

Peripheral blood mRNA expression of neural stem cell markers in bipolar disorder and the effect of long-term lithium treatment

Ekspresja mRNA markerów nerwowych komórek macierzystych we krwi obwodowej pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową oraz efekty długotrwałego stosowania litu

Ewa Ferencztajn-Rochowiak¹, Maciej Tarnowski², Jerzy Samochowiec³, Michał Michalak⁴, Mariusz Z. Ratajczak^{2, 5}, Janusz Rybakowski¹



Received 31.05.2016
Accepted 13.06.2016

AFFILIATIONS / AFILIACJE

- 1 Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Klinika Psychiatrii Dorosłych
- 2 Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Zakład Fizjologii
- 3 Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie, Katedra i Klinika Psychiatrii
- 4 Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Katedra i Zakład Informatyki i Statystyki
- 5 University of Louisville, Stem Cell Biology Program at the James Graham Brown Cancer Center

KEYWORDS

- bipolar affective illness
- lithium
- nestin
- β 3-tubulin
- vimentin

SŁOWA KLUCZOWE

- choroba afektywna dwubiegunowa
- lit
- nestyna
- β 3-tubulina
- wimentyna

CORRESPONDENCE ADDRESS / ADRES DO KORESPONDENCJI

Ewa Ferencztajn-Rochowiak
Uniwersytet Medyczny w Poznaniu, Klinika Psychiatrii Dorosłych
ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań, Poland
phone: +48 618 491 400
email: ferencztajnewa@gmail.com

ABSTRACT

Objectives. Research on stem cells indicates their role in the pathogenesis of psychiatric disorders and mechanisms of psychotropic drugs. In this study, we evaluated expression of mRNA markers of neural stem cells (NSCs): nestin, β 3-tubulin and vimentin in peripheral blood of patients with bipolar disorder (BD) and assessed the effect of long-term lithium treatment.

Material and methods. Thirty patients with BD were included (fifteen during remission, with illness duration minimum 10 years, never treated with lithium, and 15 treated with lithium for 8–40 years, 16 years on average), and 15 control subjects, matched in terms of sex and age. Assessment of the mRNA was performed using the real-time quantitative reverse transcription PCR procedure.

Results. In BD patients never treated with lithium, the mRNA expression of nestin and β 3-tubulin was significantly higher, compared to the control group. In lithium-treated patients, the expression of β 3-tubulin was similar to the control group. The mRNA expression of vimentin was higher in lithium-treated BD patients, compared to non-lithium-treated patients and the control group. In the control group, the mRNA expression of nestin and vimentin correlated negatively with the number of CD133+ VSELs (very small embryonic-like stem cells), which was not observed in BD subjects.

Conclusions. The results show a differential mRNA expression of NSCs markers in BD patients and variable effects of long-term lithium treatment on these parameters. Increased levels of nestin and β 3-tubulin may indicate excessive regenerative processes occurring in the course of BD, and long-term lithium treatment may

inhibit overexpression of β 3-tubulin. Elevated mRNA levels of vimentin in lithium-treated patients may be related to neuroprotective properties of this ion.

STRESZCZENIE

Cel pracy. Badania nad komórkami macierzystymi wskazują na możliwość odgrywania przez nie roli w patogenezie zaburzeń psychicznych i mechanizmach działania leków psychotropowych. W pracy badano ekspresję mRNA markerów nerwowych komórek macierzystych (NSCs, *neural stem cells*): nestyny, β 3-tubuliny i wimentyny we krwi obwodowej pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową (ChAD) oraz efekty długotrwałego leczenia węglanem litu.

Materiał i metody. Badaniem objęto 30 pacjentów z ChAD (15 o czasie trwania choroby minimum 10 lat, nigdy nieleczonych litem i 15 otrzymujących lit przez okres 8–40 lat, średnio 16 lat) oraz 15 osób z grupy kontrolnej, dobranych pod względem płci i wieku. Analizę ekspresji genów wykonano przy pomocy techniki ilościowego PCR czasu rzeczywistego.

Wyniki. U pacjentów z ChAD nieleczonych litem ekspresja mRNA nestyny i β 3-tubuliny była istotnie większa niż w grupie kontrolnej. U leczonych litem ekspresja β 3-tubuliny była podobna do grupy kontrolnej. Ekspresja mRNA wimentyny była wyższa w grupie pacjentów z ChAD leczonych litem, w porównaniu zarówno z osobami nieleczonymi litem, jak i grupą kontrolną. W grupie kontrolnej ekspresja mRNA nestyny i wimentyny korelowała negatywnie z liczbą komórek CD133+ VSELs (*very small embryonic like stem cells*), czego nie stwierdzono u osób z ChAD.

Wnioski. Wyniki wskazują na zróżnicowaną ekspresję mRNA badanych markerów NSCs u pacjentów z ChAD oraz na odmienny wpływ długotrwałego stosowania litu na te parametry. Podwyższone wartości w zakresie nestyny i β 3-tubuliny mogą świadczyć o nadmiernych procesach regeneracji zachodzących w przebiegu ChAD, a długotrwałe stosowanie litu może hamować nadmierną ekspresję β 3-tubuliny. Wyższe wartości mRNA wimentyny u pacjentów otrzymujących lit mogą być związane z neuroprotekcijnym działaniem tego jonu.

Introduction

Research on stem cells in psychiatry begins a new chapter in the search for understanding of the pathogenesis of psychiatric disorders and for new therapy methods (Panchision 2013, Ratajczak *et al.* 2014a). Stem cells are capable of renewing themselves and of differentiating into either progenitor or tissue-specific cells from all three germ layers, which makes it possible to examine individual phases of the development of nerve cells. Stem cells form a developmental continuum consisting of totipotent, pluripotent, multipotent and unipotent cells. In terms of their origin, we can distinguish embryonic and somatic (found in tissues of adult organisms) stem cells. An adult person has, among others, multipotent hematopoietic (HSCs), mesenchymal (MSCs) and neural (NSCs) stem cells, each group characterised by different properties and functions (Roszek and Komoszyński 2008). They are present in the body in the so-called niches, from where they can be mobilised to peripheral blood if tissues and organs need regeneration.

In 2007, a new population of stem cells was discovered, namely VSELs – very small embryonic-like stem cells (Kucia *et al.* 2007), which circulate in peripheral blood in small numbers. They function as a reserve pool of pluripotent stem cells involved in regenerative processes of the body. They are rapidly mobilised in the event of sudden stress, tissue damage, cardiac muscle ischaemia, stroke, haemorrhage or infections. However, adverse effects can be observed if they are excessively mobilised to areas of

chronic inflammation (Ratajczak *et al.* 2010). It is believed that these cells may play a certain role in the process of nervous tissue remodelling (Ratajczak *et al.* 2011).

Most of the research conducted so far on stem cells in psychiatry focuses on schizophrenia and autism (Kálmán *et al.* 2016). In 2014, researchers from Szczecin started researching the role of VSELs in psychotic disorders (Kucharska-Mazur *et al.* 2014). Compared with healthy people, enhanced mobilisation of for example CD34+ VSELs in peripheral blood of patients with a first psychotic episode was observed, while no significant effect of antipsychotic treatment on these cells was demonstrated.

One of the research methods concerning stem cells in psychiatry is the use of induced pluripotent stem cells (iPSCs). They are obtained from the patient's somatic cells (mainly fibroblasts) using transcription factors – such as OCT-4, SOX2 or Nanog – and retroviral vectors in order to create neural cell lines that can be tested for changes in terms of the expression of particular genes. Recently, reports from several studies have been published, where the iPSC technique was applied for the purpose of studying the pathogenesis of bipolar disorder (BD) at the level of neural stem cells, and for the purpose of their further differentiation (O'Shea and McInnis 2016).

The effect of lithium on stem cells has been described at the level of hematopoietic (HSCs), mesenchymal (MSCs) and neural (NSCs) stem cells. An increase in the number of leukocytes (Radomski *et al.* 1950) as well as intensified granulopoiesis and megakaryocytopoiesis in lithium-treated BD patients has been observed for

a long time, which is due to lithium's effect on HSCs and to the fact that it stimulates the production of hematopoietic growth factors. MSCs proliferation intensification was described in the case of low, while inhibition in the case of high lithium concentrations (Bolton *et al.* 2008). Based on both *in vitro* and *in vivo* studies, Kim *et al.* (2004) reported that lithium selectively increased neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells. In the animal model of ischaemic stroke (Li *et al.* 2011), intracerebral haemorrhage (Kang *et al.* 2012) and radiation exposure (Huo *et al.* 2012), a reduced neuronal loss, increased proliferation and survival of neural progenitor cells as well as reduced cerebral hemisphere oedema and inflammatory processes were observed after administering lithium. The data concerning the effects of lithium on stem cells has been recently reviewed (Ferenztajn-Rochowiak and Rybakowski 2016).

Chen *et al.* (2014) showed that the neuronal cell lines in patients with BD were characterised by increased expression of transcription factors for membrane-bound receptors and ion channels, mainly related to calcium signalling and increased expression of genes involved in ventral fate and GABAergic interneuron differentiation. The use of lithium altered the way neurons functioned, mainly by means of reducing calcium concentrations and decreasing the wave amplitude, which – according to the authors – was caused by the WNT pathway signalling activation. Wang *et al.* (2014) studied the model of cellular adhesion of induced neuronal-like cells (iNLC) obtained from patients with BD. They came to the conclusion that the cellular adhesion in lithium nonresponsive patients was lower than in those who responded well to lithium treatment. Following a family-based study of BD patients, Madison *et al.* (2015) found significant changes in gene expression associated with the processes of neurogenesis and neuroplasticity (mainly related to WNT signalling and ion channel subunits), as well as differentiated neurodevelopmental phenotypes in neuronal cell lines. These changes could be reversed by using an inhibitor of the GSK-3 enzyme (the lithium ion also demonstrates such properties), which increased the expression of β -catenin and activated the WNT pathway. Mertens *et al.* (2015) described mitochondrial changes and the phenotype of hyperexcitable hippocampal dentate gyrus-like early neurons derived from patients with BD using the iPSCs method. These changes could be reversed by lithium treatment only in cells derived from patients who responded well to lithium treatment.

Viswanath *et al.* (2015) analysed 85 articles in which, apart from iPSCs, other cellular models were used to study the pathogenesis of BD (among others B cell lines or olfactory neuroepithelium cells). The most replicated findings included abnormalities in calcium signalling or in the functioning of endoplasmic reticulum, mitochondria and membrane ion channels as well as of the

so-called 'clock' and apoptosis-related genes. The above abnormalities seemed to be intensified by cellular stressors (e.g. oxidative stress) and were in most cases reversed after lithium treatment.

In 2016, we published the first results of research on the effects of long-term lithium treatment in BD patients on VSELs (Ferenztajn-Rochowiak *et al.* 2016). We showed that in BD subjects not taking lithium, the number of CD34+ VSELs was significantly higher than in the control group, and that it correlated with both the duration of illness and the age of the patients. In lithium-treated patients the numbers of CD34+ VSELs, CD34+ HSCs, MSCs and endothelial progenitor cells (EPCs) were similar to controls, while the number of VSELs correlated negatively with the duration of lithium treatment and lithium concentrations. This indicates that long-term treatment with lithium may result in normalisation of the number of stem cells circulating in peripheral blood of BD patients to the level observed in healthy subjects.

Nestin, β 3-tubulin and vimentin are markers of neural stem cells and early neural progenitors (Kempermann 2006). Nestin is a cellular cytoskeletal protein, a type VI intermediate filament and one of the most commonly used NSCs markers (Gilyarow 2008). β 3-tubulin is a marker for immature neurons, common in the central and peripheral nervous system. Vimentin is also one of the cytoskeletal proteins, a type III intermediate filament and a so-called radial glial cell marker (Fanarraga *et al.* 1999).

Stem cell surface antigens allow their precise identification. CD34+ antigen (sialomucin) is characteristic of stem and progenitor hematopoietic cells; it is involved in cell adhesion and its expression decreases as the process of differentiation and maturation of cells advances. CD133+ antigen (formerly known as AC133) is also an early marker of hematopoietic stem cells and may play a role in the inter-protein contact with the marrow stroma elements (Yin *et al.* 1997). CD34+ and CD133+ antigens are also characteristic of developmentally early pluripotent VSELs, which can be described as two phenotypically distinct types (Lin-/CD45-/CD45+ and Lin-/CD45-/CD133+).

The study presented herein was aimed to evaluate the concentrations of mRNA neural stem cell markers – nestin, β 3-tubulin and vimentin – in peripheral blood of patients with BD and to determine their relationship to the number of VSELs. The effect of long-term lithium carbonate treatment on the tested parameters was evaluated as well.

Material and methods

Study group

Thirty patients with bipolar disorder in remission, all of them being treated at the outpatient clinic of the

Department of Adult Psychiatry, Poznań University of Medical Sciences, and 15 control subjects, matched in terms of sex and age, were included in the study.

The group with BD included 15 patients (10 women, 5 men) aged 53 ± 7 , with illness duration of at least 10 years (20 ± 9 years on average, ranging from 10 to 44) and never treated with lithium: Bipolar Li(-). The patients received mood stabilisers, including valproic acid (7 persons), lamotrigine (6 persons) and carbamazepine (3 persons), as well as antidepressants (9 persons) and antipsychotics (7 persons).

The second group with BD [Bipolar Li(+)] included 15 patients (10 women, 5 men) aged 55 ± 6 , with illness duration of 24 ± 9 years, treated with lithium carbonate for 8–40 years (16 years on average). The serum lithium level was in the range of 0.5–0.8 mmol/L (0.73 mmol/L on average). Six persons were also additionally treated with carbamazepine, antidepressants (8 persons) and quetiapine (3 persons).

The control group consisted of 15 healthy subjects (10 women, 5 men) at the age of 50 ± 5 , with no personal or family history of psychiatric disorders, matching the study group in terms of sex and age.

The exclusion criteria included the following factors: a history of perinatal and developmental disorders, impaired glucose tolerance and diabetes, organic damage to the central nervous system, active/acute phase of an autoimmune disease, infection, psychoactive drug abuse and other serious physical illness that could corrupt the study results.

The study was approved by the Bioethics Committee of the Poznań University of Medical Sciences. Each of the participants signed an informed consent to participate in the study, having received detailed explanations.

Laboratory tests

Twenty ml of venous blood was collected from each patient and on the same day transported at $+4^\circ\text{C}$ to the Department of Physiology in Szczecin for determination.

The analysis of the gene expression for neural stem cells (nestin, $\beta 3$ -tubulin and vimentin) was carried out using the quantitative real-time PCR (qPCR) technique. Total RNA was isolated from peripheral blood using the RNeasy Kit (Qiagen). Then, the reverse transcription reaction was conducted using the First Strand cDNA Synthesis Kit and OligoDT primers (Fermentas). The following primers were used in the analysis:

1. Nestin (forward) GGCCTGGAGCAGGAGAA
(reverse) TCCAGGAGGGTCTGTACGT
2. $\beta 3$ -tubulin (forward) TTCTGGGAAGTCATCAGTGATGA
(reverse) CGAGTC GCC CACGTAGTTG
3. Vimentin (forward) AATGGCTCGTCACCTTCGTGAAT
(reverse) CAGATTAGTTCCCTCAGGTTTCAG

The quantitative mRNA analysis was performed on the ABI 7500 Fast instrument, using Power SYBR Green PCR

Master Mix reagents. The reaction was carried out in the following conditions: 95°C (15 s), 40 cycles at 95°C (15 s) and 60°C (1 min). According to the melting point, only one PCR product was amplified in these conditions. The relative expression of the tested gene (R), normalised in relation to the internal control (β -2 microglobulin as a reference gene) and the calibrator, was expressed using the comparative $\Delta\Delta\text{Ct}$ method.

The number of CD34+ VSELs and CD133+ VSELs was determined by means of a flow cytometric analysis in line with the procedure described by Zuba-Surma and Ratajczak (2010) and used in the previous study (Ferenstajn-Rochowiak *et al.* 2016).

Statistics

The statistical calculations were performed using Statistica (StatSoft-Polska), version 10. The threshold of statistical significance was set at $p < 0.05$. The tested parameters were compared among three groups: Bipolar Li(-), Bipolar Li(+) and the control group. The normal distribution was tested using the Shapiro-Wilk test. The data did not come from a normally distributed population, so the Kruskal-Wallis test was used together with the *post-hoc* Dunn's test. The assessment of a correlation with CD133+ VSELs values was carried out using the Spearman's rank correlation coefficient.

Results

The clinical characteristics of the study group are shown in table 1.

No differences were demonstrated in terms of the tested parameters between the groups.

The results of the mRNA levels of neural stem cell markers - nestin, $\beta 3$ -tubulin and vimentin - are shown in table 2.

In the group of patients not taking lithium, the expression of nestin and $\beta 3$ -tubulin genes was significantly higher than in the control group (0.2366 vs. 0.0328, $p = 0.0003$ for nestin and 0.2801 vs. 0.0393, $p = 0.047$ for $\beta 3$ -tubulin). The expression of the $\beta 3$ -tubulin gene was also significantly higher than in patients treated with lithium (0.2801 vs. 0.0381, $p = 0.017$). The vimentin mRNA levels were significantly higher in patients treated with lithium than in the group not taking it (506.02 vs. 159.57, $p = 0.014$).

The correlations between the mRNA levels of neural stem cell markers and the number of CD133+ VSELs are shown in table 3.

A negative correlation was demonstrated between the nestin and vimentin mRNA levels and the number, percentage and number/[μl] of CD133+ VSELs in the control group. No correlation was demonstrated in BD

Table 1 Clinical characteristics of patients with bipolar disorder not treated with lithium [Bipolar Li(-)], treated with lithium [Bipolar Li(+)], and control subjects.

	Bipolar Li(-) n = 15	Bipolar Li(+) n = 15	Control group n = 15
M/F	5/10	5/10	5/10
Age [years]	53±7	55±6	50±5
BMI [kg/m ²]	28±4	26±6	25±3
Illness duration [years]	20±9	24±9	–
Lithium treatment duration [years]	–	16±8	–
Serum lithium concentration [mmol/l]	–	0.73±0.20	–

Table 2 Real-time PCR for mRNA expression of neural stem cell markers (mean±SD) in bipolar patients not treated with lithium Li (-), patients treated with lithium Li (+), and control subjects. Values are given as target gene expression with respect to the housekeeping gene β -2 microglobulin (β 2M).

	Bipolar Li(-)	Bipolar Li(+)	Control group
Nestin	0.2366±0.25 *p = 0.0003	0.2382±0.48	0.0328±0.05
β 3-tubulin	0.2801±0.43 *p = 0.047 #p = 0.017	0.0381±0.05	0.0393±0.05
Vimentin	159.57±122.45	506.02±489.54 #p = 0.014	276.54±213.09

p < 0.05 – statistical significance

* difference between the tested group and the control group

difference between the Bipolar Li(-) and the Bipolar Li(+) group

Table 3 Correlations between mRNA levels of neural stem cell markers and CD133+ VSELs number in bipolar patients not treated with lithium [Bipolar Li(-)], patients treated with lithium [Bipolar Li(+)], and control subjects.

mRNA	Stem cells	Bipolar Li(-)	Bipolar Li(+)	Control group
Nestin &	CD133+ VSELs	R = 0.07 p = 0.82	R = 0.38 p = 0.16	R = -0.67 *p = 0.006
	% CD133+ VSELs	R = 0.03 p = 0.92	R = 0.17 p = 0.54	R = -0.56 *p = 0.03
	CD133+ VSELs/[ul]	R = 0.07 p = 0.8	R = 0.025 p = 0.93	R = -0.53 *p = 0.04
β 3-tubulin &	no correlation	-	-	-
Vimentin &	CD133+ VSELs	R = -0.24 p = 0.4	R = 0.13 p = 0.64	R = -0.6 *p = 0.018
	% CD133+ VSELs	R = -0.25 p = 0.39	R = 0.1 p = 0.72	R = -0.57 *p = 0.028
	CD133+ VSELs/[ul]	R = -0.31 p = 0.27	R = -0.096 p = 0.73	R = -0.59 *p = 0.021

* Spearman correlation coefficient

patients between the levels of the tested markers and the number of CD34+ and CD133+ VSELs as well as the illness duration. In lithium-treated patients, the levels of the tested markers did not correlate with the lithium treatment duration or with the lithium level.

Conclusions

Our study demonstrated an elevated expression of nestin and β 3-tubulin genes in BD patients untreated with lithium compared with healthy individuals, as well as elevated vimentin mRNA levels in patients treated with lithium.

Higher levels of nestin and β 3-tubulin were observed in various types of damage to the nervous system, associated with the phenomenon of the so-called reactive neurogenesis, which involves the process of generating new neurons and glial cells to replace damaged, abnormal nerve cells. A higher nestin expression was observed among others after a stroke or brain injury (Kernie and Parent 2010), inflammation and epilepsy (Nakagawa *et al.* 2004). In the animal model of global cerebral ischaemia, Tonchev *et al.* (2005) observed increased proliferation of nestin- and β 3-tubulin-expressing cells in the subventricular zone of the lateral ventricles. Reactive neurogenesis occurring soon after the CNS injury is beneficial due to its regenerative effects, in contrast to the

persistent and prolonged repair processes which become pathogenic in nature.

Increased values of nestin and β 3-tubulin markers may be a sign of pathologically intensified regenerative processes observed in BD subjects not treated with lithium in the case of a long-standing illness (in our group: 20 \pm 9 years on average). In BD patients receiving long-term lithium treatment, the nestin expression values were on average higher than in the control group. However, due to a large dispersion of results, the difference was not statistically significant, which means that the effect of lithium on the expression of this marker cannot be unambiguously interpreted. By contrast, mRNA levels of β 3-tubulin, a marker of immature neurons, in patients receiving lithium were similar to those observed in the control group, which may indicate that in the case of β 3-tubulin, long-term use of lithium (for 8–40 years in the case of our group) can inhibit its excessive expression, keeping it at a level observed in healthy people.

Radial glial cells, for which vimentin functions as a marker, are involved in the production of new neurons and are conducive to their migration (Weissman *et al.* 2003). A number of studies have demonstrated a link between an increased expression of this marker and the intensification of proliferation and neurogenesis, for example in brain and spinal cord injury models (Walder *et al.* 2003; Teshigawara *et al.* 2013). Hui *et al.* (2015) recently demonstrated an increased expression of vimentin and pluripotent transcription factors in these models, which was associated with the activation of neural progenitor cells. It can be assumed that an increased mRNA expression of vimentin in patients receiving prolonged lithium treatment may be associated with neuroprotective effects of lithium, which in clinical conditions are observed also in those receiving lithium for many years (Hajek and Weiner 2016).

In patients with BD, no correlation was found between the expression of the tested markers and the number of CD133+ VSELs of nestin and vimentin, while in the control group, a negative correlation between the mRNA

expression of nestin and vimentin and the number of these cells was demonstrated. This may indicate that there is no direct relationship in BD patients between the tested markers and CD133+ VSELs, and that there are differences in terms of differentiation and regeneration of NSCs between healthy people and those with BD.

Our study is limited due to small groups of patients, which is caused by the fact that it is difficult to recruit subjects matched in terms of sex and age within the required clinical groups. Still, we managed to form a well-matched and defined population of BD patients suffering from a long-standing illness (22 years on average), half of whom receive long-term lithium treatment (16 years on average). Another limitation is that whole blood mRNA was used for the study, while the tested NSCs markers in peripheral blood can also originate from other cell types, e.g. glial cell precursors. Nevertheless, although the isolation of mRNA from individual cell lines of peripheral blood would offer more accurate results, it is a very complicated, time-consuming and difficult procedure. We cannot exclude the effects of other drugs used by BD patients on the tested parameters, either. There is an ongoing discussion on the presence and identification of VSELs as well as on the methodological difficulties lying in obtaining these cells (Ratajczak *et al.* 2014b). Despite certain criticism (Miyaniishi *et al.* 2013), VSELs were described from the perspective of their function as a reserve pool of pluripotent stem cells (Shaikh *et al.* 2015; Havens *et al.* 2014), their regenerative properties in lungs (Kassmer *et al.* 2013), liver (Chen *et al.* 2015) or pancreas (Abouzaripour *et al.* 2015), and their role in inflammatory processes and an immune response (Marlicz *et al.* 2012; Paczkowska *et al.* 2009).

Taking all these limitations into consideration, we believe that the obtained results allow us to make an attempt at evaluating the activity of neural stem cell markers, such as nestin, β 3-tubulin and vimentin in peripheral blood of patients with BD, and the effects of long-term treatment with lithium carbonate. ■

Wstęp

Badania nad komórkami macierzystymi w psychiatrii otwierają nowy rozdział w poszukiwaniach rozumienia patogenezy zaburzeń psychicznych i nowych metod terapii (Panchision 2013; Ratajczak i wsp. 2014a). Komórki macierzyste mają zdolność samoodnowy i różnicowania do komórek progenitorowych oraz komórek zróżnicowanych tkankowo, ze wszystkich trzech listków zarodkowych, co daje możliwość badania poszczególnych etapów rozwoju komórek nerwowych. Komórki macierzyste tworzą kontinuum rozwojowe, na które składają się komórki

totipotencjalne, pluripotencjalne, multipotencjalne oraz unipotencjalne. Ze względu na pochodzenie możemy wyróżnić embrionalne oraz somatyczne (występujące w tkankach dorosłych organizmów) komórki macierzyste. U dorosłego człowieka występują m.in. multipotencjalne hematopoetyczne (HSCs – *hematopoietic stem cells*), mezenchymalne (MSCs – *mesenchymal stem cells*) oraz nerwowe komórki macierzyste (NSCs – *neural stem cells*), które różnią się właściwościami i funkcją (Roszek i Komoszyński 2008). Występują one w organizmie w specjalnych tzw. niszach i mogą zostać zmobilizowane do krwi obwodowej w sytuacjach wymagających regeneracji tkanek i narządów.

W 2007 roku odkryto nową populację komórek macierzystych, tzw. VSELs (*very small embryonic-like stem cells*) – bardzo małych embrionalno-podobnych komórek macierzystych (Kucia i wsp. 2007), które w niewielkiej liczbie krążą we krwi obwodowej. Stanowią one pulę rezerwową pluripotencjalnych komórek macierzystych (PSCs – *pluripotent stem cells*), biorących udział w procesach regeneracyjnych organizmu. Ich szybka mobilizacja następuje w sytuacjach nagłego stresu, uszkodzenia tkanek, w niedokrwieniu mięśnia sercowego, udarze, krwawieniu czy w infekcjach. Może jednak dochodzić do negatywnych skutków, jeśli zostaną one nadmiernie zmobilizowane do obszarów przewlekłego procesu zapalnego (Ratajczak i wsp. 2010). Uważa się, że komórki te mogą odgrywać pewną rolę w remodelingu tkanki nerwowej (Ratajczak i wsp. 2011).

Większość dotychczas przeprowadzonych badań nad komórkami macierzystymi w psychiatrii dotyczy schizofrenii oraz autyzmu (Kálmán i wsp. 2016). W 2014 roku badacze szczenińscy rozpoczęli badania nad rolą VSELs w zaburzeniach psychotycznych (Kucharska-Mazur i wsp. 2014). Stwierdzono zwiększoną mobilizację m.in. komórek CD34+ VSELs we krwi obwodowej pacjentów z pierwszym epizodem psychotycznym w porównaniu z osobami zdrowymi. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu leczenia przeciwpsychotycznego na te komórki.

Jedną z metod badawczych dotyczących komórek macierzystych w psychiatrii jest wykorzystanie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSCs – *induced pluripotent stem cells*). Uzyskuje się je z komórek somatycznych pacjenta (głównie fibroblastów), z wykorzystaniem czynników transkrypcyjnych, takich jak OCT-4, SOX2 czy Nanog, oraz wektorów retrowirusowych, w celu wytworzenia neuronalnych linii komórkowych, które można badać pod kątem zmian ekspresji poszczególnych genów. W ostatnim czasie opublikowano doniesienia z kilku badań, w których zastosowano technikę iPSCs do badania patogenezy choroby afektywnej dwubiegunowej (ChAD) na poziomie nerwowych komórek macierzystych oraz dalszych etapów ich różnicowania (O'Shea i McInnis 2016).

Wpływ litu na komórki macierzyste został opisany na poziomie hematopoetycznych (HSCs – *hematopoietic stem cells*), mezenchymalnych (MSCs – *mesenchymal stem cells*) i nerwowych komórek macierzystych (NSCs – *neural stem cells*). Od dawna obserwowano zwiększoną liczbę leukocytów u pacjentów z ChAD leczonych litem (Radomski i wsp. 1950) oraz nasilenie granulopoezy i megakariocytopeny, lit wpływa bowiem na hematopoetyczne komórki macierzyste (HSCs) oraz na stymulację produkcji hematopoetycznych czynników wzrostu. Opisano nasilenie proliferacji MSCs przy niskich, a hamowanie przy wysokich stężeniach litu (Bolton i wsp. 2008). Kim i wsp. (2004) stwierdzili w badaniach *in vitro* i *in vivo* selektywne zwiększenie różnicowania neuronalnych komórek progenitorowych hipokampa w neurony pod wpływem litu. W zwierzęcym modelu

udarzu niedokrwinnego (Li i wsp. 2011), krwawienia wewnątrzczaszkowego (Kang i wsp. 2012) oraz przy ekspozycji na naświetlanie (Huo i wsp. 2012) po podaniu litu obserwowano zmniejszenie utraty neuronów, zwiększenie proliferacji i przeżycia neuronalnych komórek progenitorowych, zmniejszenie obrzęku półkulowego oraz procesów zapalnych. Ostatnio dokonano przeglądu danych na temat wpływu litu na komórki macierzyste (Ferenstajn-Rochowiak i Rybakowski 2016).

Chen i wsp. (2014) wykazali, że linie neuronalne osób z ChAD charakteryzowały się zwiększoną ekspresją czynników transkrypcyjnych dla receptorów błonowych i kanałów jonowych, głównie związanych z przekaźnictwem wapniowym, a także zwiększoną ekspresją genów związanych z różnicowaniem obszarów brzusznych układu nerwowego oraz różnicowaniem interneuronów GABA-ergicznymi. Zastosowanie litu zmieniło funkcjonowanie neuronów, głównie poprzez zmniejszenie stężeń wapnia i amplitudy fali, a efekt ten autorzy wiążą z aktywacją ścieżki sygnałowej Wnt. Wang i wsp. (2014) badali model adhezji komórkowej indukowanych komórek podobnych do neuronów (iNLC – *induced neuronal-like cells*) uzyskanych od pacjentów z ChAD i stwierdzili mniejszą adhezję komórek u pacjentów wykazujących brak skuteczności terapeutycznej litu w porównaniu z osobami z dobrą skutecznością litu. Madison i wsp. (2015) w oparciu o badanie rodziny z ChAD stwierdzili istotne zmiany w ekspresji genów związanych z procesami neurogenezy i neuroplastyczności (głównie związanych ze ścieżką sygnałową Wnt i podjednostkami kanałów wapniowych) oraz zróżnicowane fenotypy neurorozwojowe w liniach komórek neuronalnych. Zmiany te możliwe były do odwrócenia dzięki zastosowaniu inhibitora enzymu GSK-3 (które to własności posiada również jon litu), co zwiększyło ekspresję β -kateniny i aktywowało ścieżkę Wnt. Mertens i wsp. (2015) opisali zmiany mitochondrialne oraz fenotyp nadmiernie pobudliwych wczesnych neuronów zakrętu zębatego hipokampa uzyskanych metodą iPSCs od pacjentów z ChAD. Zmiany te były odwracalne pod wpływem litu jedynie w komórkach pobranych od pacjentów z dobrą reakcją na leczenie litem.

Viswanath i wsp. (2015) przeanalizowali 85 artykułów, w których oprócz techniki iPSCs wykorzystano inne modele komórkowe do badania patogenezy ChAD (m.in. linie limfocytów B, komórki neuroepithelium opuszki węchowej). Najczęściej stwierdzano: nieprawidłowości w przekaźnictwie wapniowym, funkcji siateczki śródplazmatycznej, mitochondriów i błonowych kanałów jonowych, a także genów tzw. „zegarowych” i związanych z apoptozą. Nieprawidłowości te były nasilane przez stresory komórkowe (np. stres oksydacyjny) i w większości ulegały odwróceniu pod wpływem leczenia litem.

W 2016 roku opublikowaliśmy pierwsze wyniki badania nad wpływem długotrwałego leczenia litem

pacjentów z ChAD na komórki VSELs (Ferenzstajn-Rochowiak i wsp. 2016). Wykazaliśmy, że u osób z ChAD nieleczonych litem występuje istotnie większa liczba komórek CD34+ VSELs niż w grupie kontrolnej oraz że koreluje ona z długością trwania choroby oraz wiekiem pacjentów. W grupie osób leczonych litem stwierdziliśmy podobną liczbę komórek CD34+ VSELs, CD34+ HSCs, MSCs i endotelialnych komórek progenitorowych (EPCs) co w grupie kontrolnej oraz zaobserwowaliśmy, że im dłuższy czas leczenia litem oraz im wyższe jego stężenia, tym mniejsza liczba komórek VSELs. Wskazuje to, że długoterminowe leczenie litem może prowadzić do normalizacji liczby komórek macierzystych krążących we krwi obwodowej u pacjentów z ChAD, które osiągnęły poziom obserwowany u osób zdrowych.

Nestyna, β 3-tubulina i wimentyna należą do markerów nerwowych komórek macierzystych oraz wczesnych komórek neuroprogenitorowych (Kempermann 2006). Nestyna jest białkiem cytoszkieletu komórkowego, filamentem pośrednim klasy VI i należy do najczęściej stosowanych markerów NSCs (Gilyarow 2008). β 3-tubulina jest markerem niedojrzałych neuronów, powszechnym w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Wimentyna również należy do białek cytoszkieletu, jest filamentem pośrednim klasy III, a także markerem tzw. gleju radialnego (Fanarraga i wsp. 1999).

Antygeny powierzchniowe komórek macierzystych pozwalają na ich precyzyjną identyfikację. Antygen CD34+ (sialomucyna) jest charakterystyczny dla macierzystych i progenitorowych komórek hematopoetycznych, uczestniczy w adhezji komórkowej, a jego ekspresja zmniejsza się wraz z procesem różnicowania i dojrzewania komórek. Antygen CD133+ (dawniej AC133) również jest wczesnym markerem macierzystych komórek krwiotwórczych i może odgrywać rolę w interakcjach międzybiałkowych z elementami podścieliska szpiku (Yin i wsp. 1997). Antygeny CD34+ i CD133+ charakteryzują także wcześniejsze rozwojowo, pluripotencjalne komórki VSELs, które można opisać jako dwa fenotypowo odrębne typy (Lin-/CD45-/CD45+ oraz Lin-/CD45-/CD133+).

Przedstawione tu badanie miało na celu ocenę stężeń mRNA markerów nerwowych komórek macierzystych: nestyny, β 3-tubuliny i wimentyny we krwi obwodowej pacjentów z ChAD oraz określenie ich związku z liczbą komórek VSELs. Oceniono również wpływ długotrwałego leczenia węglanem litu na badane parametry.

Material i metody

Grupa badana

W badaniu wzięło udział 30 pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową w okresie remisji, będących pacjentami Poradni Przyklinicznej Kliniki Psychiatrii Dorosłych Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz 15 osób

zdrowych, stanowiących grupę kontrolną, dobranych pod względem wieku i płci.

Wśród osób z ChAD znalazło się 15 pacjentów (10 kobiet, 5 mężczyzn) w wieku 53 ± 7 lat, o czasie trwania choroby minimum 10 lat (średnio 20 ± 9 lat, rozpiętość 10–44 lata), którzy nigdy nie byli leczeni litem: Bipolar Li(-). Pacjenci przyjmowali leki normotymiczne: kwas walproinowy (7 osób), lamotryginę (6 osób) oraz karbamazepinę (3 osoby), a także leki przeciwdepresyjne (9 osób) oraz przeciwpsychotyczne (7 osób).

Drugą grupę osób z ChAD [Bipolar Li(+)] stanowiło 15 osób (10 kobiet, 5 mężczyzn) w wieku 55 ± 6 lat, o średnim czasie trwania choroby 24 ± 9 lat, leczonych długotrwanie węglanem litu przez okres 8–40 lat (średnio 16 lat). Stężenie litu w surowicy mieściło się w zakresie 0,5–0,8 mmol/L (średnio 0,73 mmol/L). Dodatkowo 6 osób leczonych było karbamazepiną, a także lekami przeciwdepresyjnymi (8 osób) i kwetiapiną (3 osoby).

Grupa kontrolna składała się z 15 osób zdrowych (10 kobiet, 5 mężczyzn) w wieku 50 ± 5 lat, z negatywnym wywiadem osobistym i rodzinnym w kierunku zaburzeń psychicznych, dobranych odpowiednio pod względem wieku i płci do grupy badanej.

Do kryteriów wykluczających należały następujące czynniki: dodatni wywiad w kierunku zaburzeń okołoporodowych i rozwojowych, zaburzenia tolerancji glukozy i cukrzyca, organiczne uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego, aktywna/ostra faza choroby autoimmunologicznej, obecność infekcji, nadużywanie substancji psychoaktywnych oraz inne poważne schorzenie fizyczne, które mogłoby zaburzyć wyniki badania.

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, a każdy z uczestników podpisał świadomą zgodę na udział w badaniu, po udzieleniu mu szczegółowych wyjaśnień.

Badania laboratoryjne

Od każdego pacjenta pobierano 20 ml krwi żyłnej i tego samego dnia transportowano w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$ do Zakładu Fizjologii w Szczecinie, gdzie wykonywano oznaczenia.

Analiza ekspresji genów charakterystycznych dla nerwowych komórek macierzystych (nestyna, β 3-tubulina oraz wimentyna) została wykonana z wykorzystaniem techniki ilościowego PCR czasu rzeczywistego (RealTime PCR – qPCR). Całkowite RNA zostało wyizolowane z krwi obwodowej za pomocą zestawu RNeasy Kit (Qiagen). Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, wykorzystując zestaw FirstStrand cDNA Synthesis Kit oraz startery OligoDT (Fermentas). W analizie zastosowano następujące startery:

1. Nestyna (forward) GGCCCTGGAGCAGGAGAA (reverse) TCCAGGAGGGTCTCTGTACGT
2. β 3-tubulina (forward) TTCTGGGAAGTCATCAGTGATGA (reverse) CGAGTC GCC CACGTAGTTG

3. Wimentyna (forward) AATGGCTCGTCACCTTCGTGAAT
(reverse) CAGATTAGTTTCCCTCAGGTTTCAG

Ilościowa analiza mRNA została wykonana na aparacie ABI 7500 Fast oraz odczynnikach Power SYBR Green PCR Master Mix. Reakcję przeprowadzono w następujących warunkach: 95°C (15 s), 40 cykli w 95°C (15 s) i 60°C (1 min). Według temperatury topnienia w tych warunkach był amplifikowany tylko jeden produkt PCR. Względna ekspresję badanego genu (R), znormalizowaną w stosunku do wewnętrznej kontroli (gen referencyjny β -2 mikroglobuliny) i do kalibratora, wyrażano metodą komparatywną $\Delta\Delta vCt$.

Ocenę ilości komórek VSELs CD34+ i CD133+ VSELs wykonano za pomocą technik cytometrii przepływowej zgodnie z procedurą opisaną przez Zuba-Surma i Ratajczak (2010) i wykorzystaną w poprzedniej pracy (Ferenstajń-Rochowiak i wsp. 2016).

Statystyka

Obliczenia statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica (StatSoft-Polska), wersja 10. Jako próg istotności statystycznej przyjęto wartość $p < 0,05$. Badane parametry porównano pomiędzy trzema grupami: Bipolar Li(-), Bipolar Li(+) oraz grupą kontrolną. Zgodność z rozkładem normalnym zbadano przy użyciu testu Shapiro-Wilka. Dane nie były zgodne

z rozkładem normalnym, dlatego zastosowano test Kruskala-Wallisa z testem *post-hoc* Dunna. Ocenę korelacji z wartościami CD133+ VSELs przeprowadzono z użyciem współczynnika korelacji rang Spearmana.

Wyniki

Charakterystykę kliniczną grupy badanej przedstawiono w tabeli 1.

Nie wykazano różnic pod względem badanych parametrów pomiędzy grupami.

Wyniki stężeń mRNA markerów nerwowych komórek macierzystych: nestyny, β 3-tubuliny i wimentyny przedstawiono w tabeli 2.

W grupie pacjentów nieleczonych litem ekspresja genów nestyny i β 3-tubuliny była istotnie większa niż w grupie kontrolnej (0,2366 vs 0,0328, $p = 0,0003$ dla nestyny oraz 0,2801 vs 0,0393, $p = 0,047$ dla β 3-tubuliny), a także ekspresja genu β 3-tubuliny była istotnie większa niż w grupie osób leczonych litem (0,2801 vs 0,0381, $p = 0,017$). Stężenia mRNA wimentyny były istotnie wyższe w grupie osób leczonych litem niż w grupie osób nieleczonych litem (506,02 vs 159,57, $p = 0,014$).

Korelacje pomiędzy stężeniami mRNA markerów nerwowych komórek macierzystych a liczbą CD133+ VSELs przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 1 Charakterystyka kliniczna pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową nieleczonych litem [Bipolar Li(-)], leczonych litem [Bipolar Li(+)] i grupy kontrolnej

	Bipolar Li(-) n = 15	Bipolar Li(+) n = 15	Grupa kontrolna n = 15
M/K	5/10	5/10	5/10
Wiek [lata]	53 \pm 7	55 \pm 6	50 \pm 5
BMI [kg/m ²]	28 \pm 4	26 \pm 6	25 \pm 3
Czas trwania choroby [lata]	20 \pm 9	24 \pm 9	–
Długość leczenia litem [lata]	–	16 \pm 8	–
Stężenie litu w surowicy [mmol/l]	–	0,73 \pm 0,20	–

Tabela 2 Analiza ekspresji genów charakterystycznych dla nerwowych komórek macierzystych wykonana za pomocą RealTime PCR (średnia \pm SD) u pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową nieleczonych litem Li(-), leczonych litem Li(+) oraz w grupie kontrolnej. Wartości podane są w odniesieniu do ekspresji genu referencyjnego β -2 mikroglobuliny (β 2M)

	Bipolar Li(-)	Bipolar Li(+)	Control
Nestyna	0,2366 \pm 0,25 * $p = 0,0003$	0,2382 \pm 0,48	0,0328 \pm 0,05
β 3-tubulina	0,2801 \pm 0,43 * $p = 0,047$ # $p = 0,017$	0,0381 \pm 0,05	0,0393 \pm 0,05
Wimentyna	159,57 \pm 122,45	506,02 \pm 489,54 * $p = 0,014$	276,54 \pm 213,09

$p < 0,05$ – istotność statystyczna

* różnica pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną

różnica pomiędzy grupą Bipolar Li(-) a Bipolar Li(+)

Tabela 3 Korelacje pomiędzy stężeniami mRNA markerów nerwowych komórek macierzystych a liczbą CD133+ VSELs u pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową nieleczonych litem [Bipolar Li(-)], leczonych litem [Bipolar Li(+)] i grupy kontrolnej

mRNA	Komórki macierzyste	Bipolar Li(-)	Bipolar Li(+)	Grupa kontrolna
Nestyna &	CD133+ VSELs	$R = 0,07$ $p = 0,82$	$R = 0,38$ $p = 0,16$	$R = -0,67$ $*p = 0,006$
	% CD133+ VSELs	$R = 0,03$ $p = 0,92$	$R = 0,17$ $p = 0,54$	$R = -0,56$ $*p = 0,03$
	CD133+ VSELs/[ul]	$R = 0,07$ $p = 0,8$	$R = 0,025$ $p = 0,93$	$R = -0,53$ $*p = 0,04$
β3-tubulina &	brak korelacji	–	–	–
Wimentyna &	CD133+ VSELs	$R = -0,24$ $p = 0,4$	$R = 0,13$ $p = 0,64$	$R = -0,6$ $*p = 0,018$
	% CD133+ VSELs	$R = -0,25$ $p = 0,39$	$R = 0,1$ $p = 0,72$	$R = -0,57$ $*p = 0,028$
	CD133+ VSELs/[ul]	$R = -0,31$ $p = 0,27$	$R = -0,096$ $p = 0,73$	$R = -0,59$ $*p = 0,021$

*współczynnik korelacji Spearmana

Wykazano ujemną korelację pomiędzy stężeniami mRNA nestyny i wimentyny a liczbą, procentem oraz liczbą/[ul] CD133+ VSELs w grupie kontrolnej. W grupie osób z ChAD nie wykazano korelacji między stężeniami badanych markerów a liczbą CD34+ oraz CD133+ VSELs, a także pomiędzy czasem trwania choroby. W grupie osób leczonych litem stężenia badanych markerów nie korelowały ani z długością leczenia litem, ani ze stężeniem litu.

Omówienie

W naszym badaniu stwierdziliśmy podwyższone wartości ekspresji genów nestyny i β 3-tubuliny u osób z ChAD nieleczonych litem – w porównaniu z osobami zdrowymi oraz podwyższone wartości ekspresji mRNA wimentyny u osób leczonych litem.

Zwiększone stężenia nestyny i β 3-tubuliny obserwowano w różnych typach uszkodzenia układu nerwowego, związanych ze zjawiskiem tzw. reaktywnej neurogenezy. Polega ona na procesie tworzenia nowych neuronów i komórek glejowych w miejsce uszkodzonych, nieprawidłowych komórek nerwowych. Podwyższoną ekspresję nestyny stwierdzano m.in. w udarze czy uszkodzeniu mózgu (Kernie i Parent 2010), stanach zapalnych oraz padaczce (Nakagawa i wsp. 2004). Tonchev i wsp. (2005) w zwierzęcym modelu całkowitego niedokrwienia mózgu stwierdzili zwiększoną proliferację komórek wykazujących ekspresję nestyny oraz β 3-tubuliny w strefie okołokomorowej komór bocznych. Reaktywna neurogeneza zachodząca w krótkim czasie po uszkodzeniu OUN ma korzystny wymiar regeneracyjny, w przeciwieństwie do utrzymujących się i przedłużających w czasie procesów naprawczych, które zyskują patogenetyczny charakter.

Podwyższone wartości markerów nestyny i β 3-tubuliny mogą świadczyć o patologicznie nasilonych procesach regeneracji, zachodzących u osób z ChAD nieleczonych litem w długim okresie przebiegu choroby (w naszej grupie średnio 20 \pm 9 lat). W grupie osób z ChAD długotrwale leczonych litem wartości ekspresji nestyny były średnio

wyższe niż w grupie kontrolnej, natomiast ze względu na duży rozrzut wyników różnica nie osiągała poziomu znacząco statystycznej. W związku z tym nie można jednoznacznie zinterpretować wpływu litu na ekspresję tego markera. Natomiast stężenia mRNA β 3-tubuliny, markera niedojrzałych neuronów, w grupie osób otrzymujących lit były podobne do obserwowanych w grupie kontrolnej, co może świadczyć, że w przypadku β 3-tubuliny długotrwałe stosowanie litu (w naszej grupie 8-40 lat) może hamować jej nadmierną ekspresję, utrzymując ją na poziomie właściwym dla osób zdrowych.

Glej radialny, którego markerem jest wimentyna, bierze udział w tworzeniu nowych neuronów oraz sprzyja ich migracji (Weissman i wsp. 2003). W szeregu badań wykazano związek między zwiększoną ekspresją tego markera a nasileniem procesów proliferacji i neurogenezy m.in. w modelach uszkodzenia mózgu i rdzenia kręgowego (Walder i wsp. 2003; Teshigawara i wsp. 2013). Ostatnio Hui i wsp. (2015) wykazali zwiększoną ekspresję wimentyny oraz czynników transkrypcyjnych pluripotencji w tych modelach, co związane było z aktywnością neuronalnych komórek progenitorowych. Można przypuszczać, że zwiększona ekspresja mRNA wimentyny u pacjentów długotrwale leczonych litem może się wiązać z neuroprotektynnym działaniem litu, które w warunkach klinicznych stwierdza się również u osób otrzymujących lit przez wiele lat (Hajek i Weiner 2016).

W grupie pacjentów z ChAD nie stwierdzono korelacji między ekspresją badanych markerów a liczbą komórek CD133+ VSELs nestyny i wimentyny, natomiast w grupie kontrolnej wykazano korelację ujemną między ekspresją mRNA nestyny i wimentyny a liczbą tych komórek. Może to wskazywać na brak bezpośredniego związku u chorych z ChAD między badanymi markerami a komórkami CD133+ VSELs oraz na odmienności dotyczące różnicowania i regeneracji NSCs między osobami zdrowymi a chorymi na ChAD.

Ograniczeniem naszego badania są niewielkie grupy chorych, co wynika z trudności pozyskania osób dobranych pod względem płci i wieku w zakresie wymaganych grup klinicznych. Uzyskano jednak dobrze dobraną

i zdefiniowaną populację pacjentów z ChAD, o długim czasie trwania choroby (średnio 22 lata), spośród których połowa jest długotrwale leczona węglanem litu (średnio 16 lat). Innym ograniczeniem jest fakt, że do badania użyto mRNA z krwi pełnej, a badane markery komórek NSC we krwi obwodowej mogą pochodzić również z innych typów komórek, m.in. prekursorów komórek glejowych. Jakkolwiek izolowanie mRNA z poszczególnych linii komórkowych krwi obwodowej byłoby dokładniejszą metodą, jest to procedura bardzo skomplikowana, czasochłonna i trudna do przeprowadzenia. Nie można wykluczyć również wpływu innych leków stosowanych przez pacjentów z ChAD na badane parametry. Wciąż trwa dyskusja nad obecnością i identyfikacją komórek VSELs, a także trudnościami metodologicznymi

w uzyskiwaniu tych komórek (Ratajczak i wsp. 2014b). Pomimo pewnych głosów krytycznych (Miyanishi i wsp. 2013), opisano VSELs jako pulę rezerwową pluripotentnych komórek macierzystych (Shaikh i wsp. 2015; Havens i wsp. 2014), ich właściwości regeneracyjne w płucach (Kassmer i wsp. 2013), wątrobie (Chen i wsp. 2015) czy trzustce (Abouzaripour i wsp. 2015) oraz rolę w procesach zapalnych i odpowiedzi immunologicznej (Marlicz i wsp. 2012; Paczkowska i wsp. 2009).

Uwzględniając wszystkie te ograniczenia, uważamy, że uzyskane wyniki pozwalają na próbę oceny aktywności markerów nerwowych komórek macierzystych, takich jak nestyna, β 3-tubulina i wimentyna we krwi obwodowej pacjentów z ChAD oraz efektów długotrwałego leczenia węglanem litu. ■

Źródło finansowania. Badanie zostało sfinansowane w ramach grantu z polskiego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju, POIG.0101.02-00-109/09.

Conflict of interest non declared. / Nie zgłoszono konfliktu interesów.

The work described in this article has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and Uniform Requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. / Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Wkład autorów / Authors' contributions: EF-R – basic conceptual work, data collection and interpretation, literature search / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy, zebranie danych i ich interpretacja, zebranie piśmiennictwa; JR – basic conceptual work, data collection and interpretation, critical reviewing, acceptance of the final manuscript version / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy, zebranie danych i ich interpretacja, krytyczne recenzowanie pod kątem istotnej zawartości intelektualnej, akceptacja ostatecznej wersji do opublikowania; MT – analysis of laboratory tests / wykonanie analiz badań laboratoryjnych; JS – basic conceptual work / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy; MM – statistical analysis and preparation for analysis of test results / analiza statystyczna i przygotowanie wyników badań do analizy; MZR – basic conceptual work / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy

Piśmiennictwo

- Abouzaripour M, Ragerdi Kashani I, Pasbakhsh P, Atlasy N. Intravenous transplantation of very small embryonic like stem cells in treatment of diabetes mellitus. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2015; 7: 22–31.
- Bolton JM, Metge C, Lix L, Prior H, Sareen J, Leslie WD. Fracture risk from psychotropic medications: a population-based analysis. *J Clin Psychopharmacol* 2008; 28: 384–391.
- Chen HM, DeLong CJ, Bame M, Rajapakse I, Herron TJ, McInnis MG, et al. Transcripts involved in calcium signaling and telencephalic neuronal fate are altered in induced pluripotent stem cells from bipolar disorder patients. *Transl Psychiatry* 2014; 4: e375.
- Chen ZH, Lv X, Dai H, Liu C, Lou D, Chen R, Zou GM. Hepatic regenerative potential of mouse bone marrow very small embryonic-like stem cells. *J Cell Physiol.* 2015; 230: 1852–1861.
- Fanarraga M., Avila J., Zabala J. Expression of unphosphorylated class III beta-tubulin isotype in neuroepithelial cells demonstrates neuroblast commitment and differentiation. *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11: 517–527.
- Ferensztajn-Rochowiak E, Kucharska-Mazur J, Samochowiec J, Ratajczak MZ, Michalak M, Rybakowski JK. The effect of long-term lithium treatment of bipolar disorder on stem cells circulating in peripheral blood. *World J Biol Psychiatry.* 2016 Apr 13:1–25.
- Ferensztajn-Rochowiak E, Rybakowski JK. The effect of lithium on hematopoietic, mesenchymal and neural stem cells. *Pharmacol Rep.* 2016; 68: 224–230.
- Gilyarov AV. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci Behav Physiol.* 2008; 38: 165–169.
- Hajek T, Weiner MW. Neuroprotective Effects of Lithium in Human Brain? Food for Thought. *Curr Alzheimer Res.* 2016 Feb 18 [Epub ahead of print].
- Havens AM, Sun H, Shiozawa Y, Jung Y, Wang J, Mishra A, Jiang Y, O'Neill DW, Krebsbach PH, Rodgerson DO, Taichman RS. Human and murine very small embryonic-like cells represent multipotent tissue progenitors, in vitro and in vivo. *Stem Cells Dev.* 2014; 23: 689–701.
- Hui SP, Nag TC, Ghosh S. Characterization of Proliferating Neural Progenitors after Spinal Cord Injury in Adult Zebrafish. *PLoS One.* 2015; 10: e0143595.
- Huo K, Sun Y, Li H, Du X, Wang X, Karlsson N, et al. Lithium reduced neural progenitor apoptosis in the hippocampus and ameliorated functional deficits after irradiation to the immature mouse brain. *Mol Cell Neurosci* 2012; 51: 32–42.
- Kálmán S, Hathy E, Réthelyi JM. A Dishful of a Troubled Mind: Induced Pluripotent Stem Cells in Psychiatric Research. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:7909176.

14. Kang K, Kim YJ, Kim YH, Roh JN, Nam JM, Kim PY, *et al.* Lithium pretreatment reduces brain injury after intracerebral hemorrhage in rats. *Neurol Res* 2012; 34: 447–454.
15. Kassmer SH, Jin H, Zhang PX, Bruscia EM, Heydari K, Lee JH, Kim CF, Kassmer SH, Krause DS. Very small embryonic-like stem cells from the murine bone marrow differentiate into epithelial cells of the lung. *Stem Cells*. 2013; 31: 2759–2766.
16. Kempermann G. *Adult neurogenesis*. Oxford University Press, New York 2006.
17. Kernie SG, Parent JM. Forebrain neurogenesis after focal ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis*. 2010; 37: 267–274.
18. Kim JS, Chang MY, Yu IT, Kim JH, Lee SH, Lee YS, *et al.* Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both in vitro and in vivo. *J Neurochem* 2004; 89: 324–336.
19. Kucharska-Mazur J, Tarnowski M, Dołęgowska B, Budkowska M, Pędziwiatr D, Jabłoński M *et al.* Novel evidence for enhanced stem cell trafficking in antipsychotic-naïve subjects during their first psychotic episode. *J Psychiatr Res*. 2014; 49: 18–24.
20. Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E *et al.* Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood: preliminary report. *Leukemia*. 2007; 21: 297–303.
21. Li H, Li Q, Du X, Sun Y, Wang X, Kroemer G, *et al.* Lithium-mediated long-term neuroprotection in neonatal rat hypoxia-ischemia is associated with antiinflammatory effects and enhanced proliferation and survival of neural stem/progenitor cells. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31: 2106–2115.
22. Madison JM, Zhou F, Nigam A, Hussain A, Barker DD, Nehme R, *et al.* Characterization of bipolar disorder patient-specific induced pluripotent stem cells from a family reveals neurodevelopmental and mRNA expression abnormalities. *Mol Psychiatry* 2015; 20: 703–717.
23. Marlicz W, Zuba-Surma E, Kucia M, Blogowski W, Starzynska T, Ratajczak MZ. Various types of stem cells, including a population of very small embryonic-like stem cells, are mobilized into peripheral blood in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012; 18: 1711–1722.
24. Mertens J, Wang QW, Kim Y, Yu DX, Pham S, Yang B *et al.* Differential responses to lithium in hyperexcitable neurons from patients with bipolar disorder. *Nature*. 2015; 527: 95–99.
25. Miyanishi M, Mori Y, Seita J, Chen JY, Karten S, Chan CK, Nakauchi H, Weissman IL. Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? *Stem Cell Reports*. 2013; 1: 198–208.
26. Nakagawa T, Miyamoto O, Janjua NA, Auer RN, Nagao S, Itano T. Localization of nestin in amygdaloid kindled rat: an immunoelectron microscopic study. *Can. J. Neurol. Sci* 2004; 31: 514–519.
27. O'Shea KS, McInnis MG. Neurodevelopmental origins of bipolar disorder: iPSC models. *Mol Cell Neurosci*. 2016; 73: 63–83.
28. Paczkowska E, Kucia M, Koziarska D, Halasa M, Safranow K, Masiuk M, Karbicka A, Nowik M, Nowacki P, Ratajczak MZ, Machalinski B. Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke*. 2009; 40: 1237–1244.
29. Panchision DM. Meeting report: using stem cells for biological and therapeutics discovery in mental illness, April 2012. *Stem Cells Transl Med*. 2013; 2: 217–222.
30. Radomski J, Fuyat HN, Nelson AA, Smith PK. The toxic effects, excretion and distribution of lithium chloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1950; 100: 429–440.
31. Ratajczak J, Zuba-Surma E, Paczkowska E, Kucia M, Nowacki P, Ratajczak MZ. Stem cells for neural regeneration--a potential application of very small embryonic-like stem cells. *J Physiol Pharmacol*. 2011; 62: 3–12.
32. 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.
33. Ratajczak M, Kucharska-Mazur J, Samochowiec. Badania nad komórkami macierzystymi i ich rosnący wpływ na współczesną psychiatrię. *Psychiatr Pol*. 2014; 48: 1073–1085. (a)
34. Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Wojakowski W, Suszynska M, Mierzejewska K, Liu R, Ratajczak J, Shin DM, Kucia M. Very small embryonic-like stem cells (VSELs) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia*. 2014; 28: 473–484. (b)
35. Roszek K, Komoszyński M. Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Postepy Hig Med Dosw* 2008; 62: 660–667.
36. Shaikh A, Nagvenkar P, Pethe P, Hinduja I, Bhartiya D. Molecular and phenotypic characterization of CD133 and SSEA4 enriched very small embryonic-like stem cells in human cord blood. *Leukemia*. 2015; 29: 1909–1917.
37. Teshigawara K, Kuboyama T, Shigyo M, Nagata A, Sugimoto K, Matsuya Y, Tohda C. A novel compound, denosomin, ameliorates spinal cord injury via axonal growth associated with astrocyte-secreted vimentin. *Br J Pharmacol*. 2013; 168: 903–919.
38. Tonchev AB, Yamashima T, Sawamoto K, Okano H. Enhanced proliferation of progenitor cells in the subventricular zone and limited neuronal production in the striatum and neocortex of adult macaque monkeys after global cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2005; 81: 776–788.
39. Viswanath B, Jose SP, Squassina A, Thirthalli J, Purushottam M, Mukherjee O *et al.* Cellular models to study bipolar disorder: a systematic review. *J Affect Disord* 2015; 184: 36–50.
40. Walder S, Zhang F, Ferretti P. Up-regulation of neural stem cell markers suggests the occurrence of dedifferentiation in regenerating spinal cord. *Dev Genes Evol*. 2003; 213: 625–630.
41. Wang JL, Shamah SM, Sun AX, Waldman ID, Haggarty SJ, Perlis RH. Label-free, live optical imaging of reprogrammed bipolar disorder patient-derived cells reveals a functional correlate of lithium responsiveness. *Transl Psychiatry* 2014; 4: e428.
42. Weissman T, Noctor SC, Clinton BK, Honig LS, Kriegstein AR. Neurogenic radial glial cells in reptile, rodent and human: from mitosis to migration. *Cereb Cortex*. 2003; 13: 550–559.
43. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997; 90: 5002–5012.
44. Zuba-Surma EK, Ratajczak MZ. Overview of very small embryonic-like stem cells (VSEL) and methodology of their identification and isolation by flow cytometric methods. *Current protocols in cytometry*. 2010. Chapter 9: Unit 9, 29.