

## EPENDYMA I SUBEPENDYMA MÓZGU DOROSŁYCH SSAKÓW ŹRÓDŁEM NEURALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH

### EPENDYMA AND SUBEPENDYMA OF ADULT MAMMALIAN BRAIN AS A SOURCE OF NEURAL STEM CELLS

Katarzyna ROSZEK, Joanna CZARNECKA, Michał KOMOSZYŃSKI

Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

*Streszczenie:* Mózg dorosłych ssaków, w tym człowieka, zachowuje zdolność wytwarzania zarówno komórek glejowych, jak i neuronów w procesie neurogenezy. Jest on możliwy dzięki obecności neuralnych komórek macierzystych w tzw. strefach neurogennych. Intensywność procesu neurogenezy jest zdecydowanie najwyższa w obrębie warstwy subependymalnej, będącej częścią strefy okołokomorowej komór bocznych mózgu. Także komórki ependymalne, tworzące zewnętrzną wyściółkę komór bocznych, mogą różnicować się w komórki układu nerwowego. Komórki ependymalne (ependymocyty) powstają z gleju promienistego w okresie zarodkowym i wczesnym okresie postnatalnym. Ependymocyty dorosłych ssaków dają początek migrującym komórkom, które różnicują się zarówno w astrocyty, jak i w neurony. Ponadto komórki ependymalne cechuje ekspresja markerów komórek neuroprogenitorowych, takich jak: Sox2 czy nestyna oraz CD133 – markera komórek macierzystych tkanek dorosłych organizmów. Subependyma jest zróżnicowaną strefą zbudowaną z kilku rodzajów komórek zlokalizowanych pod jednorodną warstwą komórek ependymalnych. Liczne badania wskazują, że subependymalne astrocyty, wykazujące ekspresję glejowego kwaśnego białka włókienkowego (GFAP), stanowią populację komórek proliferujących i mają cechy neuralnych komórek macierzystych. Strefa subependymalna stanowi niszę dla neuralnych komórek macierzystych, komórek prekursorowych (progenitorowych) neuronów i gleju oraz neuroblastów i glioblastów, czyli niedojrzałych neuronów i komórek glejowych. Ependyma wraz z warstwą subependymalną mogą więc być bogatym źródłem neuralnych komórek macierzystych. Neuralne komórki macierzyste – NSCs (*neural stem cells*) to pierwotne komórki cechujące się nieograniczoną zdolnością do samoodnawiania, a także różnicowania w jedną z trzech linii komórek układu nerwowego, tj. neurony, oligodendrocyty i astrocyty. Hodowla *in vitro* neuralnych komórek macierzystych wyizolowanych z obszarów neurogenicznych mózgu ssaków możliwa jest w dwóch systemach: w postaci hodowli jednowarstwowych (ang. *monolayer system*) oraz hodowli neurosfer. Neurosfery w hodowli *in vitro* są sferycznymi lub elipsoidalnymi strukturami złożonymi z kilkuset komórek w otocze bogatej w składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki neurosfer różnią się wielkością, obecnością ziarnistości w cytosolu, liczbą mitochondriów i mogą znajdować się w różnych fazach cyklu komórkowego. Neurosfery to wysoce złożone struktury biologiczne, w których w tym samym czasie zachodzą procesy fagocytozy, mitozy, apoptozy, a nawet nekrozy. Szacunki dotyczące

odsetka NSCs w neurosferach wskazują, że jest ich zaledwie 0,16%. W warunkach fizjologicznych procesy proliferacji i różnicowania neuralnych komórek macierzystych są precyzyjnie regulowane przez różnorodne oddziaływania i systemy sygnalizacji w obrębie niszy. W artykule omówiono jedynie najlepiej poznane cząsteczki i szlaki sygnałowe. Odtworzenie zawitych zależności i pełna charakterystyka czynników i szlaków sygnałowych tworzących nisze dla NSCs jest ciągle wyzwaniem dla badaczy. Dopiero kompleksowe poznanie i zrozumienie tych złożonych mechanizmów pozwoli na pełną kontrolę wzrostu i różnicowania neuralnych komórek macierzystych w hodowlach *in vitro*. To z kolei umożliwi wykorzystanie NSCs do leczenia chorób neurodegeneracyjnych, m.in. choroby Alzheimera, choroby Parkinsona oraz urazów i udarów mózgu.

*Słowa kluczowe:* ependyma, subependyma, neuralne komórki macierzyste, neurosfery, kontrola różnicowania.

*Summary:* The brain of adult animals, including humans, sustained the ability to create new glial cells and neurons. This process is called postnatal neurogenesis. It is possible owing to the presence of neuronal stem cells in the neurogenic zones. The subependymal layer, a part of periventricular zone, demonstrates the highest intensity of neurogenesis. Ependymal cells, forming the external lining of the lateral ventricles, can also effectively differentiate into cells of the nervous system. Ependymal cells (ependymocytes) originate from radial glia and are created during embryonal and early postnatal development. Ependymocytes of adult mammalian brain form migrating cells differentiating into astrocytes and neurones. Ependymal cells express neuroprogenitor markers like Sox2 or nestin and adult stem cells marker – CD133. Subependyma is layered below the uniform ependyma lining. It is formed of a few diverse types of cells. There are numerous data indicating that subependymal, GFAP-positive astrocytes proliferate intensively and they have the characteristics of neural stem cells. The subependymal zone is a niche for neural stem cells, neuronal and glial precursor (progenitor) cells, neuroblasts and glioblasts that are immature neurons and glia, respectively. Ependymal and subependymal zone emerges to be a rich source of neural stem cells. Neural stem cells (NSCs) are primary cells with the ability of self-renewal or differentiation into one of three types of nervous system cells: neurons, oligodendrocytes or astrocytes. NSCs isolated from neurogenic zones of adult mammalian brain can be cultured *in vitro* in two systems: as monolayer system or as culture of neurospheres. Neurospheres cultured *in vitro* are spherical or ellipsoidal structures formed of hundreds of cells surrounded by an envelope rich in extracellular matrix components. The cells forming neurosphere differ in their size, presence of cytosolic granules, number of mitochondria, the phase of cell cycle. Neurospheres appear as complex biological structures in which events such as phagocytosis, mitosis, apoptosis and even necrosis occur at the same time. The amount of NSCs in neurospheres is estimated as about 0.16%. In physiological conditions proliferation and differentiation of neural stem cells are precisely regulated through different interactions and signalization systems within the niche. The attempt to recognize these complex interactions and to fully characterize all the factors and signaling systems is still a challenge for the researchers. In this article we describe only these molecules and pathways of signalization that are quite well characterized. Our understanding of the mechanisms regulating proliferation and differentiation of NSCs will allow to precisely control these processes in *in vitro* cultures. These findings will help to applicate NSCs in the therapy of neurodegenerative diseases like Alzheimer or Parkinson disease, brain injury and stroke.

*Keywords:* ependyma, subependyma, neural stem cells, neurospheres, differentiation control.

*Wykaz skrótów:* **BDNF** (*brain-derived neurotrophic factor*) – czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego, **bFGF** (*basic fibroblast growth factor*) – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów, **EGF** (*epidermal growth factor*) – naskórkowy czynnik wzrostu, **GFAP** – glicynowe kwaśne białko włóknikowe, **NGF** (*nerve growth factor*) – czynnik wzrostu nerwów, **NSCs** (*neural stem cells*) – neuralne komórki macierzyste, **PDGF** – (ang. *platelet-derived growth factor*) – płytkopochodny czynnik wzrostu, **PMR** – płyn mózgowo-rdzeniowy, **PVZ** (*periventricular zone*) – strefa okołokomorowa, **SEZ** (*subependymal zone*) – strefa subependymalna, **SGZ** (*subgranular zone*) – strefa podziarnista.

## 1. WPROWADZENIE

Odkrycie obecności neuralnych komórek macierzystych – NSCs (ang. *neural stem cells*) w ośrodkowym układzie nerwowym dorosłych ssaków, w tym człowieka [31, 32], radykalnie zmieniło spojrzenie na zdolności regeneracyjne tkanki nerwowej. Mózg dorosłego osobnika zachowuje zdolność wytwarzania zarówno komórek glejowych, jak i neuronów w procesie neurogenezy. Proces ten jest możliwy dzięki obecności neuralnych komórek macierzystych w tzw. strefach neurogennych mózgu. Podstawowym miejscem neurogenezy w życiu dorosłym są dwie strefy: strefa okołokomorowa – PVZ (ang. *periventricular zone*) komór bocznych mózgu oraz strefa podziarnista – SGZ (ang. *subgranular zone*) zawoju zębatego hipokampa [5, 19, 22]. W wyniku różnicowania NSCs powstają dojrzałe neurony lub komórki gleju, które biorą udział w uzupełnianiu i zastępowaniu uszkodzonych komórek.

Intensywność procesu neurogenezy jest zdecydowanie najwyższa w obrębie warstwy subependymalnej – SEZ (ang. *subependymal zone*) będącej częścią strefy okołokomorowej komór bocznych [6, 20]. Liczne badania wskazują, że subependymalne astrocyty, wykazujące ekspresję glejowego kwaśnego białka włóknikowego (GFAP), stanowią populację komórek proliferujących i mają cechy neuralnych komórek macierzystych [13, 20, 41]. W mózgu dorosłych gryzoni aktywność mitotyczną zachowują zarówno komórki strefy subependymalnej, jak i ependymalnej. Komórki strefy ependymalnej, tworzące zewnętrzną wyściółkę komory bocznej mózgu, mogą różnicować się w komórki glejowe lub neurony [16, 31, 39].

Powyższe dane wskazują, że ependyma wraz z warstwą subependymalną otaczające przestrzenie komór bocznych układu komorowego mózgu, odgrywają istotną rolę w dorosłym organizmie i mogą być bogatym źródłem neuralnych komórek macierzystych.

## 2. UKŁAD KOMOROWY MÓZGU

Układ komorowy mózgu ssaków jest miejscem produkcji i krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR). Stanowi zbiór czterech przestrzeni zwanych komorami zlokalizowanych wewnątrz mózgowia. Wyróżnia się dwie komory boczne, komorę trzecią i komorę czwartą. Ściany komór, podobnie jak ściany wodociągu mózgu i kanału środkowego rdzenia kręgowego, są wyścielone warstwą komórek nabłonkowych – ependymą [42].

Ependyma i znajdująca się pod nią warstwa subependymalna stanowią barierę, zapewniającą selektywną wymianę substancji pomiędzy tkanką nerwową a płynem mózgowo-rdzeniowym. Ponadto, ependyma wraz z subependymą tworzą strefę neurogenną mózgu, aktywną zarówno podczas rozwoju zarodkowego, jak i u dorosłych osobników, przy czym intensywność neurogenezy maleje wraz z wiekiem [5].

### Charakterystyka i funkcje komórek ependymy

Wyściółka układu komorowego i środkowego kanału rdzenia kręgowego jest rodzajem tkanki glejowej w formie nabłonka. Komórki ependymalne (ependymocyty) występują głównie w postaci jednej warstwy, o zróżnicowanej wysokości. Kontury

komórek zarysowane są przez wyraźne błony komórkowe [17]. W skład nabłonka wchodzi dwa morfologicznie różne typy komórek:

1) Komórki sześciennie o centralnie położonym, kulistym jądrze, które stanowią „typową” ependymę. Od strony światła komórki ependymy pokryte są wydatnymi rzęskami, zasłaniającymi obecnie na powierzchni komórek mikrokosmki [17, 30].

2) Wydłużone komórki – tancyty, które mają u podstawy wypustki kierujące się ku warstwie subependymalnej. Ciało tancytów jest wydłużone, jądra komórkowe są owalne. W obszarach okołokomorowych mózgu tancyty są wyspecjalizowanymi komórkami ependymy, kontaktującymi się z komórkami nerwowymi i naczyniami włosowatymi [30].

Ependymocyty uczestniczą w transporcie substancji z płynu mózgowo-rdzeniowego do mózgu oraz produktów metabolizmu tkankowego w przeciwnym kierunku, a także biorą udział w kształtowaniu bariery PMR – mózg [17]. Rzęski obecne na powierzchni komórek wymuszają krążenie płynu mózgowo-rdzeniowego.

Komórki ependymy powstają z gleju promienistego w okresie zarodkowym i wczesnym okresie postnatalnym. W późniejszym okresie rozwoju, jako komórki zróżnicowane są już mitotycznie nieaktywne [51]. Ta ich cecha sugeruje, że nie mogą funkcjonować jako neuralne komórki macierzyste w dorosłym organizmie. Jednakże istnieją też wyniki badań wskazujące na udział ependymocytów w neurogenezie dorosłych organizmów. Wyniki badań Johanssona i wsp. [31] dowodzą, że ependymocyty dorosłych ssaków dają początek migrującym komórkom, które różnicują się w astrocyty i neurony. Ponadto, komórki ependymy cechuje ekspresja markerów komórek neuroprogenitorowych, takich jak: Sox2 czy nestyna oraz CD133 – markera komórek macierzystych tkanek dorosłych organizmów [16, 39]. Aby potwierdzić zdolność ependymocytów CD133<sup>+</sup> do różnicowania *in vivo*, Coskun i wsp. dokonali transplantacji komórek CD133<sup>+</sup> do mózgu myszy. W wyniku tych doświadczeń komórki ependymalne CD133<sup>+</sup> tworzyły komórki progenitorowe, dające początek neuronom [16]. Przypuszczalnie, komórki ependymalne lub ich prekursorzy wykazują potencjał neurogeniczny w określonych warunkach, np. szoku spowodowanego uszkodzeniem lub izolacją komórek do hodowli *in vitro* [6]. U gryzoni poddanych ogniskowemu niedotlenieniu zarówno komórki ependymy, jak i komórki spłotu naczyniówkowego biorą aktywny udział w tworzeniu nowych neuronów i astrocytów. Następuje proliferacja pojedynczej warstwy komórek do kilku warstw. Ependymocyty spłotu naczyniówkowego, mimo funkcjonalnej specjalizacji, proliferują w odpowiedzi na uszkodzenie warstwy ependymy, co sugeruje, że mogą wykazywać cechy komórek macierzystych [12]. Nie jest jasne, czy za proliferację i regenerację odpowiadają wszystkie komórki strefy ependymalnej. Często wysuwana jest hipoteza, że komórki ependymalne i neuralne komórki macierzyste są zlokalizowane w obrębie tej samej niszy i ich funkcje są powiązane [24].

### Charakterystyka i funkcje komórek subependymy

Subependyma stanowi zróżnicowaną warstwę kilku rodzajów komórek zlokalizowanych pod jednorodną warstwą komórek ependymalnych. Badania ultrastrukturalne

Quinones-Hinojosa i wsp. [42] wykazały obecność czterech odrębnych stref w ścianie komory bocznej mózgu człowieka: najbardziej zewnętrzna monowarstwa komórek ependymalnych oddzielona jest przestrzenią ubogokomórkową (ang. *hypocellular gap*) od warstwy astrocytów i położonej poniżej strefy przejściowej. Obecność ubogokomórkowej przestrzeni została dotychczas stwierdzona jedynie w mózgu człowieka i bydła domowego [6]. Przestrzeń ta zawiera nieliczne neurony i astrocyty. Tuż pod nią znajduje się warstwa GFAP-pozytywnych astrocytów, które dzięki wypustkom mogą kontaktować się z komórkami ependymy [46]. Strefa subependymalna, a w szczególności warstwa astrocytów, stanowi niszę dla neuralnych komórek macierzystych, komórek prekursorowych (progenitorowych) neuronów i gleju oraz neuroblastów i glioblastów, czyli niedojrzałych neuronów i komórek glejowych [41]. Neuroblasty powstające w wyniku różnicowania NSCs migrują do opuszek węchowych, gdzie zostają włączone w pulę istniejących już interneuronów. Migracja neuroblastów modulowana jest przez przepływ białkowych czynników, krążących w płynie mózgowo-rdzeniowym dzięki ruchom rzęsek ependymocytów [47].

### 3. NEURALNE KOMÓRKI MACIERZYZYSTE

#### Identyfikacja neuralnych komórek macierzystych

Neuralne komórki macierzyste – NSCs (*neural stem cells*) to pierwotne komórki cechujące się nieograniczoną zdolnością do samoodnawiania, a także różnicowania w jedną z trzech linii komórek układu nerwowego, tj. neurony, oligodendrocyty i astrocyty [3, 6, 12].

Identyfikacja neuralnych komórek macierzystych jest trudnym zadaniem z kilku przyczyn. NSCs stanowią niewielką populację w mózgu dorosłych osobników i żadne markery molekularne, włączając CD133 i GFAP, nie mogą jednoznacznie zidentyfikować NSCs, szczególnie w warunkach *in situ*. Ponadto komórki macierzyste powinny mieć zdolność do samoodnowy i pluripotencjalność, co ogranicza ich identyfikację do badań w hodowli *in vitro* [3, 53]. Heterogenność populacji NSCs wyraża się między innymi w różnorodnych profilach ekspresji białek, a to powoduje, że nie ma jednego uniwersalnego antygenu powierzchniowego dla precyzyjnej identyfikacji tych komórek [4, 53]. Tym niemniej, istnieje pewien zestaw markerów stosowanych do identyfikacji, izolacji i oczyszczania neuralnych komórek macierzystych czy komórek progenitorowych. Dostępne dane literaturowe dotyczące białek markerowych zebrano w tabeli 1.

#### Izolacja i hodowla NSCs *in vitro*

Hodowla *in vitro* neuralnych komórek macierzystych wyizolowanych z obszarów neurogennych mózgu ssaków możliwa jest w dwóch systemach: w postaci hodowli jednowarstwowych (ang. *monolayer system*) oraz hodowli neurosfer (ang. *neurosphere system*).

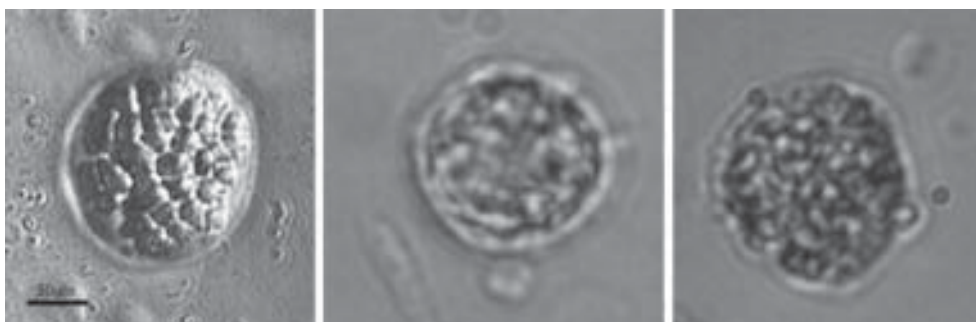
TABELA 1. Markery NSCs i komórek progenitorowych [wg 6, 52, 53, zmodyfikowane]  
 TABLE 1. Markers of NSCs and progenitor cells [modified from 6, 52, 53]

Marker	Właściwości	Literatura
GFAP	Ulega ekspresji w astrocytach SEZ i SGZ gryzoni, naczelnych i człowieka	[20]
CD133	Jest to modyfikowane glikolitycznie białko prominina-1. W ependymocytach umiejscawia się w wypustkach ich błony komórkowej. Występuje w licznych komórkach progenitorowych, a także nowotworowych	[16]
Nestyna	Marker komórek neuroprogenitorowych oraz neuroepitelialnych komórek macierzystych (ependymy)	[26]
Sox-1, Sox-2	Czynniki transkrypcyjne zaangażowane w neurogenezę, utrzymują komórki neuroprogenitorowe w stanie niezróżnicowanym	[9]
Notch-1	Białko receptorowe, ulega ekspresji w astrocytach SEZ, ependymocytach i neuroblastach	[27]
Gli-1	Czynnik transkrypcyjny, niezbędny w funkcjonowaniu szlaku Shh, ulega ekspresji w astrocytach i komórkach neuroprogenitorowych	[40]
Musashi-1	Białko wiążące się z mRNA, zaangażowane w regulację sygnalizacji na szlaku Notch, obecne w komórkach neuroprogenitorowych	[48]
PDGF-R FGF-R	Receptory czynników wzrostowych promujących proliferację NSCs, obecność receptorów wykazano w wielu wczesnych komórkach neuroprogenitorowych	[36]

Dotychczas w literaturze opisane zostały procedury jednowarstwowych hodowli neuralnych komórek macierzystych izolowanych z tkanek embrionalnych. Hodowle jednowarstwowe są zakładane z zawiesiny komórek bądź z eksplantu tkanki nerwowej, które umieszcza się na podłożu pokrytym substratem. Substratami skutecznie zwiększającymi stopień adhezji komórek do podłoża są przykładowo fibronektyna, poliornityna, kolagen, żelatyna, laminina [15]. W porównaniu z hodowlą neurosfer, hodowle jednowarstwowe są bardziej homogenne. Zaletą adherentnych hodowli w postaci monowarstwy jest też lepsza ekspozycja komórek na sygnały środowiska hodowlanego. Być może dlatego wydajność różnicowania NSCs w kierunku komórek nerwowych w warunkach *in vitro* zwiększa się z 5% w przypadku hodowli neurosfer do ponad 40% w hodowli jednowarstwowej [15].

Historycznie starszym systemem hodowli NSCs jest hodowla neurosfer. Metoda opisana po raz pierwszy przez Reynoldsa i Weissa [44] polegała na hodowli fragmentu tkanki mózgowej dorosłej myszy w naczyniu hodowlanym niepokrytym substratem. Pożywka hodowlana bez dodatku surowicy zawierała wysokie stężenie, 20 ng/ml, naskórkowego czynnika wzrostu (EGF), który pobudzał proliferację wyłącznie komórek prezentujących na powierzchni receptor EGF. Po kilku dniach hodowli większość komórek obumierała, natomiast pozostałe żywe komórki tworzyły swobodnie unoszące się kuliste agregaty, tzw. neurosfery. Proliferujące niezróżnicowane komórki neurosfer cechowała ekspresja nestyny. Neurosfery te indukowano do różnicowania, co skutkowało tworzeniem komórek morfologicznie i antygenowo odpowiadających neuronom i astrocytom [44]. Tworzenie neurosfer zaobserwowano w przypadku zakładania hodowli zarówno z mózgu dorosłych zwierząt, jak i z tkanek embrionalnych [3].

Neurosferę w hodowli *in vitro* są sferycznymi lub elipsoidalnymi strukturami złożonymi z kilkuset komórek w otoczce bogatej w składniki macierzy zewnątrzkomórkowej. Komórki neurosfer różnią się wielkością, obecnością lub brakiem ziarnistości w cytosolu, liczbą mitochondriów, mogą znajdować się w różnych fazach cyklu komórkowego [8]. Komórki te wykazują ekspresję receptorów EGF, FGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , nestyny, GFAP,  $\beta$ -III tubuliny i specyficznego dla neuronów białka NeuN [3]. Tak szerokie spektrum antygenów dowodzi wysokiej heterogenności neurosfer. Struktury te stanowią agregaty właściwych NSCs, komórek neuroprogenitorowych na różnym etapie różnicowania oraz dojrzałych neuronów i komórek gleju. Neurosferę to wysoce złożone struktury biologiczne, w których w tym samym czasie zachodzą procesy fagocytozy, mitozy, apoptozy, a nawet nekrozy [8]. Szacunki dotyczące odsetka NSCs w neurosferach wskazują, że jest ich zaledwie 0,16% [43]. Również same neurosferę różnią się między sobą wielkością i morfologią (ryc. 1). Mogą być nieregularnego kształtu z wystającymi drobnymi wyrostkami przypominającymi rzęski lub regularnie kuliste. Niektóre neurosferę wykształcają wyraźne pseudopodia, dzięki którym mogą czasowo ulegać adhezji do podłoża, a następnie spontanicznie odrywają się od dna [8].



RYCINA 1. Neurosferę z mózgu dorosłej świni w hodowli *in vitro* (badania własne)  
FIGURE 1. Neurospheres from adult pig brain cultured *in vitro*

Metoda hodowli neurosfer, mimo swoich ograniczeń, stanowi cenne narzędzie w badaniach nad biologią komórek macierzystych układu nerwowego. Uzyskane ze skrawka tkanki nerwowej i rozproszone komórki umieszczają się w pożywce pozbawionej surowicy, z dodatkiem czynników wzrostu: EGF w stężeniu 20 ng/ml i bFGF w stężeniu 10 ng/ml. W tych warunkach przeżywają jedynie komórki wrażliwe na mitogeny, po 6–8 dniach hodowli komórki te tworzą neurosferę [18]. Pierwotne neurosferę można pasażować, kiedy osiągną średnicę około 100–150  $\mu$ m. Komórki neurosfer pierwotnych, rozproszone enzymatycznie (za pomocą 0,05% trypsyny), po około 7 dobach od pasażu tworzą neurosferę wtórne. Zdolność tworzenia wielu kolejnych pokoleń neurosfer jest dowodem na obecność NSCs zdolnych do ciągłego samoodnawiania [18, 43].

Chiasson i wsp. potwierdzili obecność neuralnych komórek macierzystych w warstwie ependymy, jak i subependymy [13]. Jednak zdolność tych komórek do tworzenia *in vitro* neurosfery pierwotnych i wtórnych jest różna. Komórki pochodzenia ependymalnego z łatwością proliferują i tworzą neurosfery pierwotne niezależnie od obecności w pożywce hodowlanej EGF i bFGF, natomiast po enzymatycznej dysocjacji nie tworzą neurosfery wtórnych. Neurosfery pierwotne są niewielkie – poniżej 0,1 mm średnicy. Umieszczone w warunkach różnicujących dają początek wyłącznie komórkom GFAP-pozytywnym. Natomiast populacja NSCs pochodzenia subependymalnego wykazuje większą zdolność do samoodnawiania, tworzenia neurosfery pierwotnych i wtórnych, jednak warunkiem niezbędnym jest obecność w środowisku hodowlanym mitogenów EGF lub bFGF. Neurosfery pierwotne pochodzenia subependymalnego mają co najmniej kilkakrotnie większą średnicę (od 0,5 do 1 mm) w porównaniu z neurosferami pierwotnymi z komórek ependymalnych. W warunkach różnicujących z NSCs pochodzenia subependymalnego tworzą się zarówno komórki GFAP<sup>+</sup>, jak i neurony [13].

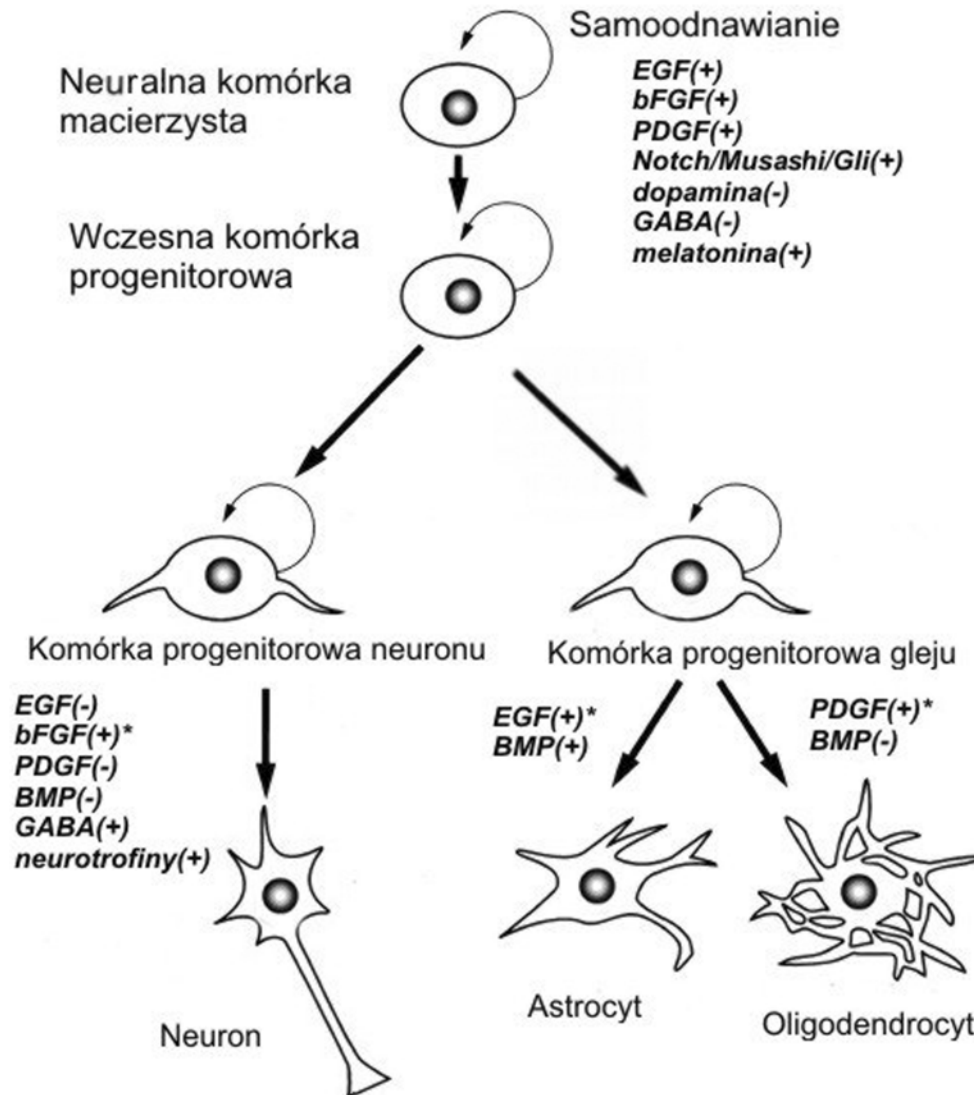
### Kontrola proliferacji i różnicowania NSCs

W tkankach dorosłego organizmu komórki macierzyste są umiejscowione w tzw. niszach, czyli regionach macierzy zewnątrzkomórkowej. Znaczącą rolę w kontroli proliferacji i różnicowania komórek macierzystych odgrywa obecność w obrębie niszy zarówno dojrzałych komórek i wydzielanych przez nie czynników wzrostu, jak i białek macierzy zewnątrzkomórkowej. W kontrolę proliferacji i różnicowania neuralnych komórek macierzystych *in vivo* zaangażowane są liczne szlaki sygnałowe. Ich współdziałanie determinuje losy NSCs, regulując tempo proliferacji i samoodnawiania lub kierunek różnicowania [6] (ryc. 2). Próba odtworzenia zawitych zależności i pełnego scharakteryzowania czynników i szlaków sygnałowych tworzących nisze dla NSCs jest ciągle wyzwaniem dla badaczy. Najlepiej poznane cząsteczki i szlaki sygnałowe opisano poniżej.

**EGF** – naskórkowy czynnik wzrostu (ang. *epidermal growth factor*) to klasyczny mitogen stosowany w hodowli NSCs [43, 44]. Zwiększa tempo proliferacji nieodróżnionych komórek zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Jego działanie *in vivo* jest jednak szersze – EGF znacząco indukuje powstawanie GFAP-pozytywnych komórek astroglii i ich migrację z SEZ do sąsiadujących stref mózgu. Odbywa się to kosztem ograniczenia różnicowania w kierunku neuronów i zmniejszenia ruchliwości neuroblastów [33].

**bFGF** – zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *basic fibroblast growth factor*) w warunkach *in vitro* zwiększa tempo proliferacji nieodróżnionych komórek, podczas gdy usunięcie tego czynnika indukuje neurogenezę [3, 43]. Infuzja bFGF do komórki bocznej mózgu gryzoni powoduje natomiast zwiększenie intensywności neurogenezy w SEZ [6]. Odmienna reakcja komórek na ten sam czynnik dowodzi, że hodowle *in vitro* nie zawsze stanowią idealne odwzorowanie warunków panujących *in vivo*. W tym przypadku kontrola tempa proliferacji i różnicowania przez bFGF może dodatkowo zależeć od współdziałania z innymi czynnikami wzrostowymi oraz od zmian w profilu ekspresji aktywnych receptorów [25].





RYCINA 2. Kontrola proliferacji i różnicowania neuralnych komórek macierzystych (kompilacja danych literaturowych): (+) oznacza stymulację, (-) hamowanie, \* wpływ stwierdzony tylko w warunkach *in vivo*

FIGURE 2. The control of proliferation and differentiation of neural stem cells (compilation of literature data): (+) stimulation, (-) inhibition, \* influence observed *in vivo* only

**PDGF** – płytkopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet-derived growth factor*) jest również skutecznym mitogenem dla NSCs izolowanych z mózgu dorosłych myszy, jednak zwiększenie tempa proliferacji komórek obserwowano jedynie w przypadku zastosowania PDGF wraz z bFGF [28]. Infuzja PDGF do komór bocznych mózgu gryzoni powoduje, podobnie jak w przypadku EGF, aktywację astrocytów SEZ kosztem ograniczenia neurogenezy [28].

Sygnalizacja z udziałem **BMP** (ang. *bone morphogenetic protein*) wzmaga tworzenie astrocytów *in vitro* i *in vivo*. Nadekspresja BMP7 w mózgu dorosłych osobników powoduje zmniejszenie tempa proliferacji i neurogenezy, zwiększa natomiast różnicowanie w kierunku astrocytów. Przeciwny efekt wywołuje noggina, białko będące rozpuszczalnym antagonistą szlaku sygnalizacyjnego, w którym uczestniczy BMP [14].

Szlak sygnalizacyjny **Notch** jest uniwersalnym systemem sygnalizacji, zapewniającym utrzymanie zdolności komórek macierzystych do samoodnawiania przez zahamowanie procesów ich różnicowania [45]. W przypadku neuralnych komórek macierzystych, aktywacja szlaku Notch powoduje zwiększenie tempa proliferacji NSCs kosztem zahamowania neurogenezy [2, 5, 10]. Białko błonowe receptora Notch, podobnie jak białko Musashi – jeden z elementów szlaku sygnałowego Notch, stanowią markery proliferujących komórek układu nerwowego (tab. 1). Oprócz szlaku Notch, ważną rolę w utrzymaniu puli nieodróżnionych NSCs odgrywa także szlak sygnalizacyjny Shh (ang. *sonic hedgehog homolog*) [5]. Jednym z elementów tego szlaku jest czynnik transkrypcyjny z rodziny białek Gli (ang. *glioma-associated oncogene homolog*), który także proponowany jest jako jeden z markerów komórek neuroprogenitorowych.

**Neurotransmitery** wydzielane przez dojrzałe komórki neuronów są kolejnymi czynnikami działającymi w obrębie nisz dla neuralnych komórek macierzystych, niepozostającymi bez wpływu na zdolność NSCs do proliferacji bądź różnicowania. Astrocyty strefy subependymalnej mają na swojej powierzchni aktywne receptory kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) i reagują obniżeniem tempa proliferacji oraz tworzeniem neuroblastów na obecność GABA w środowisku. Powstające neuroblasty wydzielają kolejne cząsteczki GABA, co stanowi mechanizm sprzężenia zwrotnego kontrolującego proliferację i różnicowanie astrocytów [38].

Serotonina (5-hydroktryptamina, 5-HT) i układ serotonergiczny również moduluje tempo neurogenezy w mózgu dorosłych zwierząt, szczególnie w obszarze hipokampa [19]. Podwyższony poziom serotoniny zwiększa intensywność neurogenezy *in vivo*, podobny efekt obserwowano także w hodowlach neuralnych komórek macierzystych *in vitro* [7]. W regulację procesu neurogenezy za pośrednictwem serotoniny bezpośrednio zaangażowane są receptory 5-HT<sub>1A</sub>, co wykazano w kilku eksperymentach *in vitro* [7, 19].

**Dopamina** ogranicza proliferację i samoodnawianie neuralnych komórek macierzystych. Jak dotąd jednak nie wykazano bezsprzecznie ekspresji receptorów dopaminy na powierzchni komórek NSCs dorosłych ssaków, dlatego niezbędne są dalsze precyzyjne badania [34].

**Melatonina** jest hormonem produkowanym przez szyszynkę – jego główna funkcja to kontrola rytmu snu i czuwania, ale także chroni komórki nerwowe przed śmiercią wywołaną, np. działaniem substancji neurotoksycznych. Wyniki najnowszych badań wykazały, że melatonina zwiększa tempo proliferacji neuralnych komórek macierzystych i komórek neuroprogenitorowych wyizolowanych ze strefy subependymalnej mózgu dorosłych myszy. Komórki te cechuje wysoki poziom ekspresji receptora melatoniny [50].

**Neurotrofiny**, takie jak: czynnik wzrostu nerwów – NGF (*nerve growth factor*), czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego – BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) oraz neurotrofina3 (NT3) kontrolują w warunkach fizjologicznych proliferację oraz różnicowanie NSCs. Aktywowane receptory tych czynników charakteryzują się aktywnością kinazy tyrozynowej i fosforylują białka z domeną SH2 lub PH, zapoczątkowując w ten sposób odpowiedź komórkową [1]. Stany patologiczne, np. niedokrwienie mózgu, wywołują wzrost stężenia wymienionych neurotrofin, co przyspiesza różnicowanie komórek macierzystych w neurony.

Macierz zewnątrzkomórkowa jest kolejnym istotnym elementem niszy, a jej składniki mogą być zaangażowane w regulację samoodnowy lub różnicowania NSCs. Heparyna, kolagen, LewisX i Tenascyna-C to najlepiej poznane składniki macierzy zewnątrzkomórkowej komórek układu nerwowego [6]. Ich wpływ na tempo proliferacji lub różnicowania NSCs jest pośredni poprzez interakcję z mitogenami i innymi czynnikami [11].

Hodowla neurosfer *in vitro* w pożywce pozbawionej surowicy, zawierającej EGF i/lub bFGF pozwala na nieograniczoną proliferację komórek, natomiast pasażowanie neurosfer umożliwia uzyskanie praktycznie nieskończonej liczby kolejnych pokoleń neurosfer [18]. Pożywki hodowlane z surowicą, pozbawione dodatku mitogenów EGF i bFGF, aktywują spontaniczne różnicowanie neuralnych komórek macierzystych w obrębie neurosfery głównie w kierunku astrocytów, a w mniejszym stopniu w kierunku neuronów i oligodendrocytów. Dodanie do pożywki hodowlanej czynnika neurotroficznego, np. NGF lub BDNF znacząco zwiększa liczebność neuronów w populacji zróżnicowanych komórek [3].

Możliwe jest różnicowanie całych neurosfer lub komórek uzyskanych w wyniku ich enzymatycznej dyspersji [18]. Różnicowanie komórek rozproszonych enzymatycznie i hodowanych w postaci monowarstw pozwala na precyzyjne ukierunkowanie różnicowania i uzyskanie znacznej liczby komórek wyspecjalizowanych.

#### **4. PERSPEKTYWY WYKORZYSTANIA NEURALNYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH W LECZENIU CHOROÓB UKŁADU NERWOWEGO**

Zdolność neuralnych komórek macierzystych do długotrwałej proliferacji i regenerowania dojrzałych komórek układu nerwowego daje nadzieję na wykorzystanie NSCs do leczenia chorób neurodegeneracyjnych, m.in. choroby Alzheimera, choroby Parkinsona, stwardnienia rozsianego oraz udarów mózgu, które wiążą się z utratą wielu milionów neuronów. Wykorzystanie NSCs w terapii schorzeń układu nerwowego może odbywać się w dwojaki sposób:

1) *poprzez przeszczep egzogennych NSCs* – W dotychczasowych badaniach na mysich modelach chorób układu nerwowego przeszczepiano różnorodne komórki, zarówno NSCs, jak i komórki neuroprogenitorowe oraz niedojrzałe neurony [53]. Celem przeszczepiania NSCs lub komórek progenitorowych jest nie tylko ich różnicowanie się w dojrzałe komórki układu nerwowego, ale też zapewnienie

wsparcia dla procesów regeneracyjnych *in vivo* poprzez wydzielanie odpowiednich ilości czynników neurotroficznych i przeciwzapalnych. Pozwala to na częściowe złagodzenie skutków uszkodzenia, niezależnie od jego przyczyny [3]. Istnieją doniesienia wskazujące, że wprowadzone dożylnie, wstępnie zróżnicowane NSCs, pokonują barierę krew-mózg i są zdolne do integracji strukturalnej oraz funkcjonalnej z tkanką nerwową organizmu biorcy [35]. Dodatkowo NSCs wykazują tropizm w kierunku uszkodzonej tkanki bądź zmian nowotworowych [35, 53]. Mechanizm tego zjawiska polega prawdopodobnie na interakcjach ligand-receptor, przy czym czynników wywołujących dodatnią chemotaksję komórek macierzystych lub progenitorowych może być nawet kilkanaście. Nieliczne zidentyfikowane czynniki to EGF i jego receptor, SCF/c-Kit i HGF/c-Met [54]. Istnienie dodatniego tropizmu ukierunkowanego w stronę komórek nowotworowych stwarza możliwość wykorzystania NSCs także jako transporterów leków skierowanych przeciwko nowotworom mózgu [35].

2) *poprzez stymulację endogennych NSCs* – W warunkach fizjologicznych procesy proliferacji i różnicowania komórek macierzystych są precyzyjnie regulowane poprzez różnorodne oddziaływania i systemy sygnalizacji w obrębie niszy. Dopiero poznanie i zrozumienie tych złożonych mechanizmów pozwoli na pełną kontrolę neurogenezy *in vivo*. Ograniczeniem dla stosowania czynników neurotroficznych pobudzających neurogenezę było dotychczas pokonanie przez nie bariery krew-mózg i precyzyjne dostarczenie tych białek do miejsca uszkodzenia [23]. Obecnie jest to możliwe dzięki zastosowaniu terapii genowej i wektorów wirusowych [37].

Aktualne badania dotyczą wykorzystania NSCs w terapii zaburzeń neurologicznych – depresji i schizofrenii [53]. Depresję bardzo często wyzwała długotrwały stres, co wiąże się ze zwiększoną produkcją kortyzolu. Hormon ten oddziałuje neurotoksycznie na komórki układu nerwowego oraz powoduje osłabienie procesów neurogenezy [5]. Wykazano, że leki przeciwdepresyjne z grupy agonistów receptorów serotoninowych, znacząco zwiększają neurogenezę u osób dorosłych [21, 29]. Skuteczne okazało się także leczenie depresji w modelach zwierzęcych za pomocą czynników neurotroficznych, takich jak BDNF, zwiększających neurogenezę nawet po zastosowaniu pojedynczej dawki leku [49]. Argumentem na poparcie tych tez może być 4–6-tygodniowy okres upływający od podania leku przeciwdepresyjnego do wystąpienia widocznego efektu terapeutycznego. Odpowiada to czasowi, w jakim neurony dzielą się, różnicują, a następnie włączają się funkcjonalnie w tkankę [53].

Nieprawidłowości w neurogenезie mogą przyczyniać się także do rozwoju schizofrenii. W tym przypadku patogenezę choroby wiąże się ze zmniejszeniem tempa proliferacji NSCs w zawoju zębatym hipokampa, co potwierdzono doświadczalnie u pacjentów chorych na schizofrenię [5]. Istotną rolę przypisuje się genowi DISC1 (*Disrupted in Schizophrenia 1*), który kontroluje proces funkcjonalnej integracji neuronów powstających u dorosłych osobników. Uszkodzenie tego genu nie jest jedyną przyczyną, ale jednym z czynników sprzyjających rozwojowi schizofrenii [21]. Tak więc, zastosowanie terapii z użyciem egzogennych neuralnych komórek macierzystych pozwoliłoby na przywrócenie właściwego poziomu neurogenezy.

Wykorzystanie NSCs w terapii chorób układu nerwowego budzi jednak pewne zastrzeżenia związane z wydajnością izolacji neuralnych komórek macierzystych z

tkanki mózgu lub innych źródeł ich pozyskiwania. Równie ważna jest precyzyjna kontrola różnicowania przeszczepionych NSCs oraz funkcjonalna integracja komórek w warunkach *in vivo*. Liczne badania wskazują, że przeszczepione NSCs wywierają głównie efekt pobudzenia procesów regeneracyjnych oraz przywrócenia homeostazy w miejscu uszkodzenia [3]. Ponadto NSCs hodowane *in vitro* mogą stać się narzędziem do zrozumienia mechanizmów powstawania chorób układu nerwowego oraz do testowania nowych leków. Niezależnie od zastosowanej strategii terapeutycznej, leczenie chorób układu nerwowego z udziałem neuralnych komórek macierzystych wymaga jeszcze wielu dalszych badań.

## LITERATURA

- [1] ABE K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; **20**: 1393–1408.
- [2] ABLES JL, DECAROLIS NA, JOHNSON MA, RIVERA PD, GAO Z, COOPER DC, RADTKE F, HSIEH J, EISCH AJ. Notch1 is required for maintenance of the reservoir of adult hippocampal stem cells. *J Neurosci* 2010; **30**: 10484–10492.
- [3] AHMED S. The culture of neural stem cells. *J Cell Biochem* 2009; **106**: 1–6.
- [4] ALVAREZ-BUYLLAA, KOHWI M, NGUYEN TM, MERKLE FT. The heterogeneity of adult neural stem cells and the emerging complexity of their niche. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2008; **73**: 357–365.
- [5] BALU DT, LUCKI I. Adult hippocampal neurogenesis: regulation, functional implications, and contribution to disease pathology. *Neurosci Biobehav Rev* 2009; **33**: 232–252.
- [6] BASAK O, TAYLOR V. Stem cells of the adult mammalian brain and their niche. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 1057–1072.
- [7] BENNINGHOFF J, GRITTI A, RIZZI M, LAMORTE G, SCHLOESSER RJ, SCHMITT A, ROBEL S, GENIUS J, MOESSNER R, RIEDERER P, MANJI HK, GRUNZE H, RUJESCU D, MOELLER HJ, LESCH KP, VESCOVIAL. Serotonin depletion hampers survival and proliferation in neurospheres derived from adult neural stem cells. *Neuropsychopharmacology* 2010; **35**: 893–903.
- [8] BEZA, CORSINI E, CURTI D, BIGGIOGERA M, COLOMBO A, NICOSIA RF, PAGANO SF, PARATI EA. Neurosphere and neurosphere-forming cells: morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 2003; **993**: 18–29.
- [9] BRAZEL CY, LIMKE TL, OSBORNE JK, MIURA T, CAI J, PEVNY L, RAO MS. Sox2 expression defines a heterogeneous population of neurosphere-forming cells in the adult murine brain. *Aging Cell* 2005; **4**: 197–207.
- [10] CAMPOS LS, DECKER L, TAYLOR V, SKARNES W. Notch, epidermal growth factor receptor, and beta1-integrin pathways are coordinated in neural stem cells. *J Biol Chem* 2006; **281**: 5300–5309.
- [11] CAPELAA, TEMPLE S. LeX is expressed by principle progenitor cells in the embryonic nervous system, is secreted into their environment and binds Wnt-1. *Dev Biol* 2006; **291**: 300–313.
- [12] CARLÉN M, MELETIS K, GÖRITZ C, DARSALIA V, EVERGREN E, TANIGAKI K, AMENDOLAM, BARNABÉ-HEIDER F, YEUNG MS, NALDINI L, HONJO T, KOKAIAZ, SHUPLIAKOV O, CASSIDY RM, LINDVALL O, FRISÉN J. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci* 2009; **12**: 259–267.
- [13] CHIASSON BJ, TROPEPE V, MORSHEAD CM, VAN DER KOOY D. Adult mammalian forebrain ependymal and subependymal cells demonstrate proliferative potential, but only subependymal cells have neural stem cell characteristics. *J Neurosci* 1999; **19**: 4462–4471.
- [14] CHO SR, BENRAISSA, CHMIELNICKI E, SAMDANIA, ECONOMIDES A, GOLDMAN SA. Induction of neostriatal neurogenesis slows disease progression in a transgenic murine model of Huntington disease. *J Clin Invest* 2007; **117**: 2889–2902.
- [15] CONTI L, POLLARD SM, GORBA T, REITANO E, TOSELLI M, BIELLA G, SUN Y, SANZONE S, YING QL, CATTANEO E, SMITH A. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 2005; **3**: e283.

- [16] COSKUN V, WU H, BLANCHI B, TSAO S, KIM K, ZHAO J, BIANCOTTI JC, HUTNICK L, KRUEGER RC Jr, FAN G, de VELLIS J, SUN YE. CD133<sup>+</sup> neural stem cells in the ependyma of mammalian postnatal forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 1026–1031.
- [17] Del BIGIO MR. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia* 1995; **14**: 1–13.
- [18] DELEYROLLE LP, REYNOLDS BA. Isolation, expansion, and differentiation of adult mammalian neural stem and progenitor cells using the neurosphere assay. *Methods Mol Biol* 2009; **549**: 91–101.
- [19] DJAVADIAN RL. Serotonin and neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of adult mammals. *Acta Neurobiol Exp* 2004; **64**: 189–200.
- [20] DOETSCH F, CAILLE I, LIM DA, GARCIA-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLAA. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; **97**: 703–716.
- [21] EISCHAJ, CAMERON HA, ENCINAS JM, MELTZER LA, MING GL, OVERSTREET-WADICHE L S. Adult neurogenesis, mental health, and mental illness: hope or hype? *J Neurosci* 2008; **28**: 11785–11791.
- [22] ERIKSSON PS, PERFILIEVAE, BJÖRK-ERIKSSON T, ALBORNAM, NORDBORG C, PETERSON DA, GAGE FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; **4**: 1313–1317.
- [23] FUMAGALLI F, MOLteni R, CALABRESE F, MAJ PF, RACAGNI G, RIVA MA. Neurotrophic factors in neurodegenerative disorders: potential for therapy. *CNS Drugs* 2008; **22**: 1005–1019.
- [24] GARCIA-VERDUGO JM, FERRÓN S, FLAMES N, COLLADO L, DESFILIS E, FONT E. The proliferative ventricular zone in adult vertebrates: a comparative study using reptiles, birds, and mammals. *Brain Res Bull* 2002; **57**: 765–775.
- [25] GRITTA, FRÖLICHSTHAL-SCHOELLER P, GALLI R, PARATI EA, COVA L, PAGANO SF, BJORN-SON CR, VESCOVI AL. Epidermal and fibroblast growth factors behave as mitogenic regulators for a single multipotent stem cell-like population from the subventricular region of the adult mouse forebrain. *J Neurosci* 1999; **19**: 3287–3297.
- [26] HOMBACH-KLONISCH S, PANIGRAHI S, RASHEDI I, SEIFERT A, ALBERTIE, POCAR P, KURPISZ M, SCHULZE-OSTHOFF K, MACKIEWICZ A, LOS M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential-perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med* 2008; **86**: 1301–1314.
- [27] IRVIN DK, NAKANO I, PAUCAR A, KORNBLUM HI. Patterns of Jagged1, Jagged2, Delta-like 1 and Delta-like 3 expression during late embryonic and postnatal brain development suggest multiple functional roles in progenitors and differentiated cells. *J Neurosci Res* 2004; **75**: 330–343.
- [28] JACKSON EL, GARCIA-VERDUGO JM, GIL-PEROTIN S, ROY M, QUINONES-HINOJOSAA, VANDENBERG S, ALVAREZ-BUYLLAA. PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron* 2006; **51**: 187–199.
- [29] JACOBS B, van PRAAG H, GAGE F. Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol Psychiatry* 2000; **5**: 262–269.
- [30] JARVISA C, ANDREW D. Correlated electrophysiology and morphology of the ependyma in rat hypothalamus. *J Neurosci* 1988; **8**: 3691–3702.
- [31] JOHANSSON CB, MOMMA S, CLARKE DL, RISLING M, LENDAHL U, FRISEN J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999a; **96**: 25–34.
- [32] JOHANSSON CB, SVENSSON M, WALLSTEDT L, JANSON AM, FRISEN J. Neural stem cells in the adult human brain. *Exp Cell Res* 1999; **253**: 733–736.
- [33] KIM Y, COMTE I, SZABO G, HOCKBERGER P, SZELE FG. Adult mouse subventricular zone stem and progenitor cells are sessile and epidermal growth factor receptor negatively regulates neuroblast migration. *PLoS One* 2009; **4**: e8122.
- [34] KIPPIN TE, KAPUR S, van der KOOY D. Dopamine specifically inhibits forebrain neural stem cell proliferation, suggesting a novel effect of antipsychotic drugs. *J Neurosci* 2005; **25**: 5815–5823.
- [35] KOSZTOWSKI T, ZAIDI HA, QUINONES-HINOJOSAA. Applications of neural and mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Expert Rev Anticancer Ther* 2009; **9**: 597–612.
- [36] LACHAPELLE F, AVELLANA-ADALID V, NAIT-OUESMAR B, BARON-VAN EVERCOOREN A. Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and platelet-derived growth factor AB (PDGF AB) promote adult SVZ-derived oligodendrogenesis *in vivo*. *Mol Cell Neurosci* 2002; **20**: 390–403.
- [37] LIM ST, AIRAVAARA M, HARVEY BK. Viral vectors for neurotrophic factor delivery: a gene therapy approach for neurodegenerative diseases of the CNS. *Pharmacol Res* 2010; **61**: 14–26.
- [38] LIU X, WANG Q, HAYDAR TF, BORDEYA A. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 2005; **8**: 1179–1187.
- [39] MELETIS K, BARNABÉ-HEIDER F, CARLÉN M, EVERGREN E, TOMILIN N, SHUPLIAKOV O, FRISÉN J. Spinal cord injury reveals multilineage differentiation of ependymal cells. *PLoS Biol* 2008; **6**: e182.

- [40] PALMA V, LIM DA, DAHMANE N, SÁNCHEZ P, BRIONNE TC, HERZBERG CD, GITTON Y, CARLETON A, ALVAREZ-BUYLLAA, RUIZ ALTABAA. Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain. *Development* 2005; **132**: 335–344.
- [41] QUINONES-HINOJOSAA, SANAI N, GONZALEZ-PEREZ O, GARCIA-VERDUGO JM. The human brain subventricular zone: stem cells in this niche and its organization. *Neurosurg Clin N Am* 2007; **18**: 15–20.
- [42] QUINONES-HINOJOSAA, SANAI N, SORIANO-NAVARRO M, GONZALEZ-PEREZ O, MIRZADECH Z, GIL-PEROTTIN S, ROMERO-RODRIGUEZ R, BERGER M, GARCIA-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLAA. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 2006; **494**: 415–434.
- [43] REYNOLDS BA, RIETZE RL. Neural stem cells and neurospheres- re-evaluating the relationship. *Nat Methods* 2005; **2**: 333–336.
- [44] REYNOLDS BA, WEISS S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; **255**: 1707–1710.
- [45] ROSZEK K, KOMOSZYŃSKI M. Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pepowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Post Hig Med Dosw* 2008; **62**: 660–667.
- [46] SANAI N, TRAMONTIN AD, QUINONES-HINOJOSAA, BARBARO NM, GUPTA N, KUNWAR S, LAWTON MT, MCDERMOTT MW, PARSAAT, GARCIA-VERDUGO JM, BERGER MS, ALVAREZ-BUYLLAA. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004; **427**: 740–744.
- [47] SAWAMOTO K, WICHTERLE H, GONZALEZ-PEREZ O, CHOLFIN JA, YAMADAM, SPASSKY N, MURCIANS, GARCIA-VERDUGO JM, MARIN O, RUBENSTEIN JL, TESSIER-LAVIGNE M, OKANO H, ALVAREZ-BUYLLAA. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science* 2006; **311**: 629–632.
- [48] SCHWARTZ PH, BRYANT PJ, FUJATI J, SU H, O'DOWD DK, KLASSEN H. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res* 2003; **74**: 838–851.
- [49] SHIRAYAMA Y, CHEN A, NAKAGAWA S, RUSSELL D, DUMAN R. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioural models of depression. *J Neurosci* 2002; **22**: 3251–3261.
- [50] SOTTHIBUNDHU A, PHANSUWAN-PUJITO P, GOVITRAPONG P. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res* 2010; **49**: 291–300.
- [51] SPASSKY N, MERKLE FT, FLAMES N, TRAMONTIN AD, GARCIA-VERDUGO JM, ALVAREZ-BUYLLAA. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci* 2005; **25**: 10–18.
- [52] TÁRNOK A, ULRICH H, BOCSI J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A* 2010; **77**: 6–10.
- [53] VALENZUELA M, SIDHU K, DEAN S, SACHDEV P. Neural stem cell therapy for neuropsychiatric disorders. *Acta Neuropsychiatrica* 2007; **19**: 11–26.
- [54] YIP S, SABETRASEKH R, SIDMAN RL, SNYDER EY. Neural stem cells as novel cancer therapeutic vehicles. *Eur J Cancer* 2006; **42**: 1298–1308.

*Redaktor prowadzący – Bożena Kamińska-Kaczmarek*

*Otrzymano: 28.02. 2011 r.*

*Przyjęto: 21.03.2011 r.*

*Katarzyna Roszek,*

*Zakład Biochemii, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej,*

*Uniwersytet Mikołaja Kopernika,*

*ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń,*

*e-mail: kroszek@umk.pl*