hodowli *in vitro* w inkubatorze. Szczurom z tej grupy pobrano z miejsca uszkodzenia próbki tkanki mózgowej do dalszych badań w 14 dniu od implantacji komórek stromalnych (**grupa badawcza 14 dniowa**).

Komórki stromalne zawieszono w roztworze soli fizjologicznej, w objętości i stężeniu  $2 \times 10^6$  w 10  $\mu\text{l}$ .

W grupie kontrolnej wyodrębniono podgrupy:

**KIV** – 6 osobników, którym do kory mózgowej, w miejsce uszkodzenia podano sól fizjologiczną w objętości 10  $\mu\text{l}$ . Zwierzętom tej grupy pobrano materiał z miejsca uszkodzenia do dalszych badań w 2 dniu od wykonania uszkodzenia (**grupa kontrolna 2 dniowa**).

**KV** – 6 osobników, którym do kory mózgowej, w miejsce uszkodzenia podano sól fizjologiczną w objętości 10  $\mu\text{l}$ . Zwierzętom tej grupy pobrano materiał z miejsca uszkodzenia do dalszych badań w 7 dniu od wykonania uszkodzenia (**grupa kontrolna 7 dniowa**).



**KVI** – 6 osobników, którym do kory mózgowej, w miejsce uszkodzenia podano sól fizjologiczną w objętości 10  $\mu$ l. Zwierzętom tej grupy pobrano materiał z miejsca uszkodzenia do dalszych badań w 14 dniu od wykonania uszkodzenia (**grupa kontrolna 14 dniowa**).

W dodatkowej grupie kontrolnej wyodrębniono podgrupę:

**NI** – 6 osobników, u których nie wykonywano uszkodzenia kory mózgowej i pobierano im tkankę mózgową do dalszych badań (**grupa kontrolna – norma**).

Na przeprowadzenie niniejszych badań otrzymano zezwolenie Lokalnej Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 14 04 2003 r.

### **3.4. Wykonanie uszkodzenia kory mózgowej i domózgowe podanie komórek stromalnych**

Podczas zabiegów zachowywano warunki sterylne, wykorzystując sterylne narzędzia chirurgiczne, oraz wysterylizowane pole operacyjne. Zabiegi wykonywano pod wyciągiem. Operacji uszkodzenia mózgu dokonywano w głębokiej narkozie z zastosowaniem środka usypiającego o objętości 1 ml/kg masy ciała. Do usypiania zwierząt używano mieszanki następujących substancji, w proporcjach: 0,35 ml ketamina + 0,25 ml xylozyna + 0,40 ml sól fizjologiczna. Uszkodzenie wykonywano na powierzchni lewej półkuli mózgowej, w połowie linii przebiegającej między oczodołami a podstawą małżowin usznych, w odległości 3 mm od szwu strzałkowego. Przy pomocy wiertła dentystycznego (z ogranicznikiem) o średnicy 1 mm dokonywano uszkodzenia na głębokość 2 mm.

Bezpośrednio po wykonaniu uszkodzenia kory mózgowej, dokonywano iniekcji zawiesiny komórek stromalnych do tkanki mózgowej przy pomocy strzykawki typu Hamiltona. Komórki te w ilości  $2 \times 10^6$  i objętości 10  $\mu$ l soli fizjologicznej podawano do miejsca uszkodzenia w korze mózgowej. Zwierzętom z grupy kontrolnej poddanych tej samej procedurze wykonania uszkodzenia podawano przy pomocy strzykawki typu Hamiltona w miejsce uszkodzenia 10  $\mu$ l soli fizjologicznej. Zabiegu uszkodzenia i domózgowego podania komórek stromalnych dokonywano zawsze w godzinach 14<sup>00</sup>-16<sup>00</sup>. Zabiegi wykonywano w laboratorium Zakładu Hematologii Eksperymentalnej, Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego, przy ul. R. Ingardena 6 w Krakowie.

### **3.5. Pobieranie tkanki mózgowej do badań**

Po upływie 2, 7 i 14 dni od wykonania uszkodzenia podawano dootrzewnowo zwierzętom z grupy badawczej i kontrolnej letalną dawkę morbitalu w stężeniu 2 mg/kg masy ciała. Wycinano fragment lewej półkuli mózgowej z obszarem otaczającym uszkodzenie w obszarze 4 mm od miejsca urazu w każdym kierunku. Wyizolowaną tkankę utrwalało natychmiast w 4% roztworze paraformaldehydu (Sigma) o pH 7,4. Przygotowaną tkankę zatapiało w parafinie i krajało w płaszczyźnie strzałkowej na skrawki o grubości 7  $\mu$ m.

### **3.6. Badania tkanki mózgowej**

#### **Barwienie histologiczne**

Otrzymane skrawki z górnej warstwy uszkodzenia (do 400  $\mu$ m) barwiono standardową metodą hematoksylina i eozyna. Po barwieniu skrawki odwadniano, prześwietlono w ksylenie i zaklejało DePeX (Natural Mounting Medium, Sigma-Aldrich).

Obserwacje tak przygotowanych skrawków przeprowadzano pod mikroskopem świetlnym. Wykorzystywano mikroskop Leica DMR. Oceny histologicznej dokonał wyspecjalizowany histolog z Zakładu Hematologii Eksperymentalnej, Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego, przy ul. R. Ingardena 6 w Krakowie.

### **Barwienie immunocytochemiczne na obecność astrocytów**

Skrawki z środkowej części uszkodzenia (od 400  $\mu\text{m}$  do 800  $\mu\text{m}$ ) barwiono w celu wykrycia białka specyficznego dla astrocytów – GFAP (ang. glial fibrillary acidic protein).

Po odparafinowaniu skrawki płukano w buforze Tris, inkubowano przez noc z króliczym przeciwciałem anti-GFAP (w proporcji 1:200) w temperaturze 4°C. Po kolejnym płukaniu inkubowano skrawki z kozim przeciwciałem drugorzędowym przeciw króliczej IgG (w proporcji 1:100) przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Następnie wykonano kolejne płukanie i inkubację z kompleksem peroksydaza-anty-peroksydaza (PAP) (w proporcji 1:200) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Do wizualizacji komórek użyto 0,05% 3,3'-diaminobezydyna (DAB, Sigma) z dodatkiem 0,015%  $\text{H}_2\text{O}_2$ . W wyniku reakcji powstawało brązowe zabarwienie komórek. Jądra komórek podbarwiano hematoksyliną Harris'a (Merck). Przeciwciała rozcieńczano przy użyciu buforu Tris z dodatkiem Trytonu X-100 (Sigma Aldrich).

W celu sprawdzenia specyfiki reakcji negatywne skrawki kontrolne poddawano tej samej procedurze ale bez użycia pierwszorzędowego przeciwciała (anty-GFAP).

Obserwacje tak przygotowanych skrawków przeprowadzano pod mikroskopem świetlnym. Wykorzystywano mikroskop Jenamed Carl Zeis. Badania prowadzone były w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej, Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego, przy ul. R. Ingardena 6 w Krakowie.

### **Barwienie histochemiczne na obecność makrofagów/mikrogleju**

Wykorzystano do barwienia lektyny Isolectin B<sub>4</sub> (BSI – B<sub>4</sub>) z *Bandeirea simplicifolia*, sprzężone z peroksydazą (Sigma). Stężenie lektyn wynosiło 10 µg/1 ml buforu Tris.

Otrzymane skrawki z środkowej części uszkodzenia (od 400 µm do 800 µm) po odparafinowaniu płukano w buforze Tris i inkubowano z lektynami w komorze wilgotnej przez noc w temperaturze 4°C. Następnie płukano w buforze Tris i nakładano 3,3'diaminobezydyna (DAB) (Sigma) w stężeniu 0,05%, jako substrat dla peroksydazy, z dodatkiem 0,015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Jądra komórek podbarwiano hematoksyliną Harris'a (Merck). Obserwacje tak przygotowanych skrawków przeprowadzano pod mikroskopem świetlnym. Wykorzystywano mikroskop Jenamed Carl Zeis.

Badania prowadzone były w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej, Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego, przy ul. R. Ingardena 6 w Krakowie.

### **Barwienie na obecność bromodeoksyurydyny (BrdU)**

Skrawki ( z warstw od 300 µm do 700 µm ) barwiono używając anty-BrdU Staining Kit (firmy Zymed) zgodnie z podanym protokołem w celu wykrycia wyznakowanych komórek podścieliska szpiku kostnego na obszarze uszkodzenia.

Odparafinowane skrawki zanurzano w roztworze blokującym wewnętrzną peroksydazę stosując 30% roztwór H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w metanolu 99,8% (Poch S.A.), a następnie płukano w PBS 0,1 M. Kolejno skrawki pokrywano trypsyną na 10 min. Po wypłukaniu w wodzie destylowanej nakładano roztwór denaturujący na 30 minut. BrdU wykrywano za pomocą mysiego przeciwciała anty-BrdU. W celu wykrycia reakcji stosowano kompleks streptawidyna-peroksydaza. Dla wizualizacji komórek użyto 3,3'diaminobezydyna (DAB) w stężeniu 0,05%. Jądra komórek podbarwiano

hematoksyliną Harris'a (Merck). Obserwacje tak przygotowanych skrawków przeprowadzano pod mikroskopem świetlnym. Wykorzystywano mikroskop Leica DMR.

Badania prowadzone były w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej, Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego, przy ul. R. Ingardena 6 w Krakowie.

### **3.7. Badanie mikroskopowe**

Obserwacje przeprowadzono używając mikroskopu świetlnego Jenamed analizując preparaty z mózgu każdego zwierzęcia hodowlanego, w każdym rodzaju barwienia (barwienie histologiczne, barwienie na obecność astrocytów, barwienie na obecność makrofagów i mikrogleju). Liczono astrocyty, makrofagi i mikroglej. Obserwowane preparaty zaślepiono.

Obserwacji dokonywano wokół miejsca uszkodzenia na powierzchni 7 mm<sup>2</sup>. Liczono komórki w polu okularu mikroskopu o wymiarach 220 µm na 155 µm. Na każdym skrawku liczono 200 pól o tym rozmiarze.

Dokumentację fotograficzną preparatów wykonano korzystając z mikroskopu Leica DMR, połączonego pierścieniem centrującym z aparatem cyfrowym Canon Power Shot A620. Zdjęcia wykonywano pod powiększeniem 100,200 i 400-krotnym. Dane cyfrowe katalogowano w formacie JPG.

Badania prowadzone były w Zakładzie Hematologii Eksperymentalnej, Katedry Fizjologii Zwierząt Uniwersytetu Jagiellońskiego, przy ul. R. Ingardena 6 w Krakowie.

### **3.8. Analiza statystyczna**

Analizy statystycznej dokonano korzystając z programu Statistica 6.0 oraz z programu Microsoft Excel. Obliczono średnią w grupach badawczych i kontrolnych. W analizie statystycznej wykorzystano test t-Studenta, obliczając odchylenie

standardowe oraz oznaczając poziom znamienności statystycznej na poziomie  $p < 0,05$  pomiędzy grupami badawczymi i kontrolnymi.

Dla zobrazowania dynamiki zmian w poszczególnych grupach komórkowych obliczono różnicę procentową pomiędzy ilością komórek w grupie badawczej i kontrolnej.

Dane przedstawiono na wykresach słupkowych i liniowych.

## 4.Opis wyników badań

### 4.1 Drugi dzień po urazie

W obrazie mikroskopowym na preparatach barwionych metodą hematoksylina & eozyna widoczny w grupie badawczej po dwóch dniach od urazu wyraźny ubytek tkanki mózgowej w warstwie korowej, zarówno w grupie badawczej jak i grupie kontrolnej. W grupie kontrolnej widoczne uszkodzenie pooperacyjne z licznymi erytrocytami, między nimi widoczne również nieliczne leukocyty. W świetle uszkodzenia obecne fragment uszkodzonej tkanki mózgowej (*zdj. 2*). W preparatach grupy badawczej w obszarze uszkodzenia poddanego iniekcji zawiesiny komórek stromalnych obecne liczne erytrocyty, wraz z fragmentami uszkodzonej tkanki mózgu. Zaobserwowano występowanie nielicznych komórek podścieliska szpikowego na obrzeżach rany. Sąsiadująca z uszkodzeniem tkanka mózgowa bez cech widocznej odpowiedzi immunologicznej (*zdj. 3*).

Obserwując preparaty mikroskopowe pod powiększeniem 400 x zaobserwowano zachowane żywe komórki podścieliska z przewagą komórek o kształcie bigonalnym. Wyraźne na obrzeżach uszkodzenia włókna fibryny. Dobrze zaznaczony kształt makrofagów obecnych w polu uszkodzenia. Widoczna zawiesina komórek podścieliska w płynie tkankowym w ubytku pooperacyjnym (*zdj. 4*). W rejonie uszkodzenia widoczne komórki podścieliska szpikowego oznaczone w hodowli bromodeoksyurydyną (*zdj. 5*).

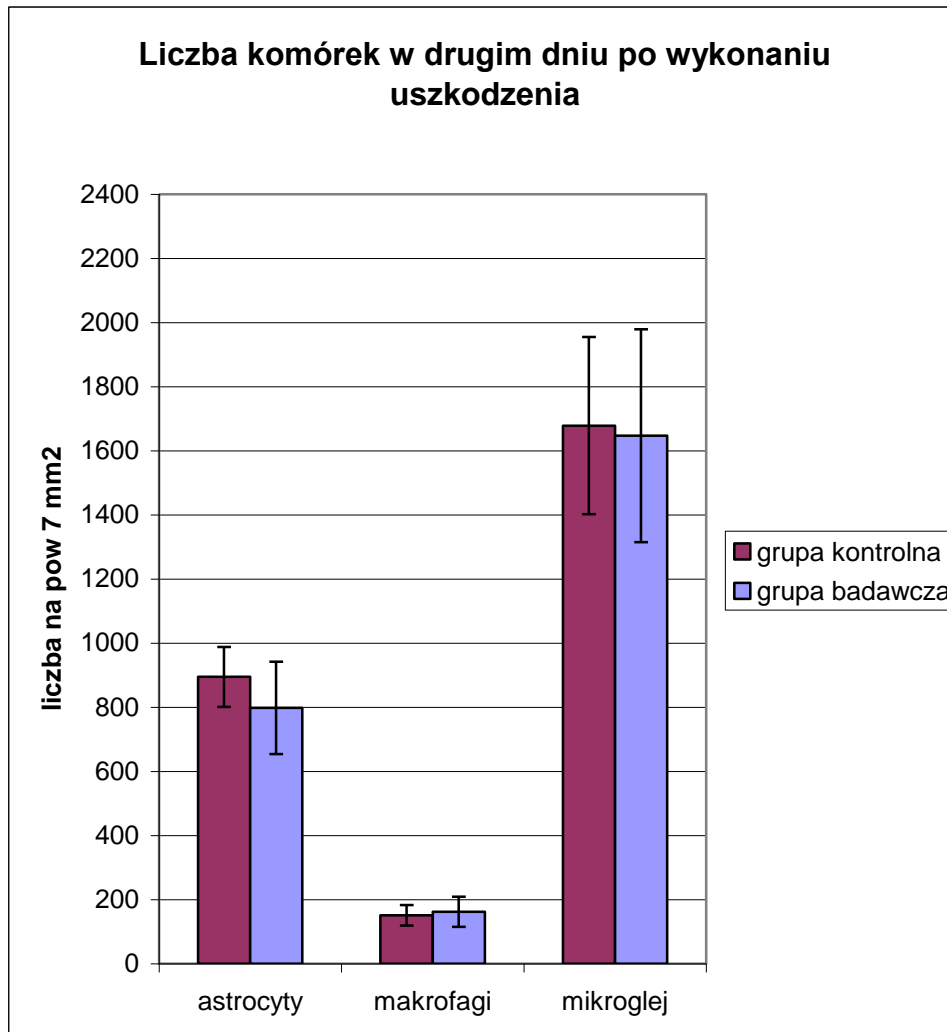
W preparatach mikroskopowych barwionych w kierunku obecności makrofagów/mikrogleju obserwowano w drugim dniu po urazie również duży ubytek pooperacyjny. W grupie kontrolnej stwierdzono obecne w sąsiedztwie uszkodzenia

liczne makrofagi pochodzenia endogennego, przekształcone prawdopodobnie z komórek mikrogleju (*zdj. 6*). Natomiast w preparatach grupy badawczej były widoczne wokół uszkodzenia liczne skupiska makrofagów o charakterze rozproszonym, duża liczba widocznych erytrocytów, jak również nieliczne leukocyty. Można było zaobserwować w tym obszarze fragmenty tkanki mózgowej z penetrującymi makrofagami (*zdj. 7*). Średnia liczba makrofagów liczona na powierzchni  $7 \text{ mm}^2$  była najwyższa w drugim dniu po dokonaniu urazu i wynosiła: w grupie kontrolnej –  $151,11 \pm 31,79$ , natomiast w grupie badawczej –  $162,22 \pm 47,22$ . Nie stwierdzono natomiast pomiędzy wynikiem grupy kontrolnej i badawczej różnicy znamiennej statystycznie na poziomie makrofagów  $p < 0,05$  (*ryc. 2*). Średnia liczba komórek mikrogleju liczona wokół uszkodzenia na powierzchni  $7 \text{ mm}^2$ , w drugim dniu od uszkodzenia wynosiła  $1678,20 \pm 276,36$  w grupie kontrolnej i  $1647,00 \pm 331,92$  w grupie badawczej. Nie wykazano istotności statystycznej (*ryc. 2*).

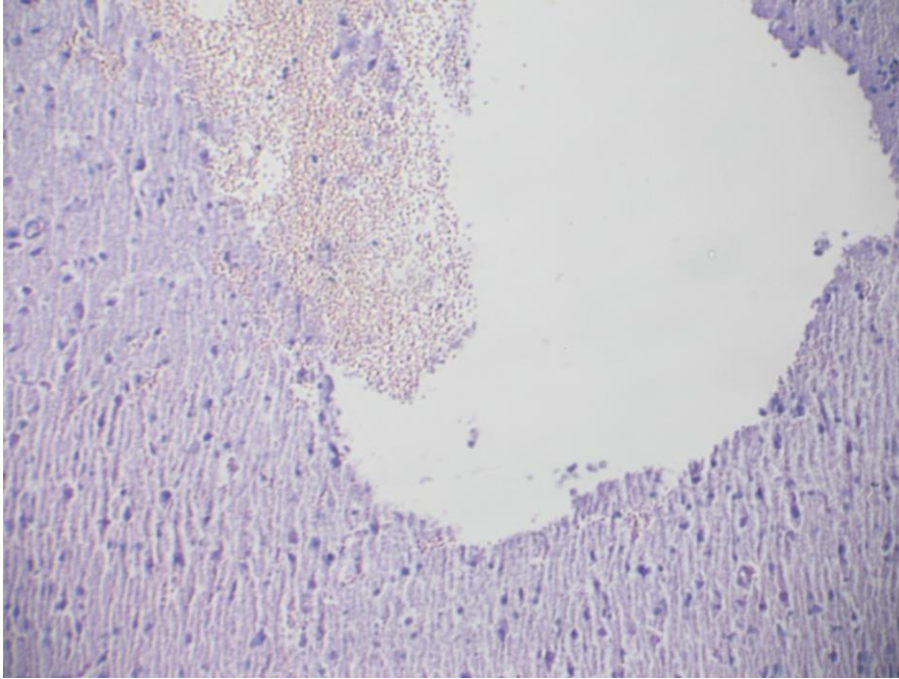
Preparaty mikroskopowe barwione na obecność astrocytów pozwalają zaobserwować w grupie badawczej i kontrolnej wokół ubytku tkanki mózgowej charakterystyczne przejaśnienie (halo). W grupie kontrolnej w pobliżu uszkodzenia stwierdzono nieliczne astrocyty włóknkowe. Brak było wyraźnej granicy występowania astrocytów. W świetle uszkodzenia obecne są erytrocyty (*zdj. 8*). W grupie badawczej w miejscu uszkodzenia i podania komórek stromalnych brak było widocznych astrocytów. W części obwodowej uszkodzenia można zauważyć liczne astrocyty protoplazmatyczne (*zdj. 9*). W pobliżu ubytku zaobserwowano nieliczne astrocyty, kształtem przypominające astrocyty włóknkowe. Na kilku preparatach pod dużym powiększeniem w polu widzenia ubytku, widoczne bardzo nieliczne komórki podścieliska szpikowego. W sąsiadującej, nieuszkodzonej tkance



mózgowej obecne naczynia krwionośne wypełnione erytrocytami (zdj. 10). Średnia liczba astrocytów liczona na powierzchni 7 mm<sup>2</sup> wokół miejsca uszkodzenia wynosiła w grupie kontrolnej 894,58 ± 93,90, a w grupie badawczej 798,11 ± 144,22. Nie stwierdzono różnicy znamiennej statystycznie p < 0,05 (ryc. 2).



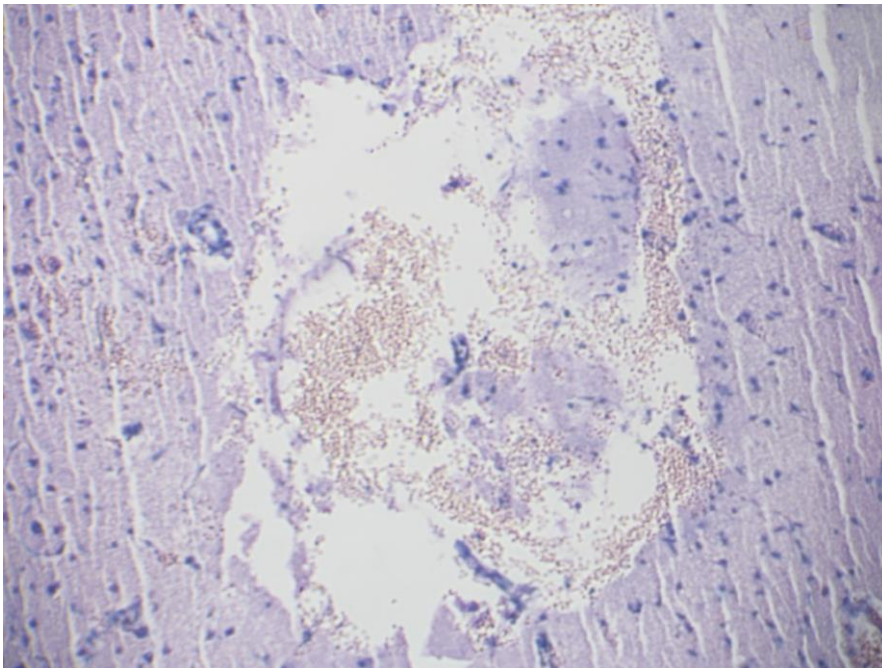
**Ryc. 2** Porównanie liczby astrocytów, makrofagów i mikrogleju w grupach kontrolnych i badawczych w 2 dni po wykonaniu uszkodzenia w korze mózgowej szczurów. Komórki zostały policzone na obszarze 7 mm<sup>2</sup> wokół miejsca urazu.



**zdjęcie nr 2**

**Drugi dzień po urazie – grupa kontrolna**

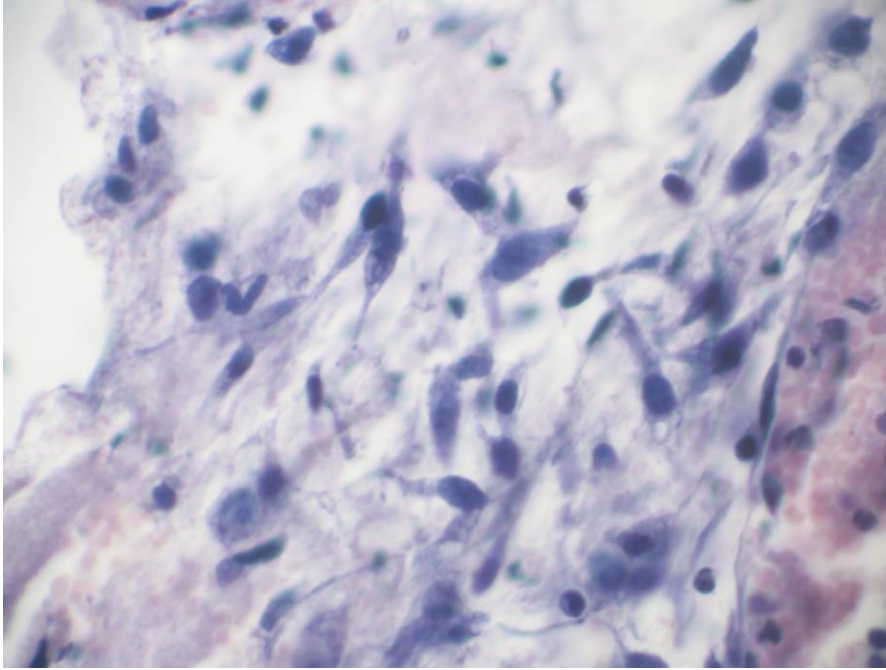
Widoczne uszkodzenie pooperacyjne z licznymi erytrocytami, między nimi widoczne nieliczne leukocyty. W świetle uszkodzenia obecne fragmenty uszkodzonej tkanki mózgowej (*powiększenie x 200, barwienie metodą hematoksylina & eozyna*).



**zdjęcie nr 3**

**Drugi dzień po urazie – grupa badawcza**

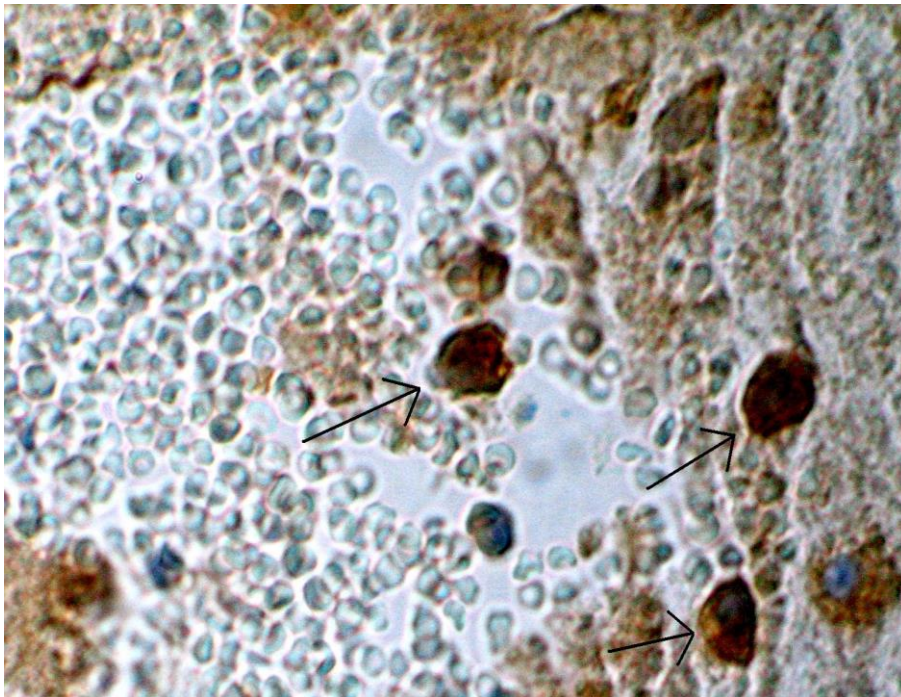
Widoczny ubytek tkanki w warstwie korowej: obecne liczne erytrocyty, wraz z fragmentami uszkodzonego mózgu, występują nieliczne komórki podścieliska szpikowego. Sąsiadująca z uszkodzeniem tkanka mózgowa bez widocznej odpowiedzi immunologicznej (*powiększenie x 200, barwienie metodą hematoksylina & eozyna*).



zdjęcie nr 4

#### Drugi dzień po urazie – grupa badawcza

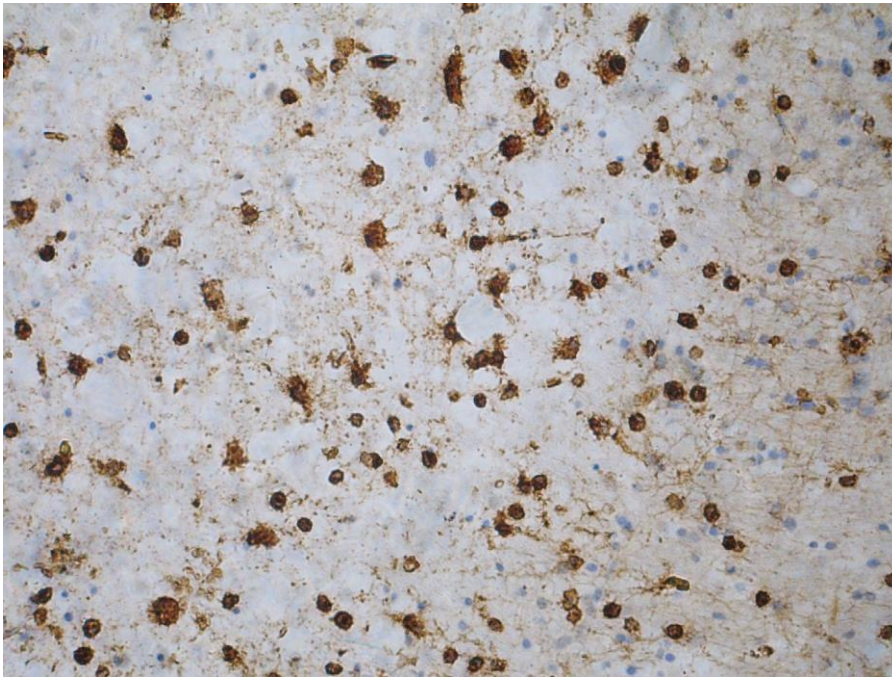
Zachowane żywe komórki podścieliska, wyraźne włókna fibryny, dominują komórki o kształcie bigonalnym. Wyraźnie zaznaczony kształt makrofagów, widoczna zawiesina komórek podścieliska w płynie tkankowym w ubytku pooperacyjnym (powiększenie x 400, barwienie metodą hematoksylina & eozyna).



zdjęcie nr 5

#### Drugi dzień po urazie – grupa badawcza

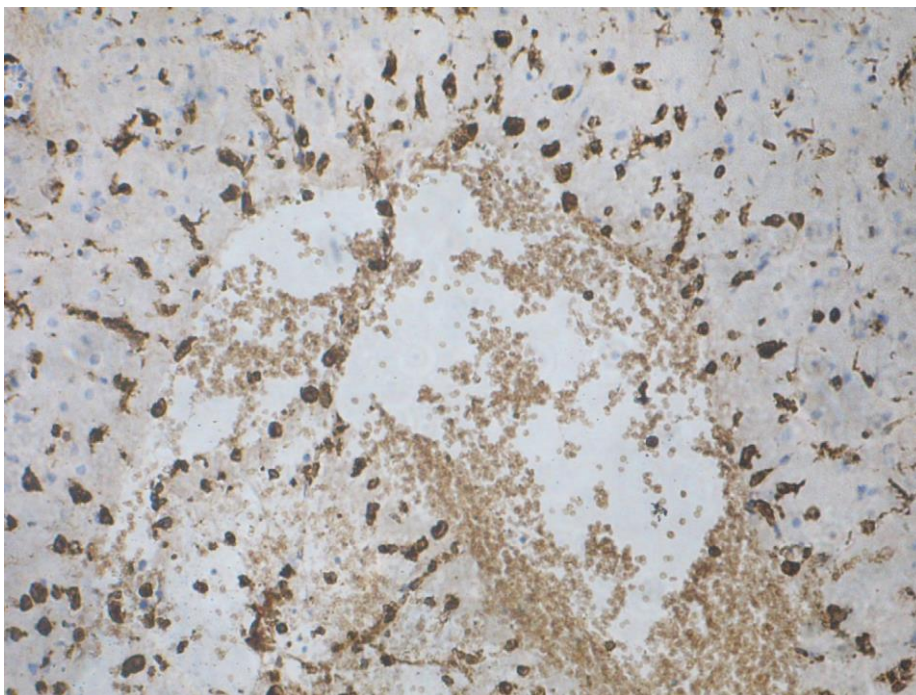
Obecne w rejonie uszkodzenia komórki podścieliska szpikowego oznaczone w hodowli bromodeoksyurydyną ( komórki zaznaczono strzałkami na zdjęciu) (powiększenie x 400, barwienie na obecność bromodeoksyurydyny - BrdU).



**zdjęcie nr 6**

#### **Drugi dzień po urazie – grupa kontrolna**

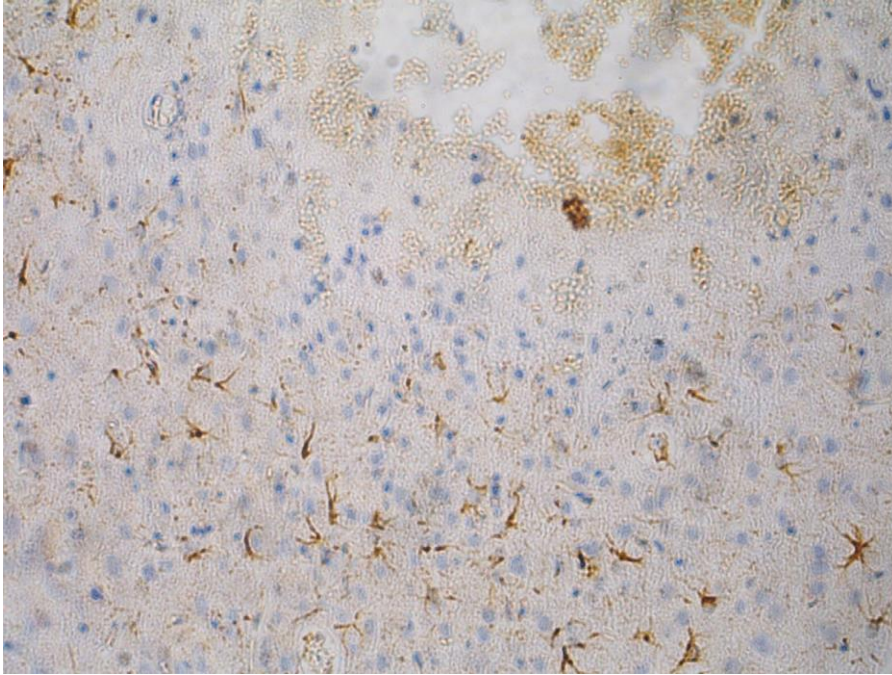
Liczne makrofagi pochodzenia endogennego, przekształcone z komórek mikrogleju, w sąsiedztwie uszkodzenia. Na zdjęciu niewidoczny pooperacyjny ubytek kory mózgowej, (*powiększenie x 200, barwienie na obecność makrofagów/mikrogleju*).



**zdjęcie nr 7**

#### **Drugi dzień po urazie – grupa badawcza**

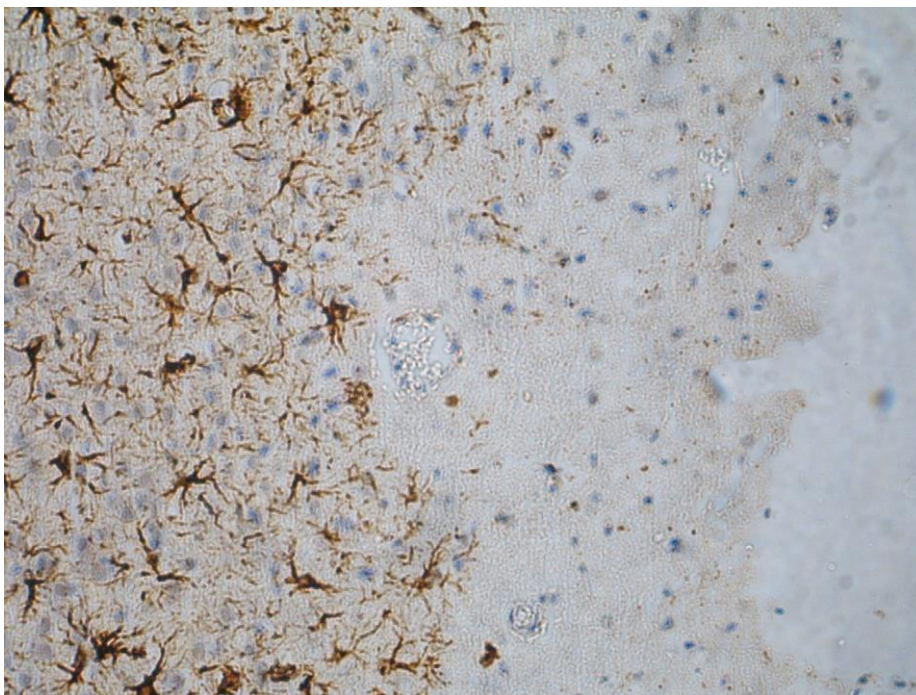
Duże uszkodzenie: po lewej stronie widoczny fragment tkanki mózgowej z penetrującymi makrofagami, wokół uszkodzenia skupisko makrofagów o charakterze rozproszonym, dużo widocznych erytrocytów, nieliczne leukocyty (*powiększenie x 200, barwienie na obecność makrofagów/mikrogleju*).



**zdjęcie nr 8**

**Drugi dzień po urazie – grupa kontrolna**

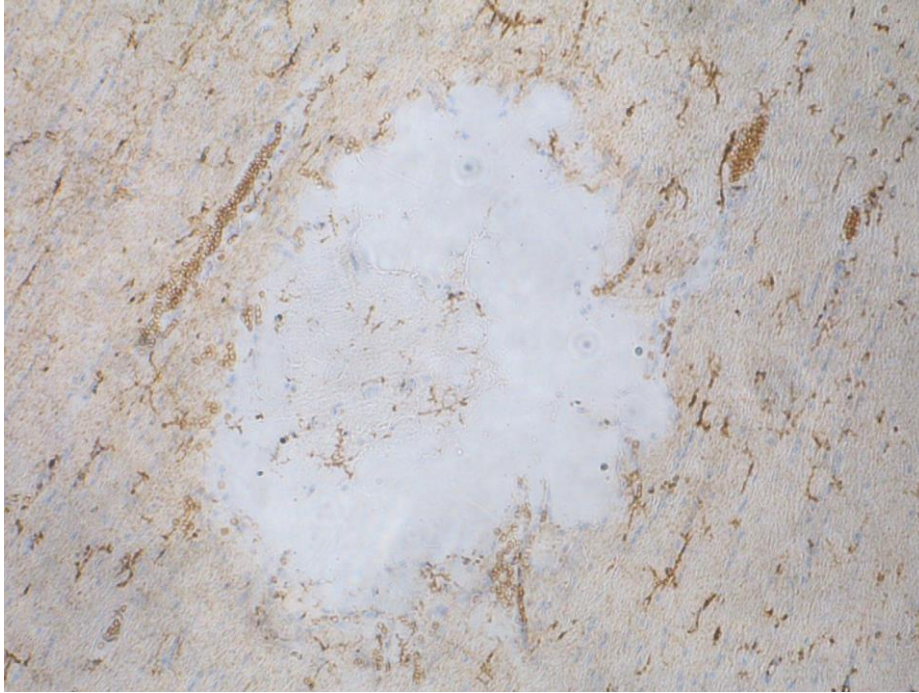
Lekkie przejaśnienie tkanki wokół uszkodzenia stanowiące fragment halo, nieliczne astrocyty, erythrocyty w świetle uszkodzenia (*powiększenie x 200, barwienie na obecność astrocytów*).



**zdjęcie nr 9**

**Drugi dzień po urazie – grupa badawcza**

W obrazie ubytku tkanki mózgowej widoczne halo (przejaśnienie) wokół miejsca uszkodzenia, w tym miejscu brak astrocytów. W części obwodowej uszkodzenia widoczne astrocyty (*powiększenie x 400, barwienie na obecność astrocytów*).



**zdjęcie nr 10**

**Drugi dzień po urazie – grupa badawcza**

W pobliżu ubytku nieliczne astrocyty, w polu widzenia ubytku widoczne bardzo nieliczne komórki podścieliska szpikowego. W sąsiadującej, nieuszkodzonej tkance mózgowej obecne naczynia krwionośne wypełnione erytrocytami (*powiększenie x 200, barwienie na obecność astrocytów*).

## 4.2 Siódmy dzień po urazie

W siódmym dniu po urazie, podczas obserwacji preparatów tkanki mózgowej barwionych metodą hematoksylina & eozyna widoczne były na preparatach pobranych od grupy kontrolnej tylko fragmenty tkanki bliznowatej nieregularnie otaczające ubytek. W świetle uszkodzenia można zaobserwować utrzymujące się skrzepy oraz erytrocyty o zatartej strukturze (*zdj. 11*). Natomiast w grupie badawczej doszło do penetracji komórek podścieliska szpikowego w tkankę mózgową otaczającą miejsce uszkodzenia. W tkance okalającej ubytek w preparatach grupy badawczej były widoczne liczne, wyraźnie zaznaczone w porównaniu z grupą kontrolną, prawdopodobnie nowe naczynia kapilarne (*zdj. 12*). Naczyń takich nie obserwowano w grupie kontrolnej (*zdj. 11*). Wokół uszkodzenia i wewnątrz miejsca urazu formuje się wyraźnie młoda łącznotkankowa blizna (*zdj. 12*). W obrębie tworzącej się blizny widoczne komórki podścieliska szpikowego oznaczone w hodowli bromodeoksyurydyną (*zdj. 13*).

Barwienie w kierunku obecności makrofagów i mikrogleju uwidocznilo w grupie kontrolnej w siódmym dniu po urazie obecność makrofagów wokół miejsca uszkodzenia. Zaobserwowano tendencję do tworzenia blizny. Na obwodzie uszkodzenia występują nieliczne makrofagi, natomiast brak ich w miejscu dokonania urazu (*zdj. 14*). W grupie badawczej zaobserwowano w miejscu uszkodzenia liczne makrofagi wypełniające światło powstającej blizny. Również wokół uszkodzenia widać było duże skupisko makrofagów (*zdj. 15*).

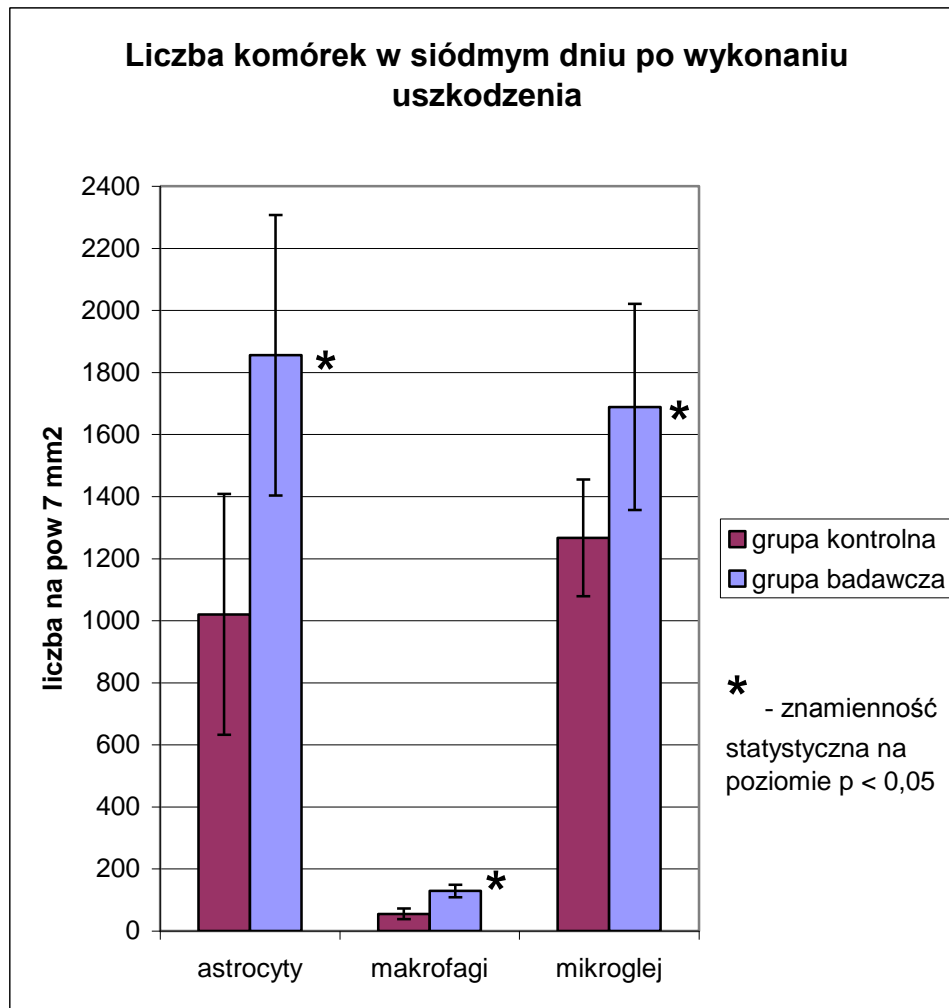
W siódmym dniu po dokonaniu urazu liczba makrofagów w tkance mózgowej wyraźnie się zmniejszyła. Wyraźny spadek ich średniej ilości widać w grupie kontrolnej, gdzie na powierzchni 7 mm<sup>2</sup> zaobserwowano je w ilości 54,94 ± 17,11.

W grupie badawczej komórki te na tej samej powierzchni występowały w ilości  $128,72 \pm 19,86$ . Różnica pomiędzy wynikiem grupy kontrolnej a badawczej wykazuje znamienność statystyczną w teście t-Studenta na poziomie  $p < 0,05$  (ryc. 3).

Średnia ilość komórek mikrogleju w siódmym dniu po dokonaniu urazu w grupie kontrolnej to  $1266,37 \pm 188,15$  i zaznaczony jest niewielki spadek ich ilości w porównaniu do drugiego dnia po urazie. W grupie badawczej zanotowano natomiast wzrost ich ilości w porównaniu do wcześniejszego pomiaru. Średnia ilość komórek mikrogleju wynosiła  $1688,41 \pm 331,98$ . Różnica pomiędzy wynikiem grupy kontrolnej a badawczej liczona testem t-Studenta jest znamienna statystycznie na poziomie  $p < 0,05$  (ryc. 3).

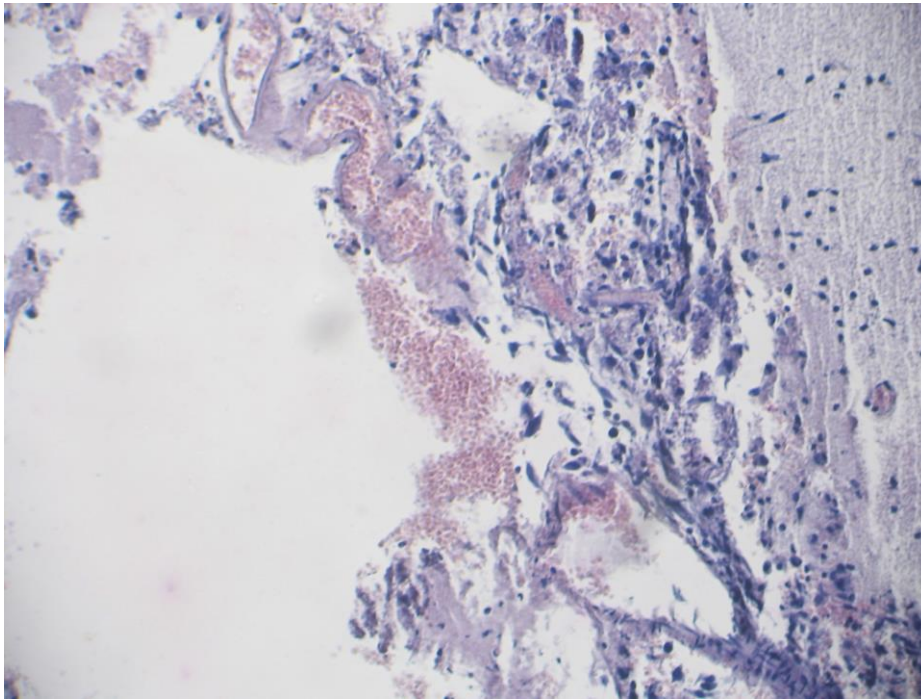
Preparaty mikroskopowe barwione na obecność astrocytów pozwalają zaobserwować liczne astrocyty na obrzeżu uszkodzenia zarówno w grupie badawczej jak i kontrolnej. W grupie kontrolnej w tworzącej się bliźnie nie zaobserwowano astrocytów. Wokół uszkodzenia, w tkance mózgowej widoczne były liczne astrocyty protoplazmatyczne i włóknikowe (zdj. 16). W preparatach grupy badawczej astrocyty występowały w bliźnie, w miejscu uszkodzenia i w miejscu implantacji komórek stromalnych. Obecna była również młoda tkanka bliznowata bez penetrujących astrocytów. Na preparatach widoczne astrocyty protoplazmatyczne i włóknikowe (zdj. 17). W siódmym dniu od dokonania urazu średnia ilość astrocytów wokół uszkodzonej tkanki mózgowej w grupie kontrolnej wynosiła  $1019,76 \pm 387,94$ . W grupie badawczej nastąpił istotny wzrost ich ilości do wartości  $1855,11 \pm 451,93$ . Pomiedzy wynikiem grupy kontrolnej a badawczej wykazano w teście t-Studenta istotność statystyczną na poziomie  $p < 0,05$  (ryc. 3).





**Ryc. 3** Porównanie liczby astrocytów, makrofagów i mikrogleju w grupach kontrolnych i badawczych w 7 dniu po wykonaniu uszkodzenia w korze mózgowej szczurów. Komórki zostały policzone na obszarze  $7 \text{ mm}^2$  wokół miejsca urazu.

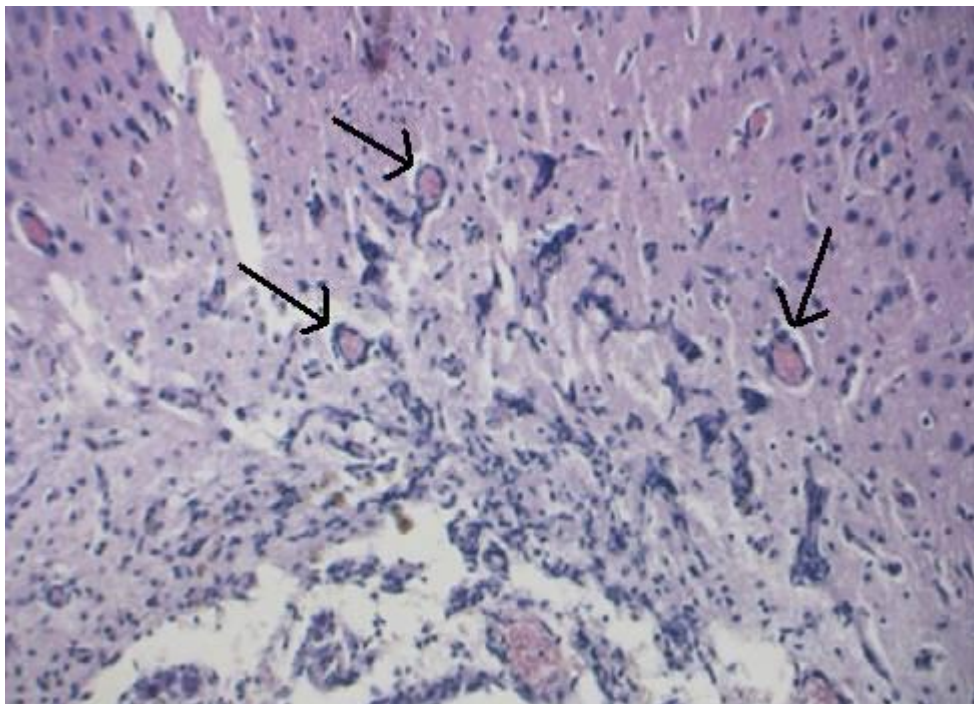
Gwiazdka (\*) oznacza wartość znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ) wyższą od wartości stwierdzonej w grupie kontrolnej.



zdjęcie nr 11

#### **Siódmy dzień po urazie – grupa kontrolna**

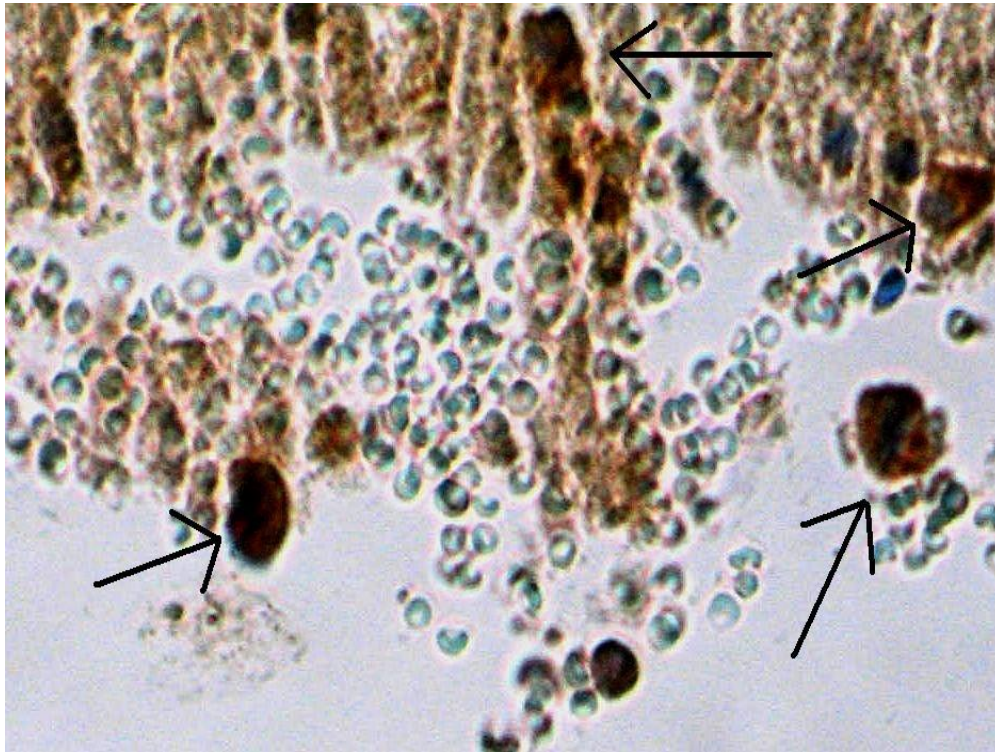
Utrzymujący się skrzep w świetle ubytku: erytrocyty o zatartej strukturze, częściowo zhemolizowane, fragmenty tkanki bliznowatej, nieregularnie otaczającej ubytek (powiększenie x 200, barwienie metodą hematoksylina & eozyna).



zdjęcie nr 12

#### **Siódmy dzień po urazie – grupa badawcza**

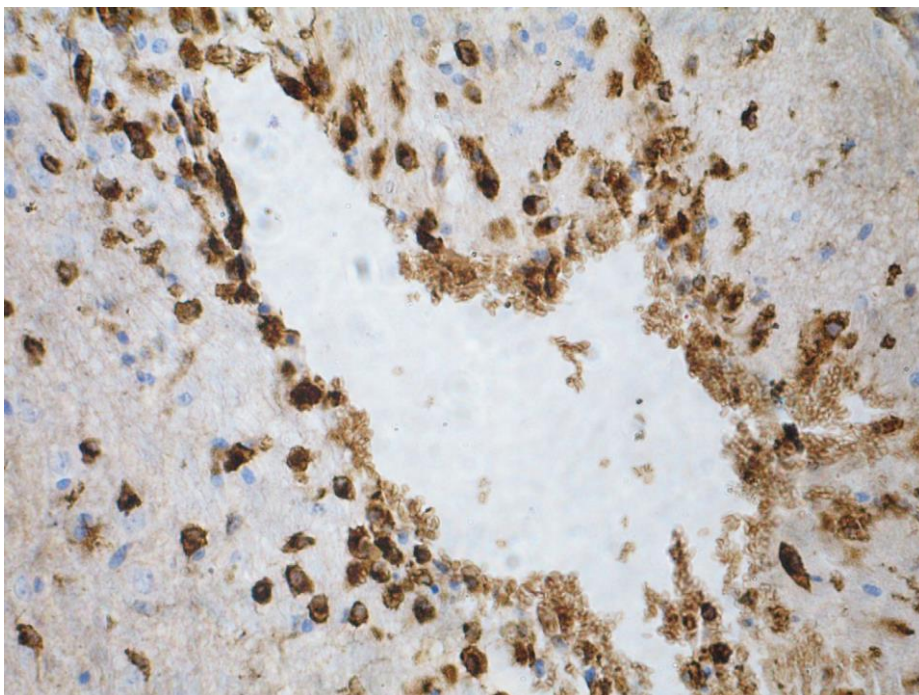
Penetracja komórek podścieliska szpikowego w tkankę mózgową otaczającą miejsce uszkodzenia. W tkance okalającej ubytek liczne naczynia kapilarne (oznaczone strzałkami). Wokół uszkodzenia widoczna tworząca się młoda łącznotkankowa blizna (powiększenie x 400, barwienie metodą hematoksylina & eozyna).



zdjęcie nr 13

**Siódmy dzień po urazie – grupa badawcza**

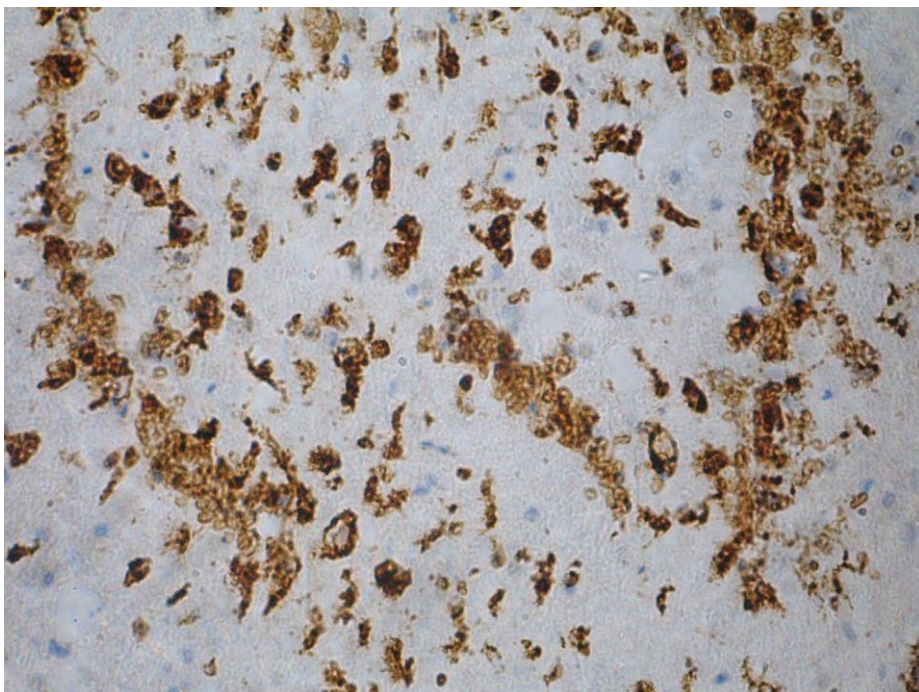
Obecne w rejonie uszkodzenia komórki podścieliska szpikowego oznaczone w hodowli bromodeoksyurydyną ( komórki zaznaczono strzałkami na zdjęciu) (powiększenie x 400, barwienie na obecność bromodeoksyurydyny - BrdU).



zdjęcie nr 14

#### **Siódmy dzień po urazie – grupa kontrolna**

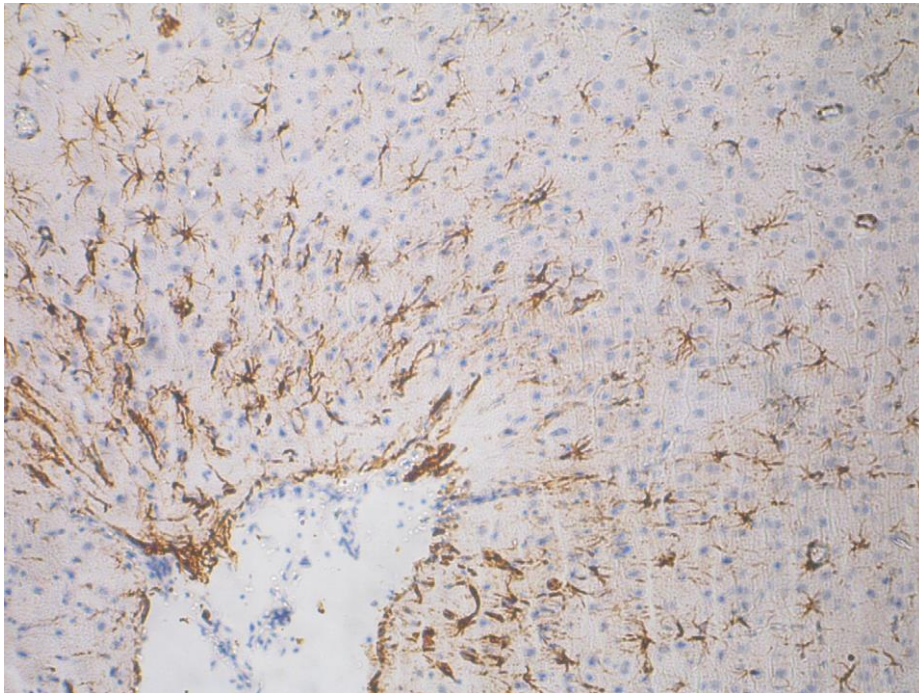
Brak zabliznienia. Widoczne makrofagi skupione wokół uszkodzenia, w świetle uszkodzenia makrofagi nieobecne. Widoczna tendencja do zabliznienia. Nieliczne makrofagi rozproszone na obwodzie (*powiększenie x 200, barwienie na obecność makrofagów/mikrogleju*).



zdjęcie nr 15

#### **Siódmy dzień po urazie – grupa badawcza**

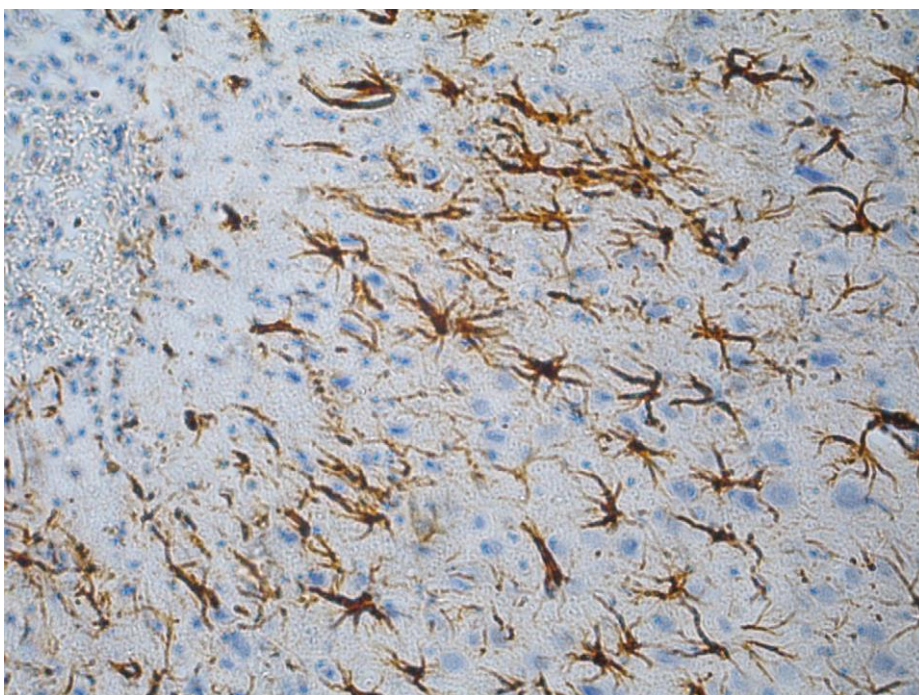
W miejscu ubytku obecne makrofagi, również wokół uszkodzenia duże skupisko makrofagów (*powiększenie x 200, barwienie na obecność makrofagów/mikrogleju*).



**zdjęcie nr 16**

**Siódmy dzień po urazie – grupa kontrolna**

W tworzącej się bliznie brak astrocytów. Wokół uszkodzenia, w tkance mózgowej liczne astrocyty protoplazmatyczne i włóknikowe (*powiększenie x 200, barwienie na obecność astrocytów*).



**zdjęcie nr 17**

**Siódmy dzień po urazie – grupa badawcza**

Astrocyty obecne w bliznie. Po lewej stronie widoczna młoda blizna, w której brak astrocytów, widoczne astrocyty włóknikowe i protoplazmatyczne (*powiększenie x 400, barwienie na obecność astrocytów*).

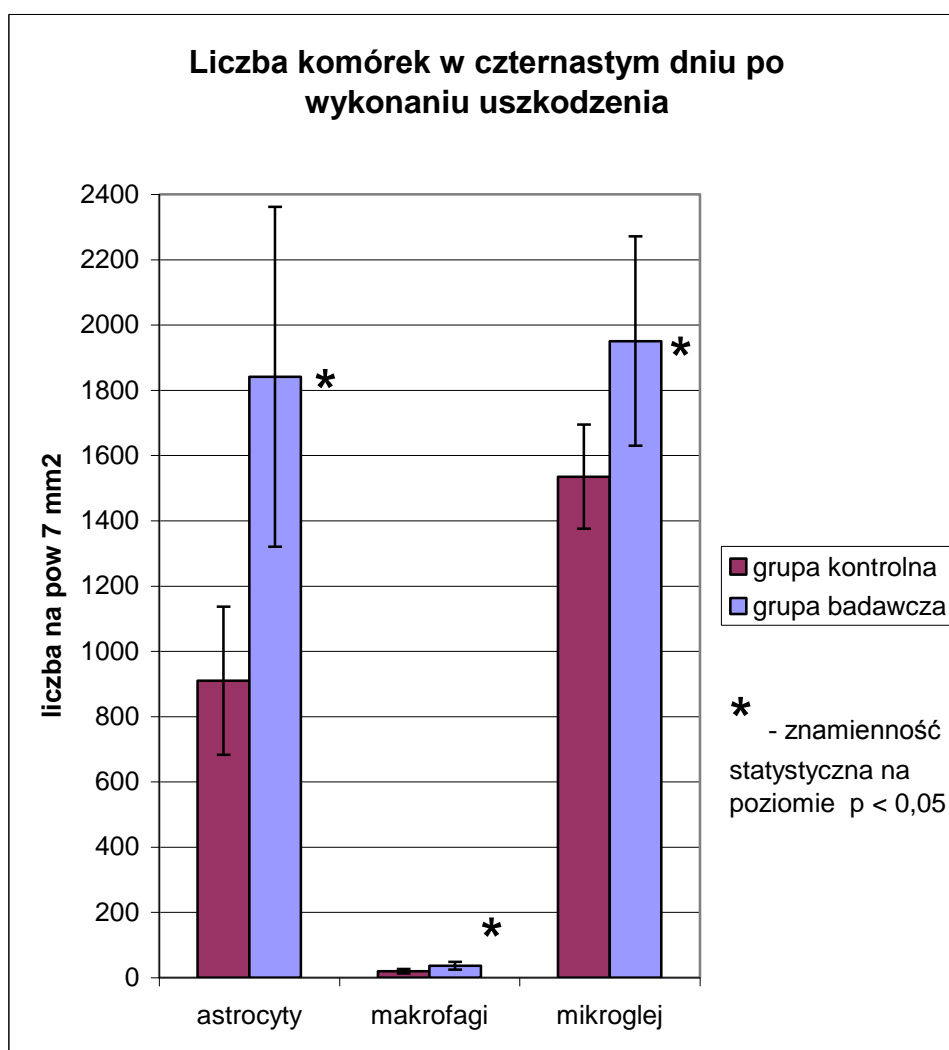
### 4.3 Czternasty dzień po urazie

W czternastym dniu po urazie mózgu, w grupie kontrolnej widoczne jest na preparatach barwionych metodą hematoksylina & eozyna zabliznienie z licznymi rozstrzeniami. Tkanka wokół uszkodzenia bez cech zmian patologicznych (*zdj. 18*). W grupie badawczej blizna wypełnia cały ubytek powstały po uszkodzeniu. Duże nagromadzenie komórek tkanki łącznej w warstwie przyściennej. Obecne są naczynia krwionośne wbudowane centralnie w miejsce uszkodzenia (*zdj. 19*). Na preparatach grupy kontrolnej nie da się zaobserwować takich naczyń (*zdj. 18*). Zaobserwowano wokół blizny na preparatach grupy badawczej, komórki podścieliska szpikowego o kształcie bigonalnym, penetrujące w tkankę mózgową (*zdj. 19*). W obszarze uszkodzenia widoczne wbudowane w tkankę bliznowatą komórki podścieliska szpikowego oznaczone w hodowli bromodeoksyurydyną (*zdj. 20*).

W barwieniu na obecność makrofagów/mikrogleju w preparatach pochodzących z grupy kontrolnej widoczne nieliczne makrofagi w obrębie blizny glejowej. W rejonie nieuszkodzonej tkanki mózgowej i wokół uszkodzenia występują pojedyncze makrofagi (*zdj. 21*). W grupie badawczej w świetle uszkodzenia widoczna wyraźnie narastająca tkanka bliznowata. Zarówno w bliźnie jak i wokół uszkodzonej tkanki widoczne makrofagi liczniejsze niż w grupie kontrolnej (*zdj. 22*). W czternastym dniu aktywność makrofagów osiąga najniższy poziom. W grupie kontrolnej średnia ilość makrofagów wynosiła  $19,77 \pm 6,67$  na powierzchni  $7 \text{ mm}^2$ . W grupie badawczej z tej samej powierzchni policzono  $36,27 \pm 11,63$  makrofaga. Wykazano testem t-Studenta znamienność statystyczną na poziomie  $p < 0,05$  pomiędzy grupą kontrolną a badawczą (*ryc. 4*).

W tym samym okresie komórki mikrogleju wykazują wzrost ilości w porównaniu do siódmego dnia po urazie, zarówno w grupie badawczej jak i kontrolnej. W grupie kontrolnej występują wokół uszkodzonej tkanki w ilości  $1534,83 \pm 159,62$ , a w grupie badawczej w ilości  $1950,50 \pm 321,10$ . Testem t-Studenta wykazano różnicę istotną statystycznie na poziomie  $p < 0,05$ , pomiędzy grupami kontrolną i badawczą (*ryc. 4*).

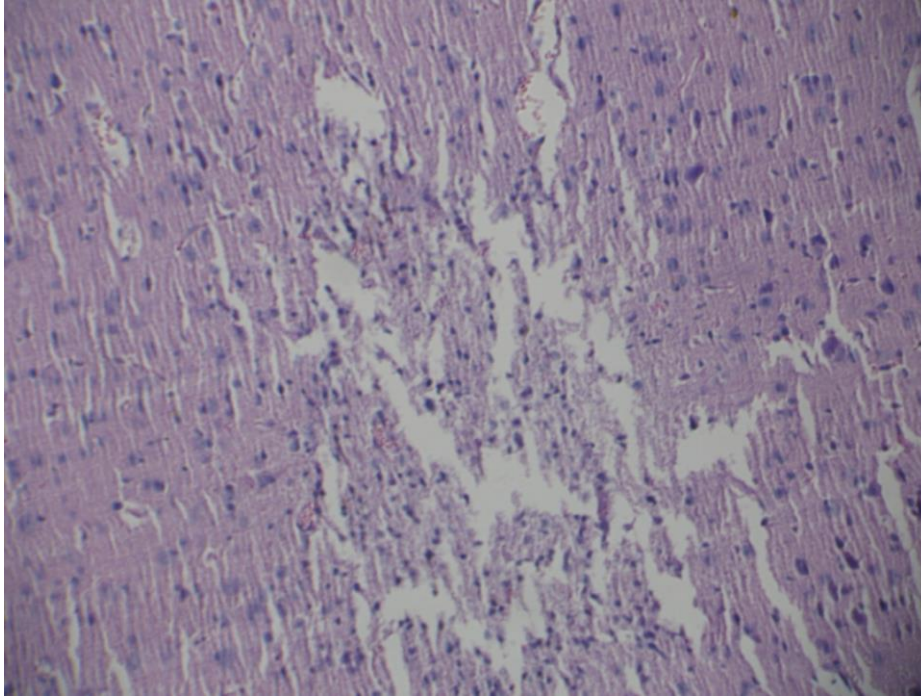
Preparaty mikroskopowe barwione na obecność astrocytów dają możliwość zaobserwowania zarówno w grupie kontrolnej jak i badawczej stopnia zablźnienia w miejscu uszkodzenia w czternastym dniu po urazie. W grupie kontrolnej widać zablźnienie, natomiast nieliczne są astrocyty w rejonie powstawania tkanki bliznowatej. Widoczne są układające się promieniście na zewnątrz blizny astrocyty protoplazmatyczne (*zdj. 23*). W grupie badawczej widoczne na preparatach wyraźne zablźnienie. Licznie skupione są wokół blizny astrocyty protoplazmatyczne oraz włóknkowe. Charakterystyczny jest obraz gwieździstego rozproszenia astrocytów wokół tkanki bliznowatej (*zdj. 24*). Widoczne są również występujące w blźnie naczynia krwionośne. Liczne astrocyty protoplazmatyczne obecne pośród tkanki bliznowatej w miejscu uszkodzenia i implantacji komórek stromalnych (*zdj. 25*). Średnia liczba astrocytów w czternastym dniu od urazu w grupie kontrolnej liczona z powierzchni  $7 \text{ mm}^2$  to  $910,16 \pm 226,92$  i jest ona porównywalna do wartości średniej osiągniętej w tej samej grupie w siódmym dniu po urazie. W grupie badawczej odnotowano średnią wartość z tej samej powierzchni w liczbie  $1840,94 \pm 520,70$  i również wartość ta jest zbliżona do wyniku osiągniętego w tej grupie w siódmym dniu po urazie. Pomiedzy wynikami grupy kontrolnej i badawczej w czternastym dniu po urazie, wykazano testem t-Studenta różnicę znamiennej statystycznie na poziomie  $p < 0,05$  (*ryc. 4*).



**Ryc. 4 Porównanie liczby astrocytów, makrofagów i mikrogleju w grupach kontrolnych i badawczych w 14 dniu po wykonaniu uszkodzenia w korze mózgowej szczurów. Komórki zostały policzone na obszarze  $7 \text{ mm}^2$  wokół miejsca urazu.**

**Gwiazdka (\*) oznacza wartość znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ) wyższą od wartości stwierdzonej w grupie kontrolnej.**

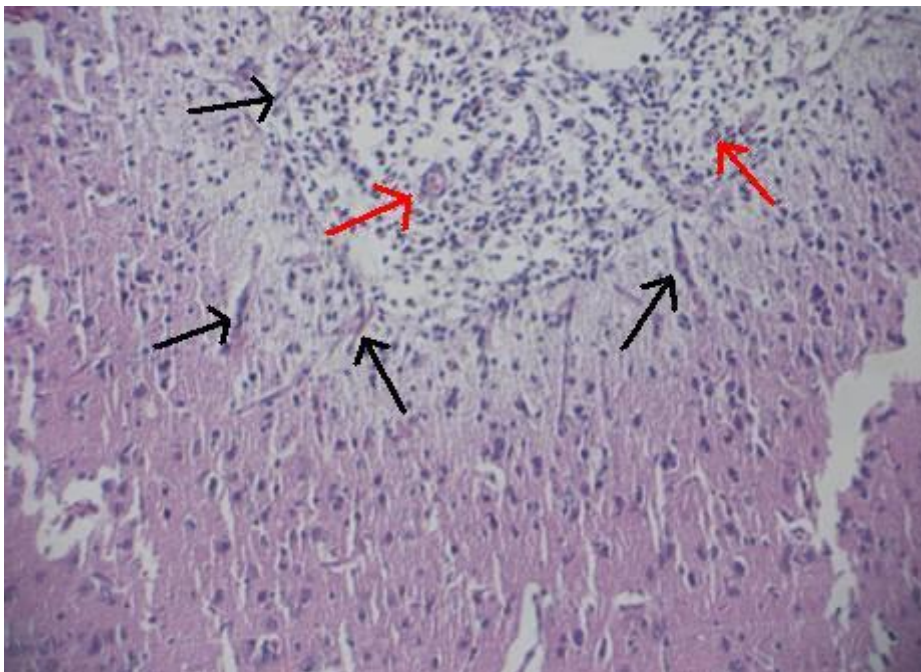




zdjęcie nr 18

#### **Czternasty dzień po urazie – grupa kontrolna**

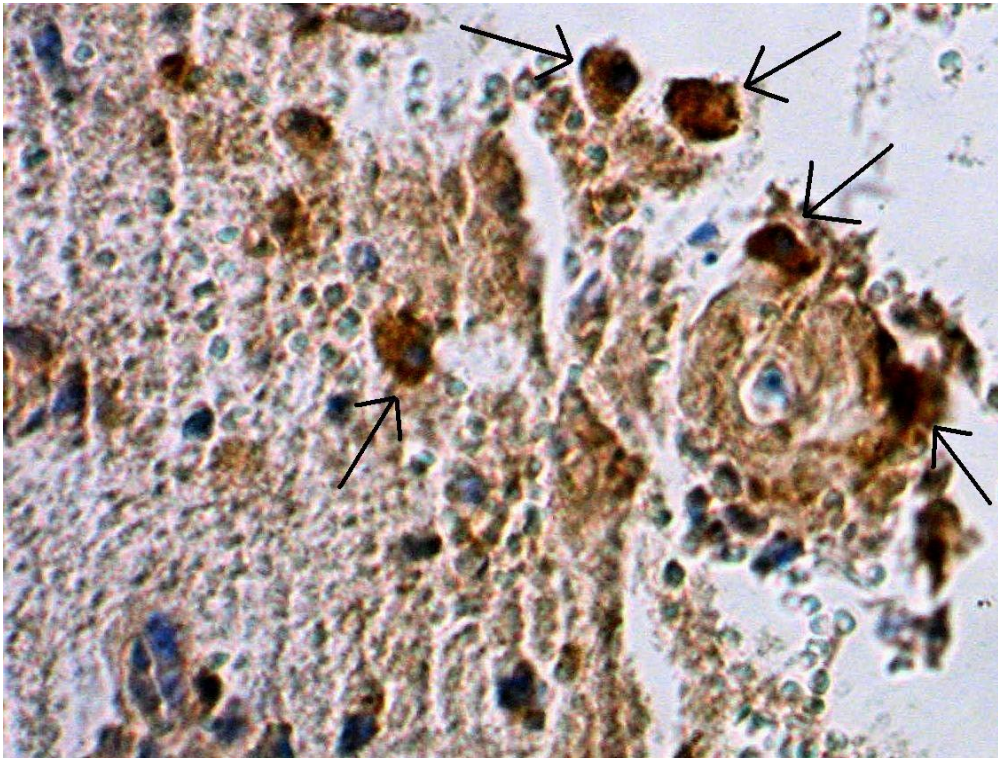
Widoczne zabliźnienie z licznymi rozstrzeniami, brak naczyń krwionośnych w bliźnie. Tkanka wokół blizny niezmienną patologicznie (*powiększenie x 200, barwienie metodą hematoksylina & eozyna*).



zdjęcie nr 19

#### **Czternasty dzień po urazie – grupa badawcza**

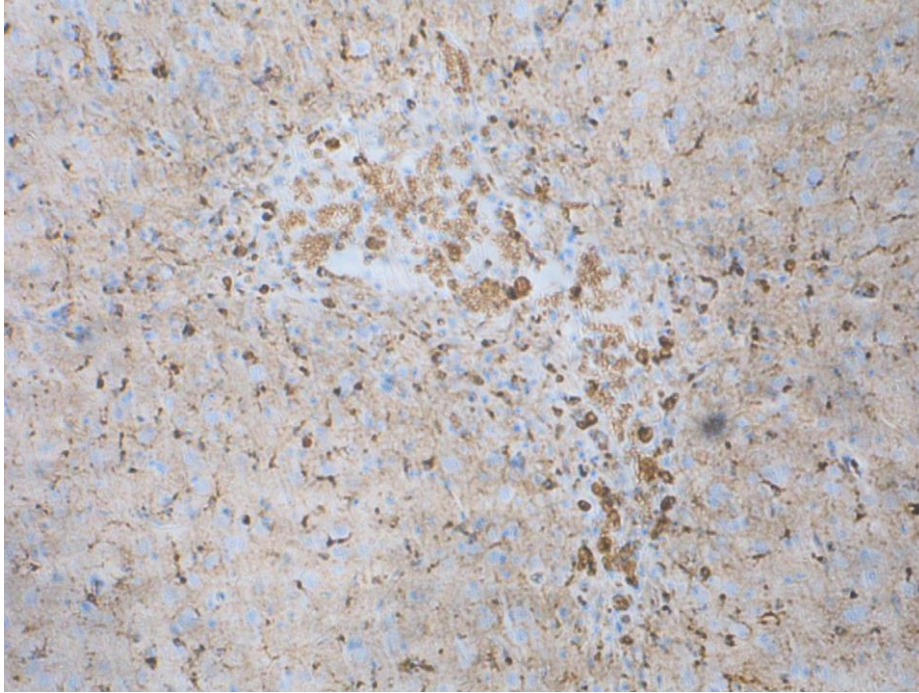
Bliźna wypełnia cały ubytek po uszkodzeniu: widoczne komórki tkanki łącznej, obecne nieliczne naczynia krwionośne (czerwone strzałki). Nielicznie wokół blizny występują wbudowane w tkankę mózgową, komórki podścieliska szpikowego w kształcie bigonalnym (czarne strzałki) (*powiększenie x 200, barwienie metodą hematoksylina & eozyna*).



zdjęcie nr 20

**Czternasty dzień po urazie – grupa badawcza**

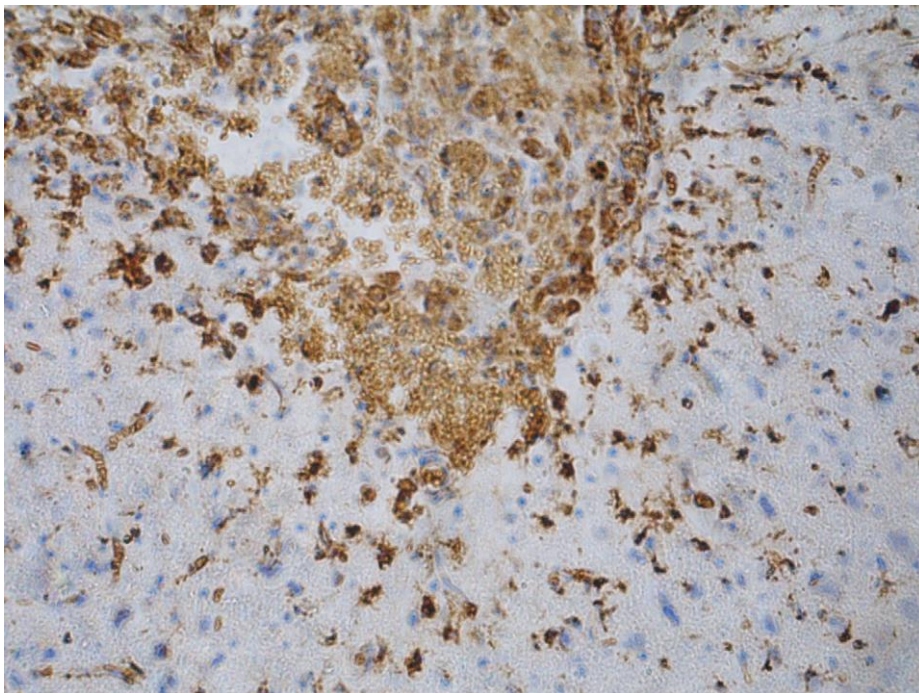
Obecne w rejonie uszkodzenia komórki podścieliska szpikowego oznaczone w hodowli bromodeoksyurydyną ( komórki zaznaczono strzałkami na zdjęciu) (powiększenie x 400, barwienie na obecność bromodeoksyurydyny - BrdU).



**zdjęcie nr 21**

**Czternasty dzień po urazie – grupa kontrolna**

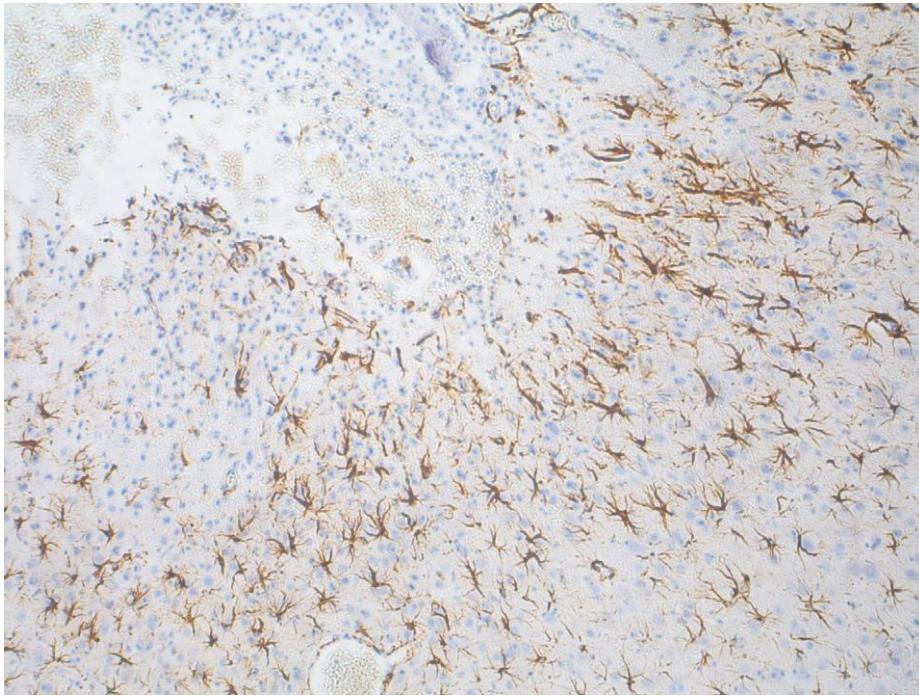
Nieliczne makrofagi w bliźnie, oraz pojedyncze w otaczającej tkance mózgowej. Wokół uszkodzenia pojedyncze makrofagi (*powiększenie x 200, barwienie na obecność makrofagów/mikrogleju*).



**zdjęcie nr 22**

**Czternasty dzień po urazie – grupa badawcza**

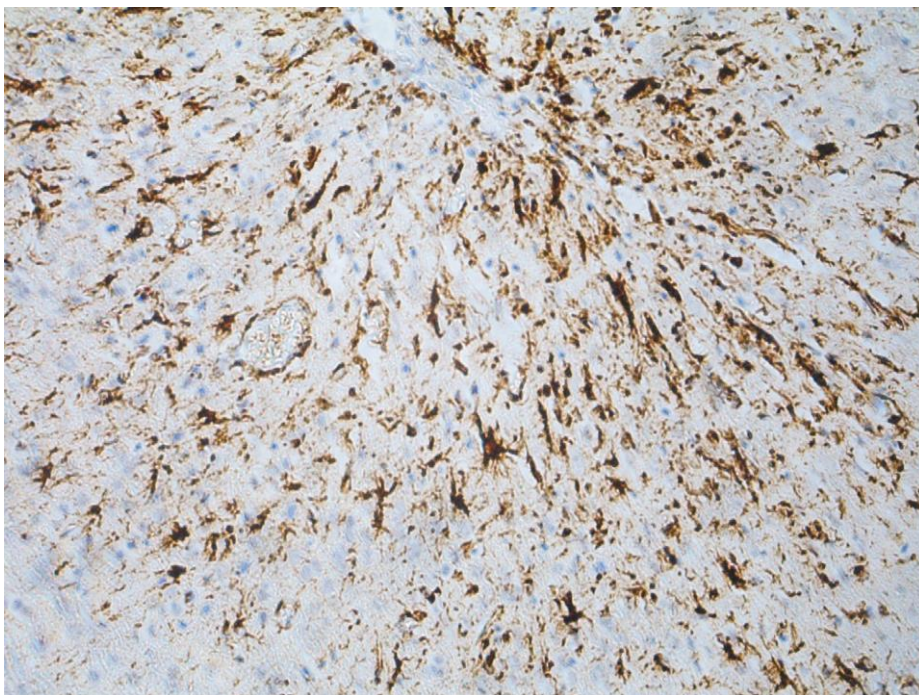
W świetle uszkodzenia widoczna tkanka bliznowata. W bliźnie oraz wokół uszkodzonej tkanki obecne Nieliczne rozproszone makrofagi (*powiększenie x 200, barwienie na obecność makrofagów/mikrogleju*).



**zdjęcie nr 23**

**Czternasty dzień po urazie – grupa kontrolna**

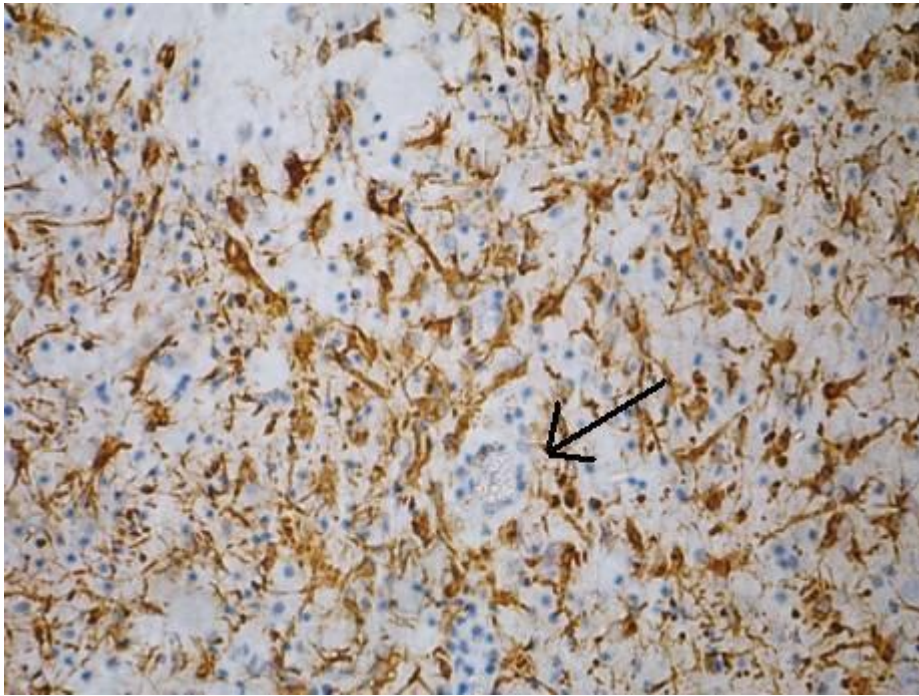
Widoczne astrocyty wokół blizny, nieliczne astrocyty w obrębie tkanki bliznowatej, widoczne zabiżnienie (*powiększenie x 200, barwienie na obecność astrocytów*).



**zdjęcie nr 24**

**Czternasty dzień po urazie – grupa badawcza**

Widoczne zabiżnienie. Skupione wokół blizny liczne astrocyty protoplazmatyczne, charakterystyczny obraz gwiaździstego rozproszenia astrocytów (*powiększenie x 200, barwienie na obecność astrocytów*).



zdjęcie nr 25

**Czternasty dzień po urazie – grupa badawcza**

Widoczne występujące w bliźnie naczynia krwionośne (oznaczone strzałką). Liczne astrocyty protoplazmatyczne i włóknkowe, obecna tkanka bliznowata w świetle uszkodzenia, w niej astrocyty protoplazmatyczne (*powiększenie x 400, barwienie na obecność astrocytów*).

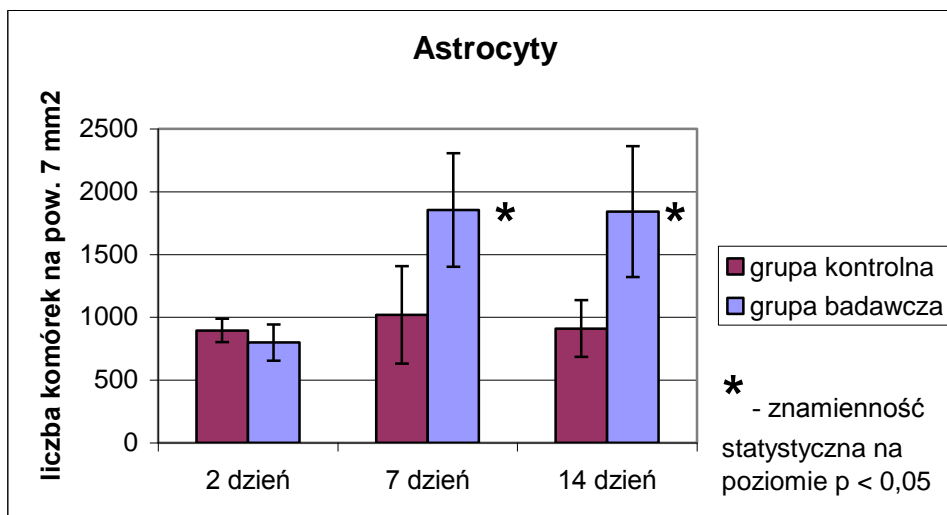
#### 4.4 Astrocyty

W drugim dniu po dokonaniu urazu zanotowano w grupach kontrolnej i badawczej najniższą ilość astrocytów w całym cyklu doświadczalnym. Różnica w wynikach grupy kontrolnej i badawczej w drugim dniu nie jest znamienna statystycznie (*ryc. 5*). Odnotowano natomiast bardzo duży przyrost ilości astrocytów zarówno w grupie kontrolnej i badawczej, w porównaniu do tkanki zdrowej (*ryc. 6*). Średnia ilość astrocytów w zdrowej tkance, na powierzchni  $7 \text{ mm}^2$  wynosiła  $26,25 \pm 8,92$ , a w grupach kontrolnej i badawczej kolejno  $894,58 \pm 93,90$  i  $798,11 \pm 144,22$  (*ryc. 6*).

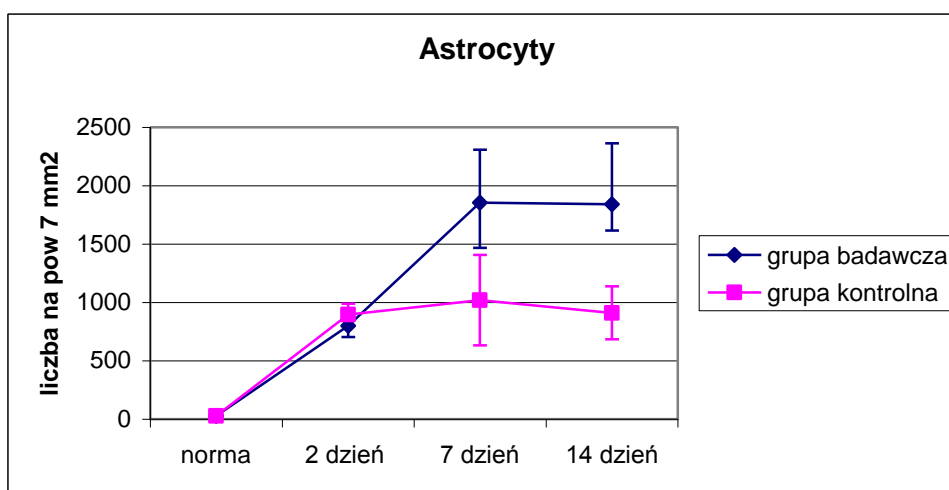
W siódmym dniu po urazie możemy zaobserwować dużą różnicę pomiędzy grupą kontrolną i badawczą. W tkance mózgowej dochodzi do wzrostu ilości astrocytów, szczególnie w grupie badawczej (*ryc. 5*). Średnia ilość astrocytów w tkance, w grupie kontrolnej wynosi  $1019,76 \pm 387,94$ , a w badawczej  $1855,11 \pm 451,93$  (*ryc. 6*). W teście t-Studenta wykazano znamienność statystyczną na poziomie  $p < 0,05$  dla różnicy pomiędzy grupą kontrolną a badawczą (*ryc. 5*). Ilości astrocytów w tkankach w grupach doświadczalnych nadal są wielokrotnie wyższe od wartości osiąganych w tkankach prawidłowych (*ryc. 6*).

W czternastym dniu po dokonaniu urazu obserwujemy nieznaczne obniżenie ilości astrocytów w porównaniu do siódmego dnia, zarówno w grupie kontrolnej jak i badawczej (*ryc. 5*). Nadal utrzymuje się duża różnica pomiędzy grupą kontrolną a badawczą, pozwalająca określić znamienność statystyczną testem t-Studenta na poziomie  $p < 0,05$  (*ryc. 5*). Średnia ilość astrocytów w tkance pobranej od zwierząt z grupy kontrolnej wynosi  $910,16 \pm 226,92$ , natomiast w grupie badawczej

wynosi  $1840,94 \pm 520,70$  (ryc. 6). W porównaniu do tkanki zdrowej ( $26,27 \pm 8,92$  astrocytów /  $7 \text{ mm}^2$ ) są to nadal wartości wielokrotnie wyższe (ryc. 6).



**Ryc.5 Liczba astrocytów w grupach kontrolnych i badawczych w 2, 7, 14 dniu po wykonaniu uszkodzenia w korze mózgowej szczurów. Komórki zostały policzone na obszarze  $7 \text{ mm}^2$  wokół miejsca urazu. Gwiazdka (\*) oznacza wartość znamiennej statystycznie ( $p < 0,05$ ) wyższą od wartości stwierdzonej w grupie kontrolnej.**



**Ryc. 6 Porównanie średniej liczby astrocytów w grupach kontrolnych i badawczych w poszczególnych dniach po wykonaniu uszkodzenia, do liczby komórek w nieuszkodzonej tkance mózgowej. Komórki zostały policzone na obszarze  $7 \text{ mm}^2$  wokół miejsca urazu.**

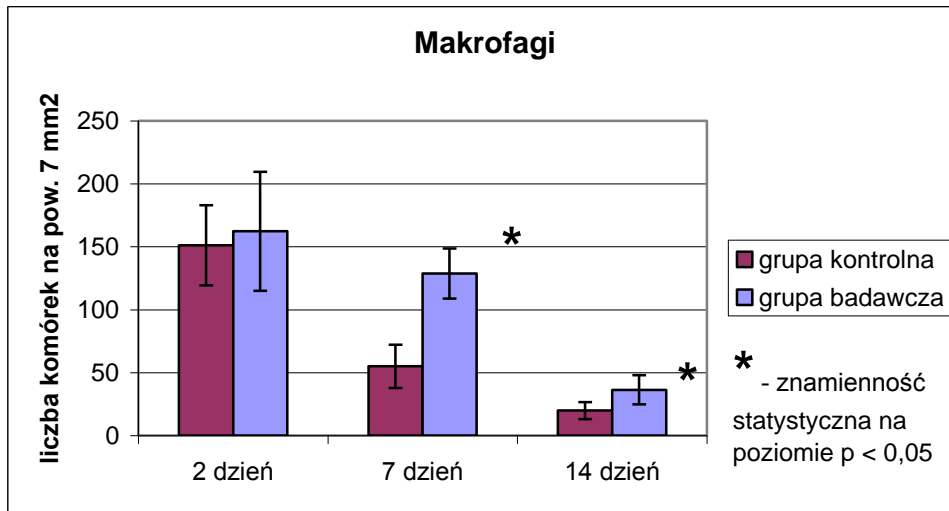
## 4.5 Makrofagi

W drugim dniu po wykonaniu urazu zanotowano najwyższą aktywność makrofagów w całym cyklu badawczym, zarówno w grupie kontrolnej jak i badawczej (ryc. 7). W porównaniu do tkanki nieuszkodzonej, dokonując obliczeń na powierzchni  $7\text{mm}^2$ , wykazano znaczny wzrost ilości makrofagów w grupach doświadczalnych (tkanka nieuszkodzona  $1,72 \pm 0,7$ ). Natomiast wartości dla grupy kontrolnej to  $151,11 \pm 31,79$ , a dla grupy badawczej  $162,22 \pm 47,22$  (ryc. 8). Dla różnic pomiędzy grupą kontrolną a badawczą nie wykazano różnic znamiennej statystycznie na poziomie  $p < 0,05$  (ryc. 7).

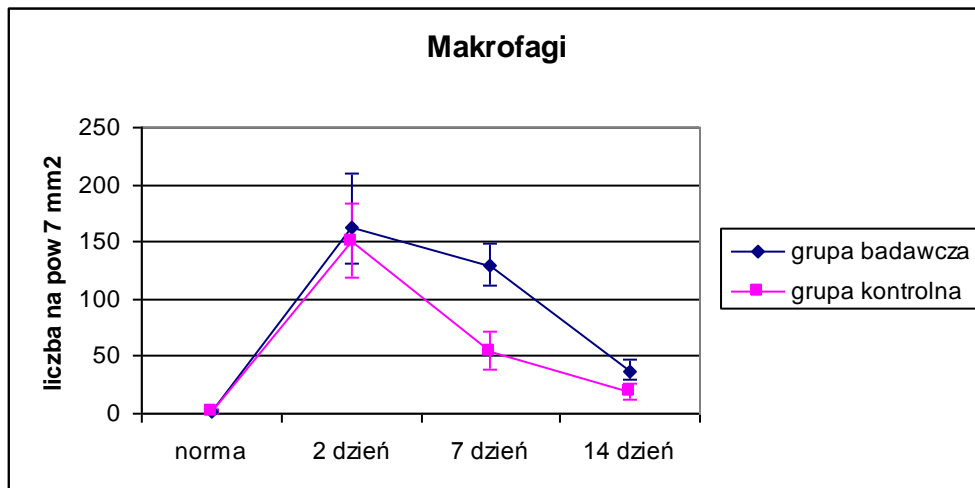
Siódmy dzień po urazie to spadek aktywności makrofagów, widoczny szczególnie w grupie kontrolnej (ryc. 7). Średnia ilość makrofagów dla grupy kontrolnej wynosi  $54,94 \pm 17,11$ , a dla grupy badawczej  $128,72 \pm 19,86$  (ryc. 8). Wykazano testem t-Studenta różnicę pomiędzy grupą kontrolną, a badawczą na poziomie istotności statystycznej  $p < 0,05$  (ryc. 7). Ilość makrofagów w uszkodzonej tkance mózgowej nadal wielokrotnie przewyższa wartości prawidłowe charakterystyczne dla nieuszkodzonej tkanki mózgowej (ryc. 8).

W czternastym dniu po wykonaniu urazu widoczna jest nadal aktywność makrofagów, szczególnie w tkance mózgowej grupy badawczej (ryc. 7). Choć dochodzi do znacznego spadku ilości makrofagów w porównaniu do siódmego dnia, osiągnięte wartości nadal znacznie przekraczają ilość makrofagów występującą w nieuszkodzonej tkance ( $1,72 \pm 0,7 / 7 \text{ mm}^2$ ) (ryc. 8). Średnia ilość makrofagów liczona z powierzchni  $7 \text{ mm}^2$  wynosi w grupie kontrolnej  $19,77 \pm 6,67$ , a w grupie badawczej  $36,27 \pm 11,63$  (ryc. 8). Testem t-Studenta wykazano różnicę znamiennej statystycznie na poziomie  $p < 0,05$  dla grupy kontrolnej i badawczej (ryc. 7).





**Ryc.7 Liczba makrofagów w grupach kontrolnych i badawczych w 2, 7, 14 dniu po wykonaniu uszkodzenia w korze mózgowej szczurów. Komórki zostały policzone na obszarze 7 mm<sup>2</sup> wokół miejsca urazu. Gwiazdka (\*) oznacza wartość znamiennej statystycznie (p<0,05) wyższą od wartości stwierdzonej w grupie kontrolnej.**



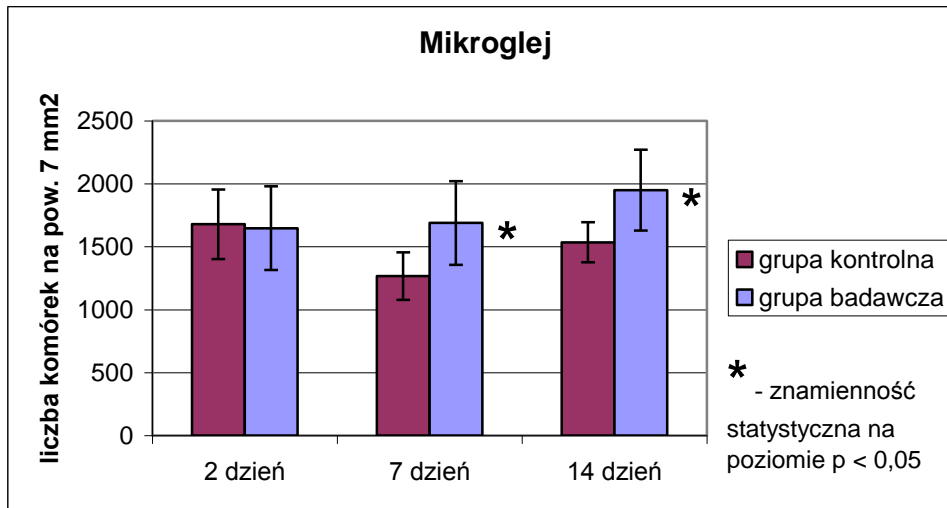
**Ryc. 8 Porównanie średniej liczby makrofagów w grupach kontrolnych i badawczych w poszczególnych dniach po wykonaniu uszkodzenia, do liczby komórek w nieuszkodzonej tkance mózgowej. Komórki zostały policzone na obszarze 7 mm<sup>2</sup> wokół miejsca urazu.**

## 4.6 Mikroglej

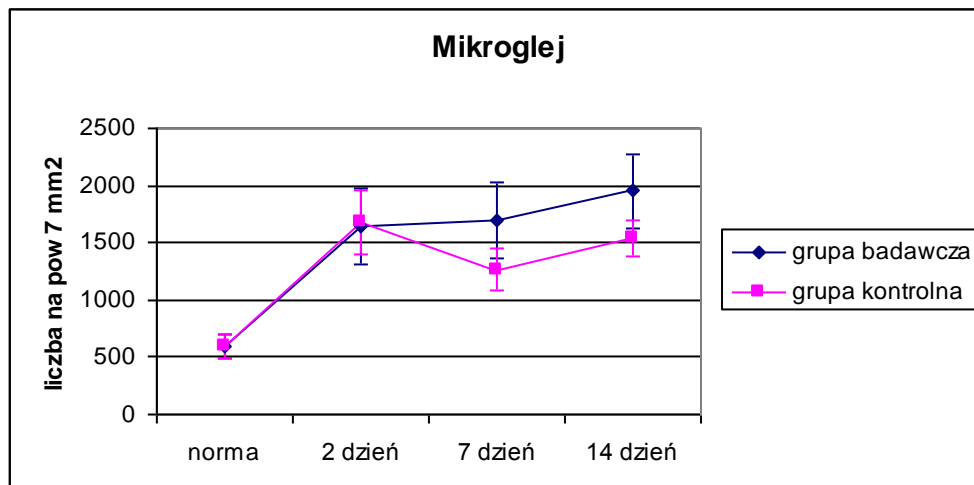
W drugim dniu od wykonaniu uszkodzenia w korze mózgowej doszło w miejscu urazu do znacznego wzrostu ilości mikrogleju w porównaniu do tkanki nieuszkodzonej (*ryc. 10*). Średnia ilość mikrogleju na powierzchni  $7 \text{ mm}^2$  wynosi w tkance nieuszkodzonej  $595,50 \pm 105,00$ , natomiast w tkance mózgowej uszkodzonej, w grupie kontrolnej  $1678,20 \pm 276,36$ , a grupie badawczej  $1647,00 \pm 331,92$  (*ryc. 10*). Dla różnic pomiędzy grupą kontrolną, a badawczą nie wykazano istotności statystycznej na poziomie  $p < 0,05$  (*ryc. 9*).

W siódmym dniu po wykonaniu uszkodzenia obserwujemy spadek ilości komórek mikrogleju w grupie kontrolnej i wzrost ich ilości w grupie badawczej (*ryc. 9*). Różnica pomiędzy nimi jest znamienna statystycznie na poziomie  $p < 0,05$  (*ryc. 9*). Średnia ilość komórek mikrogleju, liczona na powierzchni  $7 \text{ mm}^2$ , w grupie kontrolnej wynosi  $1266,37 \pm 188,15$ , a w grupie badawczej  $1688,41 \pm 331,98$  i znacznie przewyższa średnią ilość komórek w tkance nieuszkodzonej, która była równa  $595,50 \pm 105,00$  (*ryc. 10*).

W czternastym dniu od dokonania urazu odnotowujemy kolejny wzrost ilości mikrogleju w tkance mózgowej grupy badawczej, jak również wzrost ich ilości w grupie kontrolnej (*ryc. 9*). Różnice pomiędzy grupą kontrolną, a badawczą wykazane testem t-Studenta, są na poziomie istotności statystycznej  $p < 0,05$  (*ryc. 9*). Średnia ilość mikrogleju liczona na powierzchni  $7 \text{ mm}^2$  wynosi w grupie kontrolnej  $1534,83 \pm 159,62$ , w grupie badawczej  $1950,50 \pm 321,10$  i nadal jest wielokrotnie wyższa od ich ilości w tkance nieuszkodzonej ( $595,50 \pm 105,00 / 7 \text{ mm}^2$ ) (*ryc. 10*).



**Ryc.9 Liczba mikrogleju w grupach kontrolnych i badawczych w 2, 7, 14 dniu po wykonaniu uszkodzenia w korze mózgowej szczurów. Komórki zostały policzone na obszarze 7 mm<sup>2</sup> wokół miejsca urazu. Gwiazdka (\*) oznacza wartość znamienne statystycznie ( $p < 0,05$ ) wyższą od wartości stwierdzonej w grupie kontrolnej.**



**Ryc. 10 Porównanie średniej liczby mikrogleju w grupach kontrolnych i badawczych w poszczególnych dniach po wykonaniu uszkodzenia, do liczby komórek w nieuszkodzonej tkance mózgowej. Komórki zostały policzone na obszarze 7 mm<sup>2</sup> wokół miejsca urazu.**

## 5. Dyskusja

Wykonane badania w ramach niniejszej pracy mają pomóc odpowiedzieć na pytanie czy komórki podścieliska szpiku kostnego przeszczepione w miejsce uszkodzenia w korze mózgowej mogą mieć wpływ na jej proces zablźniania, poprzez modyfikację aktywności komórkowej wokół miejsca uszkodzenia. Wyniki zaprezentowanych badań przedstawiają początek procesu gojenia uszkodzonej kory mózgowej, na przestrzeni pierwszych 14 dni od dokonania urazu, oraz wpływ podania komórek stromalnych do miejsca uszkodzenia na proces tworzenia blizny. Zebrane wyniki pozwalają prześledzić początkowe zmiany w liczebności astrocytów, makrofagów i mikrogleju, oraz obserwować zmiany jakie zachodziły w tym okresie w obrębie lezji.

Tworzenie się blizny glejowej jest złożonym procesem naprawczym będącym konsekwencją między innymi urazu w obrębie kory mózgowej. Pomimo iż blizna glejowa jest uznawana za główną barierę, która uniemożliwia regenerację aksonalną, będzie ona spełniała rolę ochronną dla nieuszkodzonej, zdrowej tkanki mózgowej, przeciwdziałając opóźnionej śmierci neuronów i oligodendrocytów, do której dochodzi na drodze nekrozy lub apoptozy. Komórki wchodzące w skład blizny glejowej będą stanowić w procesie gojenia również źródło czynników neurotroficznych wspomagających ten proces (59).

W procesie gojenia tkanki nerwowej aktywny udział biorą komórki glejowe (astrocyty i mikroglej), oraz komórki pochodzenia mezenchymalnego (makrofagi pochodzące z monocytów krwi obwodowej). Makrofagi migrujące w rejon uszkodzenia oraz aktywne komórki mikrogleju będą inicjować reakcję zapalną (60). Ich współdziałanie z astrocytami (oraz fibroblastami) przyczynia się do tworzenia

blizny glejowej (61). Przebieg procesu zabliznienia zależy również od relacji między tymi komórkami i od ich funkcji w produkcji cytokin.

Badania przeprowadzone przez Sanches-Ramos'a dowodzą, że odpowiednie zaprogramowanie hodowli komórkowej pozwoli przekształcić komórki macierzyste szpiku kostnego w komórki, które będą wykazywać ekspresję markerów komórek neuronalnych i komórek glejowych, blokując równocześnie ich właściwości mezodermalne (43). Podobne wnioski przynoszą badania Crofta i Przyborskiego oraz Bossolasco. Doświadczenia te zwróciły uwagę na możliwość różnicowania komórek stromalnych w komórki glejowe, a także w niedojrzałe komórki neuralne (ekspresja NeuN, nestyny). W badaniach tych w celu stymulacji specyficznej linii komórkowej wykorzystywano medium hodowlane zawierające między innymi kwas retinowy, oraz czynniki wzrostowe: EGF i BDNF (62,63). Badania wykonane przez Kohyama i in. pozwalają zaobserwować kolejne możliwości adaptacyjne komórek szpiku kostnego. W badaniach tych autorzy przedstawiają dowód na to, że komórki szpikowe mogą nie tylko przybierać neuronalną morfologię, ale również odpowiadać, podobnie jak dojrzałe neurony, depolaryzacją na działanie odpowiedniego bodźca (64).

W prezentowanych badaniach, w drugim dniu od wykonania uszkodzenia obserwowano charakterystyczny wzrost ilości makrofagów, przy współistniejącej podwyższonej liczbie mikrogleju, zarówno w grupie kontrolnej jak i badawczej. Ta podwyższona liczba komórek jest powiązana z powstaniem w miejscu urazu reakcji zapalnej, w której komórki te aktywnie uczestniczą poprzez produkcję czynników modulujących proces zapalny – cytokin. W miejscu uszkodzenia będą występować cytokiny które indukują wzrost i proliferację astrocytów (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) (61).

W przeprowadzonych obserwacjach w drugim dniu od wykonania uszkodzenia w grupie badawczej jest widoczne charakterystyczne zagęszczenie makrofagów wokół miejsca uszkodzenia, tworzące tzw. „halo”. Komórki te wnikają też w otaczającą uszkodzenie parenchymę mózgu. Natomiast w grupie kontrolnej makrofagi, najprawdopodobniej pochodzenia endogennego, są rozsiane nieregularnie w sąsiedztwie uszkodzenia. Powodem zagęszczenia liczby makrofagów w rejonie uszkodzenia, obserwowanym w grupie badawczej, może być migracja komórek podścieliska szpikowego w okolice urazu. Zwiększona liczba makrofagów w pobliżu uszkodzenia świadczyć też może o przechodzeniu transplantowanych komórek do otaczającej tkanki mózgowej. Badania z użyciem BrdU wykonane przez Mahmood'a wykazują, że komórki stromalne podane do miejsca gdzie znajdują się uszkodzone neurony mają możliwość migrowania i zasiedlania zniszczonej tkanki mózgowej w odległości 2-3 mm od miejsca urazu. Efekt taki zaobserwowano zarówno przy podaniu dożylnym komórek stromalnych, jak i w podaniu bezpośrednio do miejsca uszkodzenia (48). Zaobserwowano, że największa aktywność makrofagów przypada na drugi dzień po dokonaniu urazu, zarówno w grupie kontrolnej jak i badawczej. Liczne makrofagi obecne w obszarze urazu mogą być dwójakiego pochodzenia. Część z nich pochodzi z przekształcenia mikrogleju spoczynkowego, obecnego w tkance mózgowej, część zaś może być pochodzenia monocytarnego (65-67). Uważa się, że w pierwszych trzech dniach dominują aktywne komórki mikrogleju, natomiast makrofagi krwiopochodne pojawiają się w drugim dniu po uszkodzeniu i dominują w siódmym dniu (68).

W siódmym dniu od wykonania uszkodzenia nadal obserwowano utrzymującą się wysoką aktywność makrofagów w grupie badawczej. Może wskazywać to na fakt, że wszczepione komórki podścieliska szpikowego migrują w rejon uszkodzenia

i mogą aktywować komórki mikrogleju do przekształcenia w makrofagi w miejscu podania. Doświadczenia przeprowadzone przez Fujita i innych badaczy wskazują, że komórki mikrogleju zachowują wiele cech makrofagów, takich jak zdolność fagocytozy, produkcję cytokin, anionów nadtlenowych, oraz zdolność do ekspresji cząsteczek MHC II podczas aktywacji (65). Maxwell wraz z zespołem wykazali natomiast, że makrofagi pojawiają się w miejscu uszkodzenia tkanki mózgowej w drugim dniu po urazie, natomiast największa ich ilość jest odnotowywana w czwartym dniu po dokonaniu uszkodzenia. Stanowią wtedy 76% całkowitej liczby komórek mezenchymatycznych w rejonie dokonania urazu (69).

W grupie badawczej zaobserwowano obecność komórek podścieliska szpikowego w otaczającej uszkodzenie tkance, już w drugim dniu po uszkodzeniu. W czternastym dniu po urazie wyraźne były zaznaczone komórki podścieliska wbudowane już w otaczającą tkankę mózgową. U zwierząt, u których dokonano wszczepienia komórek podścieliska szpikowego, zaobserwowano liczne młode naczynia kapilarne, natomiast w grupie kontrolnej nie obserwowano takich naczyń krwionośnych. W badaniach Borlongan'a i Lind'a wykazano, że podanie komórek stromalnych do uszkodzonego mózgu może mieć wpływ na odbudowę bariery krew-mózg i poprawę krążenia mózgowego w rejonie niedokrwienia (70). W badaniach *In vitro* przeprowadzonych przez Chen'a wykazano, że podanie komórek podścieliska szpikowego do uszkodzonej kory mózgowej powoduje zwiększenie produkcji czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), którego obecność w uszkodzonej tkance mózgowej pobudza proces angiogenezy (53,71).

Przeprowadzone badania pozwoliły zaobserwować w grupie badawczej w siódmym i czternastym dniu większą ilość makrofagów w porównaniu do grupy kontrolnej (na poziomie istotności statystycznej). Przyczyną tego zjawiska mogło być

dostarczenie wraz z komórkami podścieliska szpikowego dodatkowych sygnałów aktywujących mikroglej spoczynkowy oraz powodujących napływ w rejon uszkodzenia komórek makrofagowych. W badaniach Mahmooda stwierdzono, że nieliczne przeszczepione komórki szpikowe wykazywały ekspresję markerów neuronalnych NeuN i MAP-2 oraz astrocytarnego GFAP. Wysłano hipotezę, że wzrost ilości cytokin i czynników wzrostowych może być wynikiem interakcji między transplantowanymi komórkami a tkanką gospodarza (47,72-75). Sygnałem który również może wpływać na aktywację komórek dostarczanych podczas implantacji do miejsca uszkodzenia mogą być cytokiny (m.in. interleukiny IL-1 i IL-6) wysyłane z uszkodzonej tkanki mózgowej. Rolą tych cytokin jest między innymi aktywacja monocytów z krwi i pobudzenie ich proliferacji w szpiku oraz przekształcanie monocytów w makrofagi migrujące do miejsca uszkodzenia w mózgu (66,76).

Dostarczenie komórek podścieliska szpiku kostnego w rejon uszkodzenia może być również powodem utrzymywania się w siódmym i czternastym dniu zwiększonej liczby komórek mikrogleju u zwierząt w grupie badawczej. Może to wynikać z przekształcania makrofagów, dostarczonych z komórkami szpikowymi, w komórki mikrogleju. Już w badaniach Imamoto i Leblond'a (1977) wykazano, że wraz ze spadkiem ilości makrofagów w rejonie uszkodzenia dochodzi do wzrostu ilości komórek mikroglejopodobnych. W związku z tym można postawić hipotezę, że makrofagi pochodzące z krwi obwodowej przekształcają się w komórki mikroglejopodobne (77). Natomiast w nowszych badaniach wykonanych przez Kennedy'ego i Abkowitz'a udokumentowano, że przeszczep szpiku kostnego wpływa na liczbę makrofagów i mikrogleju w odległym okresie po dokonaniu tego przeszczepu. Udowodniono, że część z nowopowstałych komórek immunologicznych



może pochodzić z komórek prekursorowych szpiku kostnego. W badaniach tych wykorzystano myszy transgeniczne w modelu ROSA 26 (ROSA beta geo26) (78).

Zwiększenie ilości mikrogleju w uszkodzonej tkance stanowi prawdopodobnie szansę na szybsze zabliznienie uszkodzenia, bo jak wykazały wyniki badań Thomasa, komórki mikrogleju podobnie jak makrofagi, regulują proces zablizniania, usuwają resztki komórkowe powstałe w procesie apoptozy i nekrozy i stymulują regenerację neuronalną oraz neowaskularyzację (79). Przesłankę do stwierdzenia, że komórki szpiku kostnego mogą stanowić potencjalne źródło komórek mikrogleju w uszkodzonym mózgu, stanowią badania Banatiego, w których wykazano że komórki makrofagopodobne pochodzące ze szpiku kostnego mają taki sam wzór kanałów jonowych jak komórki mikrogleju (80).

Oprócz zaobserwowanych zmian w ilości makrofagów i mikrogleju widoczne było również w grupie badawczej szybsze zabliznianie w miejscu uszkodzenia. W siódmym dniu wyraźnie zauważalna była wokół uszkodzenia młoda łącznotkankowa blizna z wbudowanymi naczyniami kapilarnymi, natomiast w czternastym dniu obserwowano większe wypełnienie uszkodzenia, szczególnie w warstwie przyściennej. W czternastym dniu charakterystyczna była obecność nielicznych komórek podścieliska szpikowego wbudowanych w otaczającą uszkodzenie tkankę mózgową.

Analizując wyniki badań należy również zwrócić uwagę na zmiany w ilości astrocytów, które odgrywają ważną rolę w procesie zablizniania tkanki mózgowej. U dorosłych osobników uczestniczą one w utrzymaniu stabilności i integralności parenchymy mózgu, poprzez penetrację do przestrzeni zewnątrzkomórkowej utworzonej przez degenerujące komórki. Astrocyty uczestniczą w wytwarzaniu błony granicznej powierzchniowej, a ich wypustki łącząc się ze sobą i razem

z wytwarzanymi błonami, włóknami kolagenu i fibroblastami tworzą błonę graniczną okołonaczyniową (8,13,69,81). Aktywowane astrocyty w uszkodzonej tkance mózgowej są hipertroficzne i hiperplazmatyczne, oraz produkują kwaśne białko włóknienkowe (GFAP), którego obecność w tkance jest związana z procesem astroglejozy (61). W prezentowanych badaniach najniższa aktywność astrocytów była obserwowana zarówno w grupie badawczej jak i kontrolnej w drugim dniu po dokonaniu uszkodzenia. Natomiast w siódmym dniu dochodziło do zwiększenia aktywności astrocytów, szczególnie w grupie badawczej.

Berry i in. podaje, że proces który ma na celu utworzenie blizny glejowej rozpoczyna się w czwartym dniu po uszkodzeniu tkanki mózgowej. Powstająca blizna glejowa zawiera w początkowym okresie makrofagi i mikroglej (18). Później komórki ulegają kondensacji, co obserwujemy w postaci kurczenia blizny. W tym okresie dochodzi do wzmożonej aktywności astrocytów i wzmożonej produkcji kolagenu przez fibroblasty (81,82). Zależność taką zaobserwowałem w opisywanych w niniejszych badaniach preparatach. Siódmy i czternasty dzień po urazie to wzmożona aktywność astrocytów przy obniżonej, w wypadku makrofagów lub ustabilizowanej w przypadku mikrogleju ich liczbie wokół miejsca uszkodzenia. Prawdopodobnie tę można stwierdzić jeszcze wyraźniej analizując wyniki w grupie, w której do miejsca uszkodzenia podano komórki podścieliska szpikowego. Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ilości astrocytów w tej grupie zarówno w siódmym jak i czternastym dniu po wykonaniu uszkodzenia w tkance mózgowej w porównaniu do grupy kontrolnej. Na zdjęciach wykonanych w tych dniach wyraźnie widoczne są w otoczeniu blizny zarówno astrocyty włóknienkowe jak i protoplazmatyczne. Przeszczepione do miejsca uszkodzenia komórki podścieliska

szpiku kostnego mogą być czynnikiem, który powoduje wzrost ilości astrocytów w otoczeniu uszkodzonej tkanki.

Badania nad autologiczną transplantacją szpiku kostnego u zwierząt, u których dokonano eksperymentalnego niedokrwienia mózgu przeprowadzone przez Iihoshi wskazują, że komórki szpiku kostnego wykazują potencjalną możliwość różnicowania w komórki tkanki glejowej. Znakowane komórki szpiku kostnego podawane dożylnie migrowały do mózgu dojrzałego zwierzęcia i osadzały się w parenchymie ulegając przekształceniu w astrocyty oraz komórki mikrogleju (83). Doświadczenia wykonane przez Tondreau i in. wykazały że mezenchymalne komórki macierzyste ze szpiku kostnego wykazywały ekspresję markerów glejowych (GFAP) i neuronalnych (Nestin, Yuj-1, TH, MAP-2) bez żadnej dodatkowej stymulacji. Markery charakterystyczne dla bardziej dojrzałych komórek neuronalnych widoczne były po 5 pasażach, a specyficzna indukcja neuronalna powodowała dalsze różnicowanie komórek stromalnych, poprzez wzrost ekspresji TH, MAP-2, GFAP, a spadek Tuj-1 (84). Udowodniono również, że komórki szpikowe przeszczepione w rejon niedokrwienia mózgu wykazują, oprócz ekspresji białek neuronalnych (neuronalne białko jądrowe, NeuN), również ekspresję białka reaktywnych astrocytów (GFAP). Przeprowadzone badania wykazały, że przeszczepiane do mózgu komórki stromalne mogą ulegać przekształceniu w komórki o fenotypie astrocytów (85,86).

W badaniu przeprowadzonym przez Chen i Li komórki stromalne podane w pierwszym oraz siódmym dni po okluzji przeżyły i umiejscowiły się w uszkodzonym ischemicznie obszarze. Część komórek stromalnych wykazała ekspresję markerów komórek nerwowych (87,88). Późniejszy eksperyment tych samych badaczy sprawdzał reakcję w obszarze niedokrwienia w okresie 4 miesięcy po transplantacji wyznakowanych komórek stromalnych. Zaobserwowano wtedy, oprócz

podwyższonej ilości oligodendrocytów zwiększoną liczbę astrocytów, które wykazywały reakcję na oznaczenie bromodeoksyurydyną oraz zaobserwowano zwiększoną gliogenezę w obszarze uszkodzonej półkuli (85,89).

Interesująca jest rola proteoglikanów produkowanych przez astrocyty w procesie tworzenia blizny. Wyróżnia się cztery klasy proteoglikanów, w których produkcji uczestniczą astrocyty. Jest to siarczan heparyny (heparyn sulphate proteoglycan-HSPG), siarczan dermatyny (dermatan sulphate proteoglycan-DSPG), siarczan keratyny (keratyn sulphate proteoglycan-KSPG), oraz siarczan chondroityny (chondroitin sulphate proteoglycan-CSPG) (82,90). Podczas procesu gojenia uszkodzeń CSN zaobserwowano w badaniach Jones'a wzrost ilości CSPG w bliźnie glejowej zarówno w mózgu jak i w rdzeniu (91). Już w latach dziewięćdziesiątych pojawiły się pierwsze doniesienia mówiące o roli cząsteczek CSPG w procesie gojenia tkanki mózgowej (92). CSPG produkowane przez astrocyty odgrywa też rolę w plastyczności synaptycznej. Zaobserwowano w badaniach przeprowadzonych przez Pizzorusso i in. poprawę funkcji kory wzrokowej po zastosowaniu terapii związkami CSPG (93). Natomiast w badaniach *in vivo* zaobserwowano różnicę w aktywności procesu gojenia tkanki mózgowej zawierającej dojrzałe lub niedojrzałe astrocyty. Wykazano, że niedojrzałe astrocyty w większym stopniu wspomagają formowanie blizny glejowej i modyfikują proces gojenia (94).

Przedstawione wyniki badań dotyczące niedojrzałych astrocytów oraz roli CSPG w bliźnie mogą stanowić przesłankę do przypuszczenia, że w pierwszych dniach po urazie większa liczba astrocytów w młodej bliźnie glejowej może pochodzić z przeszczepionych komórek podścieliska szpikowego. Przeszczepienie komórek stromalnych do miejsca urazu jest szansą na szybsze tworzenie i modyfikację blizny glejowej m.in. przez zmianę ilości komórek glejowych. Większą

liczbę astrocytów w grupie badawczej zaobserwowałem w przeprowadzonych badaniach, szczególnie w siódmym i czternastym dniu po wykonaniu urazu po podaniu komórek podścieliska szpikowego do miejsca uszkodzenia.

Kolejnym interesującym aspektem aktywności astrocytów w tworzącej się bliźnie jest możliwość współdziałania pomiędzy siarczanem chondroityny (CSPG), a BDNF (czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego). Badania wykonane przez Tropea i in. wykazały, że stosowanie BDNF i CSPG jako skojarzonej terapii w uszkodzeniach w obrębie centralnego systemu nerwowego, przyspiesza procesy gojenia i wzrostu aksonów (95). W związku z tym należy wspomnieć, że komórki podścieliska szpiku kostnego wykazują w uszkodzonej tkance nerwowej zdolność do produkcji szeregu czynników neurotroficznych, które pobudzają procesy naprawcze. W badaniach *in vitro* (53) oraz w warunkach *in vivo*, stwierdzono tę zależność obserwując wzrost ekspresji czynnika wzrostu nerwów (NGF) oraz czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) w uszkodzonym mózgu po dożylnym podaniu szpikowych komórek stromalnych (74). Zaobserwowano również, że podanie do hodowli komórek podścieliska szpikowego neuronalnych czynników wzrostowych BDNF i NGF, może zwiększyć migrację i zasiedlanie uszkodzonej tkanki mózgowej biorcy po przeszczepie. Komórki stromalne hodowane w obecności neurotrofin powodowały lepszą poprawę funkcji motorycznych w porównaniu z wynikami badania tych funkcji u osobników, u których dokonano transplantacji komórek stromalnych hodowanych w standardowych warunkach (75,89,96-98).

Dlaczego badania nad komórkami podścieliska szpiku kostnego dotyczą w tak dużym stopniu wpływu tych komórek na regenerację układu nerwowego? Odpowiedzią na to pytanie może być stale rosnąca liczba zaburzeń neurologicznych, spowodowanych przez udary mózgu, stwardnienie rozsiane, chorobę Parkinsona,

czy najbardziej przybliżony w niniejszej pracy uraz czaszkowo-mózgowy. Szerokie rozpowszechnienie tych patologii układu nerwowego powoduje poszukiwanie nowych dróg terapeutycznych w leczeniu tych schorzeń.

Zamierzeniem większości interwencji terapeutycznych w schorzeniach mózgu, w tym strategii polegającej na implantacji komórek podścieliska szpiku kostnego do miejsca uszkodzenia, jest zabezpieczenie przed dalszym zniszczeniem bądź postępującym procesem degeneracji istniejących struktur nerwowych. Strategie lecznicze podejmowane w tym okresie mają na celu również uzyskanie w późniejszym etapie tworzenia nowych połączeń neuronalnych mogących zastąpić uszkodzony obszar układu nerwowego bądź strukturę tkanki nerwowej (19,47,70-73,85,87,89,97,99-104). Nasuwa się pytanie czy możliwe jest włączenie nowych wszczepionych komórek do istniejącej sieci neuronalnej, a jeśli tak, to jak szybko i w jakim stopniu?

W pracach zajmujących się wpływem komórek podścieliska szpikowego na schorzenia CUN, tematami często dyskutowanymi jest kwestia możliwości odbudowy połączeń nerwowych, zachowanie istniejących oraz pobudzanie uszkodzonych struktur nerwowych do produkcji neurotransmiterów (105). Równie istotnym problemem jest poszukiwanie sposobów na poprawę oraz przywrócenie zaburzonych funkcji ruchowych oraz sensorycznych (75,87,97,98,106). Stopień zdrowienia badanych zwierząt szacowano w badaniach przedklinicznych oceniając orientację przestrzenną zwierzęcia i możliwości nauczania motorycznego (ang. Morris Water Maze Test) (83). Badano też wytrzymałość na wysiłek oraz lokomocję (Rotarod Test) (47,75,85,97,98), zaburzenia czucia na podstawie szybkości lokalizacji bodźca (ang. Adhesive-removal Somatosensory Test) (87), oraz zaburzenia równowagi (ang. Beam Balance) (75,98).

W doświadczalnie wywołanym urazowym uszkodzeniu mózgu i udarze, w badaniach przeprowadzonych między innymi. przez Shohami, stopień zdrowienia określano najczęściej przy użyciu skali oceny ciężkości stanu neurologicznego (ang. Neurological Severity Scale, NSS). Na podstawie tej skali zdrowienie zwierząt po przeszczepie komórek ze szpiku kostnego oznaczało poprawę w zdolności zginania kończyn, utrzymania równowagi, poprawę w odruchach kończyn, rogówki czy reakcji na bodziec (107).

Rezultaty przedstawionych dotychczas doniesień dotyczących badań z użyciem komórek podścieliska szpiku kostnego wykonywanych doświadczalnie na zwierzętach, mogą wskazywać na możliwość uzyskania w przyszłej terapii poprawy funkcji ruchowych i czuciowych również u ludzi (102,108).

Najnowsze doniesienia naukowe prezentują wyniki badań dotyczących zdolności komórek szpikowych do zasiedlania zmienionej chorobowo tkanki mózgowej, a także przekształcania się tych komórek w komórki o morfologii komórek rezydentnych. Komórki te migrują do otaczającej tkanki i produkują czynniki wzrostowe działające troficznie na tkankę w miejscu uszkodzenia (24,62,74,75,85). Zmianom histologicznym i histochemicznym towarzyszyła również poprawa funkcji neurologicznych u badanych zwierząt (47,75,85,87,97,98).

Tworzenie nowych połączeń nerwowych, zachowywanie istniejących oraz pobudzanie struktur nerwowych do produkcji neurotransmiterów, pozostaje w ścisłym związku z możliwością poprawy zaburzonych funkcji. Trening u zwierząt i odpowiednia rehabilitacja u ludzi może wpływać na procesy neurogenezy, neowaskularyzacji, oraz neuralnej reorganizacji (109). Przeprowadzone badania wykazują, że u zwierząt przebywających w środowisku wymagającym większej aktywności ruchowej następuje szybsza poprawa sprawności funkcjonalnej (110).

Obserwacja ta może dać podstawy do przypuszczenia, że terapia w schorzeniach mózgu polegająca na transplantacji komórek szpiku kostnego, wymaga zastosowania rehabilitacji ukierunkowanej na powstałe zaburzenia funkcjonalne, podobnie jak w fizjoterapii większości pacjentów z chorobami mózgu.

W oparciu o te doniesienia można zaryzykować twierdzenie, że perspektywa wykorzystywania komórek pochodzących ze szpiku kostnego do leczenia chorób neurodegeneracyjnych, udarów i urazów mózgu wydaje się coraz bliższa. Przeprowadzane badania wskazują na wiele możliwości wykorzystania multipotencjalnych zdolności komórek podścieliska szpiku kostnego. Zastosowanie tych komórek zależy od miejsca oraz sposobu ich implantacji, zasad prowadzenia hodowli komórkowej, oraz możliwości modyfikowania ich wzrostu poprzez czynniki wzrostowe pochodzące z zewnątrz jak i poprzez te, które wytwarzane są w rejonie, w który dokonuje się przeszczepienia. Pomimo tych pozytywnych sygnałów świadczących o dobroczynnej roli komórek stromalnych, między innymi w procesie gojenia, ich zastosowanie w terapii pacjentów cierpiących na pourazowe uszkodzenie mózgu wymaga nadal wielu dalszych badań. Niezbędne są kolejne doświadczenia, dzięki którym opracowane zostaną zasady stosowania komórek szpikowych w terapii układu nerwowego oraz nowe modele zwierzęce chorób mózgu. Być może pozwoli to rozpracować zmiany molekularne zachodzące w neuronach po ich uszkodzeniu, oraz poznać wpływ komórek stromalnych na procesy regeneracji tkanki nerwowej.



## 6. Wnioski

1. Komórki podścieliska szpikowego wykazują możliwość zasiedlenia i przeżycia w środowisku uszkodzonej tkanki mózgowej.
2. Implantacja komórek podścieliska szpikowego powoduje w rejonie uszkodzenia znaczne zwiększenie liczby makrofagów i mikrogleju, zaobserwowane w 7 i 14 dniu badania.
3. Dostarczenie komórek podścieliska szpikowego bezpośrednio do miejsca urazu powoduje zwiększenie ilości astrocytów, co może przyspieszać powstawanie blizny glejowej, jak zaobserwowano na zdjęciach.
4. Implantacja komórek podścieliska szpikowego może powodować nasilenie procesu angiogenezy w tkance bliznowatej w miejscu uszkodzenia.
5. Przeprowadzone badania wykazują na celowość przeprowadzania w przyszłości badań dotyczących odległych efektów implantacji komórek podścieliska szpikowego do uszkodzonej tkanki mózgowej.

## 7. Streszczenie

Implantacja wyhodowanych *in vitro* komórek podścieliska szpikowego do uszkodzonej tkanki mózgowej, stwarza nowe perspektywy dla terapii chorób neurologicznych. Celem przeprowadzonych badań jest odpowiedź na pytanie czy komórki podścieliska szpikowego podane do uszkodzonej kory mózgowej mogą modyfikować aktywność komórkową w bliźnie.

Komórki szpikowe do 14 dniowej hodowli komórkowej *in vitro* pozyskiwano z kości udowych szczurów rasy Wistar. Do hodowli komórkowej dodawano bromodeoksyurydyny w celu znakowania komórek podścieliska szpiku kostnego. Zwierzęta doświadczalne obejmujące 42 osobniki podzielono na grupy: kontrolną i badawczą. Przebadano również tkankę mózgową nieuszkodzoną pobraną od zdrowych osobników. Bezpośrednio po wykonaniu uszkodzenia kory mózgowej w lewej półkuli, dokonywano iniekcji zawiesiny komórek stromalnych do tkanki mózgowej w ilości  $2 \times 10^6$  i objętości 10  $\mu$ l soli fizjologicznej. Zwierzętom z grupy kontrolnej poddanych tej samej procedurze wykonania uszkodzenia podawano w miejsce uszkodzenia 10  $\mu$ l soli fizjologicznej. Tkankę mózgową od zwierząt pobierano w 2, 7 i 14 dniu od wykonania uszkodzenia. Wyizolowane fragmenty tkanki zatapiano w parafinie i krajano w płaszczyźnie strzałkowej na skrawki o grubości 7  $\mu$ m. Otrzymane skrawki z górnej warstwy uszkodzenia (do 400  $\mu$ m) barwiono standardową metodą hematoksylina i eozyna. Tkanki z środkowej części uszkodzenia (od 400  $\mu$ m do 800  $\mu$ m) barwiono w celu wykrycia białka specyficznego dla astrocytów – GFAP (ang. glial fibrillary acidic protein). Otrzymane skrawki z środkowej części uszkodzenia (od 400  $\mu$ m do 800  $\mu$ m) inkubowano z lektynami sprzężonymi z peroksydazą na obecność makrofagów/mikrogleju. Skrawki ( z warstw od 300  $\mu$ m do 700  $\mu$ m ) barwiono używając

anty-BrdU Staining Kit w celu wykrycia wyznakowanych komórek podścieliska szpiku kostnego na obszarze uszkodzenia. Preparaty analizowano używając mikroskopu świetlnego.

W prezentowanych preparatach tkanki mózgowej, w drugim dniu od wykonania uszkodzenia obserwowano charakterystyczny wzrost ilości makrofagów, przy współistniejącej podwyższonej liczbie mikrogleju, zarówno w grupie kontrolnej jak i badawczej. W siódmym dniu od wykonania uszkodzenia nadal obserwowano utrzymującą się wysoką aktywność makrofagów w grupie badawczej. Może wskazywać to na fakt, że wszczepione komórki podścieliska szpikowego migrują w rejon uszkodzenia i mogą aktywować komórki mikrogleju do przekształcenia w makrofagi w miejscu podania. Przeprowadzone badania pozwoliły odnotować w grupie badawczej w siódmym i czternastym dniu większą ilość makrofagów w porównaniu do grupy kontrolnej (na poziomie istotności statystycznej). Przyczyną tego zjawiska mogło być dostarczenie wraz z komórkami podścieliska szpikowego dodatkowych sygnałów aktywujących mikroglej spoczynkowy oraz powodujących napływ w rejon uszkodzenia komórek makrofagowych. Dostarczenie komórek podścieliska szpiku kostnego w rejon uszkodzenia może być również powodem utrzymywania się w siódmym i czternastym dniu zwiększonej liczby komórek mikrogleju u zwierząt w grupie badawczej. Może to wynikać z przekształcania makrofagów, dostarczonych z komórkami szpikowymi, w komórki mikrogleju.

Oprócz zaobserwowanych zmian w ilości makrofagów i mikrogleju widoczne było również w grupie badawczej szybsze zabliznianie w miejscu uszkodzenia. W siódmym dniu wyraźnie zauważalna była wokół uszkodzenia młoda łącznotkankowa blizna z wbudowanymi naczyniami kapilarnymi, natomiast w czternastym dniu obserwowano większe wypełnienie uszkodzenia, szczególnie

w warstwie przyściennej. W grupie badawczej zaobserwowano obecność komórek podścieliska szpikowego w otaczającej uszkodzenie tkance, już w drugim dniu po uszkodzeniu. W czternastym dniu po urazie wyraźne były zaznaczone komórki podścieliska wbudowane już w otaczającą tkankę mózgową zwierząt doświadczalnych. U zwierząt, u których dokonano wszczepienia komórek podścieliska szpikowego, zaobserwowano również liczne młode naczynia kapilarne, natomiast w grupie kontrolnej nie obserwowano takich naczyń krwionośnych.

Zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ilości astrocytów w tej grupie badawczej zarówno w siódmym jak i czternastym dniu po wykonaniu uszkodzenia w tkance mózgowej w porównaniu do grupy kontrolnej. Przeszczepione do miejsca uszkodzenia komórki podścieliska szpiku kostnego mogły być czynnikiem, który powoduje wzrost ilości astrocytów w otoczeniu uszkodzonej tkanki. Na zdjęciach wykonanych w tych dniach wyraźnie widoczne są w otoczeniu blizny zarówno astrocyty włóknkowe jak i protoplazmatyczne.

Przeprowadzone badania pozwalają wysunąć wniosek, że komórki podścieliska szpikowego przeszczepione w miejsce uszkodzenia w korze mózgowej zmieniają aktywność komórkową w obrębie tworzącej się blizny glejowej poprzez zwiększenie ilości komórek makrofagów, mikrogleju i astrocytów w tym obszarze. Obserwacje mikroskopowe pozwalają zaznaczyć również tendencję do szybszego zablizniania w obrębie uszkodzenia, możliwość wbudowywania i przeżycia implantowanych komórek podścieliska w istniejącą tkankę mózgową, oraz nasilenie procesu angiogenezy w rejonie blizny.

Pomimo tych pozytywnych sygnałów świadczących o dobroczynnej roli komórek stromalnych, między innymi w procesie gojenia, ich zastosowanie w terapii pacjentów cierpiących na pourazowe uszkodzenie mózgu wymaga nadal wielu

dalszych badań. Przeprowadzone badania wskazują na celowość przeprowadzania w przyszłości badań dotyczących odległych efektów implantacji komórek podścieliska szpikowego do uszkodzonej tkanki mózgowej. Dzięki temu będzie możliwe lepsze poznanie zmian na poziomie komórkowym zachodzących w tkance mózgowej podczas procesu chorobowego i wpływu implantowanych komórek stromalnych na proces gojenia tkanki nerwowej po urazie.

## 8. Summary

Transplantation of cultured marrow stromal cells creates a new possibility for the therapy of neurological disorders and traumatic brain injuries. The aim of this study was to assess the influence of the implantation of marrow stromal cells to the site of injury of cerebral cortex on the healing process due to the modification of cell activity.

Marrow stromal cells were harvested from Wistar rat's femoral bone and cultured "*in vitro*" for 14 days. Bromodeoxyuridine was added to cell culture to mark them. The Wistar rats subjected to mechanical brain injury /n=42/ were divided into experimental and control groups. Additional sham operated group was created as the reference group. Animals from the experimental group were given marrow stromal cells ( $2 \times 10^6$  / 10  $\mu$ l) to left cerebral cortex, just after injury. Control animals received saline alone. Animals were sacrificed after 2, 7 and 14 days. The injured cortex was removed and fixed in 4% formaldehyde. Tissue blocks were embedded in paraffin and cut in 7  $\mu$ m slices. Four types of staining was applied. Isolectin from *Bandeira simplicifolia* conjugated with horseradish peroxidase was used for detection of macrophages and microglial cells. Immunocytochemical staining was used for detection of GFAP /glial fibrillary acid protein/ typical for astrocytes. Also a standard histological staining of hematoxyline-eosine was applied. BrdU Staining Kit was used to detection Bromodeoxyuridine. The observation was carried out under light microscope.

The results have shown the significant increase of macrophages and microglial cells on the second day after the implantation in both groups. On seventh day after brain injury sustained high activity of macrophages in experimental group was observed. This observation indicates that implanted

stromal cells of bone marrow have migrated to the lesion site and could activate transformation of microglial cells to macrophages. Data show significantly higher number of macrophages in the site of brain injury in experimental group, comparing to the control group in 7th and 14th day. It is likely that the marrow stromal cells could secrete the substance activating microglial cells and could stimulate macrophages inflow into the lesion site. Also in experimental group sustained high amount of microglial cells was observed in 7th and 14th day of study. This effect could be the consequence of macrophages – microglial cells transformation.

In the experimental group the increased formation of glial scar has been observed. On 7th day after operation glial scar with newly formed blood vessels was clearly seen. On 14th day larger filling of lesion site with new scar tissue was observed, especially in the lateral parts. After 2 days bone marrow cells were already found in tissue surrounding lesion site. On 14th day after injury stromal cells were incorporated into the brain cortex. In the control group no vessel formation was observed.

Significant increase of astrocytes was found in the brain tissue of the experimental group, as compared to the control group on 7th and 14th day of the study

The study has shown that marrow stromal cells implantation into the injured brain tissue produces significant changes of cell activity in growing glial scar by increasing the number of macrophages, microglial cells and astrocytes. Microscopic examinations have shown show the increased formation of glial scar and new vessels. Stromal cells are able to survive in the brain tissue lesion site.

Bone marrow stromal cells could play an important role in the modulation of cellular response after traumatic brain injury. Experiment with implantation

of marrow stromal cells to the injured cerebral cortex have shown that long-term observations of the modification of cells activity in glial scars are needed.



## 9. Literatura

1. Longstaff A., Neurobiologia, 2005, Wydawnictwo Naukowe PWN;
2. Prusiński Antoni, Neurologia praktyczna wyd. III, Warszawa 2005, Wydawnictwo Lekarskie PZWL;
3. Bochenek Adam, Michał Reicher, 2000, Anatomia Człowieka, tom IV, Układ nerwowy ośrodkowy wyd. III, Warszawa 2000, Wydawnictwo Lekarskie PZWL;
4. Konturek Stanisław, Neurofizjologia, Fizjologia człowieka, 1999, t.IV;
5. Ganong W. F., 2005, Review of Medical Physiology. 22th edn. Appleton and Lange;
6. Guyton A. C., Hall J. E., 1995, Textbook of Medical Physiology. 9th edn., Saunders, 1995;
7. Fox Stuart I, 2004, Human Physiology, 8 ed, Pierce College;
8. Ostrowski K., Histologia, wyd. II, Warszawa, 1995, Wydawnictwo Lekarskie PZWL;
9. Silver J., Miller J.H., Regeneration beyond the glial scare, Neuroscience, 2004, Vol 5 Febr: 146-156;
10. Grafstein B., Roger Sperry: pioneer of neuronal specificity. J Neurophysiol. 2006 Dec;96(6):2827-9;
11. Jakimowicz W., Neurologia kliniczna w zarysie, PZWL, 1987, Warszawa;
12. Sokołowski B., Błyszczuk J., Zarys anatomii człowieka cz. I - IV, 1996, Wydawnictwo Skryptowe nr 135, AWF Kraków;
13. Stevens A., Lowe J. S., Histologia, Wydawnictwo Medyczne Słotwiński 1994, Verlag, Brema 1994;

14. Royo NC, Schouten JW, Fulp CT, Shimizu S, Marklund N, Graham DI, McIntosh TK., From cell death to neuronal regeneration: building a new brain after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Aug;62(8):801-11;
15. Brzeziński T., *Historia Medycyny*, PZWL Warszawa 1988;
16. Seyda B., *Dzieje medycyny w zarysie*, Warszawa 1973, PZWL;
17. Bauer, J.; Rauschka, H.; Lassmann, H., Inflammation in the nervous system : the human perspective. *Glia*, 2001 36:235-243;
18. Berry M., Maxwell W. L., Logan A., Mathewson A., I in., Deposition of scare tissue in the central nervous system. *Acta Neurochir (sup)*, 1983 32: 31-53;
19. Björklund, L. M; Sanchez-Pernaute, R.; Chung, S.; Andersson, T.; Chen, I. Y.; McNaught, K. S.; Brownell, A. L.; Jenkins, B. G.; Wahlestedt, C.; Kim, K. S.; Isacson O., Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2002, 99:2344-2349;
20. Yoshizaki, T.; Inaji, M.; Kouike, H.; Shimazaki, T.; Sawamoto, K.; Ando, K.; Date, I.; Kobayashi, K.; Suhara, T.; Uchiyama, Y.; Okano, H., Isolation and transplantation of dopaminergic neurons generated from mouse embryonic stem cells. *Neurosci. Lett.*, 2004, 363:33-37;
21. Yamazaki K., Eyden B.,P., A study of intercellular relationships between trabecular bone and marrow stroma cells in the murine femoral metaphysis , *Anat. Embryol.*, 1995, 192:9-20;
22. Rosendaal M. ,Gap junctions in blood forming tissues, *Microscopy Research and Technique*, 1995, 31: 396-407;
23. Imai Y, Yamakawa M, Kasajima T., The lymphocyte-dendritic cell system. *Histol Histopathol.* 1998 Apr;13(2):469-510;

24. Bajenoff M, Egen JG, Koo LY, Laugier JP, Brau F, Glaichenhaus N, Germain RN., Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes. *Immunity*. 2006 Dec;25(6):989-1001;
25. Svensson M, Kaye PM., Stromal-cell regulation of dendritic-cell differentiation and function., *Trends Immunol*. 2006 Dec;27(12):580-7;
26. Tang Q, Bluestone JA., Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev*. 2006 Aug;212:217-37;
27. Tang Q, Krummel MF., Imaging the function of regulatory T cells in vivo. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):496-502;
28. Szakal AK, Tew JG., Follicular dendritic cells: B-cell proliferation and maturation. *Cancer Res*. 1992 Oct 1;52(19 Suppl):5554-5556;
29. Terashima K., Dobashi M, Maeda K, Imai Y., Follicular dendritic cell and ICCOSOMES in germinal center reactions. *Semin Immunol*. 1992 Aug;4(4):267-74;
30. Abbound C. N., Lichtman M. A., Structure of marrow W: Beutler E., Lichtman M. A., Coller B. S., Kipps Th. J. (Ed). *Williams Hematology Fifth Edition*. McGraw-Hill, Inc. Health Professions Division, 1995, New York, 26-38;
31. Galmiche M.C., Koteliansky V.E., Herve P., Charbord P. , Stromal cells from human long-term bone marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiated stromal cell, *J. Histochem.Cytochem.*, 1993, 49:66-76;
32. Januszewski M., Dąbrowski Z., Adamus M., Niedźwiedzki T., Tree-dimensional model of bone marrow stroma cell culture, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2003, 13, 1-9;

33. Niedzwiedzki T, Dabrowski Z, Miszta H, Pawlikowski M., Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect., *Biomaterials*. 1993;14(2):115-21;
34. Gilis-Januszewski M., Znaczenie podścieliska szpiku kostnego w procesach hemopoezy w: *Fizjologia krwi, wybrane zagadnienia*. Wydawnictwo Naukowe PWN. 1998: 58-85;
35. Takashi A., Xiaonan X., Yiqiang C., Tohru S., Kozo M., Stimulation of interleukin-6 production by endothelin in rat bone marrow-derived stroma cells, *Blood*, 1994, 84:2531-2538;
36. Lichtman M.A., Packman C.H., Constone L.S., Molecular and cellular traffics across the marrow sinus wall. W: Tavassoli M. (Ed). *Blood Cell Formation: The Role of Hemopoietic Microenvironment*. Humana Press, Clifton, New York, 1989, 87-140;
37. Seelentag W.K., Mermond J., Montesano R., Vassalli P., Additive effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor on the accumulation of three granulocyte and macrophage colony-stimulating factor mRNA in human endothelial cells. *EMBO J.*,1987, 6: 2261-2265;
38. Wight T.N., Knisella M.G., et al., Proteoglycans in human long term bone marrow cultures.: Biochemical and ultrastructural analysis. *Blood*, 1986, 67: 1333-1343;
39. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells., *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7;

40. Eisenberg L., Burns L., Eisenberg C.: Hematopoietic cells from bone marrow have the potential to differentiate into cardiomyocytes in vitro. *Anat. Rec.A.* 2003; 274A: 870-882;
41. Miyazaki M, Masaka T, Akiyama I, Nakashima E, Sakaguchi M, Huh NH Propagation of adult rat bone marrow-derived hepatocyte-like cells by serial passages in vitro. *Cell Transplant*, 2004, 13:385-396;
42. Olivares, E. L., Ribeiro, V. P.; Werneck de Castro, J. P.; Ribeiro, K. C.; Mattos, E. C.; Goldenberg, R. C.; Mill, J. G.; Dohmann, H. F.; dos Santos, R. R.; de Carvalho, A. C.; Masuda, M. O., Bone marrow stromal cells improve cardiac performance in healed infarcted rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004, 287:464-470;
43. Sanchez-Ramos J., Song S., Cardozo-Pelaez F., Hazzi C., Stadeford T., Willing A., Freeman T., Saporta S., Janssen W., Patel N., Cooper D., Sanberg P.: Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 2000; 164: 247-256;
44. Spees J., Olson S., Ylostalo J., Lynch P., Smith J., Perry A., Peister A., Wang M., Prockop D., Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2003; 100: 2397-2402;
45. Connolly J., Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Otrhop.* 1995; 313: 8-18;
46. Niedzwiedzki T., Mineralogic research of bone union formation after transplantation of autogenic bone marrow and stromal cells into the bone defect from in vitro culture. *Experimental studies. III., Przegl Lek.* 1992;49(8):249-54;

47. Lu, D.; Mahmood, A.; Wang, L.; Li, Y.; Lu, M.; Chopp, M., Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport.*, 2001, 12:559-63;
48. Mahmood, A.; Lu, D.; Lu, M.; Chopp, M., Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, 2003, 53:697-703;
49. Mezey, E.; Chandross, K. J.; Harta, G.; Maki, R. A.; McKercher, S. R., Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 2000, 290:1779-1782;
50. Bjornson, C. R.; Rietze, R. L.; Reynolds, B. A.; Magli, M. C.; Vescovi, A. L., Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*, 1999, 283:534-537;
51. Chen S., Pickard J., Harris N., Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury, *Experimental Neurology*, 2003, 182, 87-102;
52. Schouten J., Fulp C., Royo N., A review and rationale for the use of cellular transplantation as a therapeutic strategy for traumatic brain injury, *Journal of Neurotrauma*, 2004, Vol 21, Nr 11, 1501-1538;
53. Chen, X.; Katakowski, M.; Li, Y.; Lu, D.; Wang, L.; Zhang, L.; Chen, J.; Xu, Y.; Gautam, S. C.; Mahmood, A.; Chopp, M., Human bone marrow stromal cultures conditioned by traumatic brain tissue extracts: growth factors production. *J. Neurosci. Res.*, 2002, 69:687-691;
54. Kłopotowska D., Strządała L., Rola receptora TrkC i neutrofina 3 w rozwoju i funkcji komórek neuralnych *Postepy Hig Med Dosw. (online)*, 2005; 59: 517-522;

55. Bałkowiec-Iskra E., Kurkowska-Jastrzębska I., Członkowska A., Członkowski A., Wpływ reakcji autoimmunologicznej na procesy regeneracji w ośrodkowym układzie nerwowym, *Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii*, 2005, 1, 61-70;
56. Fiszer U., Wybrane aspekty zaburzeń immunologicznych immunologicznych chorobie Parkinsona, *Neurologia i Neurochirurgia Polska*, 2004, 38, (supl 1), 63-66;
57. Kim, B. J., Seo, J. H.; Bubien, J. K.; Oh, Y. S., Differentiation of adult bone marrow stem cells into neuroprogenitor cells in vitro. *Neuroreport.*, 2002 13:1185-1188;
58. Woodbury, D.; Schwarz, E. J.; Prockop, D. J.; Black, B., Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J. Neurosci. Res.*, 2000, 61:364-370;
59. Holmin, S.; Schalling, M.; Hojeberg, B.; Nordqvist, A. C.; Skeftruna, A. K.; Mathiesen, T. Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. *J. Neurosurg*, 1997, 86:493-504;
60. Tzeng, S. T.; Wu, J. P. Responses of microglia and neural progenitors to mechanical brain injury. *Neuroreport.*, 1999, 10, 2287-2292;
61. Fitch, M. T.; Silver, J., Activated macrophages and the blood-brain barrier: inflammation after CNS injury leads to increase in putative inhibitory molecules. *Exp. Neurol.*, 1997, 148:587-603;
62. Bossolasco, P., Cova, L.; Calzarossa, C.; Rimoldi, S. G.; Borsotti, C.; Lambertenghi Delilieri, G.; Silani, V.; Soligo, D.; Polli, E., Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. *Exp. Neurol.*, 2005, 193:312-325;

63. Croft, A. P.; Przyborski, S. A., Generation of neuroprogenitor- like cells from adult mammalian bone marrow stromal cells in vitro. *Stem cells Dev.*, 2004, 13:409-420;
64. Kohyama, J.; Abe, H.; Shimazaki, T.; Koizumi, A.; Nakashima, K.; Gojo, S.; Taga, T.; Okano, H.; Hata, J.; Umezawa, A., Brain from bone: efficient „meta-differentiation” of marrow stroma-derived mature osteoblast to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation*, 2001, 68:235-244;
65. Fujita T., Yoshimine T., Maruno M., Hayakawa T., Cellular dynamics of macrophages and microglial cells in reaction to stab wounds in rat cerebral cortex, *Acta Neurochirur (Wien)*, 1998, 140: 275-279;
66. Lassmann, H.; Bruck, W.; Lucchinetti, C. Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.*, 2001, 7:115-121;
67. Eglitis M., Mezey E., Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in brains of adult mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol 94 4080-4085;
68. Popovich P.G., Hickey W.F., Bone marrow chimeric rats reveal the unique distribution of resident and recruited macrophages in the contused rat spinal cord, *J. Neuropathol Exp Neurol*, 2001, 60: 676-68;
69. Maxwell W.L., Follows R., Ashhurst D.E., Berry M., The response of the cerebral hemisphere of the rat to injury. I. The mature rat. *Phil Trans R Soc Lon*, 1990, 328: 479-500;
70. Borlongan, C. V.; Lind, J. G.; Dillon-Carter, O.; Yu, G.; Hadman, M.; Cheng, C.; Carroll, J.; Hess, D. C., Bone marrow grafts restore cerebral blood flow and blood brain barrier in stroke rats. *Brain Res.*, 2004, 1010:108-11;



71. Chen, Q.; Long, Y.; Yuan, X.; Zou, L.; Sun, J.; Chen, S.; Perez-Polo, J. M.; Yang, K., Protective effects of bone marrow stromal cells transplantation in injured rodent brain: synthesis of neurotrophic factors. *J. Neurosci. Res.*, 2005, 80:611-619;
72. Lu, D.; Li, Y.; Mahmood, A.; Wang, L.; Rafiq, T.; Chopp, M., Neural and marrow-derived stromal cells sphere transplantation in rats model of traumatic brain injury. *J. Neurosurg.*, 2002, 97:935-940;
73. Lu, L.; Zhao, C.; Liu, Y.; Sun, X.; Duan, C.; Ji, M.; Zhao, H.; Xu, Q.; Yang, H., Therapeutic benefit of TH-engineered mesenchymal stem cells for Parkinson's disease. *Brain Res. Protoc.*, 2005, 15:46-51;
74. Mahmood, A.; Lu, D.; Chopp, M. Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*, 2004, 21:33-39;
75. Mahmood, A.; Lu, D.; Wang, L.; Chopp, M. Intracerebral transplantation of marrow stromal cells cultured with neurotrophic factors promotes functional recovery in adult rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. 2002, 19:1609-17;
76. Lotan M., Schwartz M., Cross talk between immune system and the nervous system in response to injury: implication for regeneration. *Faseb J.* 1994, 8: 1026-1033;
77. Imamoto K, Leblond CP., Presence of labeled monocytes, macrophages and microglia in a stab wound of the brain following an injection of bone marrow cells labeled with <sup>3</sup>H-uridine into rats. *J Comp Neuro.* 1977 Jul 15;174(2):255-279;

78. Kennedy D.W., Abkowitz J. L., Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model. *Blood*, 1997 90: 986-993;
79. Thomas W.E., Brain macrophages: evaluation of microglia and their function. *Brain Res Rev*, 1992, 17: 61-74;
80. Banati R.B., Hoppe D., Gottmann K., Kreutzberg G.W., I in., A subpopulation of bone marrow-derived macrophage-like cells shares a unique ion channel pattern with microglia. *J Neurosci Res*, 1991, 30, 593-600;
81. Rudge J.S., Smith G.M., Silver J., An in vitro model of wound healing in the CNS: analysis of cell reaction and interaction at different ages. *Exp Neurol* , 1989, 103: 1-16;
82. Silver J., Miller J.H., Regeneration beyond the glial scar, *Neuroscience*, 2004, Vol 5 Febr: 146-156;
83. Iihoshi, S.; Honmou, O.; Houkin, K.; Hashi, K.; Kocsis, J. D., A therapeutic window for intravenous administration of autologous bone marrow after cerebral ischemia in adult rats. *Brain Res.*, 2004, 1007:1-9;
84. Tondreau, T.; Lagneaux, L.; Dejeneffe, M.; Massy, M.; Mortier, C.; Delforge, A.; Bron D., Bone marrow-derived mesenchymal stem cells already express specific neural proteins before any differentiation. *Differentiation.*, 2004, 72:319-326;
85. Li, Y.; Chen, J.; Chen, X. G.; Wang, L.; Gautam, S. C.; Xu, Y. X.; Katakowski, M.; Zhang, L. J.; Lu, M.; Janakiraman, N.; Chopp, M., Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery. *Neurology.*, 2002, 59:514-523;

86. Li, Y.; Chen, J.; Zhang, C. L.; Wang, L.; Lu, D.; Katakowski, M.; Gao, Q.; Shen, L. H.; Zhang, J.; Lu, M.; Chopp, M., Gliosis and brain remodeling after treatment of stroke in rats with marrow stromal cells. *Glia*, 2005, 49:407-417;
87. Chen, J.; Li, Y.; Wang, L.; Zhang, Z.; Lu, D.; Lu, M.; Chopp, M., Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2001, 32: 1005-1011;
88. Chen, J.; Li, Y.; Zhang, R.; Katakowski, M.; Gautam, S. C.; Xu, Y.; Lu, M.; Zhang, Z.; Chopp, M., Combination therapy of stroke in rats with a nitric oxide donor and human bone marrow stromal cells enhances angiogenesis and neurogenesis. *Brain Res.*, 2004, 1005:21-28;
89. Li, Y.; Chen, J.; Wang, L.; Zhang L.; Lu, M.; Chopp, M., Intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.*, 2001, 316:67-70;
90. Johnson-Green P.C., Dow K.E., & Riopelle R.J., Characterization of glycosaminoglycans produced by primary astrocytes in vitro. *Glia*, 1991 4, 314-321;
91. Jones LL, Margolis RU, Tuszynski MH., The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan, brevican, phosphacan, and versican are differentially regulated following spinal cord injury. *Exp Neurol.*, 2003, Aug;182(2):399-411;
92. McKeon RJ, Jurynech MJ, Buck CR., The chondroitin sulfate proteoglycans neurocan and phosphacan are expressed by reactive astrocytes in the chronic CNS glial scar. *J Neurosci.* 1999 Dec 15;19(24):10778-88;

93. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L., Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*. 2002 Nov 8;298(5596):1248-51;
94. Smith G., Miller R.H., Immature type-1 astrocytes suppress glial scar formation, are motile and interact with blood vessels, *Brain Res*, 1991, 543, 11-122;
95. Tropea D., Caleo M., Maffei L., Synergistic effects of brain-derived neurotrophic factor and Chondroitinase ABC on retinal fiber sprouting after denervation of the superior colliculus in adult rats, *J Neurosci*, 2003, 23, 7830-7838;
96. Garcia, R.; Aguiar, J.; Alberti, E.; de la Cuetara, K.; Pavon N., Bone marrow stromal cells produce nerve growth factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 316:753-754;
97. Li, Y.; Chopp, M.; Chen, J.; Wang, L.; Gautam, S. C.; Xu, Y. X.; Zhang, Z., Intrastratial transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.*, 2000, 20:1311-1319;
98. Mahmood, A.; Lu, D.; Yi, L.; Chen, J. L.; Chopp, M., Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *J. Neurosurg.*, 2001, 94:589-595;
99. Bang, O. Y.; Lee, J. S.; Lee, P. H.; Lee G., Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.*, 2005, 57:874-882;
100. Georgievska, B.; Kirik, D.; Rosenblynd, C.; Lundberg, C.; Bjorklund, A., Neuroprotection in the rat Parkinson model by intrastratial GDNF gene transfer using a lentiviral vector. *Neuroreport.*, 2002, 13:75-82;

101. Freed, C. R.; Greene, P. E.; Breeze, R. E.; Tsai, W. Y.; DuMouchel, W.; Kao, R.; Dillon, S.; Winfield, H.; Culver, S.; Trojanowski, J. Q.; Eidelberg, D.; Fahn, S., Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.*, 2001, 344:710-719;
102. La Nasa, G.; Littera, R.; Cocco, E.; Battistini, L.; Marrosu, M. G.; Contu, L., Allogenic hematopoietic stem cell transplantation in a patient affected by large granular lymphocyte leukemia and multiple sclerosis. *Ann. Hematol.*, 2004, 83:403-405;
103. Mancardi, G. L.; Murialdo, A.; Rossi, P.; Gualandi, F.; Martino, G.; Marmont, A.; Ciceri, F.; Schenone, A.; Parodi, R. C.; Capello, E.; Comi, G.; Uccelli, A., Autologous stem cell transplantation as rescue therapy in malignant forms of multiple sclerosis. *Mult. Scler.*, 2005, 11:367-371;
104. Schwarz, E. J.; Regel, R. L.; Alexander, G. M.; Class, R.; Azizi, S. A.; Prockop, D. J., Rat marrow stromal cells rapidly transduced with a self-inactivating retrovirus synthesize L-DOPA in vitro. *Gene Ther.*, 2001, 8:1214-1223;
105. Schwarz, E. J.; Alexander, G. M.; Prockop, D. J.; Azizi, S. A., Multipotential marrow stromal cells transduced to produce L-DOPA: engraftment in a rat model of Parkinson disease. *Hum. Gene Ther.*, 1999, 10:2539-2549;
106. Fujimoto S., Longhi L., Saatman K., McIntosh T., Motor and cognitive function evaluation following experimental traumatic brain injury, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2004, 28, 365-378;
107. Shohami E., Novikov M., Bass R., Long-term effect of HU-211, a novel non – competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat. *Brain Res.*, 1995, 674: 55-62;

108. Chu K., Kim M., Park K., Leong S., Human neural stem cells improve sensorimotor deficits In the adult rat brain with experimental focal ischemia, Brain Research, 2004, 1016, 145-153;
109. Lindvall O., Kokaia Z., Recovery and rehabilitation in stroke – stem cell, Stroke, 2004, 35 (supl 1), 2691-2694;
110. Harvay R., Chopp M., The therapeutic effects of cellular therapy for functional recovery after brain injury. Phys Med Rehabil Clin N Am. 2003; 14 (supl 1): 143-151;