

## Metoda podawania predegenerowanych komórek Schwanna do płynu mózgowo-rdzeniowego w urazach rdzenia kręgowego u szczurów

Method of administration of the pre-degenerated Schwann cells to the cerebrospinal fluid in rats' spinal cord injury

Joanna Smętek, Ryszard Sordyl

### STRESZCZENIE

#### WSTĘP

Uszkodzenie rdzenia kręgowego jest jedną z głównych przyczyn niepełnosprawności, która dotyka młode, zdrowe osoby. Mimo postępu różnych metod leczenia, nadal w niewielu przypadkach udaje się przywrócić pełną sprawność chorym. W związku z tym, ciągle poszukuje się nowych metod wspomagających regenerację uszkodzonych włókien nerwowych. Istotną rolę wspomagającą tę odnowę przypisuje się komórkom Schwanna. Celem naszego badania było opracowanie metody hodowli aktywowanych komórek Schwanna oraz ich wszczepiania do uszkodzonego rdzenia kręgowego szczurów.

#### MATERIAŁ I METODY

Komórki Schwanna pozyskane z predegenerowanych *in vivo* nerwów kulzowych szczurów były namnażane w podłożu o specjalnie opracowanym, autorskim składzie. Następnie uszkodzono punktowo rdzeń kręgowy (Th12) i po 24 godzinach podawano do zbiornika wielkiego (podpotylicznego) ok.  $3 \times 10^5$  komórek transfekowanych białkiem GFP. Iniekcje komórek powtórzono po 7 i 14 dniach. Po 12 tygodniach od uszkodzenia, pobierano rdzenie i poddawano je obróbce histologicznej. Przy użyciu mikroskopu konfokalnego oceniano przeżywalność oraz ekspansję wszczepionych komórek.

#### WYNIKI

Udowodniono po raz pierwszy, iż komórki Schwanna można podawać w sposób bezpieczny do zbiornika wielkiego. Komórki Schwanna z predegenerowanych nerwów obwodowych przeżywają w uszkodzonym rdzeniu kręgowym oraz migrują do miejsca uszkodzenia.

Koło STN przy Katedrze i Zakładzie Fizjologii  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
Opiekun Koła i pracy:  
dr hab. n. med. Halina Jędrzejowska-Szypułka

#### ADRES

##### DO KORESPONDENCJI:

Ryszard Sordyl  
Koło STN przy Katedrze i Zakładzie Fizjologii  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Medyków 18  
40-752 Katowice  
tel. 32 252 50 87  
e-mail: ryszard.sordyl@wp.pl

Ann. Acad. Med. Siles. 2012, 66, 1, 35–42  
Copyright © Śląski Uniwersytet Medyczny  
w Katowicach  
ISSN 0208-5607

**WNIOSKI**

Komórki Schwanna pozyskiwane z predegenerowanych *in vivo* szczurzych nerwów kulszowych mogą być bezpiecznie podawane do zbiornika wielkiego drogą nakłucia podpotylicznego. Wszczepione komórki mają zdolność nie tylko do przeżywania w PMR, ale mogą swobodnie migrować, szczególnie w miejsce uszkodzenia rdzenia kręgowego.

**SŁOWA KLUCZOWE**

komórki Schwanna, uszkodzenie rdzenia kręgowego, transplantacja komórek, płyn mózgowo-rdzeniowy

**ABSTRACT****INTRODUCTION**

The spinal cord injury (SCI) is one of the major causes of disability, which generally strikes down young and healthy people. Despite the progress in the treatment of SCI, a complete recovery is still found in very few cases. Therefore, new methods of stimulation of regeneration of injured nerve fibers are under intensive investigation. Schwann cells are considered to be one of crucial stimulators of regeneration. The aim of our study was to elaborate the method of activated Schwann cells culturing as well as their grafting into the injured rat spinal cord.

**MATERIAL AND METHODS**

Schwann cells obtained from *in vivo* pre-degenerated rat sciatic nerves were cultured in originally prepared medium. Then, rat's spinal cord was focally injured and after 24 hours about  $3 \times 10^5$  GFP-transfected cells were grafted into the cisterna magna. The injections were repeated 7 and 14 days later. Twelve weeks after the injury, spinal cords were collected and subjected to histological procedures. The survival rate and expansion of grafted cells were evaluated by means of the confocal microscope.

**RESULTS**

It was proved for the first time, that Schwann cells could be administered safely into the cisterna magna. The cells obtained from pre-degenerated peripheral nerves survive in injured spinal cord and have ability to migration into the site of injury and integration with the injured spinal cord.

**CONCLUSIONS**

Schwann cells obtained from *in vivo* predegenerated rats' sciatic nerves could be safely administered into the cerebromedullary cistern. Grafted cells are able to survive as well as to migrate freely in the CSF, especially towards the injury area.

**KEY WORDS**

Schwann cells, spinal cord injury, cell transplantation, cerebrospinal fluid

**WSTĘP**

W ostatnich latach naukowcy prześcigają się w próbach opracowania nowych metod leczenia urazów rdzenia kręgowego, które po-

konająby ograniczenia regeneracji tkankowej w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i pozwoliły na przywrócenie sprawności pacjentom. Obiecujące wydają się liczne doniesienia o wszczepianiu do OUN komórek o dużym

potencjale stymulującym regenerację tkanki nerwowej, jak np. komórki Schwanna (SK).

Należą one do komórek glejowych obwodowego układu nerwowego i są zaangażowane w pełnienie licznych funkcji modulujących jego działanie, takich jak przewodzenie impulsów wzdłuż aksonu, rozwój i regeneracja włókien nerwowych, udział w odżywianiu neuronów, produkcja macierzy pozakomórkowej nerwów oraz prezentacja antygenów limfocytom T [18]. Stanowią one jedną z najczęściej badanych grup komórek, ze względu na potencjał stymulowania regeneracji włókien nerwowych. Niektóre doniesienia wskazują również na ich skuteczność w promowaniu odnowy w OUN, gdzie, jak wykazano, minimalizują spongiozę i tworzenie jam oraz znacząco zmniejszają powstającą gliozę w miejscu urazu [1].

Do tej pory opracowano kilka metod podawania SK do miejsca uszkodzenia. Opierają się one na bezpośrednim podawaniu komórek na poziomie urazu w rdzeniu kręgowym [2] oraz w mózgu [3,4]. Niektórzy autorzy stosują technikę wszczepiania specjalnych rurek polimerowych (*guidance channels*) zawierających SK w miejsce uszkodzenia rdzenia [7,8]. Ponieważ wspomniane powyżej sposoby aplikacji mają wiele wad i ograniczeń, dąży się do opracowania lepszej metody wszczepiania SK. Obiecujące wydają się techniki podawania komórek za pośrednictwem płynu mózgowo-rdzeniowego (PMR). Różne modyfikacje zakładają inne miejsca wykonania nakłucia: czwartą komorę mózgu [9,10,11,12], przestrzeń podpajęczynówkową na poziomie uszkodzenia rdzenia [13] czy też nakłucie podpotyliczne [9]. Ostatnia z wymienionych procedur podania komórek do zbiornika wielkiego (*cisterna magna*) jest, naszym zdaniem, najlepszą drogą aplikacji SK.

Nakłucie zbiornika wielkiego było już w przeszłości z powodzeniem wykorzystane do podawania leków lub czynników wzrostowych [14,15] oraz neurosfer wykorzystywanych w próbach leczenia urazów rdzenia kręgowego u szczurów [9,12]. Niemniej jednak, jako pierwsi podjęliśmy próbę wykorzystania nakłucia podpotylicznego u dorosłych szczurów w terapii ogniskowo uszkodzonego rdzenia kręgowego.

Celem naszego badania było opracowanie metody podawania aktywowanych SK do *cisterna magna* w urazach rdzenia kręgowego u szczurów.

## MATERIAŁ I METODY

W badaniu wykorzystano 15 samców szczurów Wistar o średniej masie ciała 270 g. Zwierzęta hodowano w osobnych klatkach w standardowych warunkach mikroklimatycznych (20°C, wilgotność 59–69%) oraz oświetleniowych (dzień–noc 12 h : 12 h). Szczury miały nieograniczony dostęp do wody oraz standardowej paszy. Zabiegi operacyjne przeprowadzono w warunkach sterylnych między godziną 7 a 12 rano. Szczury były traktowane zgodnie z dyrektywami Lokalnej Komisji Bioetycznej, która wydała zgodę na przeprowadzenie badania.

### USZKODZENIE RDZENIA

Rdzenie kręgowe uszkodzono miejscowo na poziomie Th10 tzw. impaktorem ciśnieniowym opracowanym przez zespół Katedry i Zakładu Fizjologii SUM. Urządzenie to umożliwia wywołanie kontrolowanego urazu rdzenia kręgowego metodą bezdotykową w modelu bezlaminektomijnym za pomocą strumienia sprężonego powietrza o odpowiednio dobranych parametrach ciśnienia i czasu ekspozycji na czynnik uszkodzający. Ze wstępnych eksperymentów wynika, że procedura taka jest wiarygodna i powtarzalna, a powstające uszkodzenie jest bardzo zbliżone do klasycznego komunikacyjnego urazu rdzenia kręgowego u ludzi.

Zwierzęta znieczulano dootrzewnowym podaniem Avertine (brak wpływu na przewodnictwo nerwowe i przekąźnictwo nerwo-mięśniowe). Następnie układano je na odpowiednio wyprofilowanej podgrzewanej platformie, wpinano w układ stabilizujący oraz nacinano skórę nad wyrostkami kolczystymi kręgów Th-9 do Th-11. Po odsłonięciu powierzchni grzbietowo-bocznej tych kręgów, używając wiertarki szybkoobrotowej, wykonywano pod kontrolą mikroskopu operacyjnego niewielki okrągły otwór trepanacyjny po stronie prawej łuku kręgu Th-10 (średnica zewnętrzna otworu 1 mm). Zwierzęta, u których w trakcie wymienionych procedur doszło do naruszenia ciągłości opony twardej, eliminowano z dalszego postępowania zabiegowego i z eksperymentu. W kolejnym etapie operacji w obręb pola operacyjnego wprowadzano dyszę „impaktora” i pod kontrolą mikroskopu operacyjnego oddawano „strzał”. Potwierdzeniem właściwego wykonania procedury był

ruch kończyn tylnych po stronie uszkodzenia w czasie zadziałania bodźca. Miejsce przyłożenia dyszy do worka oponowego zaznaczano umieszczając w miejscu urazu, na worku, niewielką kulkę szklaną, umożliwiającą dodatkowo jej wizualizację w badaniu metodą rezonansu magnetycznego. Mięśnie szytu warstwowo, skórę szwami pojedynczymi.

#### POSTĘPOWANIE POOPERACYJNE

Ranę operacyjną zabezpieczano sterylnym opatrunkiem. Miejscowo stosowano maść z neomycyną. Zwierzęta natychmiast po zabiegu otrzymywały podskórnie 5 ml PBS lub 0,9% NaCl, w celu przeciwdziałania ich odwodnieniu. Z uwagi na wegetatywne porażenie czynności pęcherza moczowego związane z urazem rdzenia kręgowego, przynajmniej 2 x dziennie, manualnie, opróżniano pęcherz moczowy, aż do spontanicznego powrotu jego funkcji (najczęściej po 3 dniach od wykonania zabiegu). Przez 3 dni zwierzęta otrzymywały także paracetamol w wodzie do picia.

#### HODOWLA I PODAWANIE KOMÓREK SCHWANNA

Komórki Schwanna pozyskiwano z predegenerowanych *in vivo* nerwów kulszowych dorosłych szczurów i hodowano w podłożu o autorskim składzie. W celu przyszłej identyfikacji wszczepionych komórek transfekowano je genem dla GFP (*green fluorescent protein*).

W celu aplikacji SK po 24 godzinach od uszkodzenia rdzenia wykonywano nakłucie podpotyliczne, zgodnie z metodą Solomona i wsp. [16], w modyfikacji własnej [17].

Głowę szczura stabilizowano w ramię aparatu stereotaktycznego pod kątem ok. 90° do tułowia, który opadał swobodnie na stół zabiegowy. Po pośrodkowym nacięciu skóry i mięśni nad okolicą ciemieniowo-potyliczną i karkiem zwierzęcia uwidaczniano kości ciemieniową i potyliczną, łuk atlasu i błonę szczytowo-potyliczną.

Otwór trepanacyjny, o średnicy 0,8 mm wiercono pod kontrolą mikroskopu operacyjnego w linii pośrodkowej na wysokości szwu ciemieniowo-potylicznego. Wprowadzano przez niego kaniulę (z cewnika Venocath-18, Abbot) do zbiornika wielkiego i przymocowywano do kości ciemieniowej klejem cyjanoakrylowym, co stanowiło również zabezpieczenie przed wyciekami PMR (ryc. 1). Właściwe położenie kaniuli kontrolowano obserwując położenie jej końca w zbiorniku wielkim poprzez błonę szczytowo-potyliczną



**Ryc. 1.** Pozycjonowanie kaniuli poprzez otwór trepanacyjny w zbiorniku wielkim.

**Fig. 1.** The cannula was placed via trepanation hole drilled sagittally over the parieto-occipital suture.

oraz stwierdzając swobodny wypływ PMR przez cewnik.

Komórki podawano wstrzykując ich zawiesinę w płynie hodowlanym (około  $3 \times 10^5$  komórek zawieszonych w 10  $\mu$ l buforowanej soli fizjologicznej – PBS – na aplikację) przez wcześniej założoną kaniulę (ryc. 2). Procedura podawania była zautomatyzowana – z użyciem mikrostrzykawki w powolnej iniekcji w czasie około 5 min. Po zakończeniu iniekcji otwór trepanopunkcyjny zamykano szczelnie klejem cyjanoakrylowym, a skórę zaopatrywano szwem chirurgicznym. Opisaną procedurę aplikacji powtarzano po 7 i 14 dniach.

Po 12 tygodniach po uszkodzeniu, rdzenie kręgowo były pobierane i poddawane obróbce histologicznej. Za pomocą mikroskopu konfokalnego określano współczynnik przeżywalności aplikowanych SK oraz ich lokalizację.



**Ryc. 2.** Podanie zawiesiny aktywowanych komórek Schwanna (ok. 300 000 komórek na iniekcję).

**Fig. 2.** Schwann cells application (suspension containing about 300 000 of cells for graft).

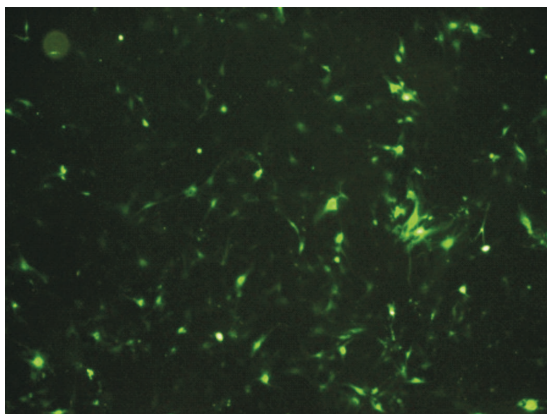
**BADANIA HISTOLOGICZNE  
I IMMUNOHISTOCHEMICZNE**

Po upływie 12 tygodni od uszkodzenia rdzenia zwierzęta były głęboko znieczulane pentobarbitem sodu, a następnie perfundowane przezsercowo 700 ml schłodzonego do temperatury 4°C roztworu płuczającego – PBS (pH 7,4), a następnie 300 ml roztworu utrwalającego (4% paraformaldehyd w schłodzonym do 4°C PBS).

Bezpośrednio po perfuzji około 2 cm fragment rdzenia kręgowego z epicentrum uszkodzenia w środku był pobierany i umieszczany na 24 h w 15% roztworze sacharozy w celu odwodnienia w temperaturze 4°C. W kolejnym etapie rdzenie kręgowo były zatapiane w specjalnym medium TissuTec (Sakura, Japonia) i krojone na mikrotomie mrożakowym (Leica, Niemcy) na 5 lub 10 µm grubości strzałkowe lub poprzeczne przekroje, które montowano na szkiełkach SuperFrost Plus (MenzelGlaeser, Niemcy) oraz suszono. Skrawki barwione były błękitem toluidyny (1% roztwór wodny) lub H-E. Wykonywano ponadto barwienie wybranych skrawków za pomocą Luxol Fast Blue (Bio-Optica, Mediolan, Włochy) w celu oceny stopnia demielinizacji istoty białej uszkodzonego rdzenia kręgowego.

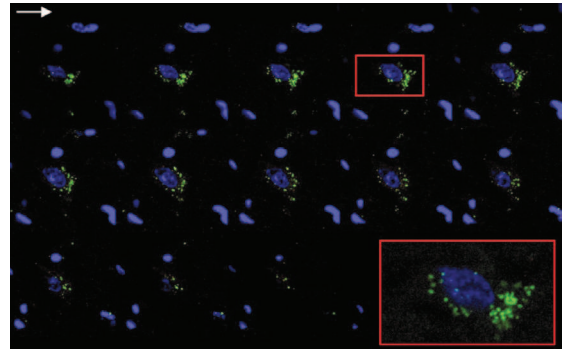
Część preparatów poddawano obróbce immunohistochemicznej, znakując je przeciwciałami anty-GFAP oraz anty-S-100 (firmy Chemicon) w celu uwidocznienia SK.

Skrawki były inkubowane przez noc w 4°C w mieszaninie przeciwciał I-rzędowych. Następnie uwidacziano je za pomocą odpowiednio dobranych przeciwciał II-rzędowych



**Ryc. 3.** Zdjęcie spod mikroskopu fluorescencyjnego przedstawiające komórki Schwanna z ekspresją GFP w hodowli. Powiększenie 100 x.

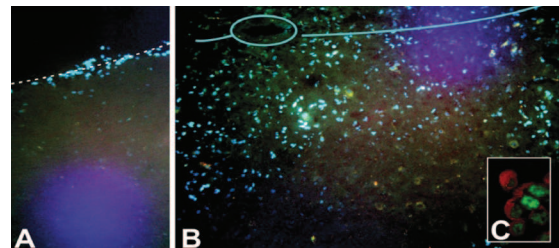
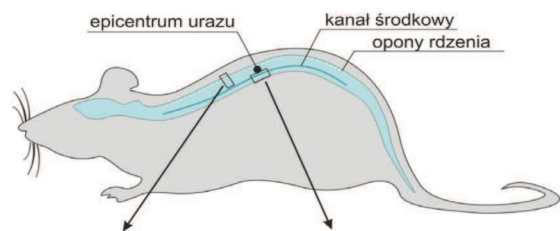
**Fig. 3.** Image from the fluorescence microscope. GFP positive Schwann cells localized in the cell culture. Magnification 100 x.



**Ryc. 4.** Obraz 3D uzyskany w mikroskopie konfokalnym. Pojedyncza GFP-pozytywna komórka Schwanna w otoczeniu innych komórek gospodarza na granicy istoty białej oraz szarej rdzenia kręgowego. Widoczne jądra komórkowe wyznakowane DAPI (kolor niebieski). Powiększenie 200 x.

**Fig. 4.** 3D image from the confocal microscope. GFP positive cell in the spinal cord. Cells' nuclei were stained with DAPI. Magnification 200 x.

sprzężonymi z fluorochromami: antykrólicze AlexaFluor 568 dającym świecenie czerwone



**Ryc. 5.** Lokalizacja przeszczepionych komórek w rdzeniu kręgowym: A – powyżej miejsca uszkodzenia SK widoczne są na powierzchni opony miękkiej, nie wnikają do wnętrza rdzenia; B – poziom uszkodzenia – SK widoczne w tkankach rdzenia (linią ciągłą zaznaczono przebieg linii środkowej rdzenia oraz położenie kanału środkowego); C – BrdU (Bromodeoksyurydino)-dodatnie komórki wskazują na obecność dzielących się komórek przeszczepu. Zdjęcia z mikroskopu fluorescencyjnego w powiększeniu: A i B – 100 x, C – 200 x.

**Fig. 5.** Localisation of injected Schwann cells in spinal cord: A – the level above the injury – cells attach the pia matter; B – the injury focus – cells diffused in the spinal tissue; C – the presence of BrdU-positive cells is the marker of active mitosis. Images were taken with a fluorescence microscope. Magnification: A and B – 100 x, C – 200 x.

i antymyście AlexaFluor 488 – świecenie zielone (oba Molecular Probes, USA). Preparaty zamykano w medium Vectashield (Vector, Wielka Brytania) z lub bez dodatku DAPI (4',6-diamino-2-fenylindol) umożliwiającego identyfikację komórek jądrzastych w preparacie.

GFP-dodatnie zaaplikowane komórki Schwanna uwidaczniano w preparatach standardowo znakowanych, poddanych analizie w mikroskopie fluorescencyjnym (ryc. 3).

Preparaty oglądano w mikroskopach fluorescencyjnym (badania przesiewowe) oraz konfokalnym (FluoView, Olympus, Japonia), a otrzymane obrazy, obejmujące miejsce uszkodzenia, zapisywano cyfrowo na płytach CD. Dokonywano rekonstrukcji trójwymiarowej (3D) wybranych obszarów preparatu w celu poznania dokładnej lokalizacji subkomórkowej interesujących nas antygenów (ryc. 4).

#### OZNACZANIE CZYSTOŚCI I ŻYWOTNOŚCI HODOWLI KOMÓRKOWEJ

Aż 98% komórek hodowlanych zidentyfikowano jako aktywowane SK dzięki obecności swoistych markerów (ekspresja antygenów S-100 oraz GFAP). Żywotność SK (*viability*) oznaczano według metodyki opisanej przez Labuzek i wsp. (2005). W teście z 0,1% błękitem trypanu tylko 3% komórek wykazywało cechy obumarcia, natomiast 97% nie barwiło się błękitem trypanu.

#### WYNIKI

Badania histologiczne potwierdziły przeżycie aktywowanych SK po wszczepieniu do uszkodzonego rdzenia kręgowego u szczurów w 12 tygodniu po podaniu. Liczebność wszczepu wyniosła  $328,3 \pm 81,3$  komórek/mm<sup>2</sup>. Transplantowane GFP-dodatnie komórki wykazywały swobodną migrację do miejsca uszkodzenia i gromadziły się w okolicy jamy porazowej, z maksymalnym zasięgiem występowania wynoszącym ok. 12,3 mm od granic ogniska urazu. Komórki Schwanna były zlokalizowane na powierzchni opony miękkiej w regionach nieuszkodzonych rdzenia oraz przemieszczały się w głąb tkanki na poziomie urazu (ryc. 5).

W żadnym przypadku zaaplikowane SK nie wytworzyły guzów oraz nie formowały zwarłych grup komórkowych.

#### DYSKUSJA

Jak wspomniano, do tej pory opracowano już kilka metod podawania SK do miejsca uszkodzenia w OUN.

Popularną technikę stanowi bezpośrednio podanie komórek do miejsca uszkodzenia w rdzeniu kręgowym [2] oraz w mózgu [3,4], jednak naszym zdaniem inwazyjność tej metody pociąga za sobą ryzyko pogłębienia już istniejącego urazu czy nawet zainicjowania na nowo procesów zapalnych w uszkodzonej tkance [5]. Ponadto bezpośrednio wstrzyknięcie umieszcza komórki w skrajnie niekorzystnym środowisku, obfitującym w cytokiny prozapalne, martwicę i krwotoki. Zmniejsza to zdolność SK do indukowania regeneracji uszkodzonych neuronów [6]. Sądzymy również, że ucisk, jakiemu poddane są wszczepione komórki, może znacząco zmniejszać ich potencjał do migracji i proregeneracyjnych funkcji.

Kolejną opracowaną techniką jest transplantacja SK za pomocą specjalnych rurek polimerowych, tzw. *guidance channels*, wszczepianych w miejsce uszkodzenia rdzenia kręgowego [7,8]. Metoda ta wydaje się nawet bardziej inwazyjna niż bezpośrednio wstrzyknięcie, dlatego może być stosowana praktycznie tylko w doświadczalnych modelach zwierzęcych badających wpływ SK na regenerację włókien nerwowych i raczej nie znajdzie zastosowania w praktyce klinicznej.

Z powodu wielu mankamentów opisanych metod, trwają prace nad opracowaniem sposobu bezpiecznego i skutecznego podawania SK do uszkodzonego rdzenia kręgowego. Naszym zdaniem, najlepszą metodą jest aplikacja komórek za pośrednictwem PMR. Procedura może być wykorzystana w leczeniu wieloogniskowych, rozsianych uszkodzeń [9]. Ponadto unika się umieszczania SK bezpośrednio w miejscu toczącego się zapalenia, które może być cytotoksyczne dla podanych komórek. Co więcej, z metodą tą – bezpieczną i tanią – można wiązać duże nadzieje na zastosowanie jej w przyszłości w praktyce klinicznej.

W fachowej literaturze można znaleźć doniesienia o próbach podawania neurosfer do *cisterna magna* [9]. Wyniki tych badań ukazują, że zaaplikowane komórki przeżywiają w PMR, przyczepiają się szczególnie w miejscu urazu rdzenia kręgowego oraz migrują w głąb uszkodzonych tkanek. Te obiecujące wyniki skłaniają do dalszych prac nad podawaniem

komórek stymulujących regenerację za pośrednictwem PMR, tym bardziej iż przypuszcza się, że PMR u szczurów z uszkodzeniem rdzenia kręgowego nie wywiera niekorzystnego wpływu na przeszczepione komórki. Nie wykazano w nim bowiem obecności czynników proapoptycznych, w przeciwieństwie do niektórych stanów patologicznych ośrodkowego układu nerwowego, takich jak choroba Parkinsona [18].

Proponowana przez nas aplikacja SK do przestrzeni podpajęczynówkowej na poziomie *cisterna magna* nie powoduje, w przeciwieństwie do aplikacji na poziomie uszkodzenia, ryzyka pogłębienia już istniejącego urazu. Co więcej, kierunek krążenia PMR wymusza ruch zaaplikowanych komórek najpierw do niższych partii rdzenia kręgowego. Omywiają one miejsce uszkodzenia, a następnie zawracają i dopiero po opuszczeniu przestrzeni podpajęczynówkowej rdzenia kręgowego, dostają się na poziom półkul mózgu, co zapobiega rozproszeniu SK

w układzie komorowym. Odpowiednie ułożenie zwierzęcia w czasie zabiegu sprzyja swobodnemu przemieszczaniu się podanych SK oraz stanowi dodatkowe zabezpieczenie przed przypadkowym uszkodzeniem rdzenia przedłużonego podczas wprowadzania kaniuli.

#### WNIOSKI

1. Komórki Schwanna pozyskiwane z predegenerowanych *in vivo* szczurzych nerwów kulszowych mogą być bezpiecznie podawane do zbiornika wielkiego drogą nakłucia podpotylicznego.
2. Wszczepione komórki mają zdolność nie tylko do przeżywania w PMR, ale mogą swobodnie migrować, szczególnie w miejsce uszkodzenia rdzenia kręgowego, gdzie koegzystują z innymi składowymi tkankowymi pochodzącymi od gospodarza.

#### Podziękowania i informacje o grantach lub źródłach finansowania pracy

Badania były finansowane z grantów SUM nr KNW-1-038/09, KNW-1-064/10.

Autorzy pragną podziękować Państwu prof. dr hab. n. med. Joannie Lewin-Kowalik, dr hab. n. med. Halinie Jędrzejowskiej-Szypułce, dr. n. med. Wiesławowi Marcolowi, dr n. med. Magdalenie Larysz-Brysz oraz całemu Zespołowi Katedry i Zakładu Fizjologii SUM za umożliwienie wzięcia aktywnego udziału w badaniu oraz pomoc w opracowaniu i interpretacji uzyskanych wyników.

Praca została uhonorowana I miejscem na V Międzynarodowej i XLIX Międzywydziałowej Konferencji Naukowej Studentów Uczelni Medycznych, która odbyła się w Katowicach w dniach 6–7.05.2010 r.

#### PIŚMIENNICTWO

1. Martin D., Robe P., Franzen R. i wsp. Effects of Schwann Cell Contusion Model of Rat Transplantation in a Spinal Cord Injury. *J. Neurosci. Res.* 1996; 45: 58–597.
2. Akiyama Y., Honmou O., Kato T., Uede T., Hashi K., Kocsis J.D. Transplantation of clonal neural precursor cells derived from adult human brain establishes functional peripheral myelin in the rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 2001; 167: 27–39.
3. Gage F.H., Coates P.W., Palmer T.D. i wsp. Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 11879–11883.
4. Reynolds B.A., Tetzlaff W., Weiss S. A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 1992; 12: 4565–4574.
5. Di Prospero N.A., Zhou X.R., Meiners S., McAuliffe W.G., Ho S.Y., Geller H.M., Suramin disrupts the gliotic response following a stab wound injury to the adult rat brain. *J. Neurocytol.* 1998; 27: 491–506.
6. Takami T., Oudega M., Bates M.L., Wood P.M., Kleitman N., Bunge M.B. Schwann cell but not olfactory ensheathing glia transplants improve hindlimb locomotor performance in the moderately contused adult rat thoracic spinal cord. *J. Neurosci.* 2002; 22: 6670–6681.
7. Xu X.M., Zhang S.X., Li H., Aebischer P., Bunge M. B. Regrowth of axons into the distal spinal cord through a Schwann-cell-seeded mini-channel implanted into hemisectioned adult rat spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11: 1723–1740.
8. Hsu J.Y., Xu X.M. Early Profiles of Axonal Growth and Astroglial Response After Spinal Cord Hemisection and Implantation of Schwann Cell-Seeded Guidance Channels in Adult Rats. *J. Neurosci. Res.* 2005; 82: 472–483.
9. Wu S., Suzuki Y., Kitada M. i wsp. New method for transplantation of neurosphere cells into injured spinal cord through cerebrospinal fluid in rat. *Neurosci. Lett.* 2002; 318: 81–84.
10. Morita E., Watanabe Y., Ishimoto M. i wsp. A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. *Exp. Neurol.* 2008; 213: 431–438.
11. Ohta M., Suzuki Y., Noda T. i wsp. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Exp. Neurol.* 2004; 187: 266–278.
12. Wu S., Suzuki Y., Noda T. i wsp. Immunohistochemical and Electron Microscopic Study of Invasion and Differentiation in Spinal Cord Lesion of Neural Stem Cells Grafted Through Cerebrospinal Fluid in Rat. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69: 940–945.
13. Firouzi M., Moshayedi P., Saberi H. i wsp. Transplantation of Schwann cells to subarachnoid space induces repair in contused rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 2006; 402: 66–70.
14. Mannisto P.T., Tornwall M., Tuomainen P., Borisenko S.A., Tuominen R.K. Effect of nitecapone and clorgyline, given intracerebro-ventricularly on l-dopa metabolism in the rat brain. *Neuroreport* 1992; 3: 641–644.

15. Araujo D.M., Hilt D.C. Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates the excitotoxin-induced behavioral and neurochemical deficits in a rodent model of Huntington's disease. *Neuroscience* 1997; 81: 1099–1110.
16. Solomon R.A., Antunes J.L., Chen R.Y.Z. i wsp. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke* 1985; 16(1): 58–64.
17. Jędrzejowska-Szypułka H., Straszak G., Larysz-Brysz M. i wsp. Interleukin-1 $\beta$  Plays a Role in the Activation of Peripheral Leukocytes after Blood-Brain Barrier Rupture in the Course of Subarachnoid Hemorrhage. *Curr. Neurovasc. Res.* 2010; 7: 39–48.
18. Hao R., Norgren R.B., Lau Y.S. and Pfeiffer R.F. Cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients inhibits the growth and function of dopaminergic neurons in culture. *Neurology* 1995; 45: 138–142.