

Neurogeneza w dorosłym mózgu

JADWIGA JAWORSKA-ADAMU, REGINA CYBULSKA

Zakład Histologii i Embriologii Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 20-950 Lublin

Jaworska-Adamu J., Cybulska R.
Neurogenesis in the adult brain

Summary

The process of the development of new neurons in the brain of mammals takes place during the entire postnatal life, especially in the dentate gyrus of the hippocampus, olfactory bulb and in the anterior lateral ventricle of the brain. Neuronal stem cells are involved in neurogenesis. It is thought that as „silente”, they are also located in the striatum, cerebral cortex, septum, cerebellum and the spinal cord. In the hippocampus, responsible for memory and learning, stem cells are located in the basal granular layer of the dentate gyrus of the hippocampus, while ependymocytes and probably astrocytes are sources of new neurons in the brain wall lateral ventricle. It is believed that astrocytes may induce the development of new neuronal cells by the production and release of factors called neurophins or neuroregulins. The isolation of stem cells may encourage studies on the direct regulation of their differentiation *in vitro* as well as *in vivo*. Finding these cells in the human brain might lead in the future to the subsequent elimination of disorders related to the damage and loss of neurons seen in neurodegenerating diseases and in cases related to brain stroke and injuries.

Keywords: neurogenesis, adult brain

Do niedawna uważano, że mózg dorosłego osobnika nie może dokonywać samonaprawy, ponieważ brak w nim macierzystych komórek (pnia), z których mogą powstawać nowe neurony. Sądzono, że w dorosłym ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) występują jedynie dojrzałe komórki nerwowe – neurocyty nie wyrażające zdolności podziałowych. Neurogeneza jest procesem wielostopniowym obejmującym: podział komórek pnia, przeżywanie niektórych komórek potomnych, migracje do miejsca przeznaczenia oraz różnicowanie w odpowiednie czynnościowe neurony. Obecnie wiadomo, że w mózgu dorosłych ssaków neurogeneza zachodzi przez całe życie w zakręcie zębatym hipokampa, opuszce węchowej oraz w warstwie ependymalnej i podkomorowej przedniej części ściany komory bocznej. Nadto neuronalne komórki pnia występują w prążkowie, korze mózgu, rdzeniu kręgowym oraz przegrodzie mózgu (8).

Pierwsze doniesienia na temat nowych komórek nerwowych u dorosłych ssaków pojawiły się w latach 60. ubiegłego stulecia, kiedy to Altman i Das (1, 2) przedstawili histologicznie i autoradiograficznie neurogenezę postnatalną w hipokampie szczura. Jednakże większość badaczy nie dała wiary tym odkryciom, a komórki pnia nie zostały jeszcze poznane. Stosowane ówczynie metody nie pozwoliły ustalić ponad wszelką wątpliwość, że powstające komórki są na pewno neuronami. Dalsze publikacje w latach 80. ubiegłego stulecia ujawniły okresowo pojawiające się w pew-

nych porach roku nowe neurony u dorosłych wędrujących i śpiewających ptaków. Wykazano je w obszarach odpowiedzialnych za pamięć i uczenie się (3, 4). Odkrycia te wywołały ponowne zainteresowanie neurogenezą dorosłych ssaków. Pionierskie badania u naczelnych (makaków) nie wykazały powstawania nowych neuronów, stąd też sądzono, że i u człowieka nie może ona zachodzić. Jednakże u niższych zwierząt (u jaszczurek) nawet przy rozległym uszkodzeniu mózgu mogą powstawać nowe komórki (9). Następnie w 1982 r. potwierdzono wyniki badań Altmana i Dasa z lat 60. ubiegłego stulecia, wykazując nowe neurony u podstawy warstwy ziarnistej zakrętu zębatego hipokampa dorosłego szczura. Bayer (5) wykazał w tym obszarze ok. 43% wzrost liczby neuronów pomiędzy 30. a 365. dniem postnatalnym. Neuronalne komórki pnia pojawiają się u podstawy warstwy ziarnistej zakrętu zębatego, następnie proliferują i wnikają do tej warstwy, a niektóre wykazują wypustki. Część z nich ulega naturalnie zaprogramowanej śmierci – apoptozie.

Większość metod stosowanych u zwierząt w celu poznania neurogenezy nie może być bezpośrednio przeniesiona na ludzi, ponieważ podawane substancje wbudowują się w DNA komórek potomnych. Obecnie używane znaczniki, np. 3 H-tymidyna czy też bromodeoksyurydyna (BrdU), wbudowują się w fazie S cyklu komórkowego, podczas duplikacji DNA do jąder i przekazywane są następnym pokoleniom komórek. Po pewnym czasie komórki różnicują się w odpo-

wiednie typy neuronów oraz astrocyty, które można obserwować na poziomie mikroskopu świetlnego jako nowo powstałe po podaniu znacznika. Bromodeoksyurydyna jest obecnie stosowana u ludzi nieuleczalnie chorych na nowotwory podczas chemioterapii, w celu monitorowania szybkości rozrostu guzów. W latach 1996-1998 Eriksson i Gage (7) dokonali pierwszych eksperymentów na ludziach. Uzyskali zgodę od pacjentów, którym uprzednio podano BrdU, na badania *post mortem* ich mózgow w kierunku neurogenezy. Przebadano mózgi w przedziale wiekowym 57-72 lata życia. Wyniki nie były zaskakujące, jak się spodziewano, stwierdzono bowiem w warstwie ziarnistej zakrętu zębatego hipokampa obecność nowych neuronów z wbudowaną do jądra komórkowego BrdU. Prawie równocześnie ujawniono neurogenezę u makaków.

W dalszym ciągu prowadzone badania procesu powstawania nowych neuronów w dorosłym mózgu ssaków przez Cassidy i Frisén (6) na modelu mózgu dorosłej myszy ujawniły lokalizację neuronalnych komórek pnia w ścianie przedniej części komory bocznej. Ściana ta wysłana jest komórkami gleju ependymalnego zaopatrzonymi w migawki. Tworzą one selektywną barierę płyn mózgowo-rdzeniowy-mózg. Uważa się, że jednym ze źródeł neuronalnych komórek pnia mogą być ependymocyty, z których w dojrzałym mózgu ssaków powstają liczne komórki lokalizujące się w warstwie podkomorowej zawartej między ependymą a prążkowiec. Warstwę tę określono mianem „szpiku mózgowego”, ponieważ jej elementy są podobne do komórek hematopoetycznych szpiku kostnego. W związku z tym podobieństwem proponuje się nazwę „neurogeneza” zastąpić mianem neuropoezy. Warstwa podkomorowa jest heterogenna pod względem komórek, dostarczając form przejściowych dla neuronów i gleju. Lokalizują się tutaj komórki pnia dzielące się na liczne komórki progenitorowe multipotencjalne (inaczej zwane ukierunkowanymi wieloczynnościowymi) przekształcające się w neuroblasty, oraz glioblasty multipotencjalne, z których powstają komórki glejowe astrocyty. Ze względu na różnorodność dzielących się tutaj komórek warstwę podkomorową określono „macierzą namnażania”.

Nadto nie wyklucza się pochodzenia nowych neuronów w dorosłym mózgu bezpośrednio z astrocytów, które mogą być formą przejściową pomiędzy ependymocytami a komórkami progenitorowymi (14). Powstające w warstwie podkomorowej neuroblasty wędrują pasmem migracyjnym do miejsca przeznaczenia, jakim jest opuszka węchowa, gdzie przekształcają się w dojrzałe interneurony (16).

Neuronalne komórki pnia aż w ok. 80% czystości wyizolowali po raz pierwszy Rietze i wsp. (13). Wykazano, że ok. 1/3 liczby komórek pnia zlokalizowana jest w ependymie, natomiast pozostałe 2/3 – w warstwie podkomorowej. Przedstawiono je jako komórki owalne o średnicy ok. 12 μm . Powstają jednak pewne wątpliwości odnośnie do pochodzenia komórek pnia,

ponieważ nie wyrażają one podobnych cech morfologicznych, jakie posiadają ependymocyty bądź astrocyty. Wyizolowane z dorosłego mózgu gryzoni nie są zaopatrzone w migawki, jak ependymocyty, ani też nie wyrażają ekspresji markera filamentów astrocytów w postaci glejowego włókienkowego kwaśnego białka (GFAP – glial fibrillary acidic protein). Sugeruje się, że powyższe różnice pomiędzy komórkami pnia a ich źródłem pochodzenia wynikają z niedoskonałości stosowanych obecnie metod izolacji. W ścianie komory bocznej mózgu na 300 komórek tutaj występujących tylko jedna jest neuronalną komórką pnia. Ze względu na bardzo małą ich liczbę wzrastają dodatkowo problemy w ich otrzymaniu, a największym jest brak poznanych specyficznych markerów i brak antygen(ów) stałocielnego na ich powierzchni oraz brak wiązania do aglutyniny uzyskanej z orzeszków ziemnych markera powierzchni komórek hematopoetycznych.

Izolacja komórek pnia z dorosłego mózgu stwarza obecnie możliwość eksperymentów prowadzonych głównie w hodowli komórkowej *in vitro*. Przeniesione do odpowiednich warunków hodowlanych tworzą one neurosferę zawierającą komórki progenitorowe (ukierunkowane). W zależności od warunków, w jakich wzrastają neurosfery, mogą z nich powstawać nowe neurony i komórki glejowe astrocyty bądź oligodendrocyty. Świeżo izolowane komórki pnia hodowane wspólnie z linią mioblastów przekształcają się w komórki o typowej wrzecionowatej morfologii, jaką posiadają mioocyty. Zawierają one ciężkie łańcuchy miozyny oraz wyrażają immunoreaktywność na α -aktyninę. Nowe komórki zawierają nadto w jądrach komórkowych astrocytarnie glejowe białko filamentów (GFP – glial fibrillary protein). W ten sposób wykazano plastyczność komórek pnia w zależności od warunków środowiskowych. Na podstawie przedstawionych badań sugeruje się, że sąsiednie komórki w mózgu produkują i uwalniają substancje (czynniki) warunkujące przekształcanie komórek pnia w podobne do nich komórki, w tym przypadku nieneuronalne. Komórki pnia nie są całkowicie plastyczne, ponieważ wstrzyknięte młodym szczurom *in utero* przekształcają się w neurony i astrocyty (13).

Na podstawie prowadzonych obecnie badań komórek pnia w hodowli uważa się, że astrocyty indukują neurogenezę u szczura w dwóch obszarach dorosłego OUN, tj. hipokampie i warstwie podkomorowej ściany komory bocznej. Produkując i uwalniając czynniki wpływające na proliferację komórek progenitorowych neuronalnych, astrocyty dostarczają komórkom pnia pewnych instrukcji w celu ich konkretnego przeznaczenia. Sugeruje się, że neuronalne komórki pnia mogą być rozległe rozmieszczone w dorosłym OUN ssaków i lokalne środowisko dostarcza wskazówek wyboru ich przeznaczenia. W hodowli komórkowej astrocyty, a nie neurony czy też inne rodzaje gleju, aktywnie regulują dorosłą neurogenezę. Nadto astrocyty są regionalnie specyficzne. W dorosłym hipokampie indukują neu-

rogenezę, lecz w rdzeniu kręgowym nie wywierają podobnego wpływu, ponieważ brak jest właściwych sygnałów z astrocytów dla tego procesu (15, 17). Istnieją pewne sugestie, że być może komórki pnia hematopoetyczne szpiku kostnego w odpowiednich warunkach mogą przekształcić się w neurony *in vivo* (13).

Podczas rozwoju mózgu neuroektodermalne komórki pnia są pobudzane w czasie indukcji embriologicznej do podziałów, różnicowania i migracji przez komórki sąsiednie mogące produkować i uwalniać czynniki stymulujące lub hamujące neurogenezę prenatalną. Proces ten włącza zaprogramowanie genetyczne, jednakże geny stymulujące ten proces nie są obecnie poznane. Najprawdopodobniej pourodzeniowy brak w mikrośrodkowisku czynników stymulujących hamuje neurogenezę, pomimo obecności w wielu obszarach OUN „uśpionych” komórek pnia. Umieszczone w hodowli z czynnikami neurotroficznymi zwanymi neuroregulinami produkowanymi przez astrocyty np. z zasadowym czynnikiem wzrostu fibroblastów (bFGF – basic fibroblast growth factor) przekształcają się w neurony, natomiast w obecności rzęskowego czynnika wzrostu (CNTF – ciliary neurotrophic factor) lub naskórkowego czynnika wzrostu (EGF – epidermal growth factor) dochodzi do przekształcania komórek pnia w astrocyty.

Do czynników stymulujących powstawanie nowych neuronów w hipokampie dorosłego szczura zaliczono: wzbogacone środowisko życia zwierząt, ćwiczenie pamięci, neurotrofiny oraz czynniki genetyczne. Zapewnienie korzystniejszych warunków, np. umieszczenie zwierząt w większych klatkach, umieszczenie w nich zabawek i bieżni kołowych, zwiększa liczbę nowych neuronów zakrętu zębatego hipokampa o ok. 60%. Uczenie się stwarza dogodne warunki do przeżywania istniejących neuronów, jak również powstawania nowych, w obszarach OUN włączonych w pamięć i uczenie się. Neurotrofiny produkowane przez glej są mitogenami dla komórek pnia. Mimo że geny sterujące tym procesem nie są poznane, uważa się, iż po ich odkryciu będzie można pobudzać je oraz ustalić, które z nich są odpowiedzialne za produkcję białek stymulujących neurogenezę. Do czynników hamujących proces powstawania neuronów zaliczono stres redukujący proliferację komórek progenitorowych oraz wysoki poziom hormonów z grupy glikokortykosteroidów (10, 11, 12).

Podłoże molekularne przemian podczas neurogenety nie jest jeszcze poznane. W dalszym ciągu trwa ulepszanie metod izolacji komórek pnia, poszukiwanie markerów w celu poznania ich cech. Obecność „uśpionych” komórek pnia w wielu obszarach OUN, zwłaszcza u dorosłych ludzi stwarza wielkie nadzieje na przyszłość w terapii chorób neurodegeneracyjnych, jak choroby Alzheimera, Parkinsona, nadto przy udarze i urazach mózgu. W procesach tych dochodzi do utraty neuronów, które – być może – będzie można zastąpić nowymi, co pozwoli łagodzić procesy związane z utratą neuronów.

Obecnie eksperymenty ograniczają się do zwierząt i hodowli tkankowej *in vitro*. W pewnym momencie trzeba będzie przenieść doświadczenia bezpośrednio na ludzi, co stwarza wiele obaw i wątpliwości, ale również nadzieje.

Piśmiennictwo

1. Altman J., Das G. D.: Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.* 1965, 124, 319-336.
2. Altman J., Das G. D.: Autoradiographic and histological studies of the kinetics, migration and transformation of cells incorporating tritiated thymidine in neonate rats, with special reference to postnatal neurogenesis in some brain regions. *J. Comp. Neurol.* 1966, 126, 337-390.
3. Alvarez-Buylla A., Nottebohm F.: Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature* 1988, 335, 353-354.
4. Alvarez-Buylla A., Theelen M., Nottebohm F.: Birth of projection neurons in the higher vocal center of the canary forebrain before, during, and after song learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988, 85, 8722-8726.
5. Bayer S.A.: Changes in the total number of dentate granule cells in juvenile and adult rats: a correlated volumetric and 3H-thymidine autoradiographic study. *Exp. Brain Res.* 1982, 46, 315-323.
6. Cassidy R., Frisén J.: Stem cells on the brain. *Nature* 2001, 412, 690-691.
7. Eriksson P. S., Gage F. H.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine* 1998, 4, 1313-1317.
8. Gage F. H., Ray J., Fisher L. J.: Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu. Rev. Neurosci.* 1995, 18, 159-192.
9. Garcia-Verdugo J. M., Llaha S., Ferrer I., Lopez-Garcia C.: Postnatal neurogenesis in the olfactory bulb of a lizard. A tritiated thymidine autoradiographic study. *Neurosci. Lett.* 1989, 98, 247-252.
10. Gould E., Beylin A., Tanapat P., Reeves A., Shors T. J.: Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat. Neurosci.* 1999, 2, 260-265.
11. Gould E., Cameron H. A., Daniels D. C., Wooley C. S., McEwen B. S.: Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J. Neurosci.* 1992, 12, 3642-3650.
12. Gould E., McEwen B. S., Tanapat P., Galea L. A. M., Fuchs E.: Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J. Neurosci.* 1997, 17, 2492-2498.
13. Rietze R. L., Vulcanis H., Brooker G. F., Thomas T., Voss A. K., Bartlett P. F.: Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature* 2001, 412, 736-739.
14. Seri B., Garcia-Verdugo J. M., McEwen B. S., Alvarez-Buylla A.: Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J. Neurosci.* 2001, 21, 7153-7160.
15. Song H., Stevens Ch. F., Gage F. H.: Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* 2002, 417, 39-44.
16. Steindler D., Kadrie T., Fillmore H., Thomas L.: The subependymal zone: „Brain marrow”. *Progr. Brain Res.* 1996, 108, 349-363.
17. Stensden C. N.: The amazing astrocytes. *Nature* 2002, 417, 29-32.

Adres autora: dr hab. Jadwiga Jaworska-Adamu, ul. Krakowskie Przedmieście 28/14, 20-002 Lublin

RIISING H. J., VAN EMPEL P., WITVLIET M.: Ochrona prosiąt przed zakaźnym zanikowym zapaleniem nosa przez szczepienie macior szczepionką przeciwko *Pasteurella multocida* i *Bordatella bronchiseptica*. (Protection of piglets against atrophic rhinitis by vaccinating the sow with a vaccine against *Pasteurella multocida* and *Bordatella bronchiseptica*). *Vet. Rec.* 150, 569-571, 2002 (18)

Przebadano działanie ochronne szczepionki Porcilis AR-T i DF Intervet w Holandii i Danii. Szczepionka zawiera kombinację białka dO, komórki *Bordatella bronchiseptica* i adjuwant. Białko dO pochodzące z *Pasteurella multocida* cechuje się dużą immunogennością i brakiem działania toksycznego. Maciory szczepiono domięśniowo (2 ml) dwukrotnie w okresie 6-8 i 2-4 tyg. przed terminem porodu. Kontrole stanowiły maciory nie poddane szczepieniu. Prosięta pochodzące od macior zakażano w wieku 3-6 dni do każdego otworu nosowego hodowlą *B. bronchiseptica* typ Da, po 4 dniach *P. multocida*. Prosięta pochodzące od macior szczepionych miały lepsze przyrosty masy ciała i rzadziej występowały u nich zmiany patologiczne w jamie nosowej. Bakterie użyte do zakażenia izolowano częściej z jamy nosowej prosiąt pochodzących z miotów od nieszczepionych macior. W surowicy szczepionych macior i pochodzących od nich prosiąt występowały w wysokim mianie przeciwciała dla *B. bronchiseptica* i toksyny *P. multocida*.