

KRYSTYNA DOMAŃSKA-JANIK

Perspektywy zastosowania terapeutycznego komórek macierzystych w chorobach centralnego układu nerwowego

Nadzieje terapeutyczne związane z możliwościami otrzymywania *in vitro* praktycznie nielimitowanych ilości ludzkich zarodkowych komórek macierzystych (eKM) (Thomson 1998), które mogą różnicować się do wszystkich rodzajów komórek i tkanek organizmu, w praktyce napotykają wciąż na poważne trudności. Wynikają one zarówno z niepełnej wiedzy podstawowej na temat biologii samych KM, jak i braku wypracowanych standardów transplantacji (tx) zwiększających szansę przeżycia i podjęcia funkcji przeszczepianych komórek w organizmie biorcy. Spośród wielu patologii, w których podjęto już próby terapii komórkowej (głównie eksperymentalnej) na czoło wysuwają się schorzenia neurologiczne. Spowodowane jest to z jednej strony brakiem innych metod leczenia wielu z tych chorób, jak i stosunkowo większym zaawansowaniem badań podstawowych dotyczących różnicowania się komórek progenitorowych w podstawowe linie neuralne: neurony, astrocyty i oligodendrocyty.

W przedstawionej zbiorczej tabeli podano zestaw neurologicznych jednostek chorobowych, w których podjęto takie próby terapeutyczne (tabela 1).

Tabela 1. Zaawansowanie badań nad terapią regeneracyjną mózgu

	eKM	Neutralne sKM
	Przeprowadzane badania	
Udary i urazy	przedkliniczne	przed i kliniczne
Choroby degeneracyjne:		
PD	przedkliniczne	przed i kliniczne
HD	brak	przed i kliniczne
AD	brak	przedkliniczne
ALS	brak	przed i kliniczne
MS	brak	przed i kliniczne
Choroby metaboliczne	przedkliniczne	przed i kliniczne

Prof. dr hab. Krystyna Domańska-Janik, Zespół Neurobiologii Naprawczej
Instytut Medycyny Doświadczalnej PAN w Warszawie

Uderzające jest to, że w większości przypadków wykorzystano w nich nie szeroko rozpropagowane eKM, ale pochodzące z tkanek tzw. somatyczne komórki macierzyste (sKM). Wynika to głównie z ich większego bezpieczeństwa biologicznego, które zostało sprawdzone w czasie co najmniej 30-letniego okresu ich stosowania w hematologii, jak i innych zespołach chorobowych. Paradoksalnie te same cechy eKM, które stanowią o ich atrakcyjności jako źródła komórek terapeutycznych tzn. nielimitowana proliferacja i różnokierunkowość różnicowania, niosą ze sobą również duże zagrożenie nowotworowe. Standardem identyfikacji pluripotencjalności eKM jest ich zdolność do wytwarzania guzów nowotworowych (teratoma) po przeszczepie do immunosupresjonowanych zwierząt. Ta podstawowa cecha jest wzmacniana szczególną podatnością tych komórek na spontaniczne i sumujące się mutacje w czasie hodowli *in vitro*. Pierwsze linie eKM, wyprowadzone przez autora (Thomson 1998) i do dziś używane w wielu ośrodkach badawczych, okazały się ostatnio w wysokim procencie zmienione kariotypowo i genetycznie (Andrews 2004), wskazując, że od lat obserwowane spontaniczne transformacje spowodowane niestabilnością genetyczną eKM (Humphrys 2001) zachodzą również w sposób niekontrolowany *in vitro*. Nie są przed nimi chronione także nowo otrzymywane przez różne grupy badawcze, jak i w coraz szerszej ofercie komercyjnej, nowe linie ludzkich eKM (zbiorczo w Orive i wsp. 2003).

Tabela 2. Zestawienie cech krytycznych zarodkowych (eKM) i somatycznych (sKM) neuralnych KM w odniesieniu do możliwości ich użycia w przeszczepach tkankowych

Problem	eKM	Ukierunkowane neuralnie sKM			
		Pochodzenia mózgowego	Pochodzenia szpikowego	Z krwi pępowinowej	Inne
1. Łatwość pozyskania materiału	teoretycznie nieograniczona	ograniczona	duża	duża	różna
2. Namnażanie <i>in vitro</i>	nielimitowane	dobrze, lecz nietypowe	bardzo wysokie	bardzo wysokie	różne
3. Tx autologiczne	możliwe	ograniczone	możliwe	możliwe	różne
4. Tumorogenność	wysoka	niska lub brak			
5. Niestabilność genetyczna	wysoka	niska do umiarkowanej (w trakcie długiej ekspansji <i>in vivo</i>)			
6. Ukierunkowanie neutralne i stabilność różnicowania	niestabilne (możliwa korekcja genetyczna)	stabilne			
7. Migracja <i>in situ</i>		kontrowersyjne dane doświadczalne			
8. Proliferacja <i>in situ</i>		kontrowersyjne dane doświadczalne			

W tabeli 2 podano zestawienie cech, które, w prowadzonych obecnie badaniach klinicznych, zdecydowały o przewadze sKM jako materiale transplantacyjnym.

Jak sama nazwa wskazuje, rodowód ontogenetyczny sKM związany jest z wykształcaniem się tkanek, a więc znacznie opóźniony w stosunku do eKM izolowanych z wężła zarodkowego blastocysty (b. wczesne, kilkudniowe stadium rozwojowe przed zagnieżdżeniem się zarodka w jamie macicy). Największą ilość informacji zgromadzono dla dwóch rodzajów możliwych do wykorzystania terapeutycznego komórek sKM, różniących się swoim pierwotnym pochodzeniem tkankowym. Pierwszą grupę stanowią neuralne komórki macierzyste (NKM), pochodzące bezpośrednio z progenitorów znajdujących się w mózgu (płodowym lub w tzw. obszarach neurogennych mózgow dorosłych w tym autopsyjnych) i dające się namnażać *in vitro* w postaci rosnącej populacji (strain) tzw. neurosfer. Do drugiej grupy zalicza się komórki pozyskiwane z tkanek o zasadniczym potencjale krwiotwórczym (szpik kostny i krew pępowinowa), które *in vitro* mogą dawać początek zarówno multipotencjalnym klasycznym liniom komórkowym o charakterze NKM (Jiang i wsp. 2002, Bużańska i wsp. w druku), jak i proliferującym *in vitro* neurosferom (Domańska i wsp. – wyniki niepublikowane). Również nisze KM występujące w innych tkankach (np. w skórze, tkance tłuszczowej, owodni, pępowinie i siatkówce oka) mogą stawać się źródłem do selekcji i propagacji NKM *in vitro*. Na podstawie tych zadziwiających obserwacji zmiany charakteru i losu komórek progenitorowych otrzymywanych z różnych tkanek wysunięto szereg interesujących hipotez. Poza całkowitym negowaniem rzeczywistego występowania tego zjawiska (Wagers i wsp. 2002, Terada i wsp. 2002) bierze się pod uwagę możliwość tzw. transdiferencjacji – zmiany podstawowej linii ukierunkowania tkankowego pod wpływem innych, płynących ze zmienionego środowiska sygnałów insruktywnych (Kohyama 2001, Woodbury 2002, Baiocchi 2003). Również dyskutuje się tak zwaną transpotencjalność wczesnych progenitorów tkankowych rezydujących w niszach, czyli okresowo występującą chwiejność genetycznej determinacji kierunku różnicowania tych komórek. Jako pozostałość po stanie pluripotencjalności charakterystycznej dla okresu embrionalnego, komórki te utrzymywałyby stan „otwarty” genomu (tzw. *multilineage transcriptosome*) szczególnie wrażliwy na różne sygnały różnicujące (Liu i Rao 2003). Możliwe jest również przetrwanie w niektórych niszach tkankowych, szczególnie we wczesnych okresach rozwoju, subpopulacji KM o cechach pluripotencjalnych (to znaczy takich, jakie uznaje się za charakterystyczne jedynie dla komórek wężła zarodkowego przed podziałem na listki zarodkowe, a także dla pochodzących z nich eKM). Nieliczna subpopulacja takich komórek, których rozrost w tkance *in vivo* byłby hamowany presją sygnałów płynących ze środowiska, mogłaby ulegać pozytywnej selekcji w warunkach promujących *in vitro* (Jing i wsp. 2002, Bużańska i wsp. 2002), a w pewnych stanach patologicznych również *in vivo* (Ratajczak i wsp. 2003). Wszystkie te hipotezy mają jedynie pośrednie poparcie doświadczalne, a więc problem mechanizmu samego zjawiska pozostaje nadal otwarty. Ten niepełny stan wiedzy odbił się również w seman-

tyce. I tak do opisu tego fenomenu używa się tak nierównoważnych terminów, jak wspomniana już transdiferencjacja, transpotencja, plastyczność, konwersja bądź metamorfoza. Natomiast niewątpliwym faktem jest, że kierunek różnicowania neuroektodermalnego przy wyborze nowej linii rozwojowej jest tu w jakimś sensie preferowany. Warto wspomnieć, że zmienność tak charakteru, jak i potencjału regeneracyjnego dojrzałych tkanek była od lat obserwowana u różnych gatunków zwierząt. U ssaków znane są przypadki ewolucyjnej zmiany wyboru podstawowej linii różnicowania końcowego. Na przykład u niektórych gatunków z neuroektodermalnej struny nerwowej (*neural crest*) wykształcane są tkanki głowy (chrząstki, mięśnie), nieodróżnialne od tych powstających z klasycznej linii, wywodzącej się z mezodermalnego listka zarodkowego. Inny przykład transdiferencjacji na poziomie sKM można znaleźć w okresie organogenezy np. oka. Jest możliwe, że ścieżka prowadząca do transdiferencjacji przebiega przez etap pośredni cofnięcia programu różnicowania komórkowego, czyli tzw. dediferencjacje. W mózgu zaobserwowano to w doświadczeniu przeróżnicowania ukierunkowanych prekursorów oligodendrocytów-O2A do multipotencjalnych neuralnych progenitorów typu NKM (Kondo i Raff 2000).

Pytania o mechanizmy molekularne leżące u podstaw obserwowanej plastyczności sKM nie mają wyłącznie charakteru akademickiego. Mechanistyczne wyjaśnienie tego zjawiska mogłoby w przyszłości zaowocować optymalizacją sposobów pozyskiwania potrzebnych terapeutycznie fenotypów komórkowych nawet (teoretycznie) z każdej komórki organizmu.

Sugerowane strategie wykorzystania KM w terapii można rozpatrywać co najmniej na 4 poziomach:

- Bezpośrednia repopulacja uszkodzonych tkanek przez hodowane *in vitro* ukierunkowane komórki progenitorowe. Aby takie terapie stały się możliwe, konieczne jest określenie warunków specyficznego i stabilnego uzyskiwania pożądanych cech *in vitro* i *in vivo*. Należy również określić optymalne warunki środowiskowe do przeszczepu, prawdopodobnie różne w zależności od tkanek i jednostek chorobowych, które zapewniłyby utrzymanie i integrację przeszczepionych komórek z tkankami biorcy.
- W terapii genowej – wszczepianie zmodyfikowanych genetycznie KM, które mogłyby się stać dobrze penetrującymi, tolerowanymi i stabilnymi nośnikami brakujących czynników sekrecyjnych (np. dopaminy, insuliny itp.) oraz troficznymi, przydatnymi w terapii określonych schorzeń.
- W miarę poznawania biologii endogennie występujących KM, uzyskanie możliwości sterowania ich rozwojem i ekspansją *in situ*, w celu zapewnienia naturalnej repopulacji uszkodzonych przez czynniki chorobowe komórek i tkanek.
- Istnieją też początki tzw. inżynierii tkankowej, testującej możliwości produkcji

zróżnicowanych tkanek oraz całych organów lub ich funkcjonalnych części (organoidów) *in vitro* do wykorzystania w tx. Odnotowano pierwsze spektakularne sukcesy, np. w hodowli skóry czy tkanki chrzęstnej np. nosa lub ucha.

Przykłady możliwości użycia KM w terapii chorób neurologicznych

- Choroba Parkinsona (PD)

Istnieją zaawansowane badania na modelach zwierzęcych wykazujące funkcjonalną skuteczność transplantacji prekursorów dopaminergicznych bezpośrednio do prądkowia lub istoty czarnej. Jednakże podjęcie przez nie funkcji zależy od ciągle mało poznanego zjawiska właściwego *patterningu* tych komórek, który występuje jedynie w rozwijającym się śródmózgowiu. Tylko NKM izolowane z tych okolic i to w określonym czasie rozwoju płodowego były zdolne do integracji z tkanką gospodarza i regulowanego bodźcem wyrzutu dopaminy (Armstrong 2003).

Wyniki badań nad zastosowaniem eKM w modelach zwierzęcych PD są kontrowersyjne. Mimo że w niektórych z nich odnotowano dużą poprawę funkcjonalną (Bjorklund i wsp. 2002), to w innych pracach nie udało się powtórzyć tego wyniku. Wszyscy autorzy podkreślają natomiast dużą niestabilność różnicowania się tych komórek, również do fenotypów nie występujących w mózgu oraz wysokie prawdopodobieństwo powstawania guzów nowotworowych (w zależności od gęstości komórek nawet do 100% (Harkany i wsp. 2004).

Podjęmowane są różne próby wyeliminowania tumurogenności eKM, np. przez indukcję różnicowania końcowego *in vitro* lub pozbycie się komórek mitotycznych przed tx (Kawasaki i wsp. 2002). W takim przypadku jednak dochodzi do zmiany charakteru terapii, która zamiast wykorzystywać pozytywne cechy komórek macierzystych (prolifrację, migrację i „wrastanie” komórek w cytoarchitekturę tkanki) staje się metodą suplementacji już „gotowymi”, wyhodowanymi w laboratorium zróżnicowanymi komórkami mającymi swoje własne ograniczenia. Do najbardziej udanych podejść doświadczalnych uzyskiwania takich komórek należy zaliczyć kombinację wstępnych manipulacji genetycznych (transdukcję czynnika transkrypcyjnego Nurr1) i epigenetycznych (dodatek białek sygnałowych Shh i FGF8 do medium różnicującego). W tych warunkach otrzymano prawie 80-procentowe różnicowanie neuronów do fenotypu dopaminergicznego. W okresie 2-miesięcznej obserwacji po tx komórek do prądkowia szczura nie odnotowano powstawania guzów z jednoczesnym dobrym wynikiem powrotu funkcji przeszczepionych neuronów (Kim i wsp. 2002). Barberi i wsp. (2003) przedstawił ostatnio bardzo efektywną metodę otrzymywania dopaminergicznie zróżnicowanych neuronów z eKM wyprowadzonych z zarodków mysich powstałych w wyniku transferu jąder (model tzw. klonowania terapeutycznego). Po przeszczepieniu do parkinsonoidalnych zwierząt odnotowano 70-procentową poprawę w testach funkcjonalnych oraz dobre przeżycie neuronów dopaminergicznych *in vivo*.

Badania eksperymentalne nad terapią regeneracyjną w PD należą do najbardziej zaawansowanych. Należy tu jednak podkreślić, że do tej pory zarówno w zwierzęcych eksperymentach przedklinicznych, jak i klinicznych nigdy nie użyto ludzkich eKM do badań przeszczepów (Richardson i wsp. 2004). Jedyną ograniczoną próbę kliniczną zanotowano w USA z wykorzystaniem ludzkich komórek hNT, pochodzących z pierwotnej linii nowotworowej (teratoma), którą można przyjąć za odpowiednik ukierunkowanych neuralnie eKM. Cechy tych komórek różnią się w wielu aspektach od stosowanych do tej pory eKM zwierząt, a ich zachowanie w tkance biorcy jest jak na razie nieznane.

- Choroba Huntingtona (HD) i Alzheimer (AD)

Jeśli uzyskamy lepszą kontrolę nad różnicowaniem się neuronów do pożądanego fenotypu końcowego, to stanie się możliwa suplementacja komórkowa chorób neurodegeneracyjnych, których ubytki stwierdzone są w określonych zespołach. Ciekawe, że jednym ze stosunkowo łatwo pojawiających się fenotypów w różnicujących się KM jest fenotyp GABA-ergiczny, który, obok DA-ergicznego, jest pożądanym w leczeniu HD. Ostatnio notuje się szybki postęp prac nad terapią regeneracyjną z zastosowaniem somatycznych NKM w eksperymentalnych modelach, a nawet klinicznych przypadkach tej choroby (Rosser i Dunnett 2003).

- Stwardnienie rozsiane i inne choroby demielinizacyjne

Przeprowadzono pomyślnie testy na zwierzęcych modelach demielinizacji CUN, w których wykazano, że wprowadzone domózgowo prekursor oligodendrocytów aktywnie remielinizowały aksony. Podstawowym problemem pozostaje jednak, w jaki sposób kierować migrujące komórki prekursorowe do rozsianych ognisk demielinizacyjnych występujących w tej chorobie i w jaki sposób chronić je przed niszczącym wpływem środowiska. Ze wstępnych badań wynika, że patologiczna nadreaktywność limfocytów T w tej chorobie może zostać stłumiona przez allogeniczne przeszczepy hematopoetycznych KM szpiku. Przez wywołanie długotrwałego efektu immunosupresyjnego w organizmie biorcy równoległy przeszczep szpiku mógłby wspomagać przeżycie przeszczepionych domózgowo oligodendrocytów (Muraro i wsp. 2003).

- Udar mózgu

Komórki hNT (patrz wyżej) były użyte do repopulacji ogniska udarowego w ograniczonej próbie klinicznej, będącej obecnie w toku.

Natomiast w wielu badaniach na modelach zwierzęcych podkreślano dysproporcję pomiędzy zaobserwowaną znaczną poprawą funkcjonalną a znikomą ilością przeżywiających w tkance i różnicujących się neuralnie KM. Wydaje się mało prawdopodobne, aby obserwowana poprawa była związana jedynie z wbudowaniem się komórek dawcy w uszkodzoną sieć neuronalną. Wielu badaczy sugeruje, że są to głównie skutki parakrynnego oddziaływania troficznego lub metabolicznego przeszczepianych komórek.

W badaniach Chena i wsp. (2001) wykazano, że w tkance ischemicznej mózgu po przeszczepie wykrywa się zwiększone ilości BDNF i NGF w porównaniu z grupą zwierząt nie poddanych transplantacji. Wykazano również dużą zdolność KM do produkcji takich czynników *in vitro*. Czynniki troficzne i wzrostowe mogłyby stymulować rezerwy regeneracyjne uszkodzonego mózgu, włącznie z pobudzeniem endogennych KM znajdujących się w tkance gospodarza.

W czasie badań nad wpływem transplantacji KM na przebieg regeneracji mózgu i rdzenia u gryzoni, zaobserwowano jeszcze jedno bardzo interesujące zjawisko. Wydaje się mianowicie, że komórki pochodzenia szpikowego lub z krwi pępowinowej po podaniu do krwioobiegu migrują selektywnie do miejsca uszkodzenia różnych narządów, w tym również do mózgu, przechodząc nawet przez nieuszkodzoną barierę krew/mózg. Prowadzone są dalsze badania nad zidentyfikowaniem chemokin czynnych w tym procesie (Wang i wsp. 2002).

- Urazy rdzenia kręgowego.

Przedkliniczne badania doświadczalne wykazały, że podane miejscowo komórki NKM mogą wytwarzać pożądane środowisko do odrostu aksonów po poprzecznym przecięciu rdzenia, jak również zapobiegać formowaniu się blizny.

- Choroby metaboliczne

W klinice pierwsze próby leczenia lizosomalnych chorób spichrzeniowych przeszczepami allogenicznymi komórek szpikowych podejmowano już przed 20 laty. Przeprowadzono zabiegi na setkach pacjentów z zespołami Huntera, Maroteaux-Lamy, adrenoleukodystrofii, metachromatycznej leukodystrofii, fukozydozy, choroby Gauchera. Jako, że choroby te są nieuleczalne i w krótszym lub dłuższym czasie prowadzą do śmierci, ocena działania terapii jest trudna, a często kontrowersyjna. Jednak w kilku przypadkach potwierdzono częściową rekonstrukcję enzymatyczną i średnie przedłużenie czasu przeżycia chorych. W każdym razie przeszczepy szpikowe nie zmieniały ostatecznie niepomyślnego rokowania (Kaufman i wsp. 1999). W celu wyjaśnienia miejscowego mechanizmu działania zmodyfikowanych genetycznie KM w modelu choroby Niemann-Picka przeprowadzono eksperymenty na myszach transgenicznym pozbawionych aktywności kwaśnej sfingomielinazy, której brak jest odpowiedzialny za wystąpienie tej choroby u ludzi. Po domózdkowym podaniu mezenchymalnych sKM z nadprodukcją brakującego enzymu wykazano lepszą przeżywalność komórek Purkiniego i zmniejszenie mózgowych złogów sfingomieliny (Jin i wsp. 2002). Badania te można uznać za pierwszą pomyślną próbę rzeczywistej suplementacji komórkowej w spichrzeniowych chorobach neurodegeneracyjnych.

Środowisko naukowe z zasady źle przyjmuje wszelkie ograniczenia nakładane swobodom badawczym i możliwościom eksperymentalnym. Jednakże na podstawie obecnej

wiedzy należy przyjąć, że kliniczne zastosowanie ludzkich zarodkowych KM będzie odłożone co najmniej do czasu zniknięcia bezpośrednich zagrożeń związanych z tą terapią. Nawet najbardziej udane eksperymenty nad przeszczepianiem eKM nie trwały dłużej niż 2-3 miesiące i nie obejmowały ludzkich eKM. Poza tym obniżenie ryzyka wystąpienia nowotworu w prowadzonych badaniach sprowadzało się głównie do postępowania prewencyjnego (stosowania środków antymitotycznych lub przeszczepiania nieproliferujących, końcowo zróżnicowanych komórek), ale nie do poznania i opanowania istoty tego zjawiska, będącego, jak się wydaje, immanentną cechą komórek zarodkowych. Biorąc pod uwagę, że ich podłożem są ciągle nieznane mechanizmy leżące u podstaw procesu nowotworzenia, sądzę, że rozwiązanie obu tych problemów będzie jednakowo trudne i wzajemnie powiązane. Jako że te najistotniejsze, nie rozwiązane do tej pory zagadnienia dotyczą wiedzy podstawowej, a nie praktycznej strony klinicznego przeszczepu ludzkich eKM, jako modele badawcze do ich rozwiązania mogą posłużyć o wiele lepiej poznane komórki zarodkowe gryzoni lub naczelnych. Natomiast rozwój metod przeszczepów terapeutycznych, tak jak do tej pory (tabela 1), powinien koncentrować się na badaniach somatycznych sKM i na dalszych udoskonaleniach tych, już w tej chwili odnotowujących pierwsze sukcesy kliniczne, metod leczniczych.

Piśmiennictwo

- [1] Andrews P.W. *Karyotype of human ES cells during extended culture*. Nat. Biotechnol. 2004; 22: 371-379.
- [2] Armstrong R.J., Tyers P., Jain M., Richards A., Dunnett S.B., Rosser A.E., Barker R.A., *Transplantation of expanded neural precursor cells from the developing ventral mesencephalon in a rat model of Parkinson's disease*. Exp. Brain Res. 2003; 151: 204-17.
- [3] Baiocchi M., Di Rico C., Di Pietro R., Baldassarre A., Migliaccio A.R. *5-Azacytidine reactivates the erythroid differentiation potential of the myeloid-restricted murine cell line 32D RO*. Exp. Cell Res., 2003; 258: 258-67.
- [4] Barberi T., Klivenyi P., Calingasan N.Y. i wsp. *Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application into parkinsonian mice*. Nat. Biotechnol. 2003; 21: 1200-1207.
- [5] Bjorklund L.M. i wsp.: (2002), *Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model*. PNAS USA, 99(4), 2344.
- [6] Bużańska L., Machaj E.K., Zabłocka B., Pojda Z., Domańska-Janik K. *Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features in vitro*. J. Cell Sci. 2002; 115 (10): 2131-2138.
- [7] Bużańska L., Domańska-Janik K., *Establishment and general properties of the unique Human Umbilical Cord Blood-derived Neural Stem Cell (HUCB-NSC) line*. Annual Report, PAN, 2004 – w druku.
- [8] Chen J., Li Y., Wang L., Lu M., Zhang X., Chopp M. *Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats*. J. Neurol. Sci. 2001; 189: 49-57.

- [9] Herkany T., Andang M., Kingma H.J., Gorcs T.J., Holmgren C.D., Zilberter Y., Ernfors P., *Region-specific generation of functional neurons from naive embryonic stem cells in adult brain*. J. Neurochem. 2004; 88: 1229-1239.
- [10] Humpherys D., Eggan K., Akutsu H., Hochedlinger K., Rideout W.M., Biniszkievicz D., Yanagimachi R., Jaenisch R. *Epigenetic instability in ES cells and cloned mice*. Science 2001; 293: 95-97.
- [11] Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. *Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow*. Nature 2002; 418: 41-49.
- [12] Jin H.K., Carter J.E., Huntley G.W., Schuchman E.H. *Intracerebral transplantation of mesenchymal stem cells into acid sphingomyelinase-deficient mice delays the onset of neurological abnormalities and extends their life span*. J. Clin. Invest. 2002; 109: 1183-191.
- [13] Kaufman C.L., Ildstad S.T. *Leukodystrophy and bone marrow transplantation: role of mixed hematopoietic chimerism*. Neurochem. Res. 1999; 24: 537-549.
- [14] Kawasaki H., Suemori H., Mizuseki K. i wsp. *Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002; 99: 1580-1585.
- [15] Kim J.H., Auerbach J.M., Rodriguez-Gomez J.A. i wsp., *Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in animal model of Parkinson disease*. Nature 2002; 418: 50-56.
- [16] Kohyama J., Abe H., Shimazaki T., Koizumi A., Nakashima K., Gojo S., Taga T., Okano H., Hata J., Umezawa A. *Brain from bone efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or demethylating agents*. Differentiation 2001; 68: 235-44.
- [17] Kondo T., Raff M., *Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotential CNS stem cells*. Science 2000; 289: 1754-57.
- [18] Liu Y., Rao M.S., *Transdifferentiation - fact or artifact*. J. Cell. Biochem. 2003; 88: 29-40.
- [19] Li Y., Chen J., Chen X.G., Wang L., Gautam S.C., Xu Y.X., Katakowski M., Zhang L.J., Lu M., Janakiraman N., Chopp M. *Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: neurotrophins and functional recovery*. Neurology (2002); 59: 514-523.
- [20] Lu D., Sanberg P.R. *Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury*. Cell Transplant. 2002; 11: 275-281.
- [21] Muraro P.A., Cassini Ingoni R., Martin R. *Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: current status and future challenges*. Cur. Opin. Neurol. 2003; 16: 299-305
- [22] Orive G., Hernandez R.M., Gascon A.R., Igartua M., Pedraz J.L. *Controversies over stem cell research*. Trends Biotechnol. 2003, 21, 109.
- [23] Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R., Majka M., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J. *Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells „hide out” in the bone marrow*. Leukemia 2004; 18: 29-40.
- [24] Richardson R.M., Fillmore H.L., Holloway K.L., Broaddus W.C. *Progress in cerebral transplantation of expanded neuronal stem cells*. J. Neurosurg. 2004; 100: 659-671.
- [25] Rosser A.E., Dunnett S.B. *Neural transplantation in patients with Huntington's disease*. CNS Drugs. 2003; 9: 853-67.

-
- [26] Terada N., Hamazaki T., Oka M., Hoki M., Mastalerz D.M., Nakano Y., Meter E.M., Morel L., Petersen B.S., Scott E.W. *Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion.* Nature 2002; 416: 542-545.
- [27] Thomson J.A., Itskovitz-Eldor, Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshal V.S., Jones J.M. *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.* Science 1998; 282: 1145-1147.
- [28] Wagers A.J., Sherwood R.I., Christensen J.L., Weissman I.L. *Little evidence for developmental of adult hematopoietic stem cells.* Science 2002; 107: 4807.
- [29] Wang L, Li Y., Chen X.J. Gautam S.C., Zhang Z. Lu M., Chopp M. *MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture.* Hematology 2002; 7: 113-117.
- [30] Willing A.E., Lixian J., Milliken M., Poulos S, Zigova T., Song S., Hart C., Sanchez-Ramos J, Sanberg Pr. *Intravenous versus Intrastriatal Cord Blood Administration in a Rodent Model of Stroke.* J. Neurosci. Res. 2003; 73: 296-307.
- [31] Windrem M.S., Nunes M.C., Rashbaum W.K., Schwartz T.H., Goodman R.A., Mckhann G. 2nd, Roy N.S., Goldman S.A. *Fetal and adult human oligodendrocyte progenitor cell isolates myelinate the congenitally dysmyelinated brain.* Nat. Med. 2004; 10: 93-97.
- [32] Woodbury D., Reynolds K., Black L.B. *Adult bone marrow stromal cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis.* J. Neurosci. Res. 2002; 69: 908-917.