

Received: 2012.06.12
Accepted: 2013.03.03
Published: 2013.07.23

Komórki Schwanna w terapii uszkodzeń rdzenia kręgowego

Schwann cells in therapy of spinal cord injuries

Izabella Woszczycka-Korczyńska, Edyta Olakowska, Wiesław Marcol,
Joanna Lewin-Kowalik, Halina Jędrzejowska-Szypułka

Katedra i Zakład Fizjologii Śląski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Komórki Schwanna (KS) wykazują szczególną aktywność w procesie naprawy układu nerwowego po jego uszkodzeniu ze względu na swoje zdolności do różnicowania, migrowania, proliferacji oraz mielinizacji aksonów. Zwiększają one również wytwarzanie licznych czynników neurotroficznych i stwarzają odpowiednie środowisko dla regenerujących aksonów. Eksperymenty przeprowadzone z zastosowaniem KS w przeszczepach nerwów wykazały, że błona podstawna tych komórek zawierająca molekuly adhezyjne jest atrakcyjnym materiałem do tworzenia protez nerwowych, ułatwiających wzrost aksonom. Ponadto KS wytwarzając stabilną mielinę przywracają prawidłową czynność neuronu. W modelach zwierzęcych zaczęto stosować przeszczepy KS w uszkodzeniach mieliny w stwardnieniu rozsianym, chorobie Parkinsona oraz urazach mózgu i rdzenia kręgowego. Ponieważ wszczepione KS nie mają zdolności migracji w obrębie prawidłowego układu nerwowego w wielu eksperymentach stosowano KS pochodzące z embrionów szczurzych. Komórki te migrowały przez prawidłową tkankę nerwową, ich przeżycie było dłuższe, a wytworzona mielina nie ulegała uszkodzeniu w przebiegu stwardnienia rozsianego. Zaobserwowano także szybki powrót czynności motorycznych uszkodzonych aksonów rdzenia kręgowego szczura po wszczepieniu KS pochodzących z komórek prekursorowych, które zawierają fenotyp charakterystyczny dla KS. Wielu badaczy wskazuje jednak na wczesną apoptozę przeszczepionych komórek, dlatego też istnieje konieczność stworzenia nowych metod poprawiających przeżycie KS w celu zastosowania ich w naprawie uszkodzeń rdzenia kręgowego.

Słowa kluczowe:

komórki Schwanna • regeneracja • uszkodzenie rdzenia kręgowego • neurotrofiny

Summary

Schwann cells (SC) have a special activity in the repair processes after injury of the nervous system because of the capability of differentiation, migration, proliferation and myelinization of axons. They enhance production of numerous neurotrophic factors, thus creating a permissive environment for axonal regeneration. Experimental studies using SC in neuronal transplants showed that these cells with their basal membrane with adhesion molecules are attractive material for neural prostheses facilitating axon growth. Moreover, SC can produce stable myelin, restoring normal function of the neuron. Transplantations of SC in myelin injury have been used in animal models of multiple sclerosis, Parkinson's disease, and brain and spinal cord injuries. Because the transplanted SC have no ability to migrate within the normal nervous system, in many experiments SC derived from rat embryos were applied. Such cells migrated through normal nervous tissue and co-operated with host cells, their survival was longer, and myelin was not destroyed in multiple sclerosis. Also, fast recovery of motor activity in injured axons in rat spinal cord was observed, especially after transplantation of SC derived from skin progenitor cells or progenitor cells which have a phenotype characteristic for SC. Many authors have reported early apoptosis of transplanted SC, so a more complex

Keywords:	repair strategy is needed that combines SC transplantation with other methods in order to achieve longer survival and optimal functional recovery following spinal cord injury. Schwann cells • regeneration • spinal cord injury • neurotrophins
Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1059602
Word count:	4105
Tables:	–
Figures:	–
References:	100

Adres autorki: dr n. przyr. Izabella Woszczycka-Korczyńska, Katedra i Zakład Fizjologii Śląski Uniwersytet Medyczny, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice; e-mail: i.korczynska@interia.pl

Mechanizmy regulujące procesy regeneracji układu nerwowego po uszkodzeniu są przedmiotem szczególnego zainteresowania neurobiologów od ponad 100 lat.

Liczne eksperymenty przeprowadzone w ostatnich latach na modelach zwierzęcych ukazują ogromną złożoność zagadnień związanych z przeżyciem i regeneracją neuronów. Przecięcie włókien nerwowych prowadzi do całkowitej degeneracji obwodowego odcinka aksonu. Ustaje zdolność przewodzenia impulsów, rozpoczynają się zmiany biochemiczne i morfologiczne w samym aksonie i osłonce mielinowej [38]. Natężenie zmian degeneracyjnych zależy od rodzaju włókna i odległości od miejsca uszkodzenia. W procesie zwanym degeneracją wallerowską następuje najpierw rozpad osłonki mielinowej, zanik podstawowych składników lipidowych mieliny, a potem uprzążanie resztek przez komórki Schwanna (KS) i licznie napływające w miejsce uszkodzenia makrofagi i granulocyty [2,11,23,91].

Z danych literaturowych wynika, że komórkami szczególnie aktywnymi w tym procesie są komórki Schwanna, których intensywne podziały indukowane są jednocześnie przez rozpadającą się błonę aksonu, osłonkę mielinową oraz makrofagi [2,85]. Komórki Schwanna, po raz pierwszy opisane przez niemieckiego anatoma Theodora Schwanna, powstają podczas rozwoju z komórek grzebienia nerwowego, a ich przeżycie i dojrzewanie kontrolowane jest przez β -neuregulinę pochodzącą z neuronów [15]. Każda KS mielinizuje jeden odcinek aksonu, zatem wiele komórek tworzy osłonkę mielinową na przebiegu całego aksonu, z okresowymi przerwami, tzw. przewężeniami Ranviera [85]. KS pełnią istotne funkcje w rozwoju i prawidłowej czynności aksonów obwodowych, regulując ich średnicę oraz fosforylację neurofilamentów [65].

ROLA KS W REGENERACJI NERWÓW

Kiedy obwodowy neuron zostaje uszkodzony, proliferujące komórki Schwanna układają się w kolumny zwane

paszami Bungera, będące rusztowaniem dla stożków wzrostu, licznie wyrastających z odcinka bliższego uszkodzonego włókna nerwowego [1,28,34]. Nie ma wątpliwości, że KS stwarzają odpowiednie środowisko do regeneracji aksonów ze względu na zwiększone wytwarzanie molekuł adhezyjnych, tj. N-kadheryny (neuro-nal-calcium dependent adhesion molecules), CAMs (cell adhesion molecules) lub L1CAM (cell adhesion molecule) w obrębie swojej błony podstawnej oraz na znajdujące się tam różnorodne substancje neurotroficzne, takie jak: NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin-3), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), FGF (fibroblast growth factor) i IGF-1 (insuline-like growth factor 1) [70,80,90]. Czynniki te są odpowiedzialne za wspomaganie procesów naprawczych, łączenie się rosnących włókien nerwowych z dystalnym kikutem nerwu oraz wydłużanie aksonów w kierunku odnerwionych regionów [13,49]. Uważa się, że czynniki neurotroficzne wytwarzane i uwalniane przez komórki Schwanna są głównymi substancjami odpowiedzialnymi za zjawiska związane z naprawą i regeneracją. Nie poznano jeszcze wszystkich czynników wytwarzanych przez te komórki, a mających wpływ na regenerację nerwów obwodowych. Co więcej, znane są tylko nieliczne prace badające oddziaływanie złożonych kombinacji tych czynników (tzn. więcej niż dwóch) na regenerację układu nerwowego [21]. Z całą pewnością, do zapewnienia optymalnej regeneracji nerwowej potrzebne jest łączne oddziaływanie więcej niż jednej takiej substancji ze względu na chociażby zróżnicowanie samych neuronów, tworzących odrębne subpopulacje [95]. Przeprowadzone do tej pory prace z aplikowaniem pojedynczych substancji dały ograniczone efekty koncentrujące się wyłącznie do oddziaływania na wybrane subpopulacje neuronalne lub też wspomagające jedynie niektóre procesy związane ze zjawiskiem regeneracyjnym [20,56].

W przeprowadzonych przez nas badaniach nie wykazaliśmy np. dobroczynnego wpływu podawania NGF

na regenerację rozlegle strauumatyzowanego nerwu obwodowego, mierzoną powrotem czynności motorycznych [60]. Ponadto stwierdziliśmy, że inaktywacja BDNF w obrębie odcinka bliższego regenerującego nerwu zmniejsza ból neuropatyczny oraz powstawanie nerwiaków, nie wpływając negatywnie na regenerację neuronów [58,60]. W całej serii innych badań dotyczących tego aspektu, bazujących na oryginalnie opracowanej przez nas metodzie wprowadzania tych substancji w sąsiedztwo regenerujących neuronów w tzw. autologicznych tunelach łącznotkankowych wypełnionych fibryną wykazaliśmy, że uzyskane z poddanych 7-dniowej predegeneracji odcinków dalszych nerwów obwodowych frakcje białkowe są zdolne do indukcji i/lub nasilenia regeneracji nerwów obwodowych, łącznie z uzyskaniem poprawy funkcjonalnej neuronów hipokampa i komórek zwojowych siatkówki [25,48,59,61]. Szczególną aktywnością cechowała się mieszanina białek zawarta w przedziale mas molowych między 10 a 100 kDa. Mieszaninę tych białek podawano w obręb uszkodzenia w tunelach wykonanych z sit molekularnych (polymer hollow fiber) [48] lub też wstępnie frakcjonowano [76]. W kolejnych badaniach podjęliśmy się próby oceny zmian aktywności neurotroficznej mieszaniny białek po wyłączeniu w niej za pomocą przeciwciał wybranych czynników neurotroficznych [26]. Wykazaliśmy, że inaktywacja BDNF jedynie nieznacznie moduluje działanie neurotroficzne wyciągu z nerwów poddanych predegeneracji.

Działanie KS i innych czynników, które pobudzają neuron do regeneracji lub apoptozy jest kontrolowane przez swoiste wewnątrzkomórkowe układy sygnałowe aktywowane w następstwie uszkodzenia. Istnieje kilka szlaków tego tzw. przekazywania sygnałów, które obejmuje niezbędną do proliferacji KS fosforylację kinazy Erk1/2 (extracellular-signal-regulated kinase 1/2) oraz aktywację czynnika transkrypcyjnego 3 (ATF3) [62]. ATF3 może kontrolować ekspresję genów, które w KS wspomagają regenerację aksonu po urazie. Hunt i wsp. wykazali nadekspresję ATF3 w KS w degenerujących segmentach neuronów obwodowych, a także zmniejszenie tej ekspresji w następstwie regeneracji [36]. Ekspresja ATF3 w KS w dystalnym fragmencie uszkodzonego nerwu rozpoczyna się w ciągu 24 godzin po urazie i pozostaje na wysokim poziomie nawet w przypadku zmniejszenia regeneracji w następstwie resekcji nerwu. Liczba komórek Schwanna z ekspresją czynnika 3 koreluje z długością odrastającego aksonu, a aksony odrastają w pobliżu tych komórek [84]. Niektóre KS obumierają po uszkodzeniu. Interesującym jest także to, że w miarę upływu czasu KS tracą zdolność wytwarzania czynników niezbędnych do wzrostu aksonu i w miarę przedłużającego się procesu odnerwienia stają się bezużyteczne [30,42,92]. Komórki Schwanna znajdujące się w pobliżu miejsca przecięcia ulegają takim samym zmianom, jak te obecne w dystalnym segmencie nerwu. Przecięcie aksonu powoduje przenoszenie transportem wstecznym do ciała neuronu, m.in. Erk 1-2 oraz ATF3 – czynników stanowiących część złożonego mechanizmu, aktywowa-

nego w neuronach w odpowiedzi na proces regeneracji po urazie [12].

Stwierdzono, że neurony czuciowe i motoryczne odmiennie reagują na uszkodzenie i to zarówno w odniesieniu do regeneracji, jak i apoptozy [42,84]. Neurony czuciowe wykazują bardziej nasilony proces apoptozy niż ruchowe. Optymalny czas naprawy uszkodzenia nerwu obwodowego jest nadal nieustalony. Wiadomo jednak, że wczesne zespolenie chirurgiczne końców uszkodzonego nerwu zwiększa przeżycie neuronu i nasila proces regeneracji [29].

Bezpośredni wpływ na wydłużanie aksonów mają także znajdujące się w błonie podstawnej KS laminina i fibronektyna. Eksperymenty przeprowadzone z zastosowaniem KS w przeszczepach nerwów wykazały, że ich błona podstawna, zawierająca molekuly adhezyjne, jest atrakcyjnym materiałem do tworzenia protez nerwowych, ułatwiających wzrost regenerującym aksonom.

Aksony zdolne są do szybkiego wydłużania, gdy KS dostarczają czynników ułatwiających wzrost, ale przy ich niedoborze proces regeneracji ulega zaburzeniu [31]. Suplementacja NGF w warunkach doświadczalnych przyspiesza regenerację nerwu, a podanie miejscowe BDNF i CNTF zwiększa liczbę zmielinizowanych aksonów obwodowo od miejsca naprawy nerwu u dorosłego szczura. Marcol i wsp. badali zastosowanie ekstraktów uzyskanych z odcinków dystalnych predegenerowanych nerwów obwodowych. Autorzy wykazali, że zastosowanie frakcji postmikrosomalnych uzyskanych z 7-dniowych predegenerowanych nerwów obwodowych wspomagało regenerację uszkodzonych nerwów kulszowych szczurów w takim stopniu jak podanie BDNF [61].

Przecięcie lub uszkodzenie rdzenia kręgowego, oprócz ciężkich zaburzeń neurologicznych, powoduje masywny napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórek, prowadzący do dysfunkcji mitochondrium i zaburzenia metabolizmu komórkowego. Jony te aktywują enzymy proteolityczne, rozpad białek cytoszkieletu oraz wytwarzanie wolnych rodników, a także powodując nadmierne wytwarzanie czynników uszkadzających, takich jak prostaglandyny $F2\alpha$ [29]. Wolne rodniki indukują peroksydację lipidów w neuronach i naczyniach krwionośnych, bezpośrednio wpływając na uszkodzenie błony komórkowej aksonów, uszkodzenie mikrokrążenia i wtórnego niedokrwienia rdzenia kręgowego, które nasilają już występujący uraz. Pojawiają się substancje hamujące regenerację (-prostanoidy – $PGF2\alpha$, tromboksan A_2) i rozpoczyna się proces zapalny z następowym tworzeniem blizny. Zatem w naprawie uszkodzenia rdzenia kręgowego trzeba wziąć pod uwagę ograniczenie wtórnego uszkodzenia tkanek w celu pobudzenia komórek nerwowych do odrostu włókien i zapewnienie odpowiedniego środowiska do przeżycia komórek nerwowych. Powszechnie wiadomo, że odpowiedni proces naprawy uszkodzonego neuronu jest związany z jego przeżyciem, właściwym wzrostem aksonu i reinerwacją odpowiedniego obszaru,

co prowadzi do przywrócenia czynności motorycznych lub czuciowych nerwu.

Do zainicjowania regeneracji po urazach rdzenia kręgowego stosowane są różne strategie. Należą do nich: zastępowanie obumarłej tkanki przeszczepami komórkowymi lub protezami nerwów obwodowych, zmniejszenie nasilenia wtórnego uszkodzenia, manipulacje dotyczące środowiska, w którym przebywają komórki rdzenia kręgowego oraz zwiększenie potencjału proliferacyjnego endogennych komórek progenitorowych [95].

Jedną z metod naprawy uszkodzeń rdzenia kręgowego jest przeszczep egzogennych komórek lub tkanek. W licznych badaniach na modelach zwierzęcych do transplantacji używano: komórek opuszki węchowej [16], embrionalnych komórek rdzenia kręgowego [39], makrofagów [79], komórek wyściółki komór mózgu [37], komórek podścieliska pochodzących z adipocytów [40], KS [63] oraz komórek macierzystych neuronów [71].

PRZESZCZEPY GLEJOWYCH KOMÓREK WĘCHOWYCH

Odrębną populację komórek, znajdującą się zarówno w części obwodowej jak i ośrodkowej drogi węchowej, stanowią glejowe komórki węchowe (GKW). Ich błona komórkowa zawiera receptor NGF, lamininę i czynnik L1. Mają one zdolność do tworzenia osłonek wokół aksonów i tym samym wykazują podobieństwo do KS. Ramon-Cueto i wsp. wykazali, że GKW przeszczepione do ogniska pierwotnego uszkodzenia rdzenia kręgowego (RK) szczura wydzielają substancje neurotroficzne wpływające na aktywację genów RAG (recombination activation genes) odpowiedzialnych za regenerację, takie jak: NGF, BDNF, NT-3, PDGF (platelet-derived growth factor) [7,78]. Glejowe komórki węchowe wszczepione w miejsce uszkodzenia zmniejszały tworzenie się blizn oraz jam pourazowych w RK, promowały migrację KS do obszaru urazu, wspomagały mielinizację i regenerację aksonów. GKW podawane bezpośrednio po przecięciu rdzenia kręgowego jak i po upływie 4 tyg. od urazu przyczyniały się do poprawy funkcji motorycznych [53]. Kato i wsp. wykazali, że mimo słabo rozwiniętego układu węchowego u człowieka, ludzkie glejowe komórki węchowe pobrane z zewnętrznych warstw opuszki węchowej są również zdolne do tworzenia osłonek mielinowych oraz indukcji neuroregeneracji w OUN [43]. Chociaż prawdopodobieństwo otrzymania fragmentów nabłonka węchowego za pomocą biopsji błony śluzowej jamy nosowej waha się w populacji zdrowych młodych osób 25-75%, to niewielka inwazyjność związana z tą metodą stwarza możliwości przeszczepiania tych komórek w terapii urazów RK u ludzi.

KOMÓRKI PREKURSOROWE

W ostatnich latach pojawiły się prace [3] wykazujące, że komórki prekursorowe pochodzące ze skóry zawierają fenotyp charakterystyczny dla KS i są wrażliwe na neureguliny - czynniki działające na cewę nerwową. Ponieważ

są one łatwo dostępne i stanowią potencjalnie autologiczne źródło dojrzałych prekursorów, autorzy prac badali, czy komórki prekursorowe oraz KS wytworzone z komórek prekursorowych mogą stworzyć odpowiednie środowisko do wzrostu i regeneracji uszkodzonych aksonów w rdzeniu kręgowym. Izolowano komórki prekursorowe myszy i wszczepiano je bezpośrednio do uszkodzonego rdzenia kręgowego u szczura lub różnicowano je w KS i w takiej postaci przeszczepiano w miejsce urazu. Analiza neuroanatomiczna przeprowadzona 12 tygodni później wykazała, że oba typy komórek przeżyły w miejscu uszkodzenia, zmniejszyła się wielkość jamy pourazowej, endogenne aksony biorcy uległy mielinizacji i następowała rekrutacja endogennych KS do miejsca uszkodzenia rdzenia kręgowego. Ponadto zaobserwowano szybki powrót czynności motorycznych. KS pochodzące z komórek prekursorowych skóry mają wiele zalet. Są łatwo dostępną populacją komórek dojrzałych, których zastosowanie nie wzbudza problemów etycznych. Ponadto mają duży potencjał proliferacyjny, ponieważ zachowują się jak komórki niedojrzałe.

Remielinizację uszkodzonego RK powodowały również komórki prekursorowe astrocytów i oligodendrocytów z ekspresją neurogeniny 2 podawane wraz z czynnikami wzrostu [41] lub modyfikowane w celu nadekspresji czynników wzrostu [8]. Jednak możliwość tworzenia się guza w OUN przez stosowanie transplantów komórkowych stanowi istotny problem związany z zastosowaniem ich w praktyce [3].

KOMÓRKI PODŚCIELISKA

We wcześniejszych badaniach wykazano, że korzystne działanie obserwowane po przeszczepie komórek podścieliska pochodzących z adipocytów może nie być spowodowane różnicowaniem się tych komórek w uszkodzonej tkance, ale najprawdopodobniej wydzielaniem przez nie czynników troficznych, korzystnych dla neuronów i astrocytów. Wykazano, że komórki te wydzielają NGF i BDNF, a także stymulują komórki glejowe do wytwarzania tych neurotrofin [10]. Zmniejszenie objętości jam powstałych w uszkodzeniu rdzenia kręgowego mogło być spowodowane proliferacją komórek glejowych, a także wydłużaniem aksonów w miejscu urazu. Niestety, do tej pory nie ustalono, jakie czynniki są odpowiedzialne za te zjawiska. Przypuszcza się, że może to być nie jeden, ale synchroniczne działanie wielu czynników troficznych [72].

KOMÓRKI MIKROGLEJU

Klasyczne już doświadczenie nad wykorzystaniem populacji komórek żernych w regeneracji rdzeniowej przeprowadzili Schwartz i wsp. Badacze ci podawali dordzeniowo namnożone oraz zaaktywowane *in vitro* krwiopochodne makrofagi [88]. Przeprowadzono nawet wielce obiecujące próby u ludzi [46,87]. Analizując dostępną literaturę zwróciliśmy uwagę na inny typ komórek żernych, których niewątpliwą zaletą jest natu-

ralne występowanie w obrębie mózgu i rdzenia, a mianowicie na komórki mikrogleju. Z badań na noworodkach szczurzych, u których całkowicie przecięto rdzeń, wiadomo, że nie dochodzi u nich w ogóle do rozwoju blizn pourazowych, a odpowiedź komórek mikrogleju na uraz rdzenia jest zupełnie inna niż u osobników dorosłych. Ustalono, że u noworodków szczurzych występujące w miejscu urazu rdzenia nacieki z komórek mikrogleju są o wiele łagodniejsze oraz szybko zanikają (już po kilku dniach), obejmując swym zasięgiem jedynie najbliższe otoczenie zmiany pourazowej [22]. Istnieją jak na razie tylko pojedyncze doniesienia literaturowe, mówiące o tym, że transplantowane dordzeniowo komórki mikrogleju były zdolne do nasilenia regeneracji i to wybiórczo jedynie populacji neuronów czuciowych [77]. Co więcej, w warunkach hodowli komórkowej uzyskano przekonujące dowody, że mieszana populacja tych komórek oraz komórek Schwanna znacznie silniej stymulowała regenerację komórek czuciowych niż każda z wyżej wymienionych populacji zastosowana oddzielnie [37]. Badania te wykazały więc, że komórki mikrogleju mogą nasilić regenerację wybranych subpopulacji neuronalnych i współdziałać w tym zakresie z innymi typami komórek rdzenia. Istnieją prace, w których wykazano, że stłumienie odpowiedzi zapalnej komórek mikrogleju na uszkodzonym rdzeniu kręgowym przez zastosowanie hipotermii może wpływać bardzo korzystnie na obraz histologiczny rdzenia kręgowego oraz na powrót utraconych funkcji ruchowych [66]. Dowiedziano ponadto, że istnieje farmakologiczny sposób modyfikujący funkcje mikrogleju, polegający na neutralizacji IL-6 poprzez zablokowanie dostępności jej receptora [68]. W wyniku tego działania dochodziło w uszkodzonym rdzeniu do podniesienia poziomu czynnika stymulującego tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF – granulocyte-macrophage colony stimulating factor), silnego mitogenu między innymi dla komórek mikrogleju oraz zwiększenia jego aktywacji, co w rezultacie doprowadzało do szybkiego zmniejszenia się ilości produktów rozpadu mieliny oraz białka Nogo-A, znanego inhibitora wzrostu aksonów. Skutkowało to zwiększeniem regeneracji aksonów i ich rozgałęzieniem się (sprouting), a efektem końcowym była zaobserwowana poprawa w zakresie utraconych funkcji ruchowych. W przeprowadzonych przez nasz zespół badaniach nad regeneracją strauumatyzowanego rdzenia kręgowego dorosłych szczurów, aby przyspieszyć oczyszczanie miejsca samego urazu, zastosowaliśmy mikroglej aktywowany już w warunkach hodowlanych. Działaniem dodatkowym zastosowania mikrogleju hodowanego w postaci aktywnej, o którym w tym miejscu trzeba wspomnieć, jest możliwość jego „przestymulowania” i doprowadzenia do powstania tzw. komórek nadreaktywnych. Dzieje się tak jednak tylko w ściśle określonych warunkach. W wykorzystanej przez nas hodowli mikrogleju stosowano niskie stężenia LPS, dobrane empirycznie na podstawie wcześniej przeprowadzonych prób tak, aby uniknąć przestymulowania mikrogleju. Tego typu komórki wydzielają mnóstwo toksycznych dla neuronów substancji, takich jak chociażby TNF- α , PGE2 lub

tlenek azotu, w przeciwieństwie do nieprzestymulowanego mikrogleju, który wydzielą czynniki troficzne [45].

W przypadku aktywowanego mikrogleju, jego podawanie bezpośrednio do uszkodzonego rdzenia kręgowego miało na celu usunięcie z miejsca uszkodzenia rdzenia produktów rozpadu aksonalnego i komórkowego, co miało stymulować szybszą regenerację uszkodzonych aksonów przez wygaszenie reakcji zapalnej. Najważniejsze dla prawidłowego postępu regeneracji jest bowiem szybkie usunięcie z miejsca urazu szkodliwych czynników hamujących postęp regeneracji tak, aby maksymalnie przyspieszyć odrost aksonalny i w ten sposób uniemożliwić wystąpienie wstecznej degeneracji neuronów pozbawionych wsparcia troficznego. Można to uzyskać dwoma sposobami: podając egzogenne populacje komórek żernych lub też farmakologicznie modulując ich czynność [57].

PRZESZCZEPY ZŁOŻONE Z RÓŻNYCH TYPÓW KOMÓREK

Do przeżycia neuronów konieczna jest interakcja między aksonami a giejem, na przykład mielinizujące KS mogą wydzielają czynniki neurotroficzne ważne dla przeżywalności neuronów [100]. Z kolei aksony sygnalizują komórkom Schwanna, które z nich mają być zmielinizowane oraz jak dużo mieliny ma zostać wytworzone [69]. Zatem proces regeneracji uszkodzeń RK może być ułatwiony, gdy różne typy komórek, tj. KS, neurony lub prekursor neuronów zostaną przeszczepione razem w miejsce uszkodzenia. W licznych pracach opisywana jest częściowa poprawa czynności motorycznych po przeszczepie KS z nadekspresją NT-3 oraz z komórkami prekursorowymi neuronów. Dodanie kwasu retinowego, ułatwiającego różnicowanie komórek prekursorowych i wspomagającego działanie neurotrofin na neurogenezę, w znacznym stopniu wpłynęło na wydłużenie czasu przeżycia neuronów i ich plastyczność [72]. Autorzy stwierdzili, że jednoczesna transplantacja komórek prekursorowych neuronów oraz KS zmniejszała ekspresję cząsteczek hamujących regenerację aksonów – CSPG (chondroitin sulfate proteoglykans) oraz zwiększała ekspresję czynników promujących regenerację: –GAP-43 (growth-associated protein-43), aktywny i tubuliny [13,100]. Aktywny mikroglej uwalnia również IL-1 i IL-6, które mogą zapoczątkować proliferację komórek astrogleju i ich hipertrofię. Z kolei aktywne astrocyty podtrzymują aktywację mikrogleju przez uwalnianie CSF-1 (colony stimulating factor-1) i innych molekuł [13]. Astrocyty w mózgu i rdzeniu kręgowym również reagują na uraz wytwarzaniem czynników neurotroficznych i cząsteczek immunoregulatorowych [13]. Początkowym zadaniem jest rozpoczęcie procesu naprawy przez eliminację uszkodzonych aksonów oraz przywrócenie ciągłości bariery krew-mózg [82].

Następne zjawiska są związane z protekcją pozostałych neuronów, wzrostem włókien i przywróceniem ich funkcji [17]. W przypadku uszkodzenia nerwu obwodowego, sygnały nerwowe mogą dotrzeć do OUN,

prowadząc do aktywacji astrocytów znajdujących się w pobliżu ciała komórki. Wydaje się bardzo prawdopodobne, że astroglej w OUN i KS w obwodowym UN mogą współdziałać w procesie naprawy [50]. Intensywność zmian synaptycznych oraz aktywacja gleju jest związana ze stopniem uszkodzenia nerwu, a czynniki neurotroficzne wydzielane przez astrocyty i KS odgrywając istotną rolę w modulacji plastyczności neuronu są związane z występowaniem przewlekłego bólu pourazowego [32].

KS W POMOSTOWANIU UBYTKÓW RDZENIA KRĘGOWEGO

Zastosowanie pomostów komórkowych do wypełnienia jam pourazowych w rdzeniu z możliwością genetycznego zaprogramowania komórek do wytwarzania dodatkowych czynników wzrostu, opisywane jest w modelu doświadczalnym stłuczenia odcinka piersiowego RK. Do powstałych jam podawano KS z wprowadzonym do nich genem D15A-modyfikowaną cząsteczką NT3, zwiększającą aktywność BDNF i NT3 [95]. Zaobserwowano znaczący wzrost liczby zmielinizowanych aksonów w porównaniu z grupą kontrolną, którą stanowiły KS z genem GFP (green fluorescence protein). Ponieważ nie nastąpiła poprawa czynności motorycznych ocenianych testem behawioralnym, kwestią otwartą pozostaje wyjaśnienie, jak uczynić tę złożoną terapię jeszcze bardziej efektywną. Kolejnym przykładem złożonej strategii postępowania w przypadku stłuczenia RK jest iniekcja KS z jednoczesnym podawaniem analogu cAMP (db-cAMP) oraz rolipramu – inhibitora fosfodiesterazy [74]. Poziom cAMP obniża się po urazie i natychmiastowe podanie rolipramu zapobiega temu spadkowi, a wstrzyknięcie db-cAMP zwiększa go. Zaobserwowano podwojenie liczby zmielinizowanych aksonów oraz znaczącą regenerację istoty białej, wrastanie włókien serotonergicznym do implantu, wzrost liczby aksonów poza miejsce uszkodzenia i 70% poprawę czynności motorycznych kończyn tylnych. Jeszcze bardziej spektakularne wyniki osiągnięto, uzupełniając wszczep składający się z komórek Schwanna o komórki opuszki węchowej, dzięki czemu dystans pokonywany przez włókna nerwowe w przeciętym rdzeniu radykalnie się zwiększył [74,75]. Regenerację podejmowały głównie neurony propriordzeniowe umiejscowione zarówno w odcinku szyjnym, jak i krzyżowym uszkodzonego rdzenia. Ponadto uwidoczniło się wewnątrz tuneli pojedyncze włókna neuronów jąder pnia mózgu i ustalono, że pochodzą one z jąder szwu i miejsca sinawego, co ma znaczenie kliniczne, ponieważ neurony te uczestniczą w programowaniu ruchu. Ustalono też, że komórki Schwanna nasilają rozgałęzianie się stożków wzrostu regenerujących aksonów w rdzeniu kręgowym [52], a także ograniczają powstawanie pourazowej blizny glowej [27].

W pracy pochodzącej z laboratorium Aguayo wykazano, że transplantacja KS pochodzących z nerwów obwodowych działa troficznie na aksony OUN i uczestniczy w remielinizacji uszkodzonego RK [81]. Można je

uzyskać z nerwów obwodowych od ludzi lub zwierząt doświadczalnych. Następnie można je łatwo rozmnożyć w odpowiedniej hodowli tkankowej oraz modyfikować genetycznie w celu wytworzenia większej liczby czynników wzrostu [24,64]. KS stosowane do transplantacji mogą być dodawane do fibryny lub specjalnego żelu (np. Matrigel), który po stwardnieniu umieszczany jest między kikutami uszkodzonego RK [96]. Jeżeli szczelina między przeciętymi końcami jest zbyt duża z powodu masywnego ubytku tkanki nerwowej i/lub retrakcji kikutów nerwu, interesującą alternatywą jest zastosowanie sztucznych protez nerwowych wyprodukowanych metodami inżynierii tkankowej. Protezy te stanowią przewodnice dla rosnących aksonów i mogą być źródłem uwalniania czynników neurotroficznych, takich jak NGF, GDNF oraz izoform FGF-2 o małej masie cząsteczkowej [19]. Wykazano również zwiększony wzrost aksonów w miejscu uszkodzenia po wypełnieniu protez komórkami Schwanna [67].

AUTOLOGICZNE KS

Od dawna wiadomo, że w ognisku demielinizacji KS ulegają różnicowaniu w bardziej prymitywne komórki prekursorowe, które następnie mogą proliferować. Skuteczną metodą pozyskiwania takich komórek jest predegeneracja nerwów obwodowych, umożliwiającą proliferację komórek bez stosowania środków farmakologicznych. Metoda ta, opisana po raz pierwszy przez Ramona y Cajala, polega na przecinaniu nerwu dawcy *in situ* w określonym czasie, w celu wystąpienia degeneracji wallerowskiej z następową proliferacją KS i usuwaniem resztek mieliny [14]. Na podstawie tych prac nie ma wątpliwości, że najlepsze wyniki leczenia stłuczenia rdzenia kręgowego daje metoda złożona [53]. Autorzy licznych prac donoszą, że odnotowano największy wzrost komórek w 7 i 14 dniu predegeneracji, wynoszący odpowiednio $10\text{--}60 \times 10^3$ komórek/mg tkanki nerwowej do nawet 140×10^3 komórek/mg tkanki nerwowej [33,51]. Rozbieżności te mogą wynikać z różnic w składzie podłoża do predegeneracji oraz różnic w wieku dawców. Lewin-Kowalik i wsp. wykazali, że autoprzeszczepy predegenerowanego nerwu kulszowego szczura w miejsce uszkodzenia hipokampa stymulowały proces regeneracji neuronów [51].

W praktyce klinicznej wczesna implantacja autologicznych KS powoduje szybszą reinerwację tkanki docelowej przez regenerujące aksony, co znacznie poprawia stan kliniczny. Dlatego też Haastert i wsp. zdecydowali się na skrócenie czasu predegeneracji świeżej tkanki *in vitro* do 7 dni, otrzymując wystarczającą (podobną do 14-dniowej) liczbę komórek do wykonania autologicznego przeszczepu [28]. Metoda ta wymaga użycia zdrowego nerwu, ale nie stwarza konieczności dodatkowego podawania leków immunosupresyjnych i wydaje się najbardziej korzystna w terapii uszkodzeń nerwów obwodowych u ludzi. Keilhof i wsp. zaobserwowali, że w obrębie dystalnego kikutu przeciętego nerwu kulszowego szczura KS są aktywne i tworzą

korzystne środowisko dla regenerującego nerwu [4,44]. Ekspresja receptora NGF oraz L1 i N-kadheryny w nerwie predegenerowanym stanowi punkt zwrotny dla procesu różnicowania komórek, który z kolei może ułatwić procesy regeneracji. Jedną z podstawowych kwestii jest uzyskanie w krótkim czasie dużej populacji mitotycznie aktywnych i w pełni funkcjonalnych KS. Zaobserwowano, że KS *in vitro* wydzielają autokrynne, mitogenne czynniki wzrostu oraz że bezpośredni kontakt KS między sobą ma działanie stymulujące proliferację [86]. Ponadto wykazano, że przeżycie KS *in vitro* było zależne od gęstości tych komórek w miejscu uszkodzenia nerwu. W większości badań najczęściej stosowanymi mitogenami były toksyna cholery, forskolina lub heregulina [83,99]. Inną możliwością wzbogacania hodowli KS jest zmniejszenie w nich liczby fibroblastów, które hamują zdolność KS do proliferacji i współzawodniczą o składniki odżywcze [6]. Jednak metoda ta jest często kwestionowana, ponieważ używane w tym procesie genotoksyny, np. arabinosyd cytozyny blokują szlaki sygnałowe czynników wzrostu nerwów, zmniejszając w ten sposób wzrost neuronów [9]. W obu przypadkach czas wymagany do przygotowania hodowli wynosi 6-8 tyg., co uniemożliwia praktyczne zastosowanie kliniczne. Zaobserwowano, że po uszkodzeniu RK cytokiny zapalne, białka pochodzące z obumarłych komórek oraz czynniki wzrostu mogą wpływać w różny sposób na procesy regeneracji [88]. W wytwarzaniu czynników mitogennych dla KS oraz ekspresji NGF w wyniku stymulacji IL-1 biorą udział makrofagi [5,46], dlatego też naciekanie makrofagów po uszkodzeniu nerwu wydaje się kolejnym czynnikiem pobudzającym proliferację KS. Zatem metoda łącząca przeszczep komórek z odpowiednią modyfikacją środowiska wydaje się szczególnie obiecującą terapią urazów rdzenia kręgowego. Wstrzyknięcie KS po tygodniu od łagodnego stłuczenia rdzenia kręgowego u szczura ułatwiało regenerację aksonów i poprawiało czynność motoryczną kończyn dolnych [94]. Poprawa stanu neurologicznego może być jednak ograniczona krótkim przeżyciem przeszczepionych KS, które ulegają martwicy i apoptozie. Martwica może powstać w wyniku uszkodzenia mechanicznego, zmniejszenia ilości składników odżywczych, hipoksji oraz wzrostu poziomu czynników toksycznych, takich jak: wolne rodniki, kwasy i jony wewnątrzkomórkowe [92]. Apoptoza natomiast może zostać zainicjowana przez zewnątrz- lub wewnątrzpochodną aktywację przez czynniki cystynowych, niezależnych od wapnia [17]. Badania przeprowadzone przez Hilla i wsp. z zastosowaniem technik biologii molekularnej wykazały, że przeszczepione komórki Schwanna obumierały w ciągu pierwszych 24 godzin po implantacji 6 razy częściej w wyniku martwicy niż apoptozy, a 22% komórek które przeżyły integrowały się z komórkami w miejscu uszkodzenia i funkcjonowały prawidłowo. Było to niezależne od liczby oraz gęstości komórek w przeszczepie. W licznych badaniach obserwowano apoptozę przeszczepionych komórek już po 90 min od zabiegu [18]. Tak wczesne wystąpienie apoptozy sugeruje, że proces ten

został zapoczątkowany przed transplantacją. Być może wzbogacenie medium do transplantacji w surowicę i mitogeny umożliwi wydłużenie czasu do wystąpienia apoptozy. Wyniki licznych prac określających czas przeżycia i mechanizm obumierania komórek, jednoznacznie wskazują na konieczność stworzenia nowych metod poprawiających przeżycie komórek w celu optymalizacji ich zastosowania w naprawie uszkodzeń RK.

KS W TERAPII CHOROÓB DEGENERACYJNYCH

Przeszczepy komórkowe są przedmiotem badań w różnych chorobach degeneracyjnych. Liczne obserwacje wskazują, że KS w odpowiednich warunkach wytwarzają stabilną mielinę, która przywraca również prawidłową czynność neuronów OUN [96]. Dlatego w modelach zwierzęcych zaczęto stosować przeszczepy KS w uszkodzeniach mielin w stwardnieniu rozsianym (SM), chorobie Parkinsona, czy urazach mózgu i rdzenia kręgowego, gdzie się mogą stać również substratami dla regenerujących aksonów [35,55]. Potencjalne wady praktycznego zastosowania KS w OUN odnoszą się do trzech problemów: migracji, przeżycia oraz interakcji między astrocytami a mieliną wytworzoną przez KS. Niestety, według większości badań wszczepione KS nie mają zdolności migracji w obrębie prawidłowego OUN, co zmniejsza szanse implantowanych komórek na osiągnięcie docelowego miejsca uszkodzenia [97]. Wykazano również, że czas przeżycia komórek Schwanna w obrębie OUN jest krótki.

Woodhoo i wsp. zbadali, czy wyżej opisane trudności mogą zostać ominięte przy zastosowaniu prekursorowych KS. Wszczepiali KS pochodzące z noworodków szczurzych oraz prekursor KS uzyskane z 14-dniowych embrionów szczurzych do OUN w różnych warunkach eksperymentalnych [97]. Jak spodziewano się na podstawie licznych wyników wcześniejszych prac, komórki prekursorowe migrowały przez prawidłową tkankę w OUN, łatwo współdziałały z komórkami glejowymi biorcy, ich przeżycie było dłuższe, a wytworzona mielin nie ulegała uszkodzeniu w przebiegu SM. Te szczególne cechy komórek prekursorowych sprawiają, że mogą one być przydatne w naprawie uszkodzeń mielin. Jednak namnożenie ich z neuronów embrionalnych stwarza poważny problem w pozyskiwaniu ich do badań i ewentualnych zastosowań terapeutycznych.

W ciągu ostatnich kilku lat znacznie poszerzyła się nasza wiedza o biologicznych mechanizmach regulujących procesy regeneracji układu nerwowego po urazie. Jednak z klinicznego punktu widzenia regeneracja jest zazwyczaj niecałkowita, towarzyszą jej różne deficyty neurologiczne pod postacią zaburzeń czucia i funkcji ruchowych, nietolerancji zimna i bólu, co w znacznym stopniu pogarsza jakość życia chorych. Głównym problemem pozostaje zapobieganie wtórnej utracie neuronów po urazie, modyfikacja odpowiedzi zapalnej i tworzenia się blizny oraz neutralizacja czynników hamujących wzrost aksonów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Acheson A., Barker P.A., Alderson R.F., Miller F.D., Murphy R.A.: Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron*, 1991; 7: 265-275
- [2] Baichwal R.R., Bigbee J.W., DeVries G.H.: Macrophage-mediated myelin-related mitogenic factor for cultured Schwann cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988; 85: 1701-1705
- [3] Biernaskie J., Sparling J.S., Liu J., Shannon C.P., Plemel J.R., Xie Y., Miller F.D., Tetzlaff W.: Skin-derived precursors generate myelinating Schwann cells that promote remyelination and functional recovery after contusion spinal cord injury. *J. Neurosci.*, 2007; 27: 9545-9559
- [4] Bolin L.M., Iismaa T.P., Shooter E.M.: Isolation of activated adult Schwann cells and a spontaneously immortal Schwann cell clone. *J. Neurosci. Res.*, 1992; 33: 231-238
- [5] Brown M.C., Perry V.H., Lunn E.R., Gordon S., Heumann R.: Macrophage dependence of peripheral sensory nerve regeneration: possible involvement of nerve growth factor. *Neuron*, 1991; 6: 359-370
- [6] Bryan D.J., Wang K.K., Chakalis-Haley D.P.: Effect of Schwann cells in the enhancement of peripheral-nerve regeneration. *J. Reconstr. Microsurg.*, 1996; 12: 439-446
- [7] Bunge M.B.: Novel combination strategies to repair the injured mammalian spinal cord. *J. Spinal Cord Med.*, 2008; 31: 262-269
- [8] Cao Q., Xu X.M., Devries W.H., Enzmann G.U., Ping P., Tsoulfas P., Wood P.M., Bunge M.B., Whittemore S.R.: Functional recovery in traumatic spinal cord injury after transplantation of multilineur trophic-expressing glial-restricted precursor cells. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 6947-6957
- [9] Chang J.Y., Brown S.: Cytosine arabinoside differentially alters survival and neurite outgrowth of neuronal PC12 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1996; 218: 753-758
- [10] Chopp M., Zhang X.H., Li Y., Wang L., Chen J., Lu D., Lu M., Rosenblum M.: Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*, 2000; 11: 3001-3005
- [11] Chumasow E.I., Svetikova K.M.: Structure and nature of macrophages participating in the wallerian degeneration of nerve fibers. *Neurosci. Behav. Physiol.*, 1992; 22: 408-414
- [12] Dahlin L.B.: The nerve response to injury. W: Upper extremity nerve repair - tips and techniques; A master skill publication. Red.: Slutsky D., ASSH, 2008; 15-28
- [13] Dallo J.G., Reichert B.V., Valladao J.B.Jr., Silva C., Luca B.A., Levy B.F., Chadi G.: Differential astroglial responses in the spinal cord of rats submitted to a sciatic nerve double crush treated with local injection of cultured Schwann cell suspension or lesioned spinal cord extract: implications on cell therapy for nerve repair. *Acta Cir. Bras.*, 2007; 22: 485-494
- [14] De Filipe J., Jones E.G.: Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system. W: History of Neuroscience, vol 5., red.: Corsi P., Jones E.G., Shepherd G.M., New York: Oxford University Press, 1991
- [15] Dong Z., Brennan A., Liu N., Yarden Y., Lefkowitz G., Mirsky R., Jessen K.R.: New differentiation factor is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron*, 1995; 15: 585-596
- [16] Doucette R.: Olfactory ensheathing cells: potential for glial cell transplantation into areas of CNS injury. *Histol. Histopathol.*, 1995; 10: 503-507
- [17] Eldadah B.A., Faden A.I.: Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J. Neurotrauma*, 2000; 17: 811-829
- [18] Emgard M., Hallin U., Karlsson J., Bahr B.A., Brundin P., Blomgren K.: Both apoptosis and necrosis occur early after intracerebral grafting of ventral mesencephalic tissue: a role for protease activation. *J. Neurochem.*, 2003; 86: 1223-1232
- [19] Fine E.G., Decosterd I., Papaliozos M., Zurn A.D., Aebischer P.: GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur. J. Neurosci.*, 2002; 15: 589-601
- [20] Frostick S.P., Yin Q., Kemp G.J.: Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery*, 1998; 18: 397-405
- [21] Fu K.Y., Dai L.G., Chiu I.M., Chen J.R., Hsu S.H.: Sciatic nerve regeneration by microporous nerve conduits seeded with glial cell line-derived neurotrophic factor or brain-derived neurotrophic factor gene transfected neural stem cells. *Artif. Organs*, 2011; 35: 363-372
- [22] Fujimoto Y., Yamasaki T., Tanaka N., Mochizuki Y., Kajihara H., Ikuta Y., Ochi M.: Differential activation of astrocytes and microglia after spinal cord injury in the fetal rat. *Eur. Spine J.*, 2006; 15: 223-233
- [23] George R., Griffin J.W.: Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiculotomy model. *Exp. Neurol.*, 1994; 129: 225-236
- [24] Golden K.L., Pearse D.D., Blits B., Garg M.S., Oudega M., Wood P.M., Bunge M.B.: Transduced Schwann cells promote axon growth and myelination after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 2007; 207: 203-217
- [25] Gołka B., Lewin-Kowalik J., Swiech-Sabuda E., Larysz-Brysz M., Górka D., Małacka-Tendera E.: Predegenerated peripheral nerve grafts rescue retinal ganglion cells from axotomy-induced death. *Exp. Neurol.*, 2001; 167: 118-125
- [26] Gołka B., Swiech-Sabuda E., Gołka D., Marcol W., Górka D., Pietrucha-Dutczak M., Lewin-Kowalik J.: The changes in neurotrophic properties of the peripheral nerves extracts following blocking of BDNF activity. *Neurol. Res.*, 2007; 29: 500-505
- [27] Guest J.D., Rao A., Olson L., Bunge M.B., Bunge R.P.: The ability of human Schwann cell grafts to promote regeneration in transected nude rat spinal cord. *Exp. Neurol.*, 1997; 148: 502-522
- [28] Haastert K., Mauritz C., Matthies C., Grothe C.: Autologous adult human Schwann cells genetically modified to provide alternative cellular transplants in peripheral nerve regeneration. *J. Neurosurg.*, 2006; 104: 778-786
- [29] Hall E.D., Springer J.E.: Neuroprotection and acute spinal cord injury: a reappraisal. *NeuroRx*, 2004; 1: 80-100
- [30] Hall S.: The response to injury in the peripheral nervous system. *J. Bone Joint Surg.*, 2005; 87: 1309-1319
- [31] Hall S.M.: The effect of inhibiting Schwann cell mitosis on the re-innervation of acellular autografts in the peripheral nervous system of the mouse. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 1986; 12: 401-414
- [32] Hammarberg H., Risling M., Hökfelt T., Cullheim S., Piehl F.: Expression of insulin-like growth factors and corresponding binding proteins (IGFBP 1-6) in rat spinal cord and peripheral nerve after axonal injuries. *J. Comp. Neurol.*, 1998; 400: 57-72
- [33] Hanemann C.O., Rosebaum C., Kupfer S., Wosch S., Stögbauer F., Müller H.W.: Improved culture methods to expand Schwann cells with altered growth behaviour from CMT11A patients. *Glia*, 1998; 23: 89-98
- [34] Heumann R., Lindholm D., Bandtlow C., Meyer M., Radeke M.J., Misko T.P., Shooter E., Thoenen H.: Differential regulation of mRNA

encoding nerve growth factor and its receptor in rat sciatic nerve during development, degeneration, and regeneration: role of macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987; 84: 8735-8739

[35] Hill C.E., Hurtado A., Blits B., Bahr B.A., Wood P.M., Bunge M.B., Oudega M.: Early necrosis and apoptosis of Schwann cells transplanted into the injured rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, 2007; 26: 1433-1445

[36] Hunt D.A., Hossain-Ibrahim K., Mason M.R., Coffin R.S., Lieberman A.R., Winterbottom J., Anderson P.N.: ATF3 upregulation in glia during Wallerian degeneration: differential expression in peripheral nerves and CNS white matter. *BMC Neurosci.*, 2004; 5: 9

[37] Hynds D.L., Rangappa N., Ter Beest J., Snow D.M., Rabchevsky A.G.: Microglia enhance dorsal root ganglion outgrowth in Schwann cells cultures. *Glia*, 2004; 46: 218-223

[38] Imaizumi T., Lankford K.L., Kocsis J.D.: Transplantation of olfactory ensheathing cells or Schwann cells restores rapid and secure conduction across the transected spinal cord. *Brain Res.*, 2000; 854: 70-78

[39] Iwashita Y., Kawaguchi S., Murata M.: Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. *Nature*, 1994; 367: 167-170

[40] Kang S.K., Lee D.H., Bae Y.C., Kim H.K., Baik S.Y., Jung J.S.: Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Exp. Neurol.*, 2003; 183: 355-366

[41] Karimi-Abdolrezaee S., Eftekharpour E., Wang J., Morshead C.M., Fehlings M.G.: Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *J. Neurosci.*, 2006; 26: 3377-3389

[42] Kataoka K., Kanje M., Dahlin L.B.: Induction of activating transcription factor 3 after different sciatic nerve injuries in adult rats. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.*, 2007; 41: 158-166

[43] Kato T., Honmou O., Vede T.: Transplantation of human olfactory ensheathing cells elicits remyelination of demyelinated rat spinal cord. *Glia*, 2000; 30: 209-218

[44] Keilhoff G., Fansa H., Schneider W., Wolf G.: In vivo predegeneration of peripheral nerves: an effective technique to obtain activated Schwann cells for nerve conduits. *J. Neurosci. Methods*, 1999; 89: 17-24

[45] Klusman I., Schwab M.E.: Effects of pro-inflammatory cytokines in experimental spinal cord injury. *Brain Res.*, 1997; 762: 173-178

[46] Knoller N., Auerbach G., Fulga V., Zelig G., Attias J., Bakimer R., Marder J.B., Yoles E., Belkin M., Schwartz M., Hadani M.: Clinical experience using incubated autologous macrophages as a treatment for complete spinal cord injury: phase I study results. *J. Neurosurg. Spine*, 2005; 3: 173-181

[47] La Fleur M., Underwood J.L., Rappolee D.A., Werb Z.: Basement membrane and repair of injury to peripheral nerve: defining a potential role for macrophages, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *J. Exp. Med.*, 1996; 184: 2311-2326

[48] Larysz-Brysz M., Kotulska K., Górka D., Gołka B., Marcol W., Lewin-Kowalik J.: Polymer hollow fiber-encapsulated peripheral nerve extracts change their activity towards injured hippocampal neurites in rats. *Acta Physiol. Hung.*, 2007; 94: 237-247

[49] Letourneau P.C., Shattuck T.A., Roche F.K., Takeichi M., Lemmon V.: Nerve growth cone migration onto Schwann cells involves the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin. *Dev. Biol.*, 1990; 138: 430-442

[50] Levy B.F., do Carmo Cunha J., Chadi G.: Cellular analysis of the S100 β and fibroblast growth factor-2 in the dorsal root ganglia and sciatic nerve of rodents. Focus on paracrine actions of activated satellite cells after axotomy. *Int. J. Neurosci.*, 2007; 117: 1481-1503

[51] Lewin-Kowalik J., Sieroń A.L., Krause M., Barski J.J., Górka D.: Time-dependent regenerative influence of predegenerated nerve grafts on hippocampus. *Brain Res. Bull.*, 1992; 29: 831-835

[52] Li Y., Raisman G.: Schwann cells induce sprouting in motor and sensory axons in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.*, 1994; 14: 4050-4063

[53] Lu J., Féron F., Mackay-Sim A., Waite P.M.: Olfactory ensheathing cells promote locomotor recovery after delayed transplantation into transected spinal cord. *Brain*, 2002; 125: 14-21

[54] Lu P., Yang H., Jones L.L., Filbin M.T., Tuszynski M.H.: Combinatorial therapy with neurotrophins and cAMP promotes axonal regeneration beyond sites of spinal cord injury. *J. Neurosci.*, 2004; 24: 6402-6409

[55] Lubetzki C., Williams A., Stankoff B.: Promoting repair in multiple sclerosis: problems and prospects. *Curr. Opin. Neurol.*, 2005; 18: 237-244

[56] Madduri S., Gander B.: Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves. *J. Control. Release*, 2012; 161: 274-282

[57] Marcol W.: Naprawa izolowanego uszkodzenia istoty białej rdzenia kręgowego u szczurów przy pomocy terapii komórkowych i neuroprotektynowych. Śląski Uniwersytet Medyczny. Rozprawa habilitacyjna Nr 6/2011

[58] Marcol W., Kotulska K., Larysz-Brysz M., Lewin-Kowalik J.: BDNF contributes to animal model neuropathic pain after peripheral nerve transection. *Neurosurg. Rev.*, 2007; 30: 235-243

[59] Marcol W., Kotulska K., Larysz-Brysz M., Matuszek I., Olakowska E., Lewin-Kowalik J.: Extracts obtained from predegenerated nerves improve functional recovery after sciatic nerve transection. *Microsurgery*, 2005; 25: 486-494

[60] Marcol W., Kotulska K., Larysz-Brysz M., Pietrucha-Dutczak M., Olakowska E., Malinowska I., Lewin-Kowalik J.: Influence of nerve growth factor upon the injured peripheral nerve in the absence of its distal part. *Ital. J. Anat. Embryol.*, 2004; 109: 199-208

[61] Marcol W., Kotulska K., Swiech-Sabuda E., Larysz-Brysz M., Gołka B., Górka D., Lewin-Kowalik J.: Regeneration of sciatic nerves of adult rats induced by extracts from distal stumps of predegenerated peripheral nerves. *J. Neurosci. Res.*, 2003; 72: 417-424

[62] Martensson L., Gustavsson P., Dahlin L.B., Kanje M.: Activation of extracellular-signal-regulated kinase-1/2 precedes and is required for injury-induced Schwann cell proliferation. *Neuroreport*, 2007; 18: 957-961

[63] Martin D., Robe P., Franzen R., Delree P., Schoenen J., Stevenaert A., Moonen G.: Effects of Schwann cell transplantation in a contusion model of rat spinal cord injury. *J. Neurosci. Res.*, 1996; 45: 588-597

[64] Menei P., Montero-Menei C., Whittemore S.R., Bunge R.P., Bunge M.B.: Schwann cells genetically modified to secrete human BDNF promote enhanced axonal regrowth across transected adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.*, 1998; 10: 607-621

[65] Mirsky R., Jessen K.R.: Schwann cell development, differentiation and myelination. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 1996; 6: 89-96

[66] Morino T., Ogata T., Takeba J., Yamamoto H.: Microglia inhibition is a target of mild hypothermic treatment after the spinal cord injury. *Spinal Cord*, 2008; 46: 425-431

[67] Mosahebi A., Fuller P., Wiberg M., Terenghi G.: Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Exp. Neurol.*, 2002; 173: 213-223

[68] Mukaino M., Nakamura M., Yamada O., Okada S., Morikawa S., Renault-Mihara F., Iwanami A., Ikegami T., Ohsugi Y., Tsuji O., Kato H., Matsuzaki Y., Toyama Y., Liu M., Okano H.: Anti-IL-6-receptor antibody promotes repair of spinal cord injury by inducing microglia-dominant inflammation. *Exp. Neurol.*, 2010; 224: 403-414

- [69] Nave K.A., Salzer J.L.: Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2006; 16: 492-500
- [70] Offenhäuser N., Böhm-Matthaei R., Tsoulfas P., Parada L., Meyer M.: Developmental regulation of full-length *trkC* in the rat sciatic nerve. *Eur. J. Neurosci.*, 1995; 7: 917-925
- [71] Ogawa Y., Sawamoto K., Miyata T., Miyao S., Watanabe M., Nakamura M., Bregman B.S., Koike M., Uchiyama Y., Toyama Y., Okano H.: Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. *J. Neurosci. Res.*, 2002; 69: 925-933
- [72] Ohta M., Suzuki Y., Noda T., Ejiri Y., Dezawa M., Kataoka K., Chou H., Ishikawa N., Matsumoto N., Iwashita Y., Mizuta E., Kuno S., Ide C.: Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.*, 2004; 187: 266-278
- [73] Pan J., Baker K.M.: Retinoic acid and the heart. *Vitam. Horm.*, 2007; 75: 257-283
- [74] Pearse D.D., Pereira F.C., Marcillo A.E., Bates M.L., Berrocal Y.A., Filbin M.T., Bunge M.B.: cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat. Med.*, 2004; 10: 610-616
- [75] Pearse D.D., Sanchez A.R., Pereira F.C., Andrade C.M., Puzis R., Pressman Y., Golden K., Kitay B.M., Blits B., Wood P.M., Bunge M.B.: Transplantation of Schwann cells and/or olfactory ensheathing glia into the contused spinal cord: Survival, migration, axon association, and functional recovery. *Glia*, 2007; 55: 976-1000
- [76] Pietrucha-Dutczak M., Marcol W., Gołka B., Lewin-Kowalik J.: Neurotrophic activity of extracts from distal stumps of pre-degenerated peripheral rat nerves varies according to molecular mass spectrum. *Neurol. Res.*, 2008; 30: 845-851
- [77] Prewitt C.M., Niesman I.R., Kane C.J., Houle J.D.: Activated macrophage/microglial cells can promote the regeneration of sensory axons into the injured spinal cord. *Exp. Neurol.*, 1997; 148: 433-443
- [78] Ramón-Cueto A., Plant G.W., Avila J., Bunge M.B.: Long-distance axonal regeneration in the transected adult rat spinal cord is promoted by olfactory ensheathing glia transplants. *J. Neurosci.*, 1998; 18: 3803-3815
- [79] Rapalino O., Lazarov-Spiegler O., Agranov E., Velan G.J., Yoles E., Fraidakis M., Solomon A., Gepstein R., Katz A., Belkin M., Hadani M., Schwartz M.: Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.*, 1998; 4: 814-821
- [80] Rende M., Muir D., Ruoslahti E., Hagg T., Varon S., Manthorpe M.: Immunolocalization of ciliary neuronotrophic factor in adult rat sciatic nerve. *Glia*, 1992; 5: 25-32
- [81] Richardson P.M., Issa V.M., Aguayo A.J.: Regeneration of long spinal axons in the rat. *J. Neurocytol.*, 1984; 13: 165-182
- [82] Rodrigues R.W., Gomide V.C., Chadi G.: Striatal injection of 6-hydroxydopamine induces retrograde and glial activation in the nigrostriatal pathway. *Acta Cir. Bras.*, 2003; 18: 272-278
- [83] Rutkowski J.L., Tennekoon G.I., McGillicuddy J.E.: Selective culture of mitotically active human Schwann cells from adult sural nerves. *Ann. Neurol.*, 1992; 31: 580-586
- [84] Saito H., Dahlin L.B.: Expression of ATF3 and axonal outgrowth are impaired after delayed nerve repair. *BMC Neurosci.*, 2008; 9: 88
- [85] Salzer J.L., Bunge R.P.: Studies of Schwann cell proliferation. I. An analysis in tissue culture of proliferation during development, Wallerian degeneration, and direct injury. *J. Cell Biol.*, 1980; 84: 739-752
- [86] Sasagasaki N., Toda K., Hollis M., Quarles R.H.: Myelin gene expression in immortalized Schwann cells: relationship to cell density and proliferation. *J. Neurochem.*, 1996; 66: 1432-1439
- [87] Schwartz M.: Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2003; 23: 385-394
- [88] Schwartz M., Cohen I., Lazarov-Spiegler O., Moalem G., Yoles E.: The remedy may lie in ourselves: prospects for immune cell therapy in central nervous system protection and repair. *J. Mol. Med.*, 1999; 77: 713-717
- [89] Setoguchi T., Nakashima K., Takizawa T., Yanagisawa M., Ochiai W., Okabe M., Yone K., Komiya S., Taga T.: Treatment of spinal cord injury by transplantation of fetal neural precursor cells engineered to express BMP inhibitor. *Exp. Neurol.*, 2004; 189: 33-44
- [90] Springer J.E., Mu X., Bergmann L.W., Trojanowski J.Q.: Expression of GDNF mRNA in rat and human nervous tissue. *Exp. Neurol.*, 1994; 127: 167-170
- [91] Stoll G., Müller H.W.: Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.*, 1999; 9: 313-325
- [92] Sulaiman O.A., Gordon T.: Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia*, 2000; 32: 234-246
- [93] Syntichaki P., Tavernarakis N.: The biochemistry of neuronal necrosis: rogue biology? *Nat. Rev. Neurosci.*, 2003; 4: 672-684
- [94] Takami T., Oudega M., Bates M.L., Wood P.M., Kleitman N., Bunge M.B.: Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J. Neurosci.*, 2002; 22: 6670-6681
- [95] Terenghi G.: Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J. Anat.*, 1999; 194: 1-14
- [96] Urfer R., Tsoulfas P., Soppet D., Escandón E., Parada L.F., Presta L.G.: The binding epitopes of neurotrophin-3 to its receptors *trkC* and *gp75* and the design of a multifunctional human neurotrophin. *EMBO J.*, 1994; 13: 5896-5909
- [97] Woodhoo A., Sahni V., Gilson J., Setzu A., Franklin R.J., Blakemore W.F., Mirsky R., Jessen K.R.: Schwann cell precursors: a favourable cell for myelin repair in the central nervous system. *Brain*, 2007; 130: 2175-2185
- [98] Xu X.M., Chen A., Guénard V., Kleitman N., Bunge M.B.: Bridging Schwann cell transplants promote axonal regeneration from both the rostral and caudal stumps of transected adult rat spinal cord. *J. Neurocytol.*, 1997; 26: 1-16
- [99] Zanazzi G., Einheber S., Westreich R., Hannocks M.J., Bedell-Hogan D., Marchionni M.A., Salzer J.L.: Glial growth factor/neuregulin inhibits Schwann cell myelination and induces demyelination. *J. Cell Biol.*, 2001; 152: 1289-1299
- [100] Zhang X., Zeng Y., Zhang W., Wang J., Wu J., Li J.: Co-transplantation of neural stem cells and NT-3-overexpressing Schwann cells in transected spinal cord. *J. Neurotrauma*, 2007; 24: 1863-1877

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.