

Chemoattractants, very small embryonic-like stem cells (VSELs) and pluripotency stem cell markers in bipolar affective disorder

Czynniki chemotaktyczne a komórki macierzyste „very small embryonic-like stem cells” (VSELs) i markery komórek pluripotencjalnych w chorobie afektywnej dwubiegunowej

Ewa Ferencztajn-Rochowiak¹, Barbara Dołęgowska^{2,3}, Marta Budkowska⁴, Michał Michalak⁵, Jerzy Samochowiec⁶, Mariusz Z. Ratajczak^{7,8}, Janusz K. Rybakowski^{1,9}



Received 22.09.2017
Accepted 9.10.2017

AFFILIATIONS / AFILIACJE

- 1 Klinika Psychiatrii Dorosłych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
- 2 Katedra Diagnostyki Laboratoryjnej i Medycyny Molekularnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
- 3 Katedra i Zakład Fizjologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
- 4 Zakład Analityki Medycznej, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
- 5 Katedra i Zakład Informatyki i Statystyki, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
- 6 Katedra i Klinika Psychiatrii, Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
- 7 Stem Cell Biology Program at the James Graham Brown Cancer Center, University of Louisville, Louisville, KY 40202, USA

- 8 Zakład Medycyny Regeneracyjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny
- 9 Klinika Psychiatrii Dzieci i Młodzieży, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

KEYWORDS

- bipolar affective disorder
- lithium
- chemoattractants
- VSELs

SŁOWA KLUCZOWE

- choroba afektywna dwubiegunowa
- lit
- czynniki chemotaktyczne
- VSELs

CORRESPONDENCE ADDRESS / ADRES DO KORESPONDENCJI

Ewa Ferencztajn-Rochowiak
Klinika Psychiatrii Dorosłych, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań, Poland
phone: +48 618 491 531, email: ferencztajnewa@gmail.com

ABSTRACT

Objectives. The aim of the present study was the assessment of the levels of sphingosine-1-phosphate (S1P), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and complement cascade components C3a, C5a, C5b-9 in peripheral blood of patients with bipolar disorder (BD) treated with lithium and without lithium treatment and its relations with very

small embryonic-like stem cells (VSELs) and pluripotency markers Oct-4, Sox2, Nanog.

Material and methods. The study comprised 30 patients with bipolar disorder and 15 healthy controls, sex and age matched. Within bipolar group, 15 patients were treated continuously with lithium carbonate for 8–40 years (mean 16 years) and other 15 subjects who had

never received lithium, with illness duration of minimum 10 years. S1P measurement was performed using reversed phase high-performance liquid chromatography. SDF-1 and C5a, C5a, C5b-9 was evaluated using ELISA kits. The assessment of VSELs was performed using flow cytometric analysis and evaluation of pluripotency markers (Oct-4, Sox2, Nanog) was performed using the Real-time quantitative reverse transcription PCR (RQ-PCR) procedure.

Results. There were no differences between groups according to S1P, SDF-1, C3a, C5a and C5b-9 levels. In the BD group never treated with lithium, negative correlation was observed between complement component C5a and the number of CD34+VSELs, the number of CD133+VSELs and % of CD133+VSELs, as well as with pluripotency markers Oct-4, Sox2 and Nanog. In patients treated continuously with lithium and the control group, no correlation was noticed between C5a and CD133+ VSELs and pluripotency markers.

Conclusions. The obtained results show significant relation between complement component C5a and VSELs and pluripotency markers in BD group never treated with lithium.

STRESZCZENIE

Cel pracy. Celem pracy była ocena stężeń sfingozynol-1-fosforanu (S1P), czynnika pochodzenia stromalnego (SDF-1) oraz składowych C3a, C5a i C5b-9 dopełniacza we krwi obwodowej pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową (ChAD) leczonych i nieleczonych litem oraz ich relacji z komórkami macierzystymi *very small embryonic*

like (VSEL) oraz markerami komórek pluripotencjalnych Oct-4, Sox2 i Nanog.

Materiał i metody. W badaniu udział wzięło 30 pacjentów z ChAD oraz 15 zdrowych osób z grupy kontrolnej, dobranych pod względem płci i wieku. Wśród pacjentów z ChAD wyróżniono podgrupę 15 osób otrzymujących lit przez 8–40 lat, średnio 16 lat, oraz podgrupę 15 osób nigdy nieleczonych litem, o czasie trwania choroby minimum 10 lat. Oznaczenia S1P wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz. Ocenę SDF-1 oraz składowych dopełniacza C3a, C5a, C5b-9 wykonano z zastosowaniem techniki ELISA. Oznaczenia VSELs przeprowadzono z użyciem cytometrii przepływowej, natomiast ocenę markerów komórek pluripotencjalnych (Oct-4, Sox2, Nanog) wykonano z wykorzystaniem techniki ilościowego PCR czasu rzeczywistego (RealTime PCR – qPCR).

Wyniki. Nie stwierdzono różnic w stężeniach czynników S1P, SDF-1, C3a, C5a i C5b-9 pomiędzy badanymi grupami. W grupie ChAD nieleczonych litem stwierdzono ujemną korelację między składową C5a dopełniacza a liczbą komórek CD34+ VSELs, liczbą CD133+VSELs oraz % CD133+ VSELs oraz ze stężeniami markerów pluripotencji Oct4, Sox2 i Nanog. W grupie osób leczonych długotrwale litem oraz osób zdrowych nie stwierdzono korelacji pomiędzy składową C5a dopełniacza a CD133+ VSELs i markerami pluripotencji.

Wnioski. Uzyskane wyniki wskazują na istotną zależność w grupie ChAD nieleczonej litem między czynnikiem C5a dopełniacza a komórkami VSELs i markerami pluripotencji.

Introduction

In recent years, we have seen intensive development of studies on stem cells (SC), which also have found their place in psychiatry (Ratajczak *et al.* 2014). In 2007, Szczecin team led by Professor Ratajczak identified a new population of stem cells, known as very small embryonic-like stem cells (VSELs), in human cord blood (Kucia *et al.* 2007). In the following years, the presence of VSELs in bone marrow (Kucia *et al.* 2008) and peripheral blood (Sovalat *et al.* 2011) was described, confirming the hypothesis that pluripotent stem cells reside in the tissues of adults as residue after the period of embryonic development.

VSELs are present in the bone marrow and peripheral blood, where they circulate in a very small fixed number, being a reserve pool of pluripotent stem cells with defined regenerative potential. In emergency situations posing a threat to the body (such as heart attack, stroke or damage to the tissues or organs) and requiring immediate activation of regeneration mechanisms, this

number increases as the cells are mobilised to peripheral blood from the bone marrow. In chronic inflammation, an abnormal process of mobilisation of VSELs from the bone marrow may occur, also resulting in an increase in their number in peripheral blood.

In 2014, Szczecin team presented results of the study on the number of VSELs in peripheral blood of patients diagnosed with the first psychotic episode, in the case of whom a significantly higher number of CD34+ VSELs in peripheral blood was observed as compared to the control group. The authors suggest that CD34+ VSELs may be a marker of the first psychotic episode (Kucharska-Mazur *et al.* 2014). In 2017, results of the studies conducted by the centre in Poznań on the number of VSELs, hematopoietic stem cells (HSCs), mesenchymal stem cells (MSCs) and endothelial progenitor cells (EPCs) in peripheral blood of patients with bipolar disorder were published (Ferensztajn-Rochowiak *et al.* 2017). In patients not treated with lithium (mean duration of the disorder: 20 years), a higher number of CD34+ VSELs

as compared to the control group and a correlation with duration of the disorder was observed. In subjects receiving long-term treatment with lithium, the number of CD34+ VSELs was similar to their number in healthy subjects and was negatively correlated with the duration of lithium treatment and serum lithium concentrations. The authors suggest that the increased number of CD34+ VSELs may be a biological marker of bipolar disorder and its progression in patients not treated with lithium, and that lithium treatment may inhibit activation of excessive regenerative processes. In 2017, the results of the studies on stem cells in patients with panic disorder were also presented. A lower number of CD133+ VSELs was observed in patients with panic disorder prior to treatment as compared with the condition after treatment in this group (Jabłoński *et al.* 2017).

Stem cells are characterised by the expression of pluripotency markers, which are the evidence of common properties of pluripotent and embryonic cells, such as self-renewal and the ability to differentiate into cells from any of the three germ layers. The most important pluripotency markers include such transcription factors as Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4), Sox2 (sex determining region Y-box 2) and Nanog. They are responsible for the processes of correct cell turnover, inter alia in the central nervous system, where the role of the Sox2 factor is best documented (Ellis *et al.* 2004). In 2016, the results of the study on transcription factors in peripheral blood of patients with bipolar disorder were published. Significantly higher expression of all three pluripotency markers (Oct-4, Sox2 and Nanog) in subjects not treated with lithium, with long duration of the disorder (20 years), as compared to the control group was found. These results were also positively correlated with the number of CD34+ VSELs in this group. It may suggest that overexpression of transcription factors in patients suffering from bipolar disorder for many years, not treated with lithium, may be an element of pathogenesis and potential biological marker of bipolar disorder, and long-term treatment with lithium may inhibit excessive regenerative processes (Ferensztajn-Rochowiak *et al.* 2016).

Mobilisation of stem cells, including VSELs, from bone marrow to peripheral blood occurs under the influence of the so-called chemoattractants, such as sphingosine-1-phosphate (S1P), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and the elements of the immune system, which belong to innate (non-specific) immunity, such as the complement system, granulocytes, antibodies and a family of Toll-like receptors (TLRs) (Ratajczak *et al.* 2010a).

Sphingosine-1-phosphate (S1P) belongs to a class of sphingolipids found in cell membranes (Sałata *et al.* 2012). It mainly affects migration, adhesion and cell differentiation, and promotes growth and survival of cells by exerting the anti-apoptotic effect. Recently, the role of S1P as a key chemoattractant whose concentration gradient

(increasing plasma level) regulates the release of various types of stem cells, such as HSCs, MSCs or VSELs, from the niches of bone marrow to peripheral blood, and then to damaged organs, has been described (Ratajczak *et al.* 2010b). It takes place, inter alia, in the case of damage to and regeneration of tissues or inflammation, and activation of the complement system plays an important role in this process. Changes in S1P levels were described, inter alia, in psychotic disorders (Kucharska-Mazur *et al.* 2014). The relationship between S1P and bipolar disorder was described in several studies. In the study of Xu *et al.* (2014), using the GWAS technique, combined with the analysis based on the bipolar disorder family model (229 families), association was found on 1q21.2 (closest gene: sphingosine-1-phosphate receptor 1 gene, S1PR1). Nakagawa and Chiba (2015) point to the potentially beneficial anti-inflammatory and neuroprotective role of S1P in pathogenesis of diseases, including bipolar disorder, in which the activation of microglia (imbalance of M1 and M2 phenotypes of macrophages) is an important element. Tokac *et al.* (2016), in the study of polymorphisms in chemokines and their receptors in the group of 200 patients with bipolar disorder, found that CXCR4-C138T C+ genotype frequencies contributed to an increased risk for bipolar disorder. However, no statistical significance could be obtained after Bonferroni correction.

SDF-1 (stromal cell-derived factor 1, CXCL12) is a chemokine responsible mainly for maintaining stem cells within bone marrow and to a lesser degree regulates their release into peripheral blood (Ratajczak *et al.* 2010b). Changes in SDF-1 levels were described in several psychiatric disorders, including psychotic disorders (Fernandez-Egea *et al.* 2009) or anxiety disorders (Ogłodek *et al.* 2015). Ogłodek *et al.* (2016) did not find differences in the levels of SDF-1 and its receptor CXCR4 in patients with panic disorders and in subjects with personality disorders as compared to the control group. No relationship was demonstrated between SDF-1 3'a polymorphism and the risk of schizophrenia (Dasdemir *et al.* 2016). Laske *et al.* (2008) described reduced levels of SDF-1 in plasma of patients at early stages of Alzheimer's disease, which were negatively correlated with the levels of tau protein in cerebrospinal fluid. Garcia-Marchena *et al.* (2017) found a reduced level of SDF-1 in plasma of alcohol abusers.

The complement system is formed by the so-called acute-phase proteins, which support non-specific (innate) immunity against pathogens (Nesargikar *et al.* 2012). Most studies describing abnormalities in the functioning of the complement system in psychiatric disorders are related to schizophrenia. Mayilyan *et al.* (2008) describe a dual role of the complement system in schizophrenia, i.e. neuroprotective in aetiology and neurodegenerative in pathogenesis. Many studies describe changes in the levels of components of the complement system in patients with bipolar disorder. For example Wade *et al.* (2002) found increased levels of components

C3 and C6 and factor B in patients with a mania episode. Santos Sória *et al.* (2012) found that the levels of components C3 and C4 in patients with bipolar disorder in the period of euthymia are at a level similar to the control group. Akcan *et al.* (2017) found that the levels of the analysed components of the complement system were significantly lower in patients with chronic bipolar disorder as compared to patients with the first episode and the control group. The authors suggest that the lowering of the levels of components of the complement system is associated with their excessive activation and wear, which is compensated by increased expression of their genes and increase in peripheral blood mRNA levels.

Kucharska-Mazur *et al.* (2014) described reduced S1P and C3a peripheral blood levels in patients with the first psychotic episode, where these factors may serve as risk predictors and new markers of this process. In patients with bipolar disorder never treated with lithium, increased levels of components C3a, C5a and C5b-9 of the complement system and SDF-1 as compared to the control group and no differences in S1P levels were observed (Kucharska-Mazur *et al.* 2017). The authors suggest potential role of these factors in the aetiology of bipolar disorder, pointing to the contribution of regenerative processes. In patients with panic disorders, lower levels of all analysed factors, i.e. C3a, C5a, C5b-9, SDF-1 and S1P, were described both before and after treatment as compared to the control group (Jabłoński *et al.* 2017).

The aim of this study was to assess the levels of sphingosine-1-phosphate (S1P), stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and components C3a, C5a and C5b-9 of the complement system in peripheral blood of patients with bipolar disorder treated with lithium and not treated with lithium, and their relationship with very small embryonic-like stem cells (VSELs) and pluripotency markers Oct-4, Sox2 and Nanog.

Methods

Study group

The study group consisted of 30 subjects with bipolar disorder in the period of remission, patients of the Outpatient Clinic of the Psychiatry Clinic of the University of Medical Sciences in Poznań, and of 15 healthy subjects (control group). Thirty patients with bipolar disorder were divided into two subgroups.

The first one, Bipolar Li(+), consisted of 15 subjects (5 men and 10 women, mean age: 55 ± 6) receiving long-term treatment with lithium for 8–40 years (mean 16 years), with the average duration of the illness of 24 ± 9 years. The serum lithium concentration was 0.5–0.8 mmol/L (mean: 0.73 mmol/L). Additionally, 6 patients in this subgroup were treated with carbamazepine. Other drugs taken by the patients included the following:

venlafaxine (3 subjects), quetiapine (3 subjects), fluoxetine (2 subjects), trazodone (2 subjects), tianeptine (1 subject), clomipramine (1 subject), bupropion (1 subject), mirtazapine (1 subject) and escitalopram (1 subject).

The second subgroup, Bipolar Li(-), consisted of 15 patients (5 men, 10 women, average age: 53 ± 7 years), with the duration of the disorder exceeding 10 years (average: 20 ± 9 years, ranging from 10 to 44 years), who were never treated with lithium. Mood stabilisers taken by the patients included the following: valproic acid/sodium valproate (7 subjects), lamotrigine (6 subjects) and carbamazepine (3 subjects). Other medicines taken by the patients included the following: quetiapine (5 subjects), venlafaxine (3 subjects), sertraline (2 subjects), paroxetine (1 subject), fluoxetine (1 subject), escitalopram (1 subject), trazodone (1 subject), clomipramine (1 subject), olanzapine (1 subject) and clozapine (1 subject).

The control group consisted of 15 subjects (5 men, 10 women, mean age: 50 ± 5 years), with no history of psychiatric disorders, matching the study group in terms of age, gender and BMI.

The study exclusion criteria included the following: comorbid mental disorders, addiction to alcohol or other psychoactive substances, perinatal/neurodevelopmental disorders, organic brain damage, acute phase of immunological diseases, infection, glucose intolerance, diabetes or any other disease which could affect results of the study. Study participants were informed that intense exercise or dietary restrictions are not allowed before blood samples are taken.

The study received the approval of the Bioethics Committee of the University of Medical Sciences in Poznań. Each subject, having received all the necessary information, gave their informed consent to participate in the study.

Methods

A 10 ml of fasten venous blood sample was taken in the morning from each subject. The blood was centrifuged (for 10 minutes at 20 °C) and obtained plasma was frozen at - 80 °C. The plasma was thawed to room temperature before determinations were done.

The S1P level was determined by reversed-phase high performance liquid chromatography. EDTA plasma and an internal standard C17-S1P (Avanti Polar Lipids) were thawed at room temperature (for at least 30 minutes). 100 µl of EDTA plasma was transferred into a test tube and 30 µl of an internal standard C17-S1P [10-fold diluted in a mixture of 10 mM of K₂HPO₄ and methanol (MetOH) (v/v, 15:85), pH: 7.2] was added. At the same time, a mixture of standards was prepared containing 30 µl of an internal standard C17-S1P (10-fold diluted by K₂HPO₄:MetOH mixture, pH: 7.2) and 30 µl of an internal standard C18-S1P (10-fold diluted in K₂HPO₄:MetOH mixture, pH: 7.2). Samples were mixed (vortex mixer)

and then 1M NaCl solution was added to reach the volume of 1 ml. Then, they were mixed once again (vortex mixer) for approximately 30 seconds and 1 ml of methanol and 300 µl of concentrated hydrochloric acid were added. Subsequent stages included, after approximately 1 minute of mixing (vortex mixer), adding 2 ml of chloroform, mixing using a mixer (20 minutes, 900 rpm) and centrifugation (3 minutes, 3,500 rpm, 20 °C). The separated lower organic phase was transferred into a new test tube and the upper organic phase was subject to retrograde extraction (2 ml of chloroform, mixing: 15 minutes, 900 rpm, and centrifugation: 3 minutes, 3,500 rpm, 20 °C). The lower organic phase was mixed with the one that had been taken earlier and dried in a vacuum centrifuge for approximately 45 minutes at 45 °C (RVC 2-25 CD). Immediately before the analytical measurement, dried extracts were dissolved in 130 µl of methanol and 20 µl of OPA reaction mixture (5 mg of o-phthalaldehyde, 100 µl of methanol, 5 µl of mercaptoethanol and 5 ml of boric acid, pH: 10.5) was added.

At the same time, a mixture of standards, containing 30 µl of an internal standard C17-S1P and 30 µl of an internal standard C18-S1P was prepared, to which 940 µl of K₂HPO₄:MetOH mixture, pH: 7.2, was added. Then, 600 µl were transferred into a new test tube and 75 µl of OPA reaction mixture was added.

All test tubes with OPA were incubated in a dark place at the room temperature for 20 minutes and then centrifuged (10 minutes, 6,000 rpm, 20 °C). The received clear supernatant was transferred into a new test tube, 20 µl of 10 mM K₂HPO₄ buffer, pH: 7.2, was added, incubated for 10 minutes at +4 °C and once again centrifuged (5 minutes, 6,000 rpm, 20 °C). After centrifugation, the supernatant was transferred into a clean vial and analysed by RP-HPLC using a Hewlett Packard Series 1200 chromatograph. Chromatography data was prepared using HP Chemstation software (Agilent, USA). Separation in the reversed phase system was performed on a Cosmosil 5 µm C18-ARII (150 × 4.6) column with a 5 µm C18-ARII (10 × 4.6) pre-column (Waters). The column temperature was 25 °C. The isocratic method with the mobile phase composed of 10 mM K₂HPO₄ (pH: 5.5) and methanol (15:85; v/v) was used. The flow rate was 1 ml/min. 50 µl samples were injected every 30 minutes. The wavelength for the detection of derivatives of S1P was 340 nm for excitation and 455 nm for emission. The basis for calculations of the S1P level was the area of the peak of an internal standard C17-S1P.

SDF-1 levels were determined by the ELISA technique using a Human CXCL12/SDF-1 ELISA Kit reagent (R&D Systems). Components C3a, C5a and C5b-9 of the complement system were determined by the ELISA method using Human C3a ELISA Kit, Human C5a ELISA Kit and Human C5b-9 ELISA Kit reagents (BD OptEIA).

The number of stem cells (CD34+ VSELs, CD133+ VSELs) was determined by means of flow cytometry in accordance

with the guidelines described by Zuba-Surma and Ratajczak (2010). Markers of pluripotent cells (Oct-4, Sox2 and Nanog) were determined by RealTime PCR – qPCR technique. Detailed methodology and the results of analyses of the above factors in peripheral blood of patients were presented in previous publications (Ferensztajn-Rochowiak *et al.* 2016, Ferensztajn-Rochowiak *et al.* 2017).

Statistical calculations were performed using Statistica (StatSoft-Polska), ver. 10. The analysed parameters were compared within the three groups: Bipolar Li(+), Bipolar Li(-) and control group. The Shapiro-Wilk test was used to check data distribution. When the data was consistent with the normal distribution, the ANOVA variance analysis method was applied and when the data was not consistent with the normal distribution, the Kruskal-Wallis test was used. Correlations were calculated in each group using the Pearson correlation coefficient (when the data was consistent with the normal distribution) and Spearman's rank correlation coefficient (in other cases). The significance level (*p*) lower than 0.05 was assumed as significant.

Results

Information about the study group is shown in Table 1. The study groups did not differ in terms of clinical parameters. In the group treated with lithium (Bipolar Li[+]), significantly higher C5b-9 levels (302 ng/ml) were observed in women than in men (198 ng/ml).

Table 1 Clinical characteristic of patients with bipolar disorder treated with lithium – Bipolar Li(+), never treated with lithium – Bipolar Li(-) and control group

	Bipolar Li(+) <i>n</i> = 15	Bipolar Li(-) <i>n</i> = 15	Control group <i>n</i> = 15
M/W	5/10	5/10	5/10
Age [years]	55 ± 6	53 ± 7	50 ± 5
BMI [kg/m ²]	26 ± 6	28 ± 4	25 ± 3
Duration of the disorder [years]	24 ± 9	20 ± 9	–
Duration of treatment with lithium [years]	16 ± 8	–	–
Duration of treatment with other mood stabiliser [years]	–	9 ± 6	–
Serum lithium level [mmol/l]	0.73 ± 0.2	–	–

The results of the determination of the levels of S1P, SDF-1, C3a, C5a and C5b-9 in individual groups are shown in Table 2. No significant differences in the levels of the analysed factors between the three groups were observed.

Correlations between component C5a of the complement system and the number of CD34+ VSELs, CD133+

Table 2 Serum levels of chemoattractants S1P, SDF-1 and complement component C3a, C5a, C5b-9 in patients treated with lithium – Bipolar Li(+), never treated with lithium – Bipolar Li(-) and in control group

	Bipolar Li(+)	Bipolar Li(-)	Control group
S1P [nmol/ml]	7.62 ± 1.5	7.73 ± 1.1	8.57 ± 1.2
S1P [ng/ml]	2785.4 ± 541.6	2824.5 ± 413.8	3133.2 ± 421.4
SDF-1 [pg/ml]	2695.0 ± 340.2	2812.1 ± 323.5	2872.2 ± 346.2
C3a [ng/ml]	679.4 ± 56.6	685.8 ± 74.3	698.8 ± 48.5
C5a [ng/ml]	137.0 ± 79.3	148.0 ± 103.1	123.6 ± 83.5
C5b-9 [ng/ml]	267.6 ± 80.4	286 ± 128	277.9 ± 129.1

S1P – sphingosine-1-phosphate, SDF-1 – stromal cell-derived factor, C3a, C5a, C5b-9 – components of the complement system

VSELs and stem cell pluripotency markers are shown in Table 3. In the group of subjects not treated with lithium (Bipolar Li[-]), a negative correlation between component C5a [ng/ml] and the number of CD34+ VSELs/ul, number of CD133+VSELs and % of CD133+ VSELs ($p = 0.01$, $p = 0.017$ and $p = 0.011$ respectively) was found. Furthermore, the levels of component C5a of the complement system were negatively correlated with the levels of markers Oct-4, Sox2 and Nanog in this group ($p = 0.047$, $p = 0.009$, $p = 0.012$ respectively). In the control group, the level of component C5a of the complement system was negatively correlated with the number of CD34+ VSELs/ul.

No significant correlations were found between the clinical data (gender, age, height, weight, BMI and duration of the disorder) and the analysed factors S1P, SDF-1, C3a, C5a and C5b-9 in the Bipolar Li(+) group, Bipolar Li(-) group and control group.

stabilisers other than lithium as compared to the control group. The higher (on average) age of our group of patients and healthy subjects as compared to the groups of study participants in Szczecin centre may be one of the reasons for this difference.

Significant changes in the levels of the analysed substances were described in psychotic disorders (Kucharska-Mazur *et al.* 2014) and anxiety disorders (Jabłoński *et al.* 2017). In the first study, patients were in the course of a psychotic episode which, as the authors suggest, may be a situation requiring the activation of regenerative processes, mobilisation of stem cells to peripheral blood and changes in the levels of chemoattractants. In the study of Jabłoński *et al.* (2017), the mean duration of the anxiety disorder was 4 years and the mean duration of treatment was short (24 days), which may partly explain the reduction in the levels of chemoattractants as failure to achieve remission at the level of biological factors.

Lack of differences between the groups may also be explained by the fact that our patients were additionally treated with antidepressants and antipsychotics. Similar conclusions were presented by Maes *et al.* (1997) in their study. They found an increase in the levels of C3 and C4 proteins in patients with schizophrenia and depression. Changes were more pronounced in patients who did not take drugs and the groups did not differ if patients were treated with antidepressants, antipsychotics or lithium.

However, our study showed a significant correlation in patients not treated with lithium between

Summary

In the present study, no differences in the levels of S1P, SDF-1 and components of the complement system were found between subjects with bipolar disorder treated with lithium, not treated with lithium and the control group. Our study did not confirm the results obtained by Kucharska-Mazur *et al.* (2017) who found higher levels of SDF-1, C3a, C5a and C5b-9 in the group of 30 subjects with bipolar disorder in remission treated with mood

Table 3 Selected correlations between levels of complement component C5a [ng/ml] and number of stem cells VSELs/[μl] and pluripotency markers (Oct4, Sox2, Nanog)

	Stem cells and pluripotency markers	Bipolar Li(+)	Bipolar Li(-)	Control group
C5a &	CD34+ VSELs/[μl]	$R = 0.24$ $p=0.38$	$R = -0.62$ * $p = 0.013$	$R = -0.57$ * $p = 0.027$
	CD133+ VSELs/[μl]	$R = -0.03$ $p = 0.92$	$R = -0.6$ * $p = 0.017$	$R = -0.25$ $p = 0.37$
	% CD133+ VSELs/[μl]	$R = -0.11$ $p = 0.69$	$R = -0.6$ * $p = 0.011$	$R = -0.23$ $p = 0.42$
	Oct4	$R = -0.032$ $p = 0.9$	$R = -0.54$ * $p=0.045$	$R = 0.1$ $p = 0.7$
	Sox2	$R = 0.16$ $p = 0.57$	$R = -0.67$ * $p=0.009$	$R=0.05$ $p = 0.85$
	Nanog	$R = 0.07$ $p = 0.81$	$R = -0.64$ * $p=0.012$	$R = 0.35$ $p = 0.2$

* $p < 0.05$ – statistical significance

Oct-4 – octamer-binding transcription factor 4; Sox 2 – sex determining region Y-box 2; Nanog – homeobox protein; VSELs – very small embryonic-like stem cells

component C5a of the complement system and the number of CD34+ VSELs, similarly as in the case of the control group. Furthermore, in the group not treated with lithium, component C5a was negatively correlated with the number and % of CD133+ VSELs, as well as all three stem cell pluripotency markers, i.e. Oct-4, Sox2 and Nanog. The obtained results may correspond to the results of the previous study, in which we found a significant increase in the number of CD34+ VSELs in peripheral blood of patients with bipolar disorder not treated with lithium (Ferensztajn-Rochowiak *et al.* 2017). Negative correlations between component C5a of the complement system and the number of CD34+ and CD133+ VSELs and pluripotency markers may indirectly indicate an important role of component C5a of the complement system in the mobilisation of VSELs to peripheral blood in patients with bipolar disorder not treated with lithium.

In patients treated with lithium, similarly as in the case of subjects from the control group, no correlations were found between component C5a and VSELs (except

for CD34+ VSELs) and transcription factors. The obtained results may indicate similarity between healthy subjects and patients with bipolar disorder during long-term treatment with lithium in terms of the impact of component C5a of the complement system on the regulation of mobilisation of CD133+ VSELs and on transcription factors. In the study on stem cells in peripheral blood of patients with bipolar disorder, a similar number of VSELs, MSCs and EPCs was observed in patients receiving long-term treatment with lithium and in healthy subjects, which suggests that the long-term use of lithium may inhibit excessive activation of regenerative processes in patients with bipolar disorder (Ferensztajn-Rochowiak *et al.* 2017).

A small group of patients (30 subjects), who were additionally taking different antidepressants and antipsychotics, was a limitation to the study. The strong point of the study was a well-defined population of patients with bipolar disorder (mean duration of the illness: 22 years), the half of whom was receiving long-term treatment with lithium (mean 16 years). ■

Wstęp

W ostatnich latach intensywnie rozwijają się badania nad komórkami macierzystymi (SC – *stem cells*), które znalazły swoje miejsce także w dziedzinie psychiatrii (Ratajczak i wsp. 2014). W 2007 roku zespół szczeciński pod kierunkiem prof. Ratajczaka zidentyfikował w ludzkiej krwi pępowinowej nową populację komórek macierzystych, tak zwane bardzo małe embrionalno-podobne komórki macierzyste (VSELs – *very small embryonic-like stem cells*) (Kucia i wsp. 2007). W kolejnych latach opisano występowanie komórek VSELs w szpiku kostnym (Kucia i wsp. 2008) i krwi obwodowej człowieka (Sovalat i wsp. 2011), potwierdzając hipotezę, iż pluripotencjalne komórki macierzyste rezydują w tkankach osób dorosłych, stanowiąc pozostałość po okresie rozwoju embrionalnego.

Komórki VSELs są obecne w szpiku kostnym oraz we krwi obwodowej, gdzie krążą w bardzo niewielkiej, stałej liczbie, stanowiąc pulę rezerwową pluripotencjalnych komórek macierzystych o określonym potencjale regeneracyjnym. W nagłych sytuacjach, stanowiących zagrożenie dla organizmu (m.in. zawał serca, udar mózgu, uszkodzenie tkanek lub narządów) oraz wymagających natychmiastowej aktywacji mechanizmów regeneracyjnych, liczba ta zwiększa się, gdyż komórki są mobilizowane do krwi obwodowej ze szpiku kostnego. W sytuacjach przewlekłego stanu zapalnego może natomiast dochodzić do nieprawidłowego procesu mobilizacji komórek VSELs ze szpiku, co także prowadzi do zwiększenia ich liczby we krwi obwodowej.

W 2014 roku zespół szczeciński przedstawił wyniki badania liczby komórek macierzystych VSELs we krwi obwodowej pacjentów z rozpoznaniem pierwszego epizodu psychotycznego, u których stwierdzono istotnie wyższą liczbę komórek CD34+ VSELs we krwi obwodowej w porównaniu z grupą kontrolną. Autorzy sugerują, iż komórki CD34+ VSELs mogą stanowić marker pierwszego epizodu psychotycznego (Kucharska-Mazur i wsp. 2014). W 2017 roku opublikowano wyniki badań ośrodka poznańskiego nad liczbą komórek VSELs, hematopoetycznych komórek macierzystych (HSCs – *hematopoietic stem cells*), mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs – *mesenchymal stem cells*), endotelialnych komórek progenitorowych (EPCs – *endothelial progenitor cells*) we krwi obwodowej pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową (ChAD) (Ferensztajn-Rochowiak i wsp. 2017). U osób nieleczonych litem (średni czas trwania choroby 20 lat) stwierdzono wyższą liczbę komórek CD34+ VSELs w porównaniu z grupą kontrolną oraz korelację z długością choroby. U osób leczonych długotrwale litem liczba komórek CD34+ VSELs była podobna jak u osób zdrowych oraz korelowała negatywnie z długością stosowania litu oraz stężeniami litu w surowicy. Autorzy sugerują, iż zwiększona liczba CD34+ VSELs może stanowić biologiczny marker ChAD i jej progresji u osób nieleczonych litem, natomiast leczenie litem może hamować aktywację procesów nadmiernej regeneracji. W 2017 roku przedstawiono również wyniki badań nad komórkami macierzystymi u pacjentów z lękiem napadowym. Stwierdzono niższą liczbę komórek CD133+

VSELs u pacjentów z napadami paniki przed leczeniem, w porównaniu ze stanem po leczeniu w tej grupie (Jałłoński i wsp. 2017).

Komórki macierzyste charakteryzuje ekspresja tak zwanych markerów pluripotencji, które świadczą o wspólnych właściwościach komórek pluripotencjalnych i embrionalnych, takich jak zdolność do samoodnowy oraz różnicowania do komórek ze wszystkich trzech listków zarodkowych. Do najważniejszych markerów pluripotencji należą takie czynniki transkrypcyjne, jak Oct-4 (*octamer-binding transcription factor 4*), Sox2 (*sex determining region Y-box 2*) i Nanog. Odpowiadają one za procesy prawidłowej wymiany komórkowej (*cell turnover*) między innymi w ośrodkowym układzie nerwowym, gdzie najlepiej została udokumentowana rola czynnika Sox2 (Ellis i wsp. 2004). W 2016 roku opublikowano wyniki badania czynników transkrypcyjnych we krwi obwodowej pacjentów z ChAD. Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję wszystkich trzech markerów pluripotencji, Oct-4, Sox2 i Nanog u osób nieleczonych litem z długim przebiegiem choroby (20 lat), w porównaniu z grupą kontrolną. Wyniki te korelowały także pozytywnie z liczbą komórek CD34+ VSELs w tej grupie. Może to wskazywać, iż nadmierna ekspresja czynników transkrypcyjnych u osób z wieloletnim przebiegiem ChAD nieleczonych litem może stanowić element patogenezы ChAD i potencjalny biologiczny marker ChAD. Natomiast długotrwałe leczenie litem może hamować nadmierne procesy regeneracji (Ferensztajn-Rochowiak i wsp. 2016).

Mobilizacja komórek macierzystych, między innymi VSELs, ze szpiku do krwi obwodowej zachodzi pod wpływem tak zwanych chemoatraktantów, na przykład sfingozyno-1-fosforanu (S1P – *phingosine-1-phosphate*), czynnika pochodzenia stromalnego (SDF-1 – *stromal cell-derived factor 1*) oraz elementów układu immunologicznego należących do odporności wrodzonej (nieswoistej), na przykład układu dopełniacza, granulocytów, przeciwciał oraz rodziny receptorów Toll podobnych (TLRs) (Ratajczak i wsp. 2010a).

Sfingozyno-1-fosforan (S1P) należy do klasy sfingolipidów występujących w błonach komórkowych (Sałata i wsp. 2012). Wpływa głównie na migrację, adhezję i różnicowanie komórek, a także promuje wzrost i przeżywalność komórek, wywierając efekt antyapoptotyczny. W ostatnim czasie opisano rolę S1P jako kluczowego chemoatraktanta, którego gradient stężeń (wzrastające stężenie w osoczu) reguluje uwalnianie różnych rodzajów komórek macierzystych, między innymi HSC, MSC czy VSELs z nisz szpiku kostnego do krwi obwodowej, a stamtąd do uszkodzonych narządów (Ratajczak i wsp. 2010b). Dzieje się tak na przykład w sytuacjach uszkodzenia i regeneracji tkanek, czy w stanach zapalnych, a istotną rolę w tym procesie odgrywa aktywacja układu dopełniacza. Zmiany stężeń S1P opisano między innymi w zaburzeniach psychotycznych (Kucharska-Mazur i wsp. 2014). W kilku badaniach opisano związek między

S1P a ChAD. W badaniu Xu i wsp. (2014), korzystając z techniki GWAS, w powiązaniu z badaniem opartym na modelu rodzinnym ChAD (229 rodzin) wykazano związek w miejscu 1q21.2, gdzie najbliższy gen związany jest z receptorem na S1P (S1PR1 – *sphingosine-1-phosphate receptor 1 gene*). Nakagawa i Chiba (2015) wskazują na potencjalnie korzystną przeciwzapalną i neuroprotekcijną rolę S1P w patogenezы chorób, między innymi ChAD, w których istotnym elementem jest aktywacja mikrogleju (zaburzona równowaga fenotypów M1 i M2 magrofażów). Tokac i wsp. (2016) w badaniu polimorfizmów chemokin i ich receptorów w grupie 200 pacjentów z ChAD wykazali, że częstość występowania genotypu C138T C+ receptora CXCR4 wiąże się ze zwiększonym ryzykiem ChAD, przy czym nie potwierdzono istotności statystycznej po zastosowaniu korekcji Bonferroniego.

Czynnik pochodzenia stromalnego (SDF-1, *stromal cell-derived factor 1*, CXCL12) jest chemokiną, odpowiedzialną głównie za utrzymanie komórek macierzystych w obrębie szpiku kostnego, natomiast w mniejszym stopniu reguluje ich uwalnianie do krwi obwodowej (Ratajczak i wsp. 2010b). Zmiany stężeń SDF-1 opisano w kilku zaburzeniach psychiatrycznych, między innymi zaburzeniach psychotycznych (Fernandez-Egea i wsp. 2009) czy lękowych (Ogłodek i wsp. 2015). Ogłodek i wsp. (2016) nie wykazali różnic w stężeniach SDF-1 i jego receptora CXCR4 u pacjentów z zaburzeniem lęku napadowego oraz u osób z zaburzeniami osobowości, w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano związku między polimorfizmem genu SDF-1 3'α a ryzykiem schizofrenii (Dasdemir i wsp. 2016). Laske i wsp. (2008) opisali zmniejszone stężenia SDF-1 w osoczu pacjentów z wczesną postacią choroby Alzheimera, które korelowały negatywnie ze stężeniami białka tau w płynie mózgowo-rdzeniowym. Garcia-Marchena i wsp. (2017) stwierdzili obniżone stężenie SDF-1 w osoczu pacjentów nadużywających alkoholu.

Układ dopełniacza tworzą tak zwane białka ostrej fazy, wspomagające nieswoistą (wrodzoną) odporność organizmu przeciw patogenom (Nesargikar i wsp. 2012). Większość badań opisujących nieprawidłowości w funkcjonowaniu układu dopełniacza w zaburzeniach psychicznych dotyczy schizofrenii. Mayilyan i wsp. (2008) opisują podwójną rolę kaskady dopełniacza w schizofrenii – neuroprotekcijną w zakresie etiologii oraz neurodegeneracyjną w zakresie patogenezы. W wielu badaniach opisywano zmiany stężeń składowych dopełniacza u osób z ChAD. Przykładowo Wadee i wsp. (2002) stwierdzili zwiększenie stężeń składowych C3, C6 i czynnika B u pacjentów z epizodem manii. Santos Sória i wsp. (2012) stwierdzili, że stężenia czynników C3 i C4 u pacjentów z ChAD w okresie eutyminii są na poziomie podobnym do grupy kontrolnej. Akcan i wsp. (2017) stwierdzili, że stężenia badanych składowych dopełniacza były istotnie niższe u pacjentów z przebiegiem przewlekłym ChAD, w porównaniu z osobami z pierwszym epizodem i grupą kontrolną. Autorzy sugerują, że obniżenie stężeń

składowych układu dopełniacza wiąże się z ich nadmierną aktywacją i zużyciem, co kompensowane jest przez nasilenie ekspresji ich genów oraz wzrost stężeń mRNA we krwi obwodowej.

Kucharska-Mazur i wsp. (2014) opisali obniżone stężenia S1P i C3a we krwi obwodowej pacjentów z pierwszym epizodem psychotycznym, gdzie czynniki te mogą stanowić predyktory ryzyka oraz nowe markery tego procesu. U pacjentów z ChAD nigdy nieleczonych litem stwierdzono podwyższone stężenia składowych C3a, C5a, C5b-9 dopełniacza i SDF-1, w porównaniu z grupą kontrolną oraz brak różnic w stężeniach S1P (Kucharska-Mazur i wsp. 2017). Autorzy sugerują potencjalną rolę powyższych czynników w etiologii ChAD, wskazując na udział procesów regeneracyjnych. U pacjentów z lękiem napadowym opisano niższe stężenia wszystkich badanych czynników: C3a, C5a, C5b-9, SDF-1 i S1P, zarówno przed, jak i po leczeniu, w porównaniu z grupą kontrolną. (Jabłoński i wsp. 2017).

Celem niniejszej pracy była ocena stężeń sfingozyno-1-fosforanu (S1P), czynnika pochodzenia stromalnego (SDF-1) oraz składowych C3a, C5a i C5b-9 dopełniacza we krwi obwodowej pacjentów z ChAD, leczonych i nieleczonych litem oraz ich relacji z komórkami macierzystymi *very small embryonic like* (VSEL) oraz markerami komórek pluripotencjalnych Oct-4, Sox2 i Nanog.

Metody

Grupa badana

Grupa badana składała się z 30 osób z chorobą afektywną dwubiegunową w okresie remisji, będących pacjentami Poradni Przyklinicznej Kliniki Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu oraz z 15 zdrowych osób, stanowiących grupę kontrolną. Spośród 30 osób z ChAD wyróżniono dwie podgrupy pacjentów.

Pierwszą z nich, Bipolar Li(+), stanowiło 15 osób (5 mężczyzn i 10 kobiet, średnia wieku 55 ± 6) leczonych długotrwale litem przez 8–40 lat (średnio 16 lat), o średnim czasie trwania choroby 24 ± 9 lat. Stężenie litu we krwi wynosiło 0,5–0,8 mmol/l (średnio 0,73 mmol/l). Dodatkowo 6 osób w tej podgrupie leczonych było karbamazepiną. Pozostałe stosowane leki to wenlafaksyna (3 osoby), kwetiapina (3 osoby), fluoksetyna (2 osoby), trazodon (2 osoby), tianeptyna (1 osoba), klomipramina (1 osoba), bupropion (1 osoba), mirtazapina (1 osoba), escitalopram (1 osoba).

Do drugiej podgrupy, Bipolar Li(-), należało 15 osób (5 mężczyzn, 10 kobiet, średnia wieku 53 ± 7 lat), o czasie trwania choroby powyżej 10 lat (średnia 20 ± 9 lat, rozpiętość 10–44 lata), które nigdy nie były leczone litem. Stosowane leki normotymiczne obejmowały kwas walproinowy/walproinian sodu (7 osób), lamotryginę (6 osób), karbamazepinę (3 osoby). Pozostałe stosowane leki

to kwetiapina (5 osób), wenlafaksyna (3 osoby), sertralina (2 osoby), paroksetyna (1 osoba), fluoksetyna (1 osoba), escitalopram (1 osoba), trazodon (1 osoba), klomipramina (1 osoba), olanzapina (1 osoba), klozapina (1 osoba).

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

Do czynników wykluczających udział w badaniu należały: współchorobowość w zakresie zaburzeń psychicznych, uzależnienie od alkoholu lub innych substancji psychoaktywnych, zaburzenia okołoporodowe/neurorozwojowe, organiczne uszkodzenie mózgu, zaostrzenie chorób immunologicznych, obecność infekcji, nietolerancja glukozy, cukrzyca lub każda inna istotna jednostka chorobowa, która mogłaby wpłynąć na wynik badania. Osoby uczestniczące w badaniu zostały poinformowane, że intensywne ćwiczenia lub ograniczenia dietetyczne są niedozwolone przed pobraniem próbek krwi.

Badanie uzyskało zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu. Każda z badanych osób udzieliła świadomej zgody na badanie, po udzieleniu wszelkich niezbędnych informacji.

Metody

Od każdego pacjenta na czczo, w godzinach porannych pobrano próbkę 10 ml krwi żyłnej. Krew odwirowano (przez 10 min w temperaturze 20°C), a uzyskane osocze zamrożono w temperaturze -80°C , które przed wykonaniem oznaczeń rozmrożono do temperatury pokojowej.

Oznaczenia S1P wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (*reversed phase high-performance liquid chromatography*). Osocze EDTA oraz wzorzec wewnętrzny C17-S1P (Avanti Polar Lipids) rozmrażano w temperaturze pokojowej (minimum 30 minut). Do próbki przenoszono 100 μl osocza EDTA i dodawano 30 μl wzorca wewnętrznego C17-S1P (10-krotnie rozcieńczonego w mieszaninie 10 mM K_2HPO_4 i metanolu [MetOH] [v/v, 15:85] o pH 7,2). Jednocześnie przygotowywano mieszaninę wzorców zawierającą 30 μl wzorca wewnętrznego C17-S1P (10-krotnie rozcieńczonego mieszaniną K_2HPO_4 :MetOH o pH 7,2) i 30 μl wzorca wewnętrznego C18-S1P (10-krotnie rozcieńczonego w mieszaninie K_2HPO_4 :MetOH o pH 7,2). Próbkę mieszano (vorteks), a następnie dopełniano do 1 ml 1 M roztworem NaCl, ponownie mieszano (vorteks) około 30 sekund i dodawano 1 ml metanolu i 300 μl stężonego kwasu solnego. W kolejnym etapie po około minutowym mieszanii (vorteks) dodawano 2 ml chloroformu, mieszano na mieszadle (20 minut, 900 rpm) i wirowano (3 minuty, 3500 rpm, 20°C). Oddzielona dolna faza organiczna była przenoszona do nowej próbki, a górna faza była poddawana reekstrakcji (2 ml chloroformu, mieszanie – 15 minut, 900 rpm i wirowanie – 3 minuty, 3500 rpm, 20°C). Dolna faza organiczna

była łączona z wcześniej zebraną i suszona w wirówce próżniowej przez około 45 minut w temperaturze 45°C (RVC 2–25 CD). Wysuszone ekstrakty bezpośrednio przed pomiarem analitycznym rozpuszczano w 130 µl metanolu i dodawano do niego 20 µl mieszaniny reakcyjnej OPA (5 mg dialdehydu o-ftalowego, 100 µl metanolu, 5 µl merkaptotetanolu, 5 ml kwasu borowego w pH 10,5).

Jednocześnie przygotowywano mieszaninę wzorców zawierającą 30 µl wzorca wewnętrznego C17-S1P i 30 µl wzorca wewnętrznego C18-S1P, do których dodawano 940 µl mieszaniny K₂HPO₄:MetOH o pH 7,2. Następnie przenoszono 600 µl do nowej probówki i dodawano 75 µl mieszaniny reakcyjnej OPA.

Wszystkie próbki z OPA inkubowano w ciemnym miejscu, w temperaturze pokojowej przez 20 minut, a następnie wirowano (10 minut, 6000 rpm, 20°C). Powstały klarowny supernatant przenoszono do nowej probówki, dodawano do niego 20 µl 10 mM buforu K₂HPO₄ o pH 7,2, inkubowano 10 minut w temperaturze +40°C i ponownie wirowano (5 minut, 6000 rpm, 20°C). Po wirowaniu supernatant przenoszono do czystej fiolki i analizowano metodą RP-HPLC za pomocą chromatografu Hewlett Packard Series 1200. Dane chromatograficzne były opracowane z wykorzystaniem oprogramowania HP Chemstation (Agilent, USA). Rozdział w układzie z odwróconymi fazami przeprowadzono na kolumnie Cosmosil 5 µm C18-ARII (150 × 4,6) z prekolumną 5 µm C18-ARII (10 × 4,6) (Waters). Temperatura kolumny wynosiła 25°C. Zastosowano metodę izokratyczną z fazą ruchomą złożoną z 10 mM K₂HPO₄ (pH 5,5) i metanolu (15:85; v/v). Szybkość przepływu wynosiła 1 ml/min. Próbki o objętości 50 µl były nastrzykiwane co 30 minut. Długości fali dla detekcji pochodnych S1P wynosiła odpowiednio dla wzbudzenia 340 nm i emisji 455 nm. Podstawą do obliczeń stężenia S1P było pole powierzchni piku wzorca wewnętrznego C17-S1P.

Oznaczenia SDF-1 wykonano z zastosowaniem techniki ELISA z wykorzystaniem odczynnika Human CXCL12/SDF-1 ELISA Kit (R&D Systems). Oznaczenia składowych dopełniacza C3a, C5a, C5b-9 wykonano metodą ELISA, z wykorzystaniem odczynników Human C3a ELISA Kit, Human C5a ELISA Kit oraz Human C5b-9 ELISA Kit (BD OptEIA).

Ocenę liczby komórek macierzystych (CD34+ VSELs, CD133+ VSELs) przeprowadzono z użyciem cytometrii przepływowej, zgodnie z wytycznymi opisanymi przez Zuba-Surmę i Ratajczaka (2010), natomiast ocenę markerów komórek pluripotencjalnych (Oct4, Sox2, Nanog) przeprowadzono z wykorzystaniem techniki ilościowego PCR czasu rzeczywistego (RealTime PCR – qPCR). Szczegółową metodologię oraz wyniki badań powyższych czynników we krwi obwodowej pacjentów opisano w poprzednich publikacjach (Ferensztajn-Rochowiak i wsp. 2016, Ferensztajn-Rochowiak i wsp. 2017).

Obliczenia statystyczne wykonano za pomocą programu Statistica (StatSoft-Polska), wersja 10. Badane

parametry porównano między trzema grupami: Bipolar Li(+), Bipolar Li(-) oraz grupą kontrolną. Zastosowano test Shapiro-Wilka, aby sprawdzić rozkład danych. Gdy dane były zgodne z rozkładem normalnym, zastosowano metodę analizy wariancji ANOVA, natomiast gdy dane nie były zgodne z rozkładem normalnym – test Kruskala-Wallisa. Korelacje zostały obliczone w każdej z grup przy użyciu współczynnika korelacji liniowej Pearsona (gdy dane były zgodne z rozkładem normalnym) oraz współczynnika korelacji rang Spearmana (w pozostałych przypadkach). Jako znaczący przyjęto poziom istotności (*p*) mniejszy od 0,05.

Wyniki

Charakterystykę grupy badanej przedstawiono w tabeli 1. Badane grupy nie różniły się pod względem parametrów klinicznych. W grupie osób leczonych litem, Bipolar Li(+) stwierdzono u kobiet istotnie większe stężenia C5b-9 (302 ng/ml) niż u mężczyzn (198 ng/ml).

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

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

Wyniki stężeń badanych czynników S1P, SDF-1, C3a, C5a i C5b-9 w poszczególnych grupach przedstawiono w tabeli 2. Nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach badanych czynników pomiędzy trzema grupami.

Korelacje pomiędzy składową C5a dopełniacza a liczbą CD34+ VSELs, CD133+ VSELs oraz markerami pluripotencji komórek macierzystych przedstawiono w tabeli 3. W grupie osób nieleczonych litem Bipolar Li(-) uzyskano ujemną korelację między składową C5a [ng/ml] a liczbą CD34+ VSELs/ul, liczbą CD133+VSELs oraz %CD133+ VSELs (*p* = 0,01, *p* = 0,017 oraz *p* = 0,011, odpowiednio). Ponadto stężenia składowej dopełniacza C5a korelowały negatywnie ze stężeniami markerów Oct4, Sox2 i Nanog w tej grupie (*p* = 0,047, *p* = 0,009, *p* = 0,012, odpowiednio). W grupie kontrolnej stężenie

Tabela 2 Stężenie czynników chemotaktycznych S1P, SDF-1 oraz składowych dopełniacza C3a, C5a i C5b-9 w surowicy, w grupie osób leczonych litem – Bipolar Li(+), grupie osób nieleczonych litem – Bipolar Li(-) oraz w grupie kontrolnej

	Bipolar Li (+)	Bipolar Li (-)	Grupa kontrolna
S1P [nmol/ml]	7,62 ± 1,5	7,73 ± 1,1	8,57 ± 1,2
S1P [ng/ml]	2785,4 ± 541,6	2824,5 ± 413,8	3133,2 ± 421,4
SDF-1 [pg/ml]	2695,0 ± 340,2	2812,1 ± 323,5	2872,2 ± 346,2
C3a [ng/ml]	679,4 ± 56,6	685,8 ± 74,3	698,8 ± 48,5
C5a [ng/ml]	137,0 ± 79,3	148,0 ± 103,1	123,6 ± 83,5
C5b-9 [ng/ml]	267,6 ± 80,4	286 ± 128	277,9 ± 129,1

S1P – sfingozyno-1-fosforan, SDF-1 – czynnik pochodzenia stromalnego, C3a, C5a, C5b-9 – składowe dopełniacza

Tabela 3 Wybrane korelacje pomiędzy stężeniem składowej dopełniacza C5a [ng/ml] a liczbą komórek macierzystych VSELs/[μ l] oraz markerami pluripotencji (Oct4, Sox2, Nanog)

Komórki macierzyste i markery pluripotencji	Bipolar Li(+)	Bipolar Li(-)	Grupa kontrolna
C5a & CD34+ VSELs/[μ l]	$R = 0,24$ $p = 0,38$	$R = -0,62$ $*p = 0,013$	$R = -0,57$ $*p = 0,027$
CD133+ VSELs/[μ l]	$R = -0,03$ $p = 0,92$	$R = -0,6$ $*p = 0,017$	$R = -0,25$ $p = 0,37$
% CD133+ VSELs/[μ l]	$R = -0,11$ $p = 0,69$	$R = -0,6$ $*p = 0,011$	$R = -0,23$ $p = 0,42$
Oct4	$R = -0,032$ $p = 0,9$	$R = -0,54$ $*p = 0,045$	$R = 0,1$ $p = 0,7$
Sox2	$R = 0,16$ $p = 0,57$	$R = -0,67$ $*p = 0,009$	$R = 0,05$ $p = 0,85$
Nanog	$R = 0,07$ $p = 0,81$	$R = -0,64$ $*p = 0,012$	$R = 0,35$ $p = 0,2$

* $p < 0,05$ – istotność statystyczna

Oct-4 – octamer-binding transcription factor 4; Sox 2 – sex determining region Y-box 2; Nanog – homeobox protein; VSELs – bardzo małe embryonalnie podobne komórki macierzyste

składowej C5a dopełniacza korelowało negatywnie z liczbą komórek CD34 + VSELs/ μ l.

Nie uzyskano istotnych korelacji pomiędzy danymi klinicznymi (płeć, wiek, wzrost, masa ciała, BMI, długość choroby) a badanymi czynnikami S1P, SDF-1, C3a, C5a, C5b-9 w grupie Bipolar Li(+), Bipolar Li(-), ani w grupie kontrolnej.

Omówienie

W obecnym badaniu nie wykazano różnic w stężeniach S1P, SDF-1 i składowych dopełniacza wśród osób z ChAD leczonych litem, nieleczonych litem oraz grupą kontrolną. Badanie nasze nie potwierdziło wyników, jakie uzyskali Kucharska-Mazur i wsp. (2017), którzy stwierdzili wyższe stężenia SDF-1 oraz C3a, C5a i C5b-9 w grupie 30 osób z ChAD w okresie remisji, leczonych innymi niż lit lekami normotymicznymi, w porównaniu z grupą kontrolną. Jednym z powodów tej różnicy może być średnio wyższy wiek naszej grupy pacjentów i osób zdrowych w porównaniu z grupami badanymi w ośrodku szczecińskim.

Istotne zmiany w stężeniach badanych substancji opisywano w zaburzeniach psychiatrycznych (Kucharska-Mazur i wsp. 2014) i lękowych (Jabłoński i wsp. 2017). W pierwszym z badań pacjenci znajdowali się w trakcie trwania epizodu psychiatrycznego, który, jak sugerują autorzy, może stanowić dla organizmu sytuację wymagającą aktywacji procesów regeneracyjnych, mobilizację

komórek macierzystych do krwi obwodowej oraz zmiany stężeń czynników chemotaktycznych. W badaniu Jabłońskiego i wsp. (2017) średni czas trwania zaburzenia lękowego wynosił 4 lata, natomiast średni czas leczenia był krótki i wynosił 24 dni, co może częściowo tłumaczyć obniżenie stężeń czynników chemotaktycznych jako brak uzyskania remisji na poziomie czynników biologicznych.

Brak różnic między grupami może także tłumaczyć fakt, iż nasi pacjenci leczeni byli dodatkowo lekami przeciwdepresyjnymi i przeciwpsychotycznymi. Podobne wnioski przedstawili w swoim badaniu Maes i wsp. (1997), którzy stwierdzili zwiększenie stężeń białek C3 i C4 u pacjentów ze schizofrenią i depresją. Zmiany były bardziej nasilone u pacjentów, którzy nie pobierali leków, natomiast grupy nie różniły się między sobą, jeżeli pacjenci leczeni byli lekami przeciwdepresyjnymi, przeciwpsychotycznymi lub litem.

Badanie nasze wykazało jednak istotną korelację u osób nieleczonych litem między składową C5a dopełniacza a liczbą komórek CD34+ VSELs, podobnie jak w grupie kontrolnej. Ponadto, w grupie nieleczonych litem składowa C5a korelowała negatywnie z liczbą i % komórek CD133+ VSELs, a także z wszystkimi trzema markerami pluripotencji komórek macierzystych, to jest Oct-4, Sox-2 i Nanog. Uzyskane wyniki mogą korespondować z wynikami poprzedniego badania, gdzie wykazano istotne zwiększenie liczby komórek CD34+ VSELs we krwi obwodowej pacjentów z ChAD nieleczonych litem (Ferenztajn-Rochowiak i wsp. 2017). Ujemne

korelacje między składową C5a dopełniacza a liczbą komórek macierzystych CD34+ i CD133+ VSELS i markerami pluripotencji mogą pośrednio świadczyć o istotnej roli składowej C5a dopełniacza w mobilizacji komórek macierzystych VSELS do krwi obwodowej u pacjentów z ChAD nieleczonych litem.

U osób leczonych litem, podobnie jak u osób z grupy kontrolnej nie stwierdzono korelacji między składową C5a a komórkami VSELS (oprócz CD34+ VSELS) i czynnikami transkrypcyjnymi. Uzyskane wyniki mogą świadczyć o podobieństwie pomiędzy osobami zdrowymi oraz osobami z ChAD w trakcie długotrwałego leczenia litem w zakresie wpływu składowej C5a dopełniacza na regulację mobilizacji CD133+ VSELS oraz na czynniki

transkrypcyjne. W badaniu komórek macierzystych we krwi obwodowej pacjentów z ChAD stwierdzono podobną liczbę komórek VSELS, MSCs i EPCs u osób długotrwałe leczonych litem oraz u osób zdrowych, sugerując, że wieloletnie stosowanie litu może hamować nadmierną aktywację procesów regeneracyjnych u osób z ChAD (Ferenstajń-Rochowiak i wsp. 2017).

Ograniczeniem badania jest mała grupa pacjentów (30 osób), którzy dodatkowo leczeni byli różnymi lekami przeciwdepresyjnymi i przeciwpsychotycznymi. Zaletą badania jest natomiast dobrze zdefiniowana populacja pacjentów z ChAD (średnia długość choroby 22 lata), gdzie połowa z nich jest długotrwałe leczona litem (średnia 16 lat). ■

Conflict of interest and financial support not declared. / Nie zgłoszono konfliktu interesów oraz dofinansowania.

The work described in this paper 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.

Authors' contributions / Wkład autorów: EF-R – essential contribution to the concept and design of the study, data collection and interpretation, collection of references / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy, zebranie danych i ich interpretacja, zebranie piśmiennictwa; BD – essential contribution to the concept and design of the study / istotny wkład w koncepcję i projekt pracy; MB – laboratory analyses / wykonanie analiz laboratoryjnych; MM – statistical analysis and preparation of study results for analysis / analiza statystyczna i przygotowanie wyników badań do analizy; JS – essential contribution to the concept and design of the study / istotny wkład w koncepcję i projekt pracy; MR – essential contribution to the concept and design of the study / istotny wkład w koncepcję i projekt pracy; JR – essential contribution to the concept and design of the study, critical review as far as important intellectual content is concerned, approval of the final version to be published / zasadniczy wkład w koncepcję i projekt pracy, krytyczne zrecenzowanie pod kątem istotnej zawartości intelektualnej, akceptacja ostatecznej wersji do opublikowania.

References / Piśmiennictwo

- Akcan U, Karabulut S, İsmail Küçükali C, Çakır S, Tüzün E. Bipolar disorder patients display reduced serum complement levels and elevated peripheral blood complement expression levels. *Acta Neuropsychiatr.* 2017 Apr 12:1–9. doi: 10.1017/neu.2017.10. [Epub ahead of print]
- Dasdemir S, Kucukali CI, Bireller ES, Tuzun E, Cakmakoglu B. Chemokine gene variants in schizophrenia. *Nord J Psychiatry* 2016; 70: 407–412.
- Ellis P, Fagan BM, Magness ST, Hutton S, Taranova O, Hayashi S i wsp. Sox2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev. Neurosci.* 2004; 26: 148–165.
- Ferenstajń-Rochowiak E, Kucharska-Mazur J, Samocho-wiec 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* 2017; 18: 54–62.
- Ferenstajń-Rochowiak E, Tarnowski M, Samocho-wiec J, Michalak M, Ratajczak MZ, Rybakowski JK. Peripheral mRNA expression of pluripotency markers in bipolar disorder and the effect of long-term lithium treatment. *Pharmacol Rep.* 2016; 68: 1042–1045.
- García-Marchena N, Araos PF, Barrios V, Sánchez-Marín L, Chowen JA, Pedraz M i wsp. Plasma Chemokines in Patients with Alcohol Use Disorders: Association of CCL11 (Eotaxin-1) with Psychiatric Comorbidity. *Front Psychiatry* 2017; 7: 214.
- Jabłoński M, Mazur JK, Tarnowski M, Dołęgowska B, Pędzi-wiatr D, Kubiś E i wsp. Mobilization of Peripheral Blood Stem Cells and Changes in the Concentration of Plasma Factors Influencing their Movement in Patients with Panic Disorder. *Stem Cell Rev.* 2017; 13: 217–225.
- Kucharska-Mazur J, Reginia A, Jabłoński M, Dołęgowska B, Rybakowski J, Ratajczak MZ i wsp. The concentration of the factors involved in trafficking of stem cells in long-term treated bipolar disorder patients. *European Psychiatry* 2017; 41S: 206.
- Kucharska-Mazur J, Tarnowski M, Dołęgowska B, Budkow-ska M, Pędziwiatr D, Jabłoński M i wsp. Novel evidence for enhanced stem cell trafficking in antipsychotic-naïve subjects during their first psychotic episode. *J Psychiatr Res.* 2014; 49: 18–24.
- Kucia M, Halasa M, Wysoczynski M, Baskiewicz-Masiuk M, Moldenhawer S, Zuba-Surma E. 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.
- Kucia M, Wysoczynski M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 125–134

12. Laske C, Stellos K, Eschweiler GW, Leyhe T, Gawaz M. Decreased CXCL12 (SDF-1) plasma levels in early Alzheimer's disease: a contribution to a deficient hematopoietic brain support? *J. Alzheimer Dis.* 2008; 15: 83–95.
13. Maes M, Delange J, Ranjan R, Meltzer HY, Desnyder R, Cooremans W i wsp. Acute phase proteins in schizofrenia, mania and major depression: modulation by psychotropic drugs. *Psychiatry Res.* 1997; 66: 1–11.
14. Mayilyan KR, Weinberger DR, Sim RB. The complement system in schizofrenia. *Drug News Perspect.* 2008; 21: 200–210.
15. Nakagawa Y, Chiba K. Diversity and plasticity of microglial cells in psychiatric and neurological disorders. *Pharmacol Ther.* 2015; 154: 21–35.
16. Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. *Eur J Microbiol Immunol* 2012; 2: 103–111.
17. Ogłodek EA, Szota AM, Just MJ, Szromek AR, Araszkiewicz A. A study of chemokines, chemokine receptors and interleukin-6 in patients with panic disorder, personality disorders and their co-morbidity. *Pharmacol Rep.* 2016; 68: 756–763.
18. Ogłodek EA, Szota AM, Moś DM, Araszkiewicz A, Szromek AR. Serum concentrations of chemokines (CCL-5 and CXCL-12), chemokine receptors (CCR-5 and CXCR-4), and IL-6 in patients with posttraumatic stress disorder and avoidant personality disorder. *Pharmacol Rep.* 2015; 67: 1251–1258.
19. Ratajczak M, Kucharska-Mazur J, Samochowiec J. Badania nad komórkami macierzystymi i ich rosnący wpływ na współczesną psychiatrię. *Psychiatr Pol.* 2014; 48: 1073–1085.
20. Ratajczak MZ, Kim CH, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, Kucia M, Ratajczak J. Innate immunity as orchestrator of stem cell mobilization. *Leukemia.* 2010a; 24: 1667–1675.
21. Ratajczak MZ, Lee H, Wysoczynski M, Wan W, Marlicz W, Laughlin MJ i wsp. Novel insight into stem cell mobilization-plasma sphingosine-1-phosphate is a major chemoattractant that directs the egress of hematopoietic stem progenitor cells from the bone marrow and its level in peripheral blood increases during mobilization due to activation of complement cascade/membrane attack complex. *Leukemia.* 2010b; 24: 976–985.
22. Sałata D, Budkowska M, Dołęgowska B. Sfingozyno-1-fosforan – dyrygent wśród cząsteczek. *Post. Bioch.* 2012; 58: 281–291.
23. Santos Sória Ld, Moura Gubert Cd, Ceresér KM, Gama CS, Kapczinski F. Increased serum levels of C3 and C4 in patients with schizofrenia compared to eutymic patients with bipolar disorder and healthy. *Rev Bras Psiquiatr.* 2012; 34: 119–120.
24. Sovalat H, Scrofani M, Eidenschen A, Pasquet S, Rimelen V, Henon P. Identification and isolation from either adult human bone marrow or G-CSF-mobilized peripheral blood of CD34(+)/CD133(+)/CXCR4(+)/Lin(-)CD45(-) cells, featuring morphological, molecular, and phenotypic characteristics of very small embryonic-like (VSEL) stem cells. *Exp Hematol* 2011; 39: 495–505.
25. Tokac D, Tuzun E, Gulec H, Yilmaz V, Bireller ES, Cakmakoglu B i wsp. Chemokine and Chemokine Receptor Polymorphisms in Bipolar Disorder. *Psychiatry Investig.* 2016; 13: 541–548.
26. Wadee AA, Kuschke RH, Wood LA, Berk M, Ichim L, Maes M. Serological observations in patients suffering from acute manic episodes. *Hum Psychopharmacol.* 2002; 17: 175–179.
27. Xu W, Cohen-Woods S, Chen Q, Noor A, Knight J, Hosang G i wsp. Genome-wide association study of bipolar disorder in Canadian and UK populations corroborates disease loci including SYNE1 and CSMD1. *BMC Med Genet.* 2014; 15: 2.
28. 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.