

## Badania nad komórkami macierzystymi i ich rosnący wpływ na współczesną psychiatrię

### Stem cell research and its growing impact on contemporary psychiatry

Mariusz Z. Ratajczak<sup>1,2</sup>, Jolanta Kucharska-Mazur<sup>3</sup>,

Jerzy Samochowiec<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Stem Cell Institute, James Graham Brown Cancer Center,  
University of Louisville, Louisville, Kentucky, USA  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. M. Z. Ratajczak

<sup>2</sup>Zakład Fizjologii PUM w Szczecinie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. M. Z. Ratajczak

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Psychiatrii PUM w Szczecinie  
Kierownik: prof. dr hab. n. med. J. Samochowiec

#### Summary

The expanding field of stem cell research is now beginning to help with the problems of modern psychiatry. On the one hand, induced pluripotent stem cells (iPSCs) can now be used to generate neural cell lines from patients suffering from psychiatric disorders, which can then serve as models for studying changes in gene expression pattern involved in the pathogenesis of these diseases. These artificially generated neural cells are also employed in studying the efficacy of newly developed antipsychotic treatments. On the other hand, evidence has accumulated that not only monocytes, which can be microglia precursors, but also certain other adult bone marrow-derived cells may cross the blood–brain barrier and affect biological processes in brain tissue. Along with evidence of circulating and brain-infiltrating cells, there are well-studied factors (e.g., chemokines, phosphosphingolipids, and complement-cleavage fragments) that modulate trafficking of these cells between bone marrow and neural tissue. These observations may help to shed new light on the pathogenesis of psychotic disorders and, in the future, perhaps help to develop more effective treatments.

**Słowa kluczowe:** komórki macierzyste, VSEL, sfingozyno-1-fosforan

**Key words:** circulating stem cells, VSEL, sphingosine-1-phosphate

---

**Finansowanie:** Przedstawiona praca powstała przy wsparciu europejskich funduszy strukturalnych, Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka POIG.01.01.01-00-109/09-01 oraz grantu Maestro 2011/02/A/NZ4/00035 dla MZR.

## Wstęp

Szybki postęp w badaniach nad komórkami macierzystymi dotyczy wszystkich dziedzin medycyny i psychiatria nie jest tu wyjątkiem. Jest to zrozumiałe, gdyż zarówno rozwój, jak i postnatalny stan oraz funkcja tkanki mózgowej pozostają pod wpływem krążących komórek, w tym komórek macierzystych [1, 2, 3]. Istotny postęp w badaniu zaburzeń psychicznych daje możliwość uzyskiwania specyficznych dla danego pacjenta neuronalnych linii komórkowych pochodzących z indukowanych pluripotencjalnych komórek (iPSCs) tworzonych z własnych komórek somatycznych pacjenta, np. komórek skóry [4]. Takie neuronalne linie komórkowe umożliwiają badanie zmian ekspresji genów związanych z zespołami zaburzeń psychicznych oraz testowanie nowych strategii terapeutycznych.

Istnieją dowody wskazujące, iż pewne komórki pochodzące ze szpiku kostnego (BM), takie jak prekursorzy mikrogleju, mogą przekraczać barierę krew–mózg nie tylko w sytuacji, gdy ta bariera jest uszkodzona (jak to się dzieje na przykład w chorobach neurodegeneracyjnych), ale także przy prawidłowym jej funkcjonowaniu [5].

Wiadomo, że krew obwodowa (PB) służy jako „autostrada” dla krążących komórek macierzystych. Hematopoetyczne komórki macierzyste (HSCs), progenitory endotelialne (EPCs), mezenchymalne komórki macierzyste (MSCs) oraz wczesne rozwojowo bardzo małe embrionalno-podobne komórki macierzyste (VSELs) krążą we krwi obwodowej w małym stężeniu. Ich liczba rośnie w różnych modelach uszkodzenia tkanek i narządów, w tym w modelu ostrego zawału mięśnia sercowego, udaru mózgu, oparzenia skóry, ostrych zapalnych chorób jelit, a także w zespołach psychiatrycznych [1–3, 6]. Zatem zwiększona liczba tych komórek we krwi obwodowej może mieć wartość diagnostyczną i prognostyczną.

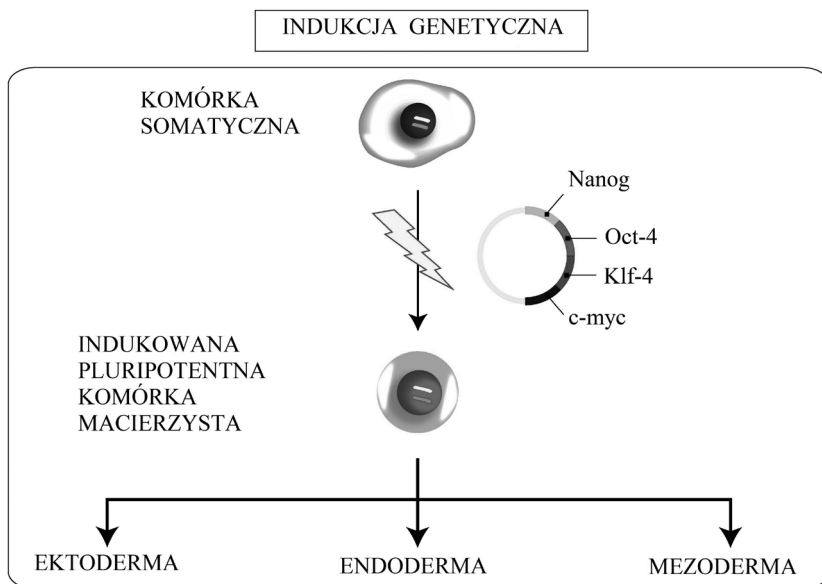
Przemieszczanie się komórek macierzystych we krwi obwodowej jest wywoływane i kontrolowane przez różne czynniki, w tym aktywację kaskad dopełniacza i krzepnięcia, wzrost poziomów pewnych chemokin, cytokin, czynników wzrostowych, bioaktywnych fosfosfingolipidów oraz zewnątrzkomórkowych nukleotydów [7].

W niniejszej pracy skupimy się na nowych odkryciach w badaniach nad komórkami macierzystymi, które znacząco przyczyniają się do zrozumienia patogenezy zaburzeń psychiatrycznych.

### **Indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste jako narzędzie do badań zaburzeń psychiatrycznych oraz testowania nowych strategii leczenia**

Rzeczywista technologia indukowanych komórek macierzystych pozwala uzyskać personalizowane linie komórkowe otrzymywane z komórek izolowanych od danego pacjenta [4]. Takie niebudzące kontrowersji etycznych komórki macierzyste są otrzymywane poprzez modyfikację genetyczną dojrzałych postnatalnych komórek somatycznych (ryc. 1) poprzez ich transformację *in vitro* przy użyciu genów kodujących kluczowe czynniki transkrypcyjne, zaangażowane we wczesne stadia embriogenezy (tj. Oct-4, Nanog, Klf4 i c-myc). Te geny regulujące rozwój embrionalny są wprowadzane do komórek somatycznych (np. fibroblastów skóry) za pomocą wektorów

retrowirusowych [4]. W rezultacie otrzymujemy transformowane iPSCs, które mogą różnicować się do komórek pochodzących ze wszystkich trzech listków zarodkowych (mezo-, ekto- i endodermy). Takie przekształcenie jest jednak stosunkowo rzadkie – przeciętnie tylko jedna komórka na kilka tysięcy poddanych wyżej wymienionym manipulacjom genetycznym ulega transformacji (indukcji do etapu embrionalnego) i zaczyna proliferować, tworząc klon złożony z iPSCs [4]. Ostatnio opisano pewne modyfikacje tej strategii polegające na użyciu bardziej ograniczonej liczby genów w procesie transdukcji, mikroRNA (miRNAs) lub małych cząsteczek modyfikujących strukturę DNA [4]. iPSCs stanowią źródło pluripotencjalnych komórek macierzystych możliwe do zaakceptowania z przyczyn etycznych, będąc alternatywą dla embrionalnych komórek macierzystych (ESCs) uzyskiwanych z zarodków. W badaniach nad psychozami ważne jest, że takie iPSCs mogą być generowane z komórek somatycznych izolowanych od pacjenta i różnicować się do komórek nerwowych, służąc jako model do badania zmian ekspresji genów związanych ze schizofrenią. To interesujące narzędzie może pomóc w zidentyfikowaniu nowych defektów genetycznych, a iPSCs mogą posłużyć do badania nowych strategii leczenia.



Rycina 1. Strategia generowania indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs) z komórek somatycznych

Pochodzące od pacjenta komórki somatyczne (na przykład fibroblasty ze skóry) są reprogramowane (transformowane) do nieśmiertelnych pluripotencjalnych komórek macierzystych za pomocą mieszanki genów kodujących embrionalne czynniki transkrypcyjne (tj. Oct-4, Nanog, Klf-4 i c-myc). Takie iPSCs mogą później różnicować się do komórek nerwowych (pochodzących z ektodermy) lub komórek pochodzących z pozostałych dwóch listków zarodkowych.

### **Komórki macierzyste krążące we krwi obwodowej i ich znaczenie w stanach patologicznych**

Jak stwierdzono powyżej, krew obwodowa jest „autostradą” dla krążących komórek macierzystych. Wiadomo, że HSCs są niestrudzonymi podróżnikami w ciele [8]. Krążą we krwi obwodowej i limfie w trakcie rozwoju, pomiędzy anatomicznymi miejscami, gdzie hematopoeza jest inicjowana i/lub chwilowo aktywna. Wyruszają z wysp krwiotwórczych w pęcherzyku żółtkowym zarodka, przechodzą przez śródbłonek aorty, naczynia łożyska i śledzionę, docierając do wątroby płodu w drugim trymestrze ciąży. W trzecim trymestrze osiągają swoją docelową lokalizację, tj. mikrośrodowisko szpiku kostnego, gdzie przebywają w dojrzałym organizmie.

Także inne typy komórek macierzystych mogą krążyć we krwi obwodowej, również w stanach niepatologicznych. Większość krążących komórek macierzystych stanowią oczywiście komórki hematopoetyczne, które używają tej drogi w życiu postnatalnym do utrzymania równowagi puli komórek macierzystych w BM kości zlokalizowanych w różnych obszarach ciała. Ponadto podczas infekcji krążące HSCs mogą w uszkodzonych tkankach różnicować się bezpośrednio do komórek progenitorowych linii mieloidalnej oraz lokalnie dostarczać granulocytów, monocytów i komórek dendrytycznych do walki z infekcją [9].

Jak wspomniano wcześniej, prócz HSCs w krwi obwodowej wykrywane są także MSCs, EPCs i VSELs. Proponuje się wyjaśnianie tego faktu tym, że różne typy komórek krążących w stanach niepatologicznych stanowią swoisty „patrol” dla tkanek obwodowych w związku z potencjalnymi uszkodzeniami i mogą pełnić rolę pomocy „paramedycznej” w naprawianiu małych uszkodzeń tych tkanek [3].

Ponadto te krążące komórki są wykrywane w PB w różnych modelach poważniejszych uszkodzeń tkanek i organów, w tym zawału serca, udaru, oparzenia skóry, zapalenia jelit, a nasz zespół opisał ich obecność w krwi obwodowej w zaburzeniach psychiatrycznych [3, 6, 10-12]. W związku z tym liczba tych komórek wykrywanych w PB może mieć wartość diagnostyczną i prognostyczną.

Ogólnie mówiąc, liczba komórek macierzystych krążących w PB wzrasta w odpowiedzi na 1) układowe bądź lokalne zapalenie, 2) wyczerpujące ćwiczenia, 3) uszkodzenie tkanek lub narządów, 4) substancje farmakologiczne [8, 9]. Szczególnie po podaniu pewnych substancji indukujących wymuszone przechodzenie komórek do PB (proces znany jako mobilizacja komórek macierzystych) w PB liczba krążących HSCs może wzrosnąć aż 100-krotnie. Farmakologiczna mobilizacja jest wykorzystywana w transplantologii hematologicznej jako sposób na uzyskanie HSPCs na potrzeby odnowy hematopoetycznej. Najważniejsze substancje używane obecnie w praktyce klinicznej do mobilizacji to czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (granulocyte colony stimulating factor – G-CSF) oraz cząsteczki blokujące receptor CXCR4 (np. AMD3100) [13, 14].

Z związku z omawianym tematem warto zauważyć, że lit, lek używany w psychiatrii od ponad 50 lat do leczenia choroby afektywnej dwubiegunowej, został opisany jako substancja indukująca mobilizację komórek macierzystych, zwiększająca osoczowy poziom G-CSF i potencjalizująca mobilizujące działanie G-CSF [15].

### **Czynniki endogenne zwiększające liczbę krążących komórek macierzystych we krwi obwodowej**

Komórki macierzyste zlokalizowane są w szpiku kostnym i w innych organach w obszarach znanych jako nisze komórek macierzystych. Na przykład w BM kluczową rolę w zatrzymywaniu HSCs odgrywa oś: chemokina – czynnik pochodzenia stromalnego (stromal-derived factor 1 – SDF-1) – receptor CXCR4 [16]. Komórki w niszy wykazują ekspresję SDF-1, a CXCR4 jest obecny na powierzchni HSCs. Nisze komórek macierzystych znajdują się także w mózgu, a nerwowe komórki macierzyste zostały opisane jako rezydujące w strefie okołokomorowej komór bocznych i opuszki węchowej oraz w strefie podziarnistej zakrętu zębatego hipokampa [17-19]. Czynniki odpowiedzialne za utrzymanie tych komórek w niszach komórek macierzystych mózgu nie są dotychczas w pełni poznane, aczkolwiek są dowody, że oś SDF-1–CXCR4 może odgrywać w tym pewną rolę [20, 21].

Sugeruje się, że przechodzenie HSCs ze szpiku do PB w trakcie procesu mobilizacji jest regulowane przez zmniejszenie interakcji SDF-1–CXCR4 w niszach BM (np. spowodowane wydzielaniem przez granulocyty enzymów proteolitycznych rozkładających SDF-1) i zwiększenie poziomu SDF-1 we krwi obwodowej, co mogłoby odwracać transendotelialny gradient chemotaktyczny SDF-1 między mikrośrodowiskiem szpiku kostnego a osoczem [14]. Ta koncepcja obecnie jest modyfikowana z powodu obserwacji, że poziom SDF-1 we krwi obwodowej nie rośnie znacząco podczas mobilizacji, a tym samym nie można tłumaczyć przechodzenia HSCs z BM do PB po prostu odwróceniem gradientu między szpikiem a krwią obwodową [22].

Aktualne badania prowadzone w naszych laboratoriach i potwierdzone przez niezależne ośrodki dowodzą, że sfingozyno-1-fosforan (S1P) jest ważnym chemoatraktantem dla HSCs oraz znajduje się w PB [22, 23]. Duże stężenie S1P w osoczu (a więc znaczny gradient chemotaktyczny w stosunku do szpiku) obserwuje się stale w warunkach stanu prawidłowego. Z drugiej strony S1P może odgrywać ważną rolę w kierowaniu komórek do tkanki mózgowej. Wiadomo, że inhibitory migracji, której mediatorem jest S1P (np. fingolimod), są stosowane do zmniejszenia infiltracji mózgu przez limfocyty w stwardnieniu rozsianym [24]. Ponadto zasugerowano, że wydzielanie neurotransmiterów z synaps neuronów unerwiających mikrośrodowisko szpiku kostnego (m.in. działających na receptory dopaminowe oraz  $\beta$ 2- i  $\beta$ 3-adrenergiczne) może wpływać na mobilizację komórek macierzystych [25], co zostanie omówione w dalszej części pracy.

Zgromadzono dowody, że mobilizacja komórek macierzystych jest wywoływana przez aktywację kaskady dopełniacza w mikrośrodowisku szpiku kostnego. Potwierdzeniem tego mechanizmu jest obserwacja, że myszy, u których nie dochodzi do aktywacji końcowej części kaskady dopełniacza, mają znaczny defekt mobilizacji HSCs [26]. Ponadto kaskada dopełniacza jest aktywowana we wszystkich mechanizmach prowadzących do mobilizacji HSCs (tj. układowym zapaleniu, uszkodzeniu narządów i przy podaniu wszystkich leków powodujących mobilizację). Jak aktualnie obserwujemy, proces mobilizacji jest zmniejszany przez oksygenazę hemową 1 (HO-1) mającą działanie przeciwwzapalne oraz hamującą aktywację kaskady dopełniacza [27].

Z powyższych przyczyn ważne jest, aby badając przemieszczanie się komórek macierzystych, równolegle mierzyć zmiany poziomu S1P i SDF-1 w PB oraz aktywację kaskady dopełniacza poprzez ocenę osoczkowego stężenia produktów rozpadu białek układu dopełniacza (tj. C3a, C5a, C5b-C9).

### **Przemieszczanie się komórek macierzystych w zaburzeniach psychicznych**

Ponieważ komórki macierzyste są mobilizowane do krwi obwodowej w różnych stanach klinicznych, nasza grupa zainteresowała się zmianami liczby krążących komórek macierzystych w zaburzeniach psychicznych. Aby wyjaśnić tę kwestię, badaliśmy komórki macierzyste krążące we krwi obwodowej w grupie pacjentów z zaburzeniami lękowymi oraz w grupie pacjentów z ostrym zespołem psychotycznym. Skupiliśmy się na liczbie krążących HSCs oraz komórek VSELs. Główną myślą przewodnią tych badań była hipoteza, że krążące komórki, w tym komórki macierzyste, mogą być zaangażowane w patogenezę różnych zaburzeń psychicznych.

Hipoteza ta wydaje się uzasadniona, gdyż wcześniej już zaproponowano, że za mobilizację HSCs do krwi obwodowej odpowiada wydzielanie neurotransmiterów z synaps neuronów unerwiających mikrośrodowisko szpiku kostnego oraz podwyższony tonus układu wegetatywnego [25]. Twierdzenie to wspiera obserwacja, że myszy z deficytem galaktozylotransferazy UDP-galaktoza:ceramid, mające zaburzone przewodzenie nerwowe i niewydzielające norepinefryny (NE) do mikrośrodowiska szpiku kostnego, nie mobilizują HSCs w odpowiedzi na podanie G-CSF [28]. Natomiast, jak aktualnie się obserwuje, modyfikacja aktywności układu współczulnego nie wpływa u ludzi na mobilizację wywołaną przez G-CSF, jak można by oczekiwać. W szczególności ochotnicy – dawcy HSPC, którzy otrzymywali inhibitory wychwyty zwrotnego noradrenaliny (NRI) z powodu depresji lub byli leczeni  $\beta$ 2-blokerami z powodu nadciśnienia, prezentowali mobilizację HSCs do krwi obwodowej na poziomie analogicznym do osób zdrowych z grupy kontrolnej [29]. Nieoczekiwanie, mobilizacja u tych pacjentów ani nie była zwiększana przez podanie NRI, ani zmniejszana przez  $\beta$ 2-blokery, czego można by oczekiwać na podstawie danych dotyczących myszy.

#### *Krążenie hematopoetycznych komórek macierzystych u pacjentów z psychozą oraz u pacjentów z zaburzeniami lękowymi*

W celu eksploracji tej intrygującej kwestii oraz rozbieżności między ludźmi a myszami analizowaliśmy poziom krążących HSCs u osób z ostrą psychozą oraz u osób z zaburzeniami lękowymi, tj. w sytuacjach klinicznych, gdy jest podwyższony poziom katecholamin w PB [30]. Wiadomo, że poziom noradrenaliny oraz dopaminy u tych osób jest podwyższony w tkankach obwodowych i w PB. Co więcej, w trakcie ostrej psychozy pacjenci znajdują się pod wpływem różnych neuromediatorów [30]. Jeden z zespołów badawczych wykazał zwiększony obrót noradrenaliny u pacjentów z pierwszym epizodem schizofrenii [31].

W naszym badaniu zrekrutowano 30 niespokrewnionych osób z diagnozą pierwszego epizodu psychotycznego, postawioną zgodnie z kryteriami 10. Międzynarodowej



Klasyfikacji Chorób i Problemów Zdrowotnych (ICD-10, 1998) [32]. Zakwalifikowano do badania pacjentów z rozpoznaniem pierwszego epizodu psychotycznego (F20, F22, F31 lub F23) wg ICD-10, bez historii zaburzeń psychicznych z osi I innych niż wyżej wymienione, dotychczas nieleczonych. Ocena psychometryczną przeprowadzano za pomocą skali PANSS. Ponadto przeprowadzono badanie z udziałem 30 pacjentów z napadami paniki [33]. Otrzymane dane porównano z dobraną pod względem płci i pochodzenia grupą kontrolną złożoną z 35 zdrowych ochotników, bez zaburzeń psychicznych, wykluczonych na podstawie badania przez specjalistę psychiatrę. Z badania wykluczono osoby z historią poważnych zdarzeń medycznych w ciągu życia, z organicznym uszkodzeniem mózgu oraz z uzależnieniem od alkoholu i narkotyków.

Mobilizacja HSCs u pacjentów z pierwszym epizodem psychotycznym, z ostrymi zaburzeniami lękowymi oraz w grupie kontrolnej była oceniana za pomocą: 1) cytofluorymetrii przepływowej (fluorescence-activated cell sorting – FACS) w celu oceny liczby HSCs krążących w PB o fenotypach  $CD34^+$ ,  $CD133^+$ ,  $CD34^+CD45^+Lin^-$  lub  $CD133^+CD45^+Lin^-$ , 2) oznaczeń funkcjonalnych *in vitro* w celu detekcji liczby klonogennych progenitorów granulocytarno-monocytnych (CFU-GM) i erytroidalnych (BFU-E). Jednocześnie mierzono stężenie epinefryny, norepinefryny i dopaminy w surowicy. Stężenie komórek, jak i katecholamin, mierzono w grupach z psychozą lub z napadami paniki zarówno przed, jak i po leczeniu oraz porównywano z dobraną pod względem wieku i płci grupą kontrolną.

W przeprowadzonych badaniach nie zaobserwowano znaczących różnic w stężeniu krążących HSCs lub klonogennych progenitorów BFU-E i CFU-GM między grupą kontrolną i pacjentami z zaburzeniami lękowymi lub zaburzeniami psychotycznymi [34]. W szczególności na liczbę HSCs krążących w PB nie wpływało podwyższone stężenie adrenaliny, norepinefryny ani dopaminy we krwi osób z ostrym zespołem psychotycznym. Co ciekawe, w naszym badaniu poziom norepinefryny i dopaminy był niższy u pacjentów z zaburzeniami lękowymi i wzrastał po leczeniu. Otrzymane wyniki przemawiają przeciwko wpływowi napięcia układu wegetatywnego na liczbę HSCs krążących w PB u ludzi. Te negatywne rezultaty uzyskane u osób z ostrą psychozą i zaburzeniami lękowymi są zgodne z wcześniej opisanymi u dawców HSPC uprzednio leczonych NRI z powodu depresji lub  $\beta_2$ -blokerami z powodu wysokiego ciśnienia krwi, poddanych mobilizacji za pomocą G-CSF [29]. Stwierdzona prawidłowość sugeruje, że istnieją wyraźne różnice między wpływem wegetatywnego układu nerwowego na mobilizację HSCs u ludzi i gryzoni.

*Krążenie bardzo małych embrionalno-podobnych komórek macierzystych u pacjentów z zaburzeniami psychotycznymi i ostrymi zespołami lękowymi*

Następnie, nasz zespół badawczy sprawdził, czy VSELs i czynniki modulujące ich przemieszczanie się mogą być biologicznymi markerami ostrych psychoz i zespołów lękowych [6]. W celu odpowiedzi na to pytanie zbadano 28 osób z pierwszym epizodem psychozy nieafektywnej, przed i po leczeniu antypsychotycznym, oraz porównano z 35 zdrowymi ochotnikami (CG); grupa psychotyczna (PG) została podzielona na podgrupę „schizofreniczną” (SG) i „nieschizofreniczną” (NG). Zbadano także 30

pacjentów z ostrym zespołem lękowym. U wszystkich pacjentów wykonano FACS w celu oznaczenia liczby VSELs o fenotypie  $\text{Lin}^-/\text{CD45}^-/\text{CD34}^+$  lub  $\text{Lin}^-/\text{CD45}^-/\text{CD133}^+$  krążących w krwi obwodowej, wykazujących ekspresję markerów wczesnych rozwojowo komórek macierzystych i markerów linii neuronalnej takich jak Oct-4, Sox2, Nanog, GFAP, Olig1, Olig2, Musashi, Nestyna i  $\beta\text{III-tubulina}$ .

Stwierdzono, że we krwi obwodowej przed leczeniem liczba VSELs  $\text{Lin}^-/\text{CD45}^-/\text{CD34}^+$  różni się, jeśli porównamy grupę kontrolną i psychiatryczną, a liczba VSELs  $\text{Lin}^-/\text{CD45}^-/\text{CD133}^+$  – jeśli porównamy podgrupy SG i NG [6]. Nie stwierdzono różnicy w liczbie krążących we krwi obwodowej VSELs u pacjentów z ostrym zespołem lękowym [6]. Jednocześnie mierzono osoczowy poziom czynników wpływających na przemieszczanie się tych komórek, w tym składowych zaktywowanej kaskady dopełniacza (C3a, C5a i C5b-9) oraz S1P i SDF-1. Analiza metodą regresji logistycznej wykazała, że stężenia C3a i S1P są najlepszymi predyktorami ryzyka oraz potencjalnymi markerami pierwszego epizodu psychiatrycznego [6]. Co więcej, w podgrupie SG liczba krążących VSELs  $\text{Lin}^-/\text{CD45}^-/\text{CD34}^+$  i osoczowy poziom S1P są najlepszymi predyktorami ryzyka, zaproponowano więc powyższe parametry jako nowe markery pierwszego epizodu schizofrenicznego [6].

Na podstawie powyższych odkryć stwierdzono, że zmieniony poziom krążących VSELs, S1P i C3a we krwi obwodowej pacjentów z pierwszym epizodem psychiatrycznym świadczy o towarzyszącej reakcji układowej związanej z mobilizacją komórek macierzystych oraz aktywacją procesów regeneracyjnych. Potwierdzeniem tej tezy jest zwiększona ekspresja mRNA genów charakterystycznych dla wczesnych nerwowych komórek macierzystych wykrytych we frakcji komórek jednojądrowych izolowanych z PB. Ponadto stwierdzono, że leczenie neuroleptyczne pierwszego epizodu psychozy nie poprawia mobilizacji VSELs. Stąd VSELs, S1P i C3a mogą więc być potencjalnie traktowane jako nowe markery pierwszego epizodu psychiatrycznego [6].

### Potencjalne implikacje VSELs dla zaburzeń psychicznych

Jesteśmy świadomi, że konieczne są dalsze badania, aby rozstrzygnąć rolę krążących VSELs u pacjentów z ostrą psychozą. Komórki te mogą przypuszczalnie różnicować się do komórek różnych listków zarodkowych, w tym – komórek nerwowych, co może odgrywać rolę w procesach regeneracji tkanki mózgowej. Mamy też świadomość, że potencjalny remodelling tkanki mózgowej w przebiegu schizofrenii wymaga dalszych badań. Faktem jest natomiast, że nieprawidłowa neurogeneza jest sugerowana jako przyczyna zaburzeń umysłowych [35], ale jest nadal kwestią otwartą, czy zachodzi ona w trakcie embrionalnej neurogenezy, czy w dojrzałym mózgu.

Dalsze badania są także potrzebne, aby lepiej zrozumieć działanie czynników modulujących przemieszczanie się komórek macierzystych. Wyniki dotyczące osoczowego poziomu SDF-1 w pierwszym epizodzie psychiatrycznym są jak dotąd nierozstrzygające i faktycznie nasz zespół nie obserwował istotnych zmian poziomu tej chemokiny w PB [36]. Podobnie nierozstrzygające są badania dotyczące aktywacji kaskady dopełniacza [37, 38]. Na przykład zaproponowano, że dopełniacz odgrywa podwójną rolę w schizofrenii: neuroprotektoryjną w etiologii, a neurodegeneracyjną



w patogenezie. Znaczna lub przewlekła aktywacja kaskady dopełniacza może wpływać na uszkodzenie komórek i prowadzić do zaburzeń neurodegeneracyjnych. Jednak aktualne badania wskazują, że C3a jest zaangażowany w podstawową i indukowaną ischemią neurogenezę oraz remodelling i eliminację synaps [39]. Doniesienia z piśmiennictwa wskazują także, że bioaktywne składowe kaskady dopełniacza C3a i C5a wpływają na neurogenezę oraz aktywność chemotaktyczną i fagocytarną gleju [35]. Ponadto końcowy produkt aktywacji kaskady dopełniacza, C5b-C9, znany także jako kompleks atakujący błonę (MAC), z jednej strony jest mediatorem nekrozy neuronalnej związanej z lizą, a z drugiej – stymuluje proliferację komórek Schwanna i jest inhibitorem apoptozy oligodendrocytów [35–39]. Obecne badania naszego zespołu wskazują, że aktywacja końcowych etapów kaskady dopełniacza i powstanie MAC są konieczne do mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku kostnego do krwi obwodowej [40].

Fakt, że pochodzące ze szpiku kostnego komórki regulują zachowania typu lękowego, jest obecnie udowodniany u myszy [41]. W szczególności, w odpowiedzi na powtarzane społeczne niepowodzenie (RSD) spowodowane przez agresywnego intruza, normalne myszy wykazują zachowanie typu lękowego, korespondujące z zależnym od tej ekspozycji wzrostem liczby krążących monocytów oraz cytokin i chemokin zaangażowanych w rekrutację komórek mieloidalnych oraz zwiększoną obecność monocytów w przestrzeni okołonaczyniowej, parenchymie kory przedczołowej, jądrze migdałowatym i hipokampie. Interesujący wydaje się fakt, że myszy z deficytem receptorów chemokin związanych z przemieszczaniem się monocytów, myszy z nokautem receptora chemokiny 2 (CCR2) lub nokautem receptora fraktalkinowego (CX3CR1) nie są zdolne do rekrutowania makrofagów do mózgu i nie wykazują zachowania typu lękowego w odpowiedzi na RSD [41]. Ta obserwacja stanowi wskazówkę dotyczącą potencjalnych strategii terapeutycznych.

### **Wpływ rytmu dobowego na krążenie komórek macierzystych we krwi obwodowej**

Wykazano u myszy, iż podwyższony tonus układu nerwowego wegetatywnego reguluje dobowe zmiany w mobilizacji HSCs do krwi obwodowej. W szczególności krążenie tych komórek w normalnych warunkach podlega regulacji przez rytm dobowy, z pikiem krążących komórek we wczesnych godzinach rannych oraz najniższym stężeniem w nocy [25]. U myszy eksponowanych na dzienne zmiany światła oscylacja poziomu HSCs w krwi krążącej pozostaje pod wpływem zmian tonusu wegetatywnego układu nerwowego [25]. Obecne badania sugerują, że G-CSF zwiększa tonus współczulny bezpośrednio przez receptory G-CSF znajdujące się na obwodowych neuronach współczulnych, które redukują wychwyty zwrotny noradrenaliny i zwiększają dostępność noradrenaliny w mikrośrodkowisku szpiku kostnego [28]. Ponieważ tonus wegetatywnego układu nerwowego może odgrywać pewną rolę w okołodobowym uwalnianiu HSCs do krwi obwodowej, interesujące wydają się badania dotyczące okołodobowych zmian liczby tych krążących komórek u pacjentów z ostrymi zespołami psychotycznymi i u pacjentów z ostrymi zespołami lękowymi w porównaniu ze

zdrową grupą kontrolną. Co więcej, podobna analiza okołodobowego krążenia HSPCs powinna być wykonana u pacjentów leczonych NRI i  $\beta$ 2-blokerami.

Tym niemniej, w jednej z prac nie stwierdzono dobowych zmian poziomu adrenaliny ani noradrenaliny, które mogłyby być tłumaczone zmianami rytmu dobowego pacjentów [42]. Osoczowy poziom noradrenaliny i adrenaliny gwałtownie zmieniał się u każdej osoby zdrowej, bez jakiegokolwiek oczywistego rytmu dobowego. Obserwowane zmiany zależały bardziej od postawy i aktywności fizycznej niż od endogennych dobowych wahań poziomu katecholamin regulowanych przez zegar wewnętrzny [42].

Skupiając się na okołodobowym krążeniu HSCs, powinniśmy pamiętać, że poziom tych komórek w PB pozostaje nie tylko pod wpływem tonusu wegetatywnego układu nerwowego, ale także zmian aktywacji kaskad dopełniacza i krzepnięcia. Te dwie ważne, konserwatywne ewolucyjnie kaskady pozostają pod wpływem zmian rytmu dobowego w związku ze spadkiem pH krwi podczas głębokiego snu [43, 44]. Twierdzenie to wspiera obserwacja, że kaskada dopełniacza jest ważnym modulatorem przemieszczania się HSCs [7]. Co więcej, istnieje współzawodnictwo między kaskadami dopełniacza i krzepnięcia, które są zwykle aktywowane jednocześnie [13]. Zwłaszcza trombina, końcowy produkt aktywacji kaskady krzepnięcia, jest silnym aktywatorem składowej C5 kaskady dopełniacza, a jak stwierdzono powyżej – mobilizacja HSCs jest znacznie osłabiona u myszy z deficytem C5 [26]. Trwające badania dotyczące ludzi odpowiedzą, które czynniki modulują okołodobowe uwalnianie komórek ze szpiku do krwi obwodowej.

### Wnioski

Konieczne są dalsze badania nad komórkami macierzystymi, a w szczególności potencjalną ośią przemieszczania się tych komórek między szpikiem kostnym a mózgiem. W niniejszej pracy przedstawiono nasze sugestie, że komórki VSELS odgrywają rolę w remodellingu mózgu u pacjentów ze schizofrenią. Innym ważnym problemem, także wymagającym wnikliwych badań, jest potencjalna rola litu, używanego jako lek stabilizujący nastrój, w mobilizacji komórek macierzystych ze szpiku kostnego i ich migracji do mózgu [41]. Pochodzące ze szpiku kostnego komórki mogą regulować zachowania typu lękowego, jak zademonstrowano u normalnych myszy poprzez powtarzane społeczne niepowodzenie spowodowane przez agresywnego intruza, co wspiera to twierdzenie [41]. Zatem w nadchodzących latach możemy się spodziewać wielu zaskakujących odkryć dotyczących wpływu krążących komórek macierzystych na patogenezę oraz nowych możliwości potencjalnego użycia ich do leczenia zaburzeń psychicznych [45].

### Piśmiennictwo

1. Burns TC, Verfaillie CM, Low WC. *Stem cells for ischemic brain injury: a critical review*. J. Comp. Neurol. 2009; 515: 125–144.
2. Farin A, Liu CY, Langmoen IA, Apuzzo ML. *Biological restoration of central nervous system architecture and function: part 3-stem cell- and cell-based applications and realities in the*

- biological management of central nervous system disorders: traumatic, vascular, and epilepsy disorders.* Neurosurgery 2009; 65: 831–859.
3. Ratajczak MZ, Marycz K, Poniewierska-Baran A, Fiedorowicz K, Zbucka-Kretowska M, Moniuszko M. *Very small embryonic-like stem cells as a novel developmental concept and the hierarchy of the stem cell compartment.* Adv. Med. Sci. 2014; 59: 273–280.
  4. Vaccarino FM, Stevens HE, Kocabas A, Palejev D, Szekely A, Grigorenko EL. i wsp. *Induced pluripotent stem cells: a new tool to confront the challenge of neuropsychiatric disorders.* Neuropharmacology 2011; 60: 1355–1363.
  5. Ataka K, Asakawa A, Nagaishi K, Kaimoto K, Sawada A, Hayakawa Y. i wsp. *Bone marrow-derived microglia infiltrate into the paraventricular nucleus of chronic psychological stress-loaded mice.* PLoS One 2013; 8(11); e81744.
  6. Kucharska-Mazur J, Tarnowski M, Dołęgowska B, Budkowska M, Pędziwiatr D, Jabłoński M. i wsp. *Novel evidence for enhanced stem cell trafficking in antipsychotic-naïve subjects during their first psychotic episode.* J. Psychiatr. Res. 2014; 49: 18–24.
  7. Ratajczak MZ, Kim CH, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Kucia M, Ratajczak J. *Innate immunity as orchestrator of stem cell mobilization.* Leukemia 2010; 24: 1667–1675.
  8. Ratajczak MZ, Kim CH, Abdel-Latif A, Schneider G, Kucia M, Morris AJ. i wsp. *A novel perspective on stem cell homing and mobilization: review on bioactive lipids as potent chemoattractants and cationic peptides as underappreciated modulators of responsiveness to SDF-1 gradients.* Leukemia 2012; 26: 63–72.
  9. Massberg S, Schaerli P, Knezevic-Maramica I, Köllnberger M, Tubo N, Moseman EA. i wsp. *Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues.* Cell 2007; 131: 994–1008.
  10. Wojakowski W, Tendera M, Kucia M, Zuba-Surma E, Paczkowska E, Ciosek J. i wsp. *Mobilization of bone marrow-derived Oct-4+ SSEA-4+ very small embryonic-like stem cells in patients with acute myocardial infarction.* J. Am. Coll. Cardiol. 2009; 53: 1–9.
  11. Kucia M, Zhang YP, Reza R, Wysoczyński M, Machaliński B, Majka M. i wsp. *Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke.* Leukemia 2006; 20: 18–28.
  12. Paczkowska E, Kucia M, Koziarska D, Halasa M, Safranow K, Masiuk M. i wsp. *Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke.* Stroke 2009; 40: 1237–1244.
  13. Borkowska S, Suszyńska M, Mierzejewska K, Ismail A, Budkowska M, Salata D. i wsp. *Novel evidence that crosstalk between the complement, coagulation and fibrinolysis proteolytic cascades is involved in mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs).* Leukemia 2014; 28(11): 2148–2154.
  14. Lapidot T, Kollet O. *The brain-bone-blood triad: traffic lights for stem-cell homing and mobilization.* Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program 2010; 2010: 1–6.
  15. Focosi D, Azzarà A, Kast RE, Carulli G, Petrini M. *Lithium and hematology: established and proposed uses.* J. Leukoc. Biol. 2009; 85: 20–28.
  16. Lévesque JP, Helwani FM, Winkler IG. *The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization.* Leukemia 2010; 24: 1979–1992.
  17. Vandenbosch R, Borgs L, Beukelaers P, Belachew S, Moonen G, Nguyen L. i wsp. *Adult neurogenesis and the diseased brain.* Curr. Med. Chem. 2009; 16: 652–666.
  18. Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. *Development of neural stem cell in the adult brain.* Curr. Opin. Neurobiol. 2008; 18: 108–115.

19. Encinas JM, Enikolopov G. *Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain*. *Methods Cell Biol.* 2008; 85: 243–272.
20. Komitova M, Mattsson B, Johansson BB, Eriksson PS. *Enriched environment increases neural stem/progenitor cell proliferation and neurogenesis in the subventricular zone of stroke-lesioned adult rats*. *Stroke* 2005; 36: 1278–1282.
21. Zhang RL, Zhang ZG, Zhang L, Chopp M. *Proliferation and differentiation of progenitor cells in the cortex and the subventricular zone in the adult rat after focal cerebral ischemia*. *Neuroscience* 2001; 105: 33–41.
22. Ratajczak MZ, Lee H, Wysoczyński M, Wan W, Marlicz W, Laughlin MJ. i wsp. *Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex*. *Leukemia* 2010; 24: 976–985.
23. Golan K, Vagima Y, Ludin A, Itkin T, Cohen-Gur S, Kalinkovich A. i wsp. *S1P promotes murine progenitor cell egress and mobilization via S1P1-mediated ROS signaling and SDF-1 release*. *Blood* 2012; 119: 2478–2488.
24. Martin R, Sospedra M. *Sphingosine-1 phosphate and central nervous system*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 378: 149–170.
25. Katayama Y, Battista M, Kao WM, Hidalgo A, Peired AJ, Thomas SA. i wsp. *Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow*. *Cell* 2006; 124: 407–421.
26. Lee HM, Wu W, Wysoczyński M, Liu R, Zuba-Surma EK, Kucia M. i wsp. *Impaired mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells in C5-deficient mice supports the pivotal involvement of innate immunity in this process and reveals novel promobilization effects of granulocytes*. *Leukemia* 2009; 23: 2052–2062.
27. Wysoczyński M, Ratajczak J, Pędzwiatr D, Rokosh G, Bolli R, Ratajczak MZ. *Identification of Heme Oxygenase 1 (HO-1) as a Novel Negative Regulator of Mobilization of Hematopoietic Stem/Progenitor Cells*. *Stem Cell Rev.* 2014; DOI 10.1007/s12015-014-9547-7.
28. Lucas D, Bruns I, Battista M, Mendez-Ferrer S, Magnon C, Kunisaki Y. i wsp. *Norepinephrine reuptake inhibition promotes mobilization in mice: potential impact to rescue low stem cell yields*. *Blood* 2012; 119: 3962–3965.
29. Bonig H, Papayannopoulou T. *Hematopoietic stem cell mobilization: updated conceptual renditions*. *Leukemia* 2013; 27: 24–31.
30. Albus M, Ackenheil M, Engel RR, Müller F. *Situational reactivity of autonomic functions in schizophrenic patients*. *Psychiatry Res.* 1982; 6: 361–370.
31. Cai HL, Fang PF, Li HD, Zhang XH, Hu L, Yang W. i wsp. *Abnormal plasma monoamine metabolism in schizophrenia and its correlation with clinical responses to risperidone treatment*. *Psychiatry Res.* 2011; 188: 197–202.
32. Sheehan DV, Lecrubier Y, Sheehan KH, Amorim P, Janavs J, Weiller E. i wsp. *The Mini-International Neuropsychiatric Interview (M.I.N.I.): the development and validation of a structured diagnostic psychiatric interview for DSM-IV and ICD-10*. *J. Clin. Psychiatry* 1998; 59(supl. 20): 22–33, quiz 34–57.
33. Rzewuska M. *Validity and reliability of the Polish version of the Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS)*. *Int. J. Methods Psychiatr. Res.* 2002; 11: 27–32.
34. Kucharska-Mazur J, Pędzwiatr D, Poniewierska A, Tkacz M, Suszyńska M, Tarnowski M. i wsp. *A lack of positive effect of enhanced vegetative nervous system tonus on mobilization*

- of hematopoietic stem and progenitor cells in patients suffering from acute psychotic syndromes.* Leukemia 2013; 27: 959–961.
35. Buffo A, Rolando C, Ceruti S. *Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential.* Biochem. Pharmacol. 2010; 79: 77–89.
  36. Fernandez-Egea E, Bruna A, Garcia-Rizo C, Bernardo M, Kirkpatrick B. *Stem cell signaling in newly diagnosed, antipsychotic-naïve subjects with nonaffective psychosis.* Mol. Psychiatry 2009; 14: 989–991.
  37. Boyajyan A, Khoyetsyan A, Chavushyan A. *Alternative complement pathway in schizophrenia.* Neurochem. Res. 2010; 35: 894–898.
  38. Hakobyan S, Boyajyan A, Sim RB. *Classical pathway complement activity in schizophrenia.* Neurosci. Lett. 2005; 374: 35–37.
  39. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N. i wsp. *The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination.* Cell 2007; 131: 1164–1178.
  40. Kim CH, Wu W, Wysoczyński M, Abdel-Latif A, Sunkara M, Morris A. i wsp. *Conditioning for hematopoietic transplantation activates the complement cascade and induces a proteolytic environment in bone marrow: a novel role for bioactive lipids and soluble C5b-C9 as homing factors.* Leukemia 2012; 26: 106–116.
  41. Wohleb ES, Powell ND, Godbout JP, Sheridan JF. *Stress-induced recruitment of bone marrow-derived monocytes to the brain promotes anxiety-like behavior.* J. Neurosci. 2013; 33: 13820–13833.
  42. Schöfl C, Becker C, Prank K, von zur Mühlen A, Brabant G. *Twenty-four-hour rhythms of plasma catecholamines and their relation to cardiovascular parameters in healthy young men.* Eur. J. Endocrinol. 1997; 137: 675–683.
  43. Reis ES, Lange T, Köhl G, Herrmann A, Tschulakow AV, Naujoks J. i wsp. *Sleep and circadian rhythm regulate circulating complement factors and immunoregulatory properties of C5a.* Brain Behav. Immun. 2011; 25: 1416–1426.
  44. Wolk R, Gami AS, Garcia-Touchard A, Somers VK. *Sleep and cardiovascular disease.* Curr. Probl. Cardiol. 2005; 30: 625–662.
  45. Ratajczak MZ, Jadczyk T, Pędziwiatr D, Wojakowski W. *New advances in stem cell research: practical implications for regenerative medicine.* Pol. Arch. Med. Wewn. 2014; 124: 417–426.

Adres: Mariusz Z. Ratajczak  
Stem Cell Institute, James Graham Brown Cancer Center  
University of Louisville  
500 S. Floyd Street, Rm. 107  
Louisville, KY 40202, USA

Otrzymano: 25.09.2014

Zrecenzowano: 28.09.2014

Otrzymano po poprawie: 29.09.2014

Przyjęto do druku: 14.10.2014