

CHOROBY UKŁADU POZAPIRAMIDOWEGO

Piotr Rieske

Received: 15.04.2008

Accepted: 18.04.2008

Published: 30.04.2008

Zastosowanie komórek macierzystych w leczeniu pacjentów z chorobą Parkinsona

Stem cells in Parkinson disease treatment

Zakład Patologii Molekularnej i Neuropatologii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, tel.: 042 675 76 11
Praca finansowana ze środków własnych, nr 502-11-439 – Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

W ostatnim czasie dokonał się istotny postęp w terapii komórkowej choroby Parkinsona. W niniejszym artykule przedstawiono strategię dotyczące terapii komórkowej, opisano wyniki prób klinicznych, przedstawiono także doświadczenia autora w przygotowaniu komórek dla osób z chorobą Parkinsona oraz uwypuklono niebezpieczeństwa, jakie mogą wynikać ze stosowania terapii komórkowej. Zaprezentowano takie strategię terapii komórkowej, jak: strategia fizjologiczna, strategia fizjologiczno-biotechnologiczna i strategia biotechnologiczna. W ramach strategii fizjologicznej ujęto zastosowanie neuralnych komórek macierzystych i koncepcję Ratajczaka. Plastyczność (transróżnicowanie) jest rozpatrywana jako podstawa strategii fizjologiczno-biotechnologicznej. Strategia biotechnologiczna to klonowanie i reprogramowanie. W artykule zaprezentowano także opinie autorytetów na temat skuteczności terapii komórkowej w leczeniu pacjentów z chorobą Parkinsona oraz krótko opisano próby kliniczne, którymi niezależnie od siebie kierowali: Hauser, Hegel, Brundin, Freed i Olanow. Przedstawiono również implikacje ich dokonań badawczych dla przyszłych prób wykorzystania komórek macierzystych w terapii osób z chorobą Parkinsona, jak również wyniki badań nad zwierzętami z eksperymentalnie wywołanym parkinsonizmem. Autor prezentuje ponadto wyniki własnych doświadczeń w przygotowywaniu komórek potencjalnie użytecznych w leczeniu pacjentów z chorobą Parkinsona oraz omawia istotne zagrożenia związane ze stosowaniem terapii komórkowej (takie jak choroba nowotworowa). Terapia komórkowa rozwija się, jednak w odczuciu autora niniejszego artykułu nie ma pewności, czy będzie ona naprawdę skuteczną.

SŁOWA KLUCZOWE: komórki macierzyste, reprogramowanie, plastyczność, różnicowanie, choroba Parkinsona

Summary

This review shows current progress in stem cell therapy of Parkinson disease. Article depicts strategies of stem cell therapy, discusses results of trials performed to treat Parkinson disease, describes experience of author in preparing cells for patients with Parkinson disease, and presents potential danger of stem cell therapy. Several strategies of stem cell therapies are presented. Strategies are divided in to: physiological, physiologically-biotechnological and biotechnological. Physiological strategy includes: use of neural stem cells, and Ratajczak concept. Plasticity (transdifferentiation), is considered as approach physiologically-biotechnological. Biotechnological strategy includes: cloning and reprogramming. Article shows opinions of authorities working on Parkinson disease stem cells therapy, briefly discusses trials of Hauser et al., Hegel et al., Brundin et al., Freed et al., and Olanow et al. Clues coming from these trials, for future use of stem cells derivatives, in

the treatment of Parkinson disease are presented. Hints coming from works on Parkinson disease animals models, are also included. Moreover author presents his own experience in preparing cells potentially useful in Parkinson disease treatment, which is use of fibroblasts and neural stem cells. Finally possible dangerous consequences of stem cells therapy, such as risk of cancers development, are shown. Stem cell therapy appears as progressing, but in author opinion there is no final conclusion to say if it will work very efficiently or not.

KEY WORDS: stem cells, reprogramming, plasticity, differentiation, Parkinson disease

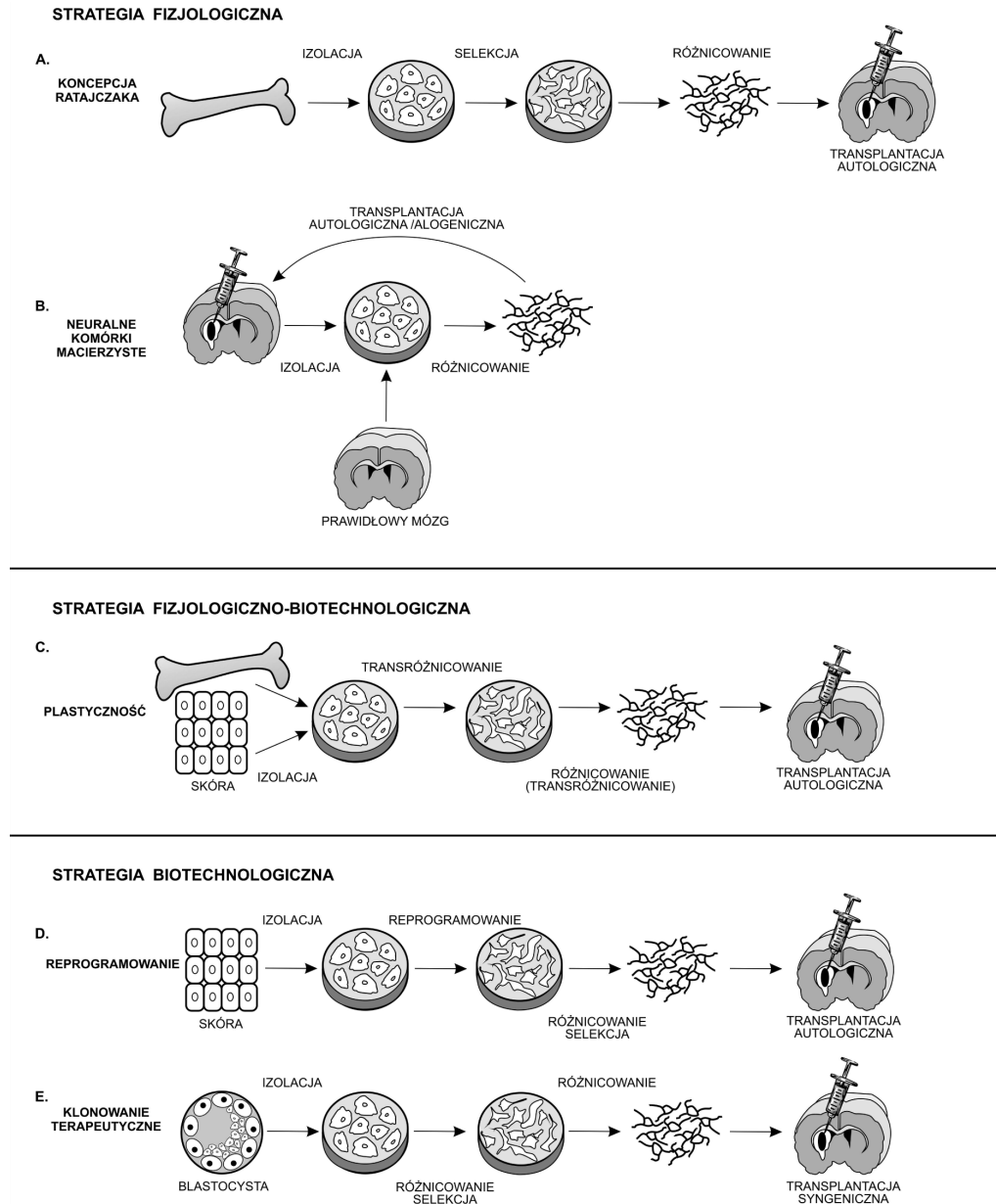
STRATEGIE TERAPII KOMÓRKOWYCH

Komórki macierzyste budzą coraz większe zainteresowanie. Stosując je w leczeniu, a właściwie ich pochodne, można posłużyć się kilkoma strategiami. Zdaniem autora niniejszej pracy strategię terapii komórkowych możemy podzielić na: fizjologiczne (wykorzystanie naturalnych zjawisk zachodzących *in vivo*), fizjologiczno-biotechnologiczne (plastyczność komórek – transróżnicowanie) i całkowicie biotechnologiczne (klonowanie, reprogramowanie). W podziale tym uwzględniono fakt, że w niektórych metodach biolodzy odwołują się do procesów fizjologicznych, a w innych – do procesów czysto biotechnologicznych, które nie mają żadnego związku z fizjologią. Wynika to z faktu, że biotechnologia wykracza poza fizjologię, a ogólnie – poza procesy zachodzące w naturze. Przykładowo bakterie nigdy nie produkują insuliny w warunkach naturalnych, a mimo to dzięki manipulacjom biotechnologicznym „można je do tego zmusić”. Podobnie rzecz się ma z będącym wytworem biotechnologów klonowaniem ssaków, które nigdy nie zachodzi w naturze. Istnieje również metodologia, której obecny stan wiedzy nie pozwala zakwalifikować ani jako strategię biotechnologiczną, ani jako fizjologiczną, ponieważ nie wiemy, czy niektóre procesy obserwowane *in vitro* zachodzą również w przyrodzie.

Jako możliwości fizjologiczne (rys. 1A) od lat stosuje się hematopoetyczne komórki macierzyste, które stanowią jeden z typów multipotencjalnych komórek macierzystych. Podobnie można wykorzystać również nowo poznane komórki multipotencjalne, np. nerwowe (neuralne) komórki macierzyste, których istnienie zostało również potwierdzone u dorosłych⁽¹⁻³⁾. Niestety, rozwiązania te wiążą się ze sporymi komplikacjami. Przede wszystkim pozyskanie nerwowych komórek macierzystych jest bardzo trudne, szczególnie do przeszczepów autologicznych. Łatwiej wykonywać w takich przypadkach przeszczepy alogeniczne, niemniej jednak należy uniemożliwić organizmowi odrzucenie otrzymanego przeszczepu (patrz rozdział: „Terapia komórkowa w chorobie Parkinsona – dotychczasowe doświadczenia”).

Pewne nadzieje na wykonywanie przeszczepów autologicznych związane są z tzw. koncepcją Ratajczaka, według której szpik kostny to fizjologiczny rezerwuar róż-

norodnych multipotencjalnych komórek macierzystych (nie tylko hematopoetycznych) (rys. 1B). Zdaniem Ratajczaka komórki te da się z powodzeniem zastosować w leczeniu wielu chorób, i to nie tylko hematologicznych⁽⁴⁻⁶⁾. Drugą wspomnianą możliwością wykorzystywania komórek macierzystych szpiku stanowi tzw. plastyczność⁽⁷⁻⁹⁾ (rys. 1C). Trudno ją zaliczyć do strategii fizjologicznych lub biotechnologicznych, ponieważ istnieje spór o to, czy plastyczność jest zjawiskiem indukowanym w sztucznych warunkach (*in vitro*), czy też obecnym *in vivo*. Według kanonów biologii rozwojowej ssaków komórka, która należy do mezodermy, nie może stać się komórką endodermy, i *vice versa*. Mówimy, że istnieje tzw. bariera listków zarodkowych, a tymczasem plastyczność często utożsamiana jest z transróżnicowaniem, czyli właśnie z przekraczaniem bariery listków zarodkowych. Biolodzy sceptycznie odnoszący się do idei plastyczności nazywają działania zmierzające do wykorzystania domniemanej plastyczności „alchemią biologii rozwojowej”⁽¹⁰⁾. Z drugiej strony mamy jednak coraz więcej dowodów, że komórki są w stanie „pokonywać barierę listków zarodkowych”⁽¹¹⁾. Plastyczność – rozpatrywana jako strategia fizjologiczna – pozwala wytłumaczyć, inaczej niż proponuje Ratajczak, fakt, że komórki szpiku kostnego można różnicować do wielu typów komórek dojrzałych, a co za tym idzie, wykorzystać w leczeniu wielu jednostek chorobowych. Dotychczas uważano, że zastosowanie hematopoetycznych komórek pnia (ang. *hematopoietic stem cells*, HSC) umożliwia otrzymanie jedynie komórek krwi. Tymczasem ostatnie wyniki badań zdają się wskazywać, że plastyczność komórek szpiku pozwala na otrzymanie również komórek nerwowych czy komórek trzustki^(11,12). W tym kontekście uzyskanie wielu rodzajów komórek dojrzałych ze szpiku nie byłoby – jak to przyjmuje Ratajczak – konsekwencją heterogenności komórek macierzystych szpiku, ale zdolności jednego typu komórek multipotencjalnych (np. stromalnych komórek macierzystych) do przeobrażania się w bardzo wiele rodzajów komórek należących do różnych listków zarodkowych^(4,5). Niezależnie od tego, czy prawdziwa jest koncepcja Ratajczaka, czy też koncepcja mówiąca o plastyczności, możemy stosować komórki szpiku pacjenta, którego chcemy leczyć; chociażby w związku z chorobą Parkinsona. Oznacza to, iż możemy przeprowadzić przeszczep autologiczny i nie ma obawy, że transplantowane komórki



Rys. 1. Trzy strategie dające nadzieję na wprowadzenie terapii komórkowej do leczenia osób z chorobą Parkinsona (i nie tylko). Strategia fizjologiczna zakłada wykorzystanie procesów zachodzących w warunkach fizjologicznych w organizmie człowieka. Możliwe jest w tym przypadku wykorzystanie np. neuralnych komórek macierzystych. Łatwiejsze jest pozyskanie takich komórek do przeszczepu alogenicznego z mózgu osoby zmarłej. Przeszczep autologiczny jest tu możliwy tylko wtedy, gdy neuralne komórki macierzyste pobrane zostaną z mózgu osoby z chorobą Parkinsona. W ramach strategii fizjologicznej rozpatrywać można także koncepcję Ratajczaka, która zakłada, że szpik kostny jest rezerwuarem różnych multipotencjalnych komórek macierzystych, także neuralnych komórek macierzystych. Strategia fizjologiczno-biotechnologiczna bazuje na zjawisku plastyczności. Nie ma w tej chwili pewności, czy plastyczność jest pożytecznym, ale jednak indukowanym tylko w warunkach in vitro, artefaktem, czy też zjawiskiem, które odgrywa rolę fizjologiczną. Stąd też trudność jednoznacznego zaklasyfikowania technologii opartej na plastyczności do strategii fizjologicznych albo biotechnologicznych. Plastyczność komórek macierzystych pozwala np. na otrzymanie ze stromalnych komórek szpiku komórek nerwowych, a z neuralnych komórek macierzystych – komórek krwi. Innymi słowy, plastyczność może pozwolić na przekroczenie tzw. bariery listków zarodkowych. Strategia biotechnologiczna odwołuje się do procesów niezachodzących w naturze. Zalicza się tu klonowanie i reprogramowanie metodą Takahashiego i Yamanaki. W czasie obydwu tych procesów wywoływana jest zmiana wzoru metylacyjnego komórki. Wzór metylacyjny komórki dojrzałej zmieniany jest na wzór metylacyjny pluripotencjalnej lub totipotencjalnej komórki macierzystej

zostaną odrzucone. W podobnym nurcie badań znajduje się zastosowanie krwi pępowinowej. Autor niniejszego artykułu uważa, że krew pępowinowa będzie miała coraz szersze zastosowanie terapeutyczne w chorobach hematologicznych. Jednak jeżeli koncepcja Ratajczaka jest prawdziwa albo jeżeli istnieje plastyczność, to lepszym źródłem komórek do transplantacji (np. w chorobie Parkinsona) będzie szpik kostny, a nie krew pępowinowa. Zrozumiałe jest magazynowanie krwi pępowinowej zanim wystąpi np. białaczka. Po co jednak przechowywać przez 60 czy 70 lat krew pępowinową dla osoby, u której obawiamy się rozwoju choroby Parkinsona, jeśli szpik kostny tej osoby – nawet już po wystąpieniu choroby – dostarczy więcej komórek macierzystych niż krew pępowinowa? Musimy pamiętać, że nie ma metod, które zapewniają 100% żywotność komórek przez tak długi czas, a w naszych doświadczeniach stwierdziliśmy co najmniej 30% spadek żywotności komórek po 10 latach przechowywania w ciekłym azocie.

O ile w przypadku plastyczności możemy jeszcze mówić o tym, że pozyskując komórki potrzebne do transplantacji, korzystamy niekiedy z mechanizmów fizjologicznych, o tyle kolejne rozwiązanie, jakie można zastosować, aby wykorzystać komórki macierzyste w terapii, jest rozwiązaniem czysto biotechnologicznym. Rozwiązanie, o którym mowa, to reprogramowanie genomu komórek⁽¹³⁾ (rys. 1D). Przyjmuje się, że w czasie różnicowania (przeobrażania komórek macierzystych w komórki dojrzałe) w genomach komórek zachodzą epigenetyczne zmiany genomu – głównie we wzorach metylacji elementów regulatorowych DNA^(13,14). Zmiany te wydają się niezwykle trwałe i odpowiedzialne za różnice między komórkami naszych organizmów. To one decydują przede wszystkim o tym, że w granulocycie aktywny jest jeden zestaw genów („programów”), a w neuronie inny. Niemniej jednak udane sklonowane ssaków po zastosowaniu jąder komórek dojrzałych dowiodło, iż zmiany epigenetyczne mogą być odwracalne. W czasie klonowania musi dochodzić do zmian we wzorze metylacji genomu – ze wzoru komórki dojrzałej na wzór komórki embrionalnej^(13,14). Klonowanie terapeutyczne jest kolejną metodą biotechnologiczną, którą można stosować, aby zdobyć komórki przydatne w terapii komórkowej (rys. 1E). Udane klonowania, którym towarzyszyły wątpliwości natury moralnej, stanowiły jedną z inspiracji do poszukiwań czynników „wykorzystywanych przez komórkę jajową” do wywołania zmian epigenetycznych. Przestano postrzegać komórkę jajową jako biologiczną czarną skrzynkę i rozpoczęto poszukiwanie białek umożliwiających między innymi zmianę wzoru metylacyjnego DNA⁽¹⁵⁾. W 2006 roku Takahashi i wsp. pokazali, że dokonanie przejściowej nadekspresji 4 czynników transkrypcyjnych w komórkach fibroblastycznych jest wystarczające do przeobrażenia ich genomu w taki sposób, aby komórki te odzyskały możliwości komórek macierzystych, z których daje się uzyskiwać

dowolne komórki organizmu, ale nie cały organizm. Możliwości takie są cechą pluripotencjalnych komórek macierzystych⁽¹³⁾. W 2007 roku ten sam zespół zaprezentował udaną przemianę fibroblastów w pluripotencjalne komórki macierzyste⁽¹⁶⁾. Takahashi i wsp. przemianę zachodzącą w jądrze dojrzałej komórki fibroblastycznej pod wpływem wybranych czynników transkrypcyjnych określili mianem „reprogramowania” (rys. 1D). Należy pamiętać, iż reprogramowanie zachodzi także w czasie klonowania (Takahashi i Yamanaka czerpali inspirację z doświadczeń nad klonowaniem). Upraszczając sprawę, można stwierdzić, że metoda Takahashiego i Yamanaki to reprogramowanie poza komórką jajową, a klonowanie to reprogramowanie w obrębie komórki jajowej. Reprogramowanie zwykło się utożsamiać z metodologią zaproponowaną przez Japończyków, ale autor artykułu dla porządku określa tę metodologię reprogramowaniem metodą Takahashiego i Yamanaki. Osiągnięty przez nich efekt jest wielce pożądany. Jeśli Takahashi i wsp. mają rację, oznacza to, że dla biotechnologa prawie każda jądrzasta komórka może odegrać rolę pluripotencjalnej komórki macierzystej. Takahashi i Yamanaka nie ukrywają, że inspiracją dla ich działań była również chęć przestrzegania norm moralnych. Wydaje się, że są skuteczni w tym aspekcie, aczkolwiek intryguje, dlaczego ich metoda pozwala otrzymać komórki pluripotencjalne, a nie tak jak w przypadku klonowania – totipotencjalne. Wygląda na to, że totipotencjalność zależy także od tzw. informacji pozycyjnej, a taka informacja może być pozyskana tylko przez pochodne komórki jajowej. Na marginesie można wspomnieć, iż autor artykułu z powodzeniem przeobraził fibroblasty w komórki przypominające pluripotencjalne komórki macierzyste, a wyniki te zostały opublikowane już w 2005 roku w czasopiśmie „Differentiation”⁽¹⁷⁾. Cel ten został osiągnięty poprzez wykorzystanie plastyczności (szerzej o tym zagadnieniu w rozdziale: „Doświadczenia własne”). Jak widać sposobów, które mogą umożliwić otrzymanie pochodnych komórek macierzystych przydatnych w leczeniu osób z chorobą Parkinsona, jest bardzo wiele. Pozostaje mieć nadzieję, że chociaż jeden z nich przyniesie oczekiwane korzyści.

TERAPIA KOMÓRKOWA W CHOROBY PARKINSONA – DOTYCHCZASOWE DOŚWIADCZENIA

Mimo że pochodne komórek macierzystych mogą być wykorzystywane w leczeniu różnych chorób, wydaje się, że w przypadku niektórych z nich terapia ta może być nieco łatwiejsza. Do tej grupy zalicza się między innymi chorobę Parkinsona. Niektórzy uważają, że wprowadzenie odpowiednich pochodnych komórek macierzystych do uszkodzonej istoty czarnej ośrodkowego układu nerwowego daje duże szanse na wznowienie produkcji dopaminy – parakrynnie wydzielanej w tym miejscu w wa-

runkach fizjologicznych. W związku z tym wystarczy stworzyć nowe ognisko produkcji tego neurotransmitera⁽¹⁸⁾. Nie zachodzi tu konieczność odbudowy precyzyjnie zlokalizowanych połączeń synaptycznych jak w przypadku choroby Alzheimera czy po uszkodzeniu rdzenia kręgowego⁽¹⁹⁾. Nie brakuje jednak krytyków powyższej hipotezy, którzy twierdzą, że za założeniami tymi kryje się nadmierne upraszczanie etiopatogenezy choroby Parkinsona⁽²⁰⁾. Teoria niedoboru parakrynnie uwalnianej dopaminy leży u podłoża prowadzonych od lat prób zastosowania terapii komórkowej w chorobie Parkinsona. Pierwsze próby kliniczne dotyczyły stosowania komórek wyizolowanych z rdzenia nadnerczy płodów ludzkich⁽²¹⁾. Próby te dały mierne efekty. W latach 90. zaczęto transplantować osobom z chorobą Parkinsona fragmenty mózgowia pobranego z płodów ludzkich i rzadziej pochodne komórek macierzystych^(18,22-28). Nie była to więc najczęściej terapia komórkowa sensu stricto, gdyż transplantaty zazwyczaj nie składały się z wyizolowanych komórek, tylko z homogenizowanych fragmentów tkanek. Niemniej jednak wyniki tych prób stanowią postawę dla obecnych prac zmierzających do wdrożenia terapii komórkowej do leczenia osób z chorobą Parkinsona. Same wyniki badań są bardzo niejednoznaczne. W literaturze można znaleźć także entuzjastyczne opinie, jak chociażby należąca do pacjenta Michela Levesque'a, neurochirurga z Cedars-Sinai Medical Center w Los Angeles i Celmed BioSciences. Levesque pobrał od 50 do 100 komórek z mózgu człowieka cierpiącego na chorobę Parkinsona, a następnie kultywował je *in vitro* przez kilka miesięcy. W marcu 1999 roku wprowadził około sześciu milionów tych komórek do istoty czarnej chorego. Po zabiegu tym pacjent stwierdził: „Two years ago I couldn't put my contact lenses in without a big problem. Now it's no problem. And I don't have to take any anti-rejection medication because the cells are myself”. Doniesienia takie zawsze bardzo trudno jest zweryfikować i w zasadzie nie są one publikowane w czasopiśmie naukowych. Z drugiej strony przeprowadzono

badania kliniczne, w odniesieniu do których również można znaleźć opinie dotyczące skuteczności takich badań. Poniżej przedstawione zostaną odmienne stanowiska autorytetów w dziedzinie badań nad terapią komórkową w chorobie Parkinsona.

– Curt R. Freed:

„Neurotransplantation with fetal dopamine neurons is now a proven strategy for treatment of patients with advanced Parkinson's disease. In our double-blind, placebo-controlled surgical trial of fetal tissue implants, we found that transplants survived in 85% of patients regardless of age and without immunosuppression and improved signs of Parkinson's disease in patients under age 60 and in older patients who still had a good response to the drug L-dopa. Sham surgery patients had no change in their symptoms. About 15% of patients who reduced or discontinued all L-dopa had the same kind of excess movements (dyskinesias) that had been caused by their L-dopa treatment. This study has proven that neurotransplants have significant benefits and also have some of the same side effects as the drug L-dopa. Transplant methods will continue to evolve, regardless of the source of dopamine neurons used for transplant”.

– J. William Langston:

„Clinton lifted this moratorium on his second day in office. Not long thereafter, 2 large controlled clinical trials aimed at using fetal human mesencephalic tissue transplanted to the striatum to treat Parkinson disease were launched with federal funding. However, to the surprise of many, both trials failed to show a significant clinical benefit based on their primary endpoint variables in spite of substantial evidence of graft survival based on both autopsy and imaging studies. Unfortunately, a substantial subset of patients also developed persistent excessive movements known as dyskinesias”⁽²²⁾. Jak wynika z opinii Freeda, pomimo obserwacji pewnych objawów ubocznych (np. dyskinezji) u pacjentów, u których przeprowadzono neurotransplantacje, okazały się one bardzo pomocne w leczeniu osób z chorobą

	Hauser i wsp., 1999 (n=6)	Hegel i wsp., 1999 (n=5)	Brundin i wsp., 2000 (n=5)	Freed i wsp., 2001 (n=19)	Olanow i wsp., 2003 (n=12)
UPDRS	-30%	-30%	-40%	-18%	+3,5%!!
Czas w ciągu dnia w tzw. fazie „off”	-43%	-59%	-43%	nm.	+7,8%!!
Potrzebna dzienna dawka L-DOPA	-16%	-37%	-45%	nm.	-20%
Wychwył Fluoro-DOPA. Różnica po operacji	+61%	+69%	+55%	+40	nm.
UPDRS – Unified Parkinson's Disease Rating Scale nm. – nie monitorowano					

Tabela 1. Procentowa zmiana określonych parametrów klinicznych po zastosowaniu terapii

Parkinsona. Z kolei według Langstona, który odnosi się negatywnie do objawów ubocznych terapii, pacjenci poddani transplantacji nie odnoszą z tego typu zabiegów żadnych korzyści.

Wobec rozbieżności w eksperckich opiniach nie pozostaje nam nic innego jak dokładniej przyjrzeć się wynikom badań (tabela 1).

Jak widać, w wynikach badań również zachodzi rozbieżność. Poszczególni autorzy obserwowali zarówno wiele korzyści, jak i korzyści bardzo wątpliwe. Najbardziej niepokojący jest fakt, że w badaniach, w których nie obserwowano ewidentnych korzyści, a nawet stwierdzano pogorszenie stanu wielu pacjentów, prowadzono analizy w oparciu o wyjątkowo obiektywne grupy kontrolne. Grupy takie stanowili pacjenci, u których przeprowadzono operacje chirurgiczne, ale którym nie podawano transplantów (ang. *sham surgeries*). Pacjenci grupy kontrolnej nie wiedzieli, że byli obiektem bardzo kontrowersyjnych badań nad efektem placebo. Mimo że badania te są moralnie dwuznaczne, sugerują, że eksperymenty (np. badania Hausera), w których grupę kontrolną stanowili pacjenci nieoperowani, mogą być obciążone efektem placebo. Niepokoi także to, że lepsze efekty obserwowano w czasie badań nad mniej licznymi grupami chorych.

Tak więc pierwszy wgląd w dane pochodzące z prób klinicznych nie pozwala raczej na zbyt optymizm. Dane te odnoszą się jednak do stanu pacjentów po kilku latach od wykonania transplantacji. Okazuje się, że krótko po transplantacji znaczną poprawę stanu pacjentów obserwowano we wszystkich badaniach, niezależnie od ośrodka je prowadzącego. Niestety, pozytywne efekty najczęściej nie utrzymywały się dłużej niż przez kilka miesięcy. Przyczyny tego upatruje się w odpowiedzi układu odpornościowego, gdyż przeszczepy, które wykonywano, były przeszczepami alogenicznymi. Poza przesłankami czysto teoretycznymi główny argument przemawiający za taką tezą stanowi ewidentny wpływ różnych programów immunosupresyjnych na czas, w którym obserwuje się poprawę u pacjentów^(18,28). Istnieje szansa, że przeszczepy syngeniczne i autologiczne okażą się znacznie skuteczniejsze od alogenicznych. Spośród strategii przedstawionych w pierwszym rozdziale niniejszego artykułu możliwość taką oferują: klonowanie terapeutyczne, reprogramowanie, plastyczność i koncepcja Ratajczaka. Kolejna ważna obserwacja poczyniona w czasie analiz to duża zmienność w odpowiedzi pacjentów. Część pacjentów reagowała pozytywnie, a u wielu nie odnotowano żadnej poprawy, a nawet odnotowano pewne pogorszenie stanu. Niestety, wydaje się, iż większą poprawę uzyskano u osób młodszych – przed 60. rokiem życia^(18,26).

Dodatkowych ważnych obserwacji dokonano w czasie badań z zastosowaniem modeli zwierzęcych. Badania prowadzono na gryzoniach i szympanсах^(29,30). Zaobserwowano, iż bardzo ważne jest wprowadzenie transplantu w miejsce, w którym wychwyty L-DOPA jest najgor-

szy. Oznacza to, że stereotaksja powinna być wspierana przez techniki obrazowe wskazujące, gdzie wychwyty neurotransmiterów jest najgorszy. Uważa się, że wprowadzenie wraz z komórkami niektórych czynników wzrostu (np. GDNF) może zwiększyć efektywność działania transplantowanych komórek⁽³¹⁾. Stwierdzono także, że bardzo ważną rolę odgrywa kompozycja transplantu – komórki powinny znajdować się na odpowiednim etapie różnicowania. Najbardziej gruntownie badania w tym względzie dotyczyły przeszczepów pochodnych komórek macierzystych mających przywrócić wzrok. Niedojrzałe komórki neuronalne okazały się bardziej odporne na zmiany środowiska i stres związany z całym procesem transplantacji niż komórki dojrzałe tego typu⁽³²⁾. Z kolei komórki, które są odporne na zmiany środowiska, ale jeszcze „nie dokonały wyboru” neuronalnej ścieżki różnicowania, mogą przeobrazić się po transplantacji w komórki o mniejszej przydatności w terapii, np. w przypadku choroby Parkinsona – w astrocyty lub oligodendrocyty.

Wynik ten pokazuje, że w odniesieniu do wielu chorób terapia komórkowa nie musi być skuteczna przez lata. Na szczęście komórki nerwowe są jednymi z najdłużej żyjących. Jednakże rozumowanie oparte na stwierdzeniu, iż komórki macierzyste są nieśmiertelne i dzięki temu zapewnią długotrwały efekt terapeutyczny, może być zawodne. Jak opisano powyżej, nieśmiertelne komórki macierzyste transplantowane do organizmu nie muszą różnicować się do komórek, które są u danego pacjenta najpotrzebniejsze. Okazuje się, że komórki macierzyste mogą transformować (różnicować się) także do komórek niebezpiecznych – nowotworowych (patrz ostatni rozdział). Ryzyko takie nie występuje w przypadku krócej żyjących pochodnych komórek macierzystych. Konkludując, wysiłki zmierzające do zastosowania terapii komórkowej u osób z chorobą Parkinsona związane są z próbami otrzymania optymalnych komórek i transplantowaniem ich w najlepszy możliwy sposób. Dotychczasowe badania kliniczne nie spełniły do końca pokładanych w nich nadziei, istnieje jednak szansa, że kolejne próby będą skuteczniejsze.

DOŚWIADCZENIA WŁASNE

Badania własne dotyczyły w pierwszej kolejności komórek definiowanych jako fibroblasty. Już w 2004 roku stwierdzono w czasie analiz, że komórki te mogą być wyjątkowo podatne na manipulacje biotechnologiczne, umożliwiające zastosowanie ich w terapii komórkowej. Artykuł odnoszący się do tego fenomenu został opublikowany w 2005 roku w czasopiśmie „Differentiation”⁽¹⁷⁾, tak więc wyprzedził on o rok lub nawet dwa lata słynne doniesienie Takahashiego i Yamanaki o możliwości wykorzystania fibroblastów jako komórek przydatnych w terapii komórkowej (dopiero w 2007 roku Japończycy wykazali, że reprogramowanie można wykonać, stosu-

jąc fibroblasty człowieka). W badaniach własnych nie próbowano reprogramować fibroblastów, ale wykorzystywano tzw. plastyczność, aby przeobrazić je w komórki macierzyste. Należy podkreślić, że metoda zaproponowana przez Japończyków jest znacznie skuteczniejsza od opisanej przez Rieske i wsp. w „Differentiation”.

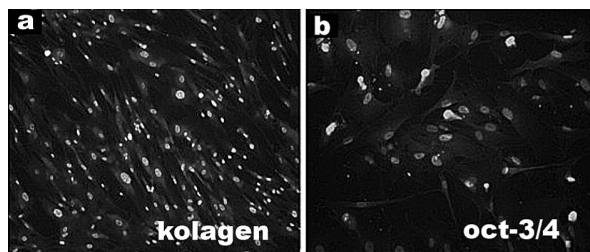
Fibroblasty hodowane w odpowiednich warunkach przez autora niniejszego artykułu wykazywały ekspresję markerów komórek macierzystych: OCT-4 i nestyny (rys. 2). Zaobserwowano także ekspresję molekuł, takich jak: SSEA1, SSEA3 i SSEA4 oraz TRA-1-60 i TRA-1-81 (rys. 3). Molekuły te podobnie jak OCT-4 są traktowane jako markery komórek pluripotencjalnych^(16,17). Takimi samymi markerami posłużyli się Japończycy, aby argumentować, że dokonali reprogramowania fibroblastów umożliwiającego przeistoczenie ich w pluripotencjalne komórki macierzyste. Wyniki badań własnych spowodowały do próby udzielenia odpowiedzi na pytanie: czy możliwe jest otrzymanie komórek neuronalnych z wyżej wymienionych fibroblastów, skoro nadano im cechy komórek macierzystych?

Powodzeniem zakończyła się próba transróżnicowania fibroblastów do komórek wykazujących cechy dojrzewających neuronów dopaminergicznych. W trakcie transróżnicowania zaobserwowano utratę ekspresji takich markerów, jak OCT-4 i nestyna, i jednocześnie wzrost poziomu neurofilamentów oraz pojawienie się ekspresji hydroksylazy tyrozynowej (rys. 4). Pojawienie się komórek wykazujących ekspresję hydroksylazy tyrozynowej (TH), enzymu niezbędnego do syntezy dopaminy, pozwala sądzić, że odniesiono sukces w trakcie próby otrzymania z fibroblastów komórek o cechach neuronalnych. Niestety, otrzymano tylko 1% komórek TH-pozytywnych (rys. 4).

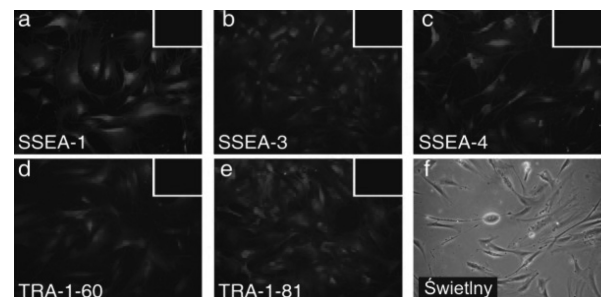
Niezależnie od badań nad fibroblastami prowadzono także badania nad progenitorami neuralnymi. Różnicowanie tych komórek pozwalało z bardzo dużą wydajnością otrzymywać komórki neuronalne: GABA-ergiczne i dopaminergiczne. Komórki neuronalne stanowiły do 60% (rys. 4)⁽³³⁾.

Wysoka wydajność różnicowania neuralnych komórek progenitorowych (60%) w porównaniu z transróżnicowaniem

fibroblastów (1%) nie pozostawia wątpliwości co do jego rzeczywistej wartości. Dodatkowo w przypadku komórek neuralnych różnicowanie odbywało się właściwie w sposób spontaniczny po usunięciu surowicy z medium, w którym dokonywano hodowli. Usunięcie surowicy powodowało pojawienie się komórek neuronalnych, przy czym dodanie bFGF nie było konieczne dla różnicowania, a jedynie podnosiło jego wydajność. Z kolei fibroblasty wymagały zastosowania kombinacji wielu związków chemicznych, takich jak: forskolina, IBMX, TPA, kwas askorbinowy, a także dodania czynnika wzrostu bFGF. Związki te były – i nadal są – używane do różnicowania⁽³⁴⁾, jednak w ostatnim okresie pojawiły się artykuły krytykujące ich stosowanie⁽³⁵⁾. Niska wydajność transróżnicowania fibroblastów i fakt użycia relatywnie drastycznych, krytykowanych środków w celu otrzymania mniej niż jednego procenta komórek dokonujących ekspresji TH mogą wzbudzić wątpliwości co do szans zastąpienia komórek neuralnych przez inne, łatwiej dostępne komórki, jakimi z pewnością są fibroblasty. Pamiętać jednak należy, że otrzymywanie neuralnych progenitorów do przeszczepów autologicznych jest zabiegiem dość karkołomnym, gdyż wymagającym biopsji mózgu u osoby z chorobą Parkinsona (rys. 1B). W efekcie nawet skromne sukcesy w przeobrażaniu fibroblastów w komórki macierzyste oraz w interesujące transplantologów ich pochodne budzą duże zainteresowanie. Sam fakt otrzymania komórek wykazujących ekspresję hydroksylazy tyrozynowej z fibroblastów daje pewne nadzieje na przyszłość. Należy ponadto pamiętać, że zaproponowana przez nas plastyczność może okazać się mniej skuteczna niż reprogramowanie zaproponowane przez Takahashiego i wsp. Tymczasem również badania Japończyków obciążone są wadą. Ponieważ reprogramowanie odbywa się dzięki zastosowaniu retrowirusów, metoda japońska może prowadzić do transformacji nowotworowej (szerzej o tym w następnym rozdziale). Ogólnie rzecz biorąc, należy stwierdzić, że wszystkie technologie zmierzające do otrzymania komórek przydatnych w leczeniu osób z chorobą Parkinsona wymagają jeszcze wielu udoskonaleń.



Rys. 2. Typowe fibroblasty wykazujące początkowo ekspresję kolagenu (rys. a) hodowane w specjalnych warunkach prezentują ekspresję OCT-4 markera pluripotencjalnych komórek macierzystych (rys. b)



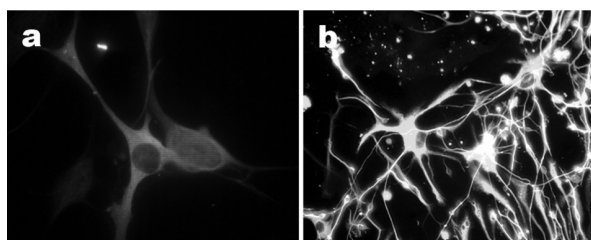
Rys. 3. Fibroblasty hodowane w specjalnych warunkach prezentują ekspresję wielu markerów pluripotencjalnych komórek macierzystych

ZAGROŻENIA, JAKIE MOŻE NIEŚĆ TERAPIA KOMÓRKOWA

„Transplant” poza kryteriami czysto fizjologicznymi (skuteczność komórek) musi spełniać także kryteria bezpieczeństwa. FDA (ang. Food and Drug Administration) – amerykańska agencja rządowa odpowiedzialna między innymi za dopuszczanie środków terapeutycznych do obrotu – jako pierwsza ogłosiła surowe kryteria bezpieczeństwa obowiązujące w terapii komórkowej.

Pierwszym z nich jest czystość biologiczna materiału. Chodzi tu między innymi o nieinfekcyjność, ale nie tylko⁽³⁴⁻³⁹⁾. W przypadku przeszczepów autologicznych należy się upewnić, że dawca nie przekazuje komórek z groźnym dla biorcy defektem genetycznym. Promowane jest także otrzymywanie komórek w hodowlach, które bazują na pożywkach otrzymywanych bez dodawania materiału zwierzęcego. Głównym składnikiem tradycyjnych pożywek jest płodowa surowica bydłęca. Jeśli już decydujemy się na użycie surowicy, nie może ona pochodzić z Wielkiej Brytanii, kraju, gdzie pasażowalne encefalopatie gąbczaste ciągle są istotnym problemem. Okazuje się również, iż komórkowe medium hodowlane zawierające surowicę bydłęcą może spowodować, że komórki przygotowywane do przeszczepu autologicznego lub syngenicznego zachowują się jak ksenogeniczne (odzwierzęce). Stopień oplaszczenia komórek antygenami pochodzenia zwierzęcego jest bowiem bardzo wysoki w medium zawierającym surowicę zwierzęcą⁽⁴⁰⁾. W naszych analizach stosujemy tzw. *serum replacement* lub tzw. białkowe suplementy surowicy.

Jednym z trudniejszych do przewidzenia zagrożeń jest możliwość przeobrażenia się transplantowanych komórek w komórki nowotworowe. Okazuje się, że nowotwory wywodzą się z komórek macierzystych, a zatem istnieje groźba transplantowania komórek, które staną się przyczyną choroby nowotworowej. Aby unaocznić zagrożenie, Ratajczak stwierdza, że prawidłowe komórki macierzyste mają się tak do nowotworowych komórek macierzystych, jak dobry rycerz Jedi do tego, który przeszedł na ciemną stronę mocy^(41,42). Najprostszym sposobem uniknięcia niebezpieczeństwa związanego



Rys. 4. a) W centrum komórka wykazująca ekspresję TH (hydroksylazy tyrozynowej) otrzymana po różnicowaniu fibroblastów. b) Komórki neuronalne i astrocytarne otrzymane po różnicowaniu progenitorów neuralnych

z łatwością transformowania komórek macierzystych jest transplantacja komórek odpowiednio zaawansowanych w różnicowaniu – im bardziej zaawansowane różnicowanie, tym mniejsze ryzyko rozwoju choroby nowotworowej. Dla przykładu, transplantacja pluripotencjalnych komórek macierzystych u myszy z niedoborem immunologicznym SCID wiąże się z prawie 100% prawdopodobieństwem wystąpienia potworniaków^(13,16). Prawdopodobieństwo wystąpienia potworniaków u myszy ze SCID po transplantacji pluripotencjalnych komórek macierzystych jest tak duże, że brak potworniaka po transplantacji traktuje się jako dowód, iż w transplancie nie było pluripotencjalnych komórek macierzystych⁽¹⁶⁾. Ryzyko rozwoju nowotworów znacznie wzrasta, jeżeli procesowi otrzymywania komórek macierzystych lub ich pochodnych towarzyszą modyfikacje genetyczne. Aktualne metody stosowania retrowirusów do reprogramowania mogą spowodować uszkodzenie supresorów nowotworowych i dodatkowo przyczynić się do ułatwienia transformacji nowotworowej komórek macierzystych. W kwietniu 2008 roku w czasopiśmie „Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America” ukazał się artykuł dowodzący, że po reprogramowaniu musimy liczyć się z ewentualnością wystąpienia nowotworów u osób z chorobą Parkinsona⁽⁴³⁾. Wernig i wsp. zastosowali do leczenia szczurów z eksperymentalnym parkinsonizmem komórki neuronalne otrzymane z reprogramowanych fibroblastów. Pozbycie się komórek pluripotencjalnych kontaminujących niejako po różnicowaniu hodowle neuronalne było absolutnym wymogiem. Bez sortowania komórek neuronalnych ryzyko wywołania potworniaków było bardzo duże. Reprogramowanie w obecnej wersji grozi wywołaniem nowotworów nie tylko dlatego, że prowadzi do pozyskania pluripotencjalnych komórek macierzystych, które wyjątkowo łatwo przeistaczają się w potworniaki. Generalnie pluripotencjalne komórki macierzyste można różnicować do ich niegroźnych pochodnych, niemniej jednak w przypadku reprogramowania za pomocą retrowirusów dochodzi do trwałej modyfikacji genomu, która może być onkogenna. Największym wyzwaniem dla biotechnologów w tej chwili jest rezygnacja z retrowirusów albo zastosowanie ich w taki sposób, aby włączały się do genomu w konkretnych miejscach, nie stwarzając zagrożenia uszkodzenia np. supresorów nowotworowych.

Wśród zagrożeń wymienić należy także efekty uboczne terapii. W przypadku stosowania terapii komórkowej u osób z chorobą Parkinsona największym wyzwaniem w tym kontekście są dyskinezyje⁽⁴⁴⁾.

Niektóre standardy FDA są oczywiste, np. terapia musi być skuteczna. Widać jednak, że spełnienie wszystkich wymogów stawianych przez tę agencję będzie trudne. Niekiedy standardy bezpieczeństwa mogą być według FDA zmieniane w zależności od stopnia zaawansowania choroby, biorąc pod uwagę kalkulację potencjalnych

zysków i zagrożeń. Nigdy jednak nie mogą być tak duże jak w przypadku bezpośredniego zastosowania pluripotencjalnych komórek macierzystych.

PODSUMOWANIE

Prace nad zastosowaniem terapii komórkowej w chorobie Parkinsona trwają od lat osiemdziesiątych XX wieku. W ciągu ostatnich kilku lat pojawiło się wiele rozwiązań technologicznych zmierzających do otrzymania pochodnych komórek macierzystych odpowiednich dla osób z chorobą Parkinsona. Wszystkie te strategie są optymalizowane pod kątem skuteczności i bezpieczeństwa. Jednocześnie zdobywa się coraz większą wiedzę o tym, jak przygotować pacjentów do terapii i jakie są najlepsze sposoby wprowadzenia transplantów komórkowych. Do dziś nie ma jednak pewności, czy terapia komórkowa spełni pokładane w niej nadzieje.

Autor odwołuje się do następujących pojęć:

Komórka totipotencjalna – komórka, z której można otrzymać cały organizm.

Komórka pluripotencjalna – komórka, z której można otrzymać dowolne komórki organizmu, ale nie cały organizm.

Komórka multipotencjalna – komórka, z której można otrzymać pewną grupę komórek, np. komórki neuralne albo komórki krwi.

Przeszczep autologiczny – dawca i biorca to ta sama osoba.

Przeszczep syngeniczny – przeszczep bliźniaczy (możliwy do wykonania także po klonowaniu).

Przeszczep alogeniczny – przeszczep, w którym dawca i biorca należą do tego samego gatunku.

Przeszczep ksenogeniczny – przeszczep, w którym dawca i biorca należą do różnych gatunków.

PIŚMIENICTWO:

BIBLIOGRAPHY:

1. Taupin P., Gage F.H.: Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals. *J. Neurosci. Res.* 2002; 69: 745-749.
2. Uchida N., Buck D.W., He D. i wsp.: Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97: 14720-14725.
3. Ohyama K., Ellis P., Kimura S., Placzek M.: Directed differentiation of neural cells to hypothalamic dopaminergic neurons. *Development* 2005; 132: 5185-5197.
4. Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z.: Are bone marrow stem cells plastic or heterogenous – that is the question. *Exp. Hematol.* 2005; 33: 613-623.
5. Kucia M., Reza R., Jala V.R. i wsp.: Bone marrow as a home of heterogenous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia* 2005; 19: 1118-1127.
6. Shih C.C., DiGiusto D., Mamelak A. i wsp.: Hematopoietic potential of neural stem cells: plasticity versus heterogeneity. *Leuk. Lymphoma* 2002; 43: 2263-2268.

7. Li W.C., Yu W.Y., Quinlan J.M. i wsp.: The molecular basis of transdifferentiation. *J. Cell. Mol. Med.* 2005; 9: 569-582.
8. Theise N.D., Krause D.S.: Toward a new paradigm of cell plasticity. *Leukemia* 2002; 16: 542-548.
9. Verfaillie C.: Stem cell plasticity. *Hematology* 2005; 10 supl. 1: 293-296.
10. Rutenberg M.S., Hamazaki T., Singh A.M., Terada N.: Stem cell plasticity, beyond alchemy. *Int. J. Hematol.* 2004; 79: 15-21.
11. Koshizuka S., Okada S., Okawa A. i wsp.: Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63: 64-72.
12. Liu M., Han Z.C.: Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. *J. Cell. Mol. Med.* 2008 [Epub. ahead of print].
13. Takahashi K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.
14. Gan Q., Yoshida T., McDonald O.G., Owens G.K.: Concise review: epigenetic mechanisms contribute to pluripotency and cell lineage determination of embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 2-9.
15. Sridharan R., Plath K.: Illuminating the black box of reprogramming. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 295-297.
16. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. i wsp.: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872.
17. Rieseke P., Krynska B., Azizi S.A.: Human fibroblast-derived cell lines have characteristics of embryonic stem cells and cells of neuro-ectodermal origin. *Differentiation* 2005; 73: 474-483.
18. Freed C.R.: Will embryonic stem cells be a useful source of dopamine neurons for transplant into patients with Parkinson's disease? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2002; 99: 1755-1757.
19. Perl D.P., Olanow C.W., Calne D.: Alzheimer's disease and Parkinson's disease: distinct entities or extremes of a spectrum of neurodegeneration? *Ann. Neurol.* 1998; 44 (3 supl. 1): S19-S31.
20. Przuntek H.: Non-dopaminergic therapy in Parkinson's disease. *J. Neurol.* 2000; 247 supl. 2: II19-II24.
21. Diamond S.G., Markham C.H., Rand R.W. i wsp.: Four-year follow-up of adrenal-to-brain transplants in Parkinson's disease. *Arch. Neurol.* 1994; 51: 559-563.
22. Langston J.W.: The promise of stem cells in Parkinson disease. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 23-25.
23. Hagell P., Schrag A., Piccini P. i wsp.: Sequential bilateral transplantation in Parkinson's disease: effects of the second graft. *Brain* 1999; 122 (cz. 6): 1121-1132.
24. Hauser R.A., Freeman T.B., Snow B.J. i wsp.: Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch. Neurol.* 1999; 56: 179-187.
25. Brundin P., Pogarell O., Hagell P. i wsp.: Bilateral caudate and putamen grafts of embryonic mesencephalic tissue treated with lazarooids in Parkinson's disease. *Brain* 2000; 123 (cz. 7): 1380-1390.
26. Freed C.R., Greene P.E., Breeze R.E. i wsp.: Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 710-719.
27. Hagell P., Brundin P.: Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2001; 60: 741-752.
28. Olanow C.W., Goetz C.G., Kordower J.H. i wsp.: A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* 2003; 54: 403-414.

29. Kim J.H., Auerbach J.M., Rodríguez-Gómez J.A. i wsp.: Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418: 50-56.
30. Takagi Y., Takahashi J., Saiki H. i wsp.: Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 2005; 115: 102-109.
31. Yoo Y.M., Kim Y.J., Lee U. i wsp.: Neurotrophic factor in the treatment of Parkinson disease. *Neurosurg. Focus* 2003; 15: ECP1.
32. MacLaren R.E., Pearson R.A., MacNeil A. i wsp.: Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006; 444: 203-207.
33. Rieske P., Azizi S.A., Augelli B. i wsp.: A population of human brain parenchymal cells express markers of glial, neuronal and early neural cells and differentiate into cells of neuronal and glial lineages. *Eur. J. Neurosci.* 2007; 25: 31-37.
34. Kim B.J., Kim S.S., Kim Y.I. i wsp.: Forskolin promotes astroglial differentiation of human central neurocytoma cells. *Exp. Mol. Med.* 2004; 36: 52-56.
35. Lu P., Blesch A., Tuszynski M.H.: Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *J. Neurosci. Res.* 2004; 77: 174-191.
36. Guidance for industry: guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. Rockville, MD: Food and Drug Administration, March 1998 [cytowany 28 września 2006 r.]. Adres: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/somgene.pdf>
37. Points to consider in the characterization of cell lines used to produce biologicals. Rockville, MD: Food and Drug Administration, July 12, 1993 [cytowany 28 września 2006 r.]. Adres: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/ptccell.pdf>
38. Guidance for industry: eligibility determination for donors of human cells, tissues, and cellular and tissue-based products (HCT/Ps). Rockville, MD: Food and Drug Administration, May 2004 [cytowany 28 września 2006 r.]. Adres: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/tissdonor.pdf>
39. Guidance for reviewers: instructions and template for chemistry, manufacturing, and control (CMC) reviewers of human somatic cell therapy investigational new drug applications (INDs). Rockville, MD: Food and Drug Administration, August 2003 [cytowany 28 września 2006 r.]. Adres: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/cmcsomcell.pdf>
40. Genbacev O., Krtolica A., Zdravkovic T. i wsp.: Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil. Steril.* 2005; 83: 1517-1529.
41. Kucia M., Ratajczak M.Z.: Stem cells as a two edged sword – from regeneration to tumor formation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57 suppl. 7: 5-16.
42. Ratajczak M.Z.: Cancer stem cells – normal stem cells “Jedi” that went over to the “dark side”. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2005; 43: 175-181.
43. Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J. i wsp.: Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2008; 105: 5856-5861.
44. Hagell P., Piccini P., Björklund A. i wsp.: Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat. Neurosci.* 2002; 5: 627-628.

Komunikat

W każdym numerze czasopisma publikujemy informacje o nadchodzących zjazdach i sympozjach dla lekarzy. Komunikaty te zamieszczamy nieodpłatnie.

Jeśli Państwa Klinika lub Towarzystwo planuje zorganizowanie takiego wydarzenia, prosimy o nadesłanie do redakcji „Aktualności Neurologicznych” notatki o zjeździe na adres kwartalnik „Aktualności Neurologiczne”, ul. Ojcowska 11, 02-918 Warszawa, faks: 022 842 53 63, e-mail: redakcja@neurologia.com.pl

Redakcja