

Komórki macierzyste w udarze mózgu

Stem cell in the cerebral stroke

Anna Gójska, Walenty Michał Nyka

Klinika Neurologii Dorosłych Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

STRESZCZENIE

W poniższym artykule przedstawiono aktualne dane dotyczące komórek macierzystych i ich możliwego zastosowania w udarze mózgu. Zawarto w nim krótkie wprowadzenie w zakresie ogólnych wiadomości dotyczących komórek macierzystych oraz mechanizmów ich krążenia po organizmie. Przedstawiono również neurogenezę fizjologiczną oraz neurogenezę i angiogenezę indukowane udarem. Podsumowano dotychczas przeprowadzone i trwające badania kliniczne poświęcone terapiom komórkowym w udarze mózgu.

Choroby Serca i Naczyń 2010, 7 (1), 23–31

Słowa kluczowe: komórki macierzyste, neurogeniza, terapia komórkowa

ABSTRACT

The following article contains current information about stem cells and their possible appliance in the cerebral stroke. A short introduction of general knowledge on stem cells and mechanisms of their circulation in the organism is included. Furthermore, physiological neurogenesis, stroke-induced neuro- and angiogenesis are presented. Finally, we report recent and on-going clinical trials on stem cell therapy in cerebral stroke.

Choroby Serca i Naczyń 2010, 7 (1), 23–31

Key words: stem cells, neurogenesis, stem cell therapy

WPROWADZENIE

Tradycyjny model linii komórek macierzystych, o charakterze progresywnej restrykcji powstał na podstawie wiedzy na temat układu krwiotwórczego [1]. Komórki macierzyste w miarę dojrzewania i nabywania określonych specyficznych cech tracą możliwość proliferacji i zmiany toru swojego rozwoju. Ostatecznie stają się w pełni zróżnicowanymi i niemymi mitotycznie komórkami

tkanki docelowej. Obecnie wiadomo, że szpik kostny jest zasiedlany nie tylko przez komórki macierzyste hematopoetyczne, zapewniające odnowę morfotycznych elementów krwi, ale również przez komórki macierzyste mezenchymalne (MSC, *mesenchymal stem cells*) i niehematopoetyczne (NHSC, *non-hematopoietic stem cells*). Na przestrzeni lat określano je na wiele różnych sposobów, co wynikało z różnorodnych metod wykorzystywanych do ich izolacji. Te określenia to między innymi śródbłonkowe komórki macierzyste (EPC, *endothelial progenitor cells*), multipotencjalne dojrzałe komórki progenitorowe (MAPC, *multipotent adult progenitor cells*), izolowane ze szpiku dojrzałe komórki indukowane wieloliniowo (MIAMI, *marrow-isolated adult multilineage inducible cells*) [2]. To właśnie one stanowią

Adres do korespondencji:

lek. Anna Gójska
Klinika Neurologii Dorosłych
Uniwersyteckie Centrum Kliniczne, GUMed
ul. Dębinki 7, 80–952 Gdańsk
tel.: 58 349 23 09
e-mail: annagojska@gumed.edu.pl

źródło rosnącego zainteresowania naukowców. Poznanie możliwości ukierunkowywania niehematopoetycznych komórek macierzystych do rozwoju w określonym kierunku pozwoliłoby na utworzenie niezliczonych rozwiązań terapeutycznych.

Obecnie są prowadzone badania poświęcone komórkom macierzystym o różnym pochodzeniu, które miałyby służyć terapiom regeneracyjnym. Ogromne zainteresowanie budzą embrionalne komórki macierzyste (ES, *embryonic stem cells*), których źródłem jest blastocysta zarodka. Zaraz za nimi znajdują się embrionalne komórki gonadalne pobierane z gonad płodów między 5. a 9. tygodniem rozwoju.

W niedawno przeprowadzonych badaniach zasugerowano, że fibroblasty można przeprogramować w celu stworzenia komórek embrionalnych poprzez wprowadzenie specyficznych dla komórek macierzystych czynników transkrypcyjnych [3, 4]. Te pluripotencjalne komórki macierzyste (indukowane komórki macierzyste pluripotencjalne) są genetycznie identyczne z biorcą i etycznie zatwierdzone. Coraz więcej uwagi poświęca się MSC izolowanym ze szpiku, pępowiny czy płynu owodniowego. Ich potencjalne użycie niesie ze sobą wiele korzyści — brak etycznej kontrowersyjności czy możliwość tworzenia przeszczepów autologicznych [5].

Właśnie w obrębie MSC, według ciekawej hipotezy popartej obecnie bardzo przekonującymi dowodami naukowymi, miałyby się znajdować tak zwane ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste [6].

Podczas ontogenezy szpik kostny rozwija się na drodze kolonizacji przez krążące komórki macierzyste. Pod koniec drugiego trymestru ciąży komórki macierzyste rozpoczynają migrację z wątroby płodowej, która w tym momencie jest narządem hematopoetycznym, do szpiku. Sygnałem dla tego transportu jest wzrastający gradient stromalnego czynnika wzrostu 1 (SDF-1, *stromal-derived factor 1*) wydzielanego przez osteoblasty, fibroblasty oraz komórki endotelialne szpiku kostnego. Receptorem dla SDF-1 jest CXCR4, znajdujący się na „przesiedlających się” komórkach macierzystych [6, 7]. Niedawno wykryto jeszcze jeden receptor dla SDF-1 — CXCR7 [8], którego obecność komplikuje, ale jednocześnie rozwija zakres różnych zależności międzykomórkowych.

W obrębie komórek wędrujących do szpiku znajdują się nie tylko komórki hematopoetyczne, ale również ukierunkowane tkankowo komórki macierzyste, a więc komórki zdolne do różnicowania się w kierunku innych tkanek

niż krew. Są to bardzo małe komórki (5–7 μm średnicy), z jądrem przypominającym jądro komórek embrionalnych, wykazujące ekspresję receptora CXCR4. W obrębie populacji ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych można wyizolować takie, które wykazują wskaźniki komórek mięśni szkieletowych (myf-5, MyoD, Myogenina), mięśnia sercowego (Nkx2,5/Csx, GATA-4, MEF-2C), naskórka (Trp63, Krt2-6a, krt2-5, BNC), wątroby (CK19, α -fetoproteina), nabłonka jelitowego (nkx2-3, Tcf4, CDX1, Msi1h), trzustki (Nkx6.1, Pdx1, Ptf1), a także komórek nerwowych (Nestin, GFAP) [6, 9].

W dojrzałym szpiku kostnym znaleziono również komórki cechujące się pluripotencjalnością (SSEA-1, Oct-4, Nanog, Rex-1) — bardzo małe komórki podobne do embrionalnych (VSEL, *very small embryonic-like*). Stanowią one zaledwie 0,02% obecnych w szpiku komórek jednojądrzastych, mają 2–4 μm średnicy, duże jądro typowe dla komórek embrionalnych. Najważniejsze jest jednak to, że *in vitro* tworzą kultury różniące się we wszystkie trzy linie komórkowe. Największa liczba tych komórek znajduje się u młodych osobników i zmniejsza z wiekiem. Silnie reagują na SDF-1, mają receptor CXCR4 [2, 10].

Komórki VSEL, tak jak komórki hematopoetyczne, w dużych ilościach znajdują się w mysiej wątrobie płodowej w okresie drugiego trymestru ciąży. Na początku trzeciego trymestru ich liczba maleje, co odpowiada okresowi, kiedy wątrobę płodową opuszczają komórki hematopoetyczne, które podążając za gradientem SDF-1, kolonizują szpik kostny. Może to potwierdzać hipotezę, że komórki VSEL są mobilne i reagują na podobne, jak komórki hematopoetyczne, czynniki chemotaktyczne [11].

Zatem szpik kostny zasiedlony komórkami macierzystymi ukierunkowanymi tkankowo i VSEL może stanowić źródło komórek macierzystych w przypadku procesów uszkadzających różne tkanki organizmu. Podczas uszkodzenia danej tkanki dochodzi do zwiększenia w jej obrębie produkcji takich czynników chemotaktycznych dla komórek macierzystych ukierunkowanych tkankowo, jak: SDF-1, czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), czynnik hamujący białaczkę (LIF, *leukemia inhibitory factor*) itd. Gradient SDF-1 przesuwa się więc na korzyść niszy uszkodzonej tkanki. Po zadziałaniu bodźca dochodzi do wzrostu liczby krążących ukierunkowanych tkankowo komórek macierzystych, które przemieszczają się do uszkodzonej tkanki, aby tam przyczyniać się do procesów regeneracyjnych. Wydaje się, że proces rywalizacji między niszami narządowymi trwa

bez przerwy, również w stanie fizjologicznym. Tkanka, która wydziela najwięcej chemoatraktantów, przyciąga najwięcej komórek macierzystych [6, 12]. Szpik, chociaż pozostaje największym, to jednak przestaje być jedynym źródłem komórek macierzystych. Są nimi również wątroba, serce, trzustka, mięśnie szkieletowe czy mózg.

Wyniki licznych badań przeprowadzonych na modelach zwierzęcych wykazujące migrację komórek do mózgu, wykrycie młodych neuronów w ludzkim hipokampie czy doniesienia o właściwościach naprawczych komórek macierzystych szpiku kostnego wzbudziło ogromne zainteresowanie naukowców medycyny regeneracyjnej [13]. Istnieje wiele proponowanych rozwiązań z użyciem komórek macierzystych. Rozwiązaniem terapeutycznym stało się również wspomaganie mobilizacji komórek macierzystych poprzez podawanie różnorodnych cytokin, na przykład granulocytarnego czynnika stymulującego kolonie (G-CSF, *granulocyte colony stimulating factor*), chemokin, takich jak SDF-1, czynników troficznyc i wzrostowych: erytropoetyny (EPO, *erythroietin*), mózgowego czynnika neurotroficznego (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) lub glijowego czynnika neurotroficznego (GDNF, *glial-derived neurotrophic factor*). Początkowo zdecydowaną wagę przywiązywano do mechanizmu „zastępowania” uszkodzonych komórek nowymi. Coraz częściej z wyników przeprowadzanych badań wynika, że komórki macierzyste odgrywają raczej rolę „chaperonów” i dodatkowe źródła czynników troficznyc dla uszkodzonej tkanki mózgowej [13].

UDAR MÓZGU

Udar mózgu jest jedną z najczęstszych przyczyn niepełnosprawności i śmierci w dzisiejszym świecie. Stopień powrotu utraconych podczas udaru funkcji wcześniej przypisywano wyłącznie plastyczności komórek neuronalnych, ale coraz więcej badań dowodzi istnienia neurogenezy indukowanej niedokrwieniem [14]. Zanim jednak poruszy się kwestię neurogenezy wywołwanej udarem, warto przytoczyć kilka faktów dotyczących neurogenezy, która ma miejsce w warunkach fizjologicznyc.

Neurogeneza w warunkach fizjologicznyc

Tworzenie ośrodkowego układu nerwowego zaczyna się podczas gastrulacji. Komórki neuroepitelialne układają się wzdłuż linii środkowej embrionu, tworząc płytkę nerwową, która następnie zwija się w cewę nerwową. W mózgu zarodka nowe neurony stale proliferują i migrują ze

strefy przykomorowej (SVZ, *subventricular zone*) do kory. Po porodzie strefa przykomorowa zanika, ale niektóre komórki gleju radialnego, wywodzące się z komórek neuroepitelialnych, pozostają w obszarze SVZ i zachowują właściwości neuralnych komórek macierzystyc [15]. (Komórki macierzyste neuralne — komórki wykazujące zdolność do różnicowania się w kierunku neuronów i komórek gleju; komórki neuronalne — komórki różnicujące się w kierunku neuronów). Podczas rozwoju mitotycznyc potomkowie komórek znajdujących się w SVZ migrują również do wnęki zakrętu zębatego hipokampa, aby utworzyć tam strefę rozrodczą aktywną przez 2 tygodnie po porodzie. Po tym czasie komórki te osadzają się po wewnętrznej stronie warstwy ziarnistej, tworząc strefę przyziarnistą (SGZ, *subgranular zone*) w zakręcie zębatym (DG, *dentate gyrus*) dojrzałego mózgu. Ich zdolność do odnawiania się zmniejsza się wraz z wiekiem organizmu i dlatego są postrzegane raczej jako komórki progenitorowe niż multipotentjalne komórki macierzyste, które znajdują się w SVZ. Umiejscowione w strefie przyziarnistej stale proliferują i migrują do strefy ziarnistej [15]. Komórki macierzyste w dorosłym mózgu znaleziono również w obszarze tylnej strefy okołokomorowej (PPv, *posterior periventricular area*), która otacza hipokamp. Strefę tę uważa się za źródło komórek macierzystyc uzupełniających właściwe neurony hipokampa. W niedawno przeprowadzonych badaniach wykazano obecność neuralnych komórek macierzystyc w innych obszarach mózgu, takich jak prążkowie, rdzeń kręgowy i kora nowa [16, 17].

W warunkach prawidłowyc, w dojrzałym mózgu gryzoni, neuralne komórki macierzyste strefy SVZ przylegają do warstwy komórek wyściółki komór. Są potomkami komórek gleju radialnego, nie są jednak jednorodne. W ich obrębie wyróżnia się cztery typy komórek: A, B, C i E. Prawdziwymi macierzystymi komórkami neuralnymi są komórki typu B [15], które proliferując, dają początek linii komórek typu A lub inaczej tranzytująco-wzmacniającego (TA, *transit-amplifying*). Komórki TA z kolei gwałtownie się namnażają (wzmocnienie), różnicują do neuroblastów, a neuroblasty te wędrują do opuszki węchowej (tranzyt), gdzie różnicują się do interneuronów. Komórki TA migrują do opuszki węchowej, tworząc łańcuchy neuroblastów (określanych mianem „rostralnego strumienia migracji” [RMS, *rostral migratory stream*]). Komórki C znajdują się u podstawy migracyjnych łańcuchów komórek A. Cechują się wysoką zdolnością proliferacyjną i wydają się być stadium pośrednim między komórkami typu B i A [15, 18].

Niedawno zidentyfikowano neuralne komórki macierzyste również w ludzkim SVZ, gdzie znajdują się w pasmach astrocytów oddzielone od wyściółki [19]. Obecność RMS w ludzkim mózgu pozostaje kontrowersyjna [20, 21].

Główną funkcją neurogenezy w dojrzałym mózgu wydaje się wymiana neuronów, które regularnie obumierają — komórek ziarnistych w zakręcie zębatym uzupełnianych progenitorami strefy SGZ czy neuronów opuszki węchowej wymienianych neuroblastami migrującymi z SVZ. Proces odnawiania ma dynamikę procesu obumierania i odbywa się na stałym, ale bardzo niskim poziomie. Proces ten może jednak ulegać wpływom zarówno negatywnym, jak i pozytywnym. Do negatywnych zalicza się takie doświadczenia życiowe, jak stres, przewlekły alkoholizm, depresja, nadużycie leków, napromienianie, wysokotłuszczowa dieta oraz stan zapalny. Za pozytywne doświadczenia życiowe uznaje się wysiłek fizyczny, uczenie się, wzbogacone środowisko, ograniczenie kalorii w diecie oraz indukcję tolerancji niedokrwienia [15, 22].

Neurogeneza indukowana udarem

Neurogeneza indukowana udarem obejmuje proliferację neuralnych komórek macierzystych i progenitorowych, różnicowanie neuralnych komórek progenitorowych oraz migrację neuroblastów do granic niedokrwienia, gdzie neuroblasty różnicują się w kierunku rezydujących neuronów oraz integrują się w tkankę mięszową. W udarze doświadczalnym ogniskowe niedokrwienie mózgu wzmacnia neurogenezę między innymi (bo również w SGZ i PPv [23, 24]) w ipsilateralnej SVZ poprzez zwiększanie frakcji proliferujących komórek SVZ oraz przez skracanie długości cyklu komórkowego [25]. U dorosłych myszy analiza profilu genowego neuralnych komórek progenitorowych z SVZ, które izolowano poprzez mikrodyssekcję laserową, wykazała, że komórki te mają ponad 70% wszystkich genów podlegających ekspresji w embrionalnych neuralnych komórkach progenitorowych kory [26]. W mysich neuralnych komórkach progenitorowych z SVZ udar aktywuje wiele genów zaangażowanych w neurogenezę podczas rozwoju embrionalnego [27]. Neuroblasty emigrują z SVZ do granicy obszaru niedokrwienia prążkowie, gdzie wykazują fenotypy dojrzałych neuronów [28, 29]. Według jednego z badań wędrówka ta jest możliwa dzięki sprzężeniu w układzie SDF-1-CXCR4 i trwa przynajmniej przez 4 miesiące po udarze [30]. Czynnikiem SDF-1 α jest chemokina, która pośredniczy w migracji neuroblastów w rozwijającym się mózgu [31]. W dojrzałym mózgu

gryzoni SDF-1 α , uwalniany przez aktywowane komórki endotelialne w otoczeniu obszaru niedokrwienia, poprzez działanie na receptor CXCR4, przyciąga neuroblasty z SVZ do wspomnianego obszaru [7, 30, 32, 33]. Blokowanie receptora CXCR4 hamuje migrację neuroblastów indukowaną udarem [7, 30, 34]. Leczenie za pomocą komórek mezenchymalnych szpiku kostnego zwiększa stężenie SDF-1 α i promuje migrację neuroblastów do obszaru otaczającego ognisko niedokrwienia [35–37].

Z wykorzystaniem techniki „łatkowej” (*patch clamp*) wykazano, że nowe neurony w granicach niedokrwienia wykazują elektrofizjologiczne cechy dojrzałych neuronów. Sugeruje to, że neuroblasty różnicują się w kierunku rezydujących neuronów i integrują się w lokalną sieć neuronalną [38–40]. Jednak neurogeneza po udarze jest ograniczona i wiele nowo utworzonych neuronów obumiera [38]. Neurogeneza indukowana udarem zachodzi również w SVZ i granicach niedokrwienia mózgu u dorosłych osób [41, 42]. Co istotne, neurogenezę indukowaną udarem obserwowano w dojrzałym ludzkim mózgu nawet wśród osób w podeszłym wieku, około 60–87 lat [43].

Pogłębiając temat, neurogeneza indukowana udarem ma zróżnicowane nasilenie i charakter w zależności od rodzaju i czasu niedokrwienia. W jednym z przeprowadzonych badań wykazano, że 2 minuty całkowitego niedokrwienia mózgowia nie powodują żadnej reakcji ze strony komórek, w tym przypadku strefy SGZ, jednak już w przypadku 4 minut (również dłuższy czas — 10 min) stwierdzano wzrost aktywności proliferacyjnej tych komórek. Zgodnie z wynikami kilku badań narastanie procesu proliferacji komórek (we wszystkich trzech strefach — SGZ, SVZ i PPv) rozpoczyna się 3–4 dni po udarze, a szczyt osiąga po 7–10 dniach. Natężenie procesu powraca do stanu wyjściowego po 3–5 tygodniach od niedokrwienia [23, 44]. W badaniach poświęconych ogniskowemu niedokrwieniu (zamykanie tętnicy środkowej mózgu u szczurów) zaobserwowano wzrost proliferacji komórek w obrębie SGZ i SVZ po 2. dniu, osiągający szczyt w 1.–2. tygodniu oraz powracający do normy po około 3–4 tygodniach [45, 46]. W tym przypadku okres niedokrwienia ma znaczenie — im jest dłuższy, tym bardziej nasila się rozplem komórek. Warto nadmienić, że zamknięcie tętnicy środkowej mózgu powoduje, że wiele z nowo powstałych komórek wędruje do obszaru penumbry prążkowie. Niektóre komórki docierają również do niedokrwionej kory mózgu i ciała modzelowatego, tam jednak nie udawało się odnaleźć dojrzałych neuronów wywodzących się z migrujących

komórek. To może sugerować, że kora mózgu nie stanowi odpowiedniego środowiska dla różnicowania się neuronalnego — albo z powodu braku czynników warunkujących przeżycie, albo z powodu obecności sygnałów, które hamują neuronalne różnicowanie się i przeżycie [15].

Udar a angiogeneza

Omawianie neurogenezy indukowanej udarem wymaga poruszenia tematu niezwykle ważnej w jej procesie angiogenezy. Udar indukuje angiogenezę i neurogenezę — dwa procesy, które są ze sobą połączone [47–54]. Mózgowe naczynia krwionośne zapewniają głównie odżywczy przepływ krwi. Jednak mózgowie komórki endotelialne wydzielają czynniki, które regulują biologiczną aktywność neuralnych komórek progenitorowych. W przypadku warunków fizjologicznych neurogeneza strefy przyziarnistej zakrętu zębatego ma miejsce w zakresie mikrośrodowiska angiogenego [55]. W warunkach patofizjologicznych, po udarze, neuroblasty utworzone w SVZ migrują do granicy niedokrwienia, gdzie ma miejsce angiogeneza, a w czasie migracji komórki te są ściśle związane z naczyniami krwionośnymi [51, 53, 55]. Supresja angiogenezy istotnie ogranicza migrację do obszaru niedokrwienia nowo utworzonych neuroblastów [56]. W mózgu gryzoni pączkowanie kapilar jest inicjowane na granicy niedokrwienia, a nowe naczynia rozwijają się w tym obszarze między 2. a 28. dniem od początku niedokrwienia [57, 58]. W mózgu człowieka angiogeneza w obszarze penumbry ma miejsce 3–4 dni po udarze [59].

U osób z udarem obserwowano istotną korelację między liczbą naczyń mózgowych na obrzeżach kory a okresem przeżycia. Pacjenci, u których gęstość naczyń krwionośnych jest duża, żyją dłużej niż osoby, u których jest ona mała [58, 60, 61]. W niedokrwionej tkance mózgowej zwierząt poddawanych terapiom komórkowym i farmakologicznym dochodziło do wzmagania procesu angiogenezy, co wiązało się z poprawą w zakresie funkcjonalności [62–66].

Komórki macierzyste w udarze — jak i kiedy stosować?

Dane z badań przedklinicznych wskazują, że terapie komórkowe i farmakologiczne, które wzmagają procesy naprawy mózgu, istotnie zwiększają naprawę funkcjonalną, jeśli są stosowane 24 godziny lub później po udarze albo uszkodzeniu mózgu [56, 63, 67–73]. Oczywiście nie oznacza to, że ustalono dokładnie optymalny czas wykonania przeszczepu komórkowego po udarze. Wynika to z dynamicznych zmian, jakim z czasem podlega obszar

niedokrwienia [74]. W udarze eksperymentalnym obserwowano, że w okresie pierwszych 2–3 tygodni lub nawet dłuższym w korze wokół obszaru niedokrwienia dochodzi do wzmożenia ekspresji genów związanych z modulacją wzrostu neuronalnego, włączając: zwiększoną ekspresję białek cytoszkieletu, angiogenezę, proliferację komórek, różnicowanie i migrację komórek z obszaru okołokomorowego (SVZ) [75]. Jednak przeszczepianie bezpośrednio po ostrej fazie udaru oznacza trudności związane z niekorzystnym środowiskiem tworzącej się blizny.

Sposób podania komórek to kolejny aspekt terapii komórkowych. W kilku badaniach stwierdzano poprawę w modelach zwierzęcych oraz u ludzi po zastosowaniu różnych dróg podawania komórek (domózgowo, dokomorowo lub dożylnie) [23, 76, 77]. Chociaż komórki docierają do ogniska i wywierają podobny wpływ bez względu na drogę podania, więcej komórek znajdowano w otoczeniu ogniska w przypadku podania domózgowego [78]. W ostrym okresie udaru bardziej racjonalne wydaje się podawanie komórek do obszaru penumbry, z uwagi na obecność żywotnego środowiska [79]. Natomiast przeszczep można by przeprowadzać w oddaleniu od obszaru zawału, na przykład po drugiej stronie, w środowisku zdrowym i dobrze unaczynionym [80]. Modo i wsp. [81] zademonstrowali, że po udarze zarówno uszkodzona, jak i zdrowa półkula przyciąga przeszczepiane komórki, co sugeruje obecność aktywacji procesów naprawczych lokalnie oraz w zakresie kontralateralnych dróg ruchowych. Podanie dożylnie, chociaż mniej inwazyjne, wiąże się z kwestią swoistości migracji komórek. Podsumowując, nadal pozostaje do ustalenia najlepsza droga przeszczepiania, w której uwzględniano by specyficzny rodzaj komórki lub mechanizm działania leżący u podstawy korzystnych efektów [82].

BADANIA KLINICZNE

Obecnie terapia komórkami macierzystymi u pacjentów z udarem jest bardzo słabo rozwinięta. Dotychczas przeprowadzono zaledwie kilka badań, w których oceniano bezpieczeństwo i efekty stosowania różnych komórek w udarze [76, 77, 83–89].

Pierwsza próba zastosowania terapii komórkowej u chorych po udarze niedokrwinnym dotyczyła 12 pacjentów między 6. miesiącem a 4,5 roku po udarze jąder podstawy mózgu, którym wszczepiano komórki hNT wprowadzone z linii NT2-N. Było to otwarte badanie I fazy przeprowadzone przez Kondziolkę i wsp. [84], zatwier-

dzone przez *Food and Drug Administration* (FDA) w 1998 roku. Pacjenci po zabiegu byli poddani immunosupresji przez 8 tygodni. Pięć lat po operacji nie obserwowano działań niepożądanych związanych z implantacją komórek (odpowiednio 2 lub 6 mln). Autopsja przeprowadzona u jednego chorego, który zmarł z powodu zawału serca, wykazała populację immunorektywne przeszczepionych komórek, bez objawów zapalenia lub nowotworzenia, co sugeruje wydłużone przeżycie przeszczepu nawet przy braku stałego stosowania leków immunosupresyjnych [90]. W pozytonowej tomografii emisyjnej (PET, *positron emission tomography*) wykonanej w 6. miesiącu wykazano wysoki wychwył F-18 fluorodeoksyglukozy w miejscu transplantacji u 6 osób, co sugeruje przeżycie przeszczepu lub odpowiedź zapalną [91]. Choć celem badania nie była ocena skuteczności, u 6 pacjentów odnotowano poprawę w Europejskiej Skali Udaru (ESS, *European Stroke Scale*) w 24. tygodniu, a u niektórych badanych korelowało to ze wzmożoną aktywnością metaboliczną wykazywaną w badaniu PET. Następnie w 2005 roku, również Kondziolka i wsp. [77] zaprezentowali randomizowane otwarte badanie II fazy, którego celem była ocena bezpieczeństwa, wykonalności i skuteczności przeszczepienia komórek NT2N w udarze. U 18 pacjentów ze stabilnym deficytem, 1–6 lat po udarze niedokrwiennym lub krwotocznym, dokonano randomizacji do grupy, w której otrzymywali 5 lub 10 milionów implantowanych komórek (7 osób na grupę) lub do grupy kontrolnej — niepoddanej operacji (4 osoby). Wszyscy badani uczestniczyli w programie rehabilitacyjnym. U jednego pacjenta stwierdzono pojedynczy napad drgawkowy dzień po zabiegu, u kolejnego — krwaka podtwardówkowego, którego usunięto miesiąc po transplantacji. Nie obserwowano działań niepożądanych związanych z implantowanymi komórkami. Pierwotny rezultat oceniano na podstawie ruchowej ESS w 6. miesiącu po zabiegu. Do wtórnych punktów końcowych zaliczono skale oceny udaru Fugl-Meyera (FMS, *Fugl-Meyer Scale*), *Action Reach Arm Test*, *Stroke Impact Scale* oraz wyniki kompleksowego badania funkcji poznawczych. Wyniki w ruchowej ESS pacjentów poddanych przeszczepieniu nie różniły się od danych uzyskanych w grupie kontrolnej. U osób z tej grupy obserwowano natomiast istotną poprawę w zakresie wtórnych punktów końcowych [77].

W trzecim z badań Savitz i wsp. [86] stereotaktycznie wstrzykiwali świńskie komórki płodowe 5 pacjentom, którzy przeszli udar jąder podstawy mózgu 1, 5 i 10 lat przed zabiegiem. Badanie zostało przerwane przez FDA, ponie-

waż u 2 osób wystąpiły działania niepożądane. U jednego pacjenta odnotowano nasilenie deficytów ruchowych 3 tygodnie po interwencji, u kolejnego — napady drgawkowe tydzień po implantacji. Po 4 latach klinicznej obserwacji u 2 badanych wykazano poprawę funkcjonalną, ale w żadnym przypadku nie stwierdzono korzyści w zakresie zmodyfikowanej Skali Rankina (mRS, *modified Rankin Scale*).

Również w 2005 roku Bang i wsp. [83] zaprezentowali randomizowane kliniczne badanie kontrolowane fazy I/II, w którym podawano autologiczne MSC w przypadku masywnego zawału koronowego w zakresie terytorium unaczynienia tętnicy środkowej mózgu. Z 30 pacjentów, w ciągu 7 dni od udaru, 5 otrzymało dożylnie autologiczne komórki macierzyste, zaś u 25 nie było interwencji. Nie stwierdzono działań niepożądanych związanych z podawanymi komórkami. W obserwacji klinicznej po roku odnotowano nieistotną poprawę w zakresie Skali Barthel (BS, *Barthel Scale*) i mRS u pacjentów leczonych komórkami macierzystymi. Zmiany w zakresie punktacji w skali *National Institute of Health Stroke* (NIHSS) były nieznaczące.

Rabinovich i wsp. [85] wstrzykiwali ludzkie komórki płodowe do przestrzeni podpajęczynówkowej 10 pacjentom, między 4. a 24. miesiącem po udarze niedokrwiennym lub krwotocznym w zakresie unaczynienia tętnicy środkowej mózgu. U niektórych badanych wystąpiła gorączka i objawy oponowe w ciągu 48 godzin od zabiegu. Grupę kontrolną oceniano retrospektywnie i punkty końcowe nie zostały jasno przedstawione [85].

Uwagę autora zwróciły również bardzo ciekawe, choć pod wieloma względami kontrowersyjne, badania przeprowadzane w Chinach, pomijane w światowym piśmiennictwie naukowym.

W latach 2002–2004 Yang i wsp. [87] w Publicznym Szpitalu w *Anyang* w Chinach badali wpływ podawania do przestrzeni podpajęczynówkowej, drogą punkcji lędźwiowej, neuralnych komórek macierzystych wyhodowanych z mózgow ludzkich embrionów. Grupa pacjentów objętych badaniem wynosiła 59 osób (39 mężczyzn oraz 20 kobiet), spośród których 41 przeżyło udar niedokrwienny, a 18 — krwotoczny. Pacjentów oceniano po 24 miesiącach za pomocą ESS oraz BS. Autorzy raportowali, że u wszystkich badanych uzyskano istotną poprawę. U 12 pacjentów stwierdzono przejściowy wzrost temperatury ciała w ciągu 24 godzin po zabiegu (37,4–38,5 °C), u 6 — niewielki ból głowy w okresie pooperacyjnym. Po 24 miesiącach w badaniach dodatkowych (tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny, EKG, RTG klatki piersiowej oraz bada-

nia laboratoryjne krwi) nie wykazano odchyień od normy u żadnego z pacjentów.

W 2005 roku Li i wsp. [88] w Centrum Czerwonego Krzyża Henan oraz w II Publicznym Szpitalu Zhengzhou w Chinach (rejon ww. badania zespołu Yang), przeprowadzili badanie, w którym 10 pacjentom w wieku 36–75 lat, w ciągu 3 miesięcy do 7 lat po udarze, podawano dożylnie MSC (średnio 6 porcji w odstępach 4-dniowych) pochodzących z krwi pępowinowej. Krew pępowinowa została pobrana od grupy 63 kobiet w położu. Funkcje neurologiczne badano (m.in. za pomocą FMS i BS) przed leczeniem i 3 miesiące po terapii. Autorzy badania podali, że funkcje neurologiczne uległy istotnej statystycznie poprawie, na dodatek nie obserwowano działań niepożądanych czy reakcji odrzucenia przeszczepu.

Meng i wsp. [89] w latach 2003–2008 prowadzili badanie w Szpitalu Qilu Uniwersytetu w Shandong, w którym 120 pacjentów po udarze niedokrwiennym mózgu podzielono równo (po 30 chorych) na 4 grupy: 1) grupę, w której stosowano leczenie zachowawcze (kontrolna); 2) grupę, w której dokonano mobilizacji komórek macierzystych filgrastinem (150 ug sc.) plus leczenie zachowawcze; 3) grupę, która jednorazowo, dożylnie, otrzymała MSC ($16,2-51,3 \times 10^3$) plus leczenie zachowawcze oraz 4) grupę, której podano komórki dożylnie, filgrastin oraz poddano leczeniu zachowawczemu (grupa terapii łączonej). W porównaniu z grupą kontrolną ocena neurologiczna w FMS oraz w Skali Niezależnego Funkcjonowania (FIM, *Function Idependence Measure*) była wyraźnie lepsza w pozostałych 3 grupach w 4. i 12. tygodniu, jak również 6 miesięcy po leczeniu. Efekt terapeutyczny był najlepszy w grupie terapii łączonej. W ciągu 14 dni po leczeniu nie odnotowano działań niepożądanych w grupie drugiej. W grupie, w której przeszczepiano komórki, u 4 pacjentów obserwowano podwyższoną temperaturę ciała ($< 38^\circ\text{C}$ — powróciła do normy po 24 godzinach). U 3 osób z tej grupy stwierdzono łagodny ból głowy i wypisano ich do domu po 24 godzinach, bez dodatkowego leczenia. Sytuacja była identyczna w grupie leczenia łączonego (4 pacjentów z gorączką i 3 z bólem głowy).

Obecnie trwają 2 badania, w których jest prowadzona rekrutacja chorych po udarze do przeszczepiania autologicznych komórek macierzystych. Celem jednego z nich, prowadzonego w Wielkiej Brytanii, jest ocena bezpieczeństwa i tolerancji autologicznych komórek CD 34⁺ pochodzących ze szpiku, podawanych drogą infuzji pacjentom, którzy przeżyli ostry udar niedokrwienny w zakresie ca-

łego przedniego krążenia mózgowego. Celem drugiego badania (wykonywanego w Brazylii) jest ocena bezpieczeństwa i wykonalności dotętnicznej infuzji autologicznych jednojądrzastych komórek szpiku kostnego u pacjentów z ostrą i podostrą fazą (> 3 dni i < 90 dni od początku udaru) udaru niedokrwiennego w zakresie unaczynienia środkowej tętnicy mózgu.

Podsumowując, nie można porównywać powyższych wstępnych badań przeprowadzonych u ludzi, z uwagi na różnice w populacji, rodzaj komórek, okres oraz sposób transplantacji. Tym niemniej wskazują one na fakt, że terapia komórkowa jest technicznie wykonalna u chorych z udarem. Działania niepożądane (pomijając kontrowersyjne wyniki badań przeprowadzonych w Chinach) obserwowano w 3 z 5 omawianych badań [77, 85, 92], bezpieczeństwo staje się więc największym problemem. Wiadomo, że dalsze badania kliniczne są bardzo potrzebne. Zalecenia i wytyczne do ich prowadzenia u ludzi, na podstawie wyników przedklinicznych i laboratoryjnych badań poświęconych udarowi, opublikowano po konferencji *The Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm In Stroke* (STEPS) [93].

PIŚMIENICTWO

1. Rice C., Halfpenny C., Scolding N. Stem cells for the treatment of neurological disease. *Transfusion Medicine* 2003; 13: 351–361.
2. Kucia M., Wysoczynski M., Ratajczak J. i wsp. Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow. *Cell Tissue Res.* 2008; 331: 125–134.
3. Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif.* 2008; 41 (supl. 1): 51–56.
4. Park I.H., Zhao R., West J.A. i wsp. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451: 141–146.
5. Zietlow R., Lane E., Dunnett S. i wsp. Human stem cells for CNS repair. *Cell Tissue Res.* 2008; 331: 301–322.
6. Kucia M., Goździk J., Majka M. i wsp. Szpik kostny jako źródło niehematopoetycznych komórek macierzystych. *Acta Haematol. Pol.* 2005; 36 (supl. 2): 19–31.
7. Imitola J., Raddassi K., Park K. i wsp. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1 alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 18117–18122.
8. Burns J.M., Summers B.C., Wang Y. i wsp. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *Journal of Experimental Medicine* 2006; 203: 2201–2213.
9. Kabos P., Ehtesham M., Black K. Neural stem cells as delivery vehicles. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2003; 3: 759–770.
10. Kucia M., Reza R., Campbell F. i wsp. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4⁺, SSEA-1⁺, Oct-4⁺, stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 2006; 20: 857–869.
11. Zuba-Surma E.K., Kucia M., Rui L. i wsp. Fetal liver very small embryonic/epiblast like stem cells follow developmental migratory pathway of hematopoietic stem cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 2009; 1176: 205–218.
12. Kucia M., Zhang Y., Reza R. i wsp. Cells enriched in markers of neural tissue-committed stem cells reside in bone marrow and are mobilized into the peripheral blood following stroke. *Leukemia* 2006; 20: 18–28.
13. Hess D., Borlongan C. Stem cells and neurological diseases. *Cell Proliferation* 2008; 41 (supl. 1): 94–114.
14. Rice C., Halfpenny C., Scolding N. Stem cells for the treatment of neurological disease. *Transfusion Medicine* 2003; 13: 351–361.

15. Wiltrout Ch., Lang B., Yan Y. i wsp. Repairing brain after stroke: a review on post-ischemic neurogenesis. *Neurochem. Int.* 2007; 50: 1028–1041.
16. Palmer T.D., Markakis E.A., Willhoite A.R., Safar F., Gage F.H. Fibroblast growth factor-2 activates a latent neurogenic program in neural stem cells from diverse regions of the adult CNS. *J. Neurosci.* 1999; 19: 8487–8497.
17. Yamamoto S., Nagao M., Sugimori M. i wsp. Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 2001; 21: 9814–9823.
18. Okano H., Sakaguchi M., Ohki K. i wsp. Regeneration of the central nervous system using endogenous repair mechanisms. *J. Neurochem.* 2007; 102: 1459–1465.
19. Curtis M.A., Kam M., Nannmark U. i wsp. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 2007; 315: 1243–1249.
20. Sanai N., Tramontin A.D., Quinones-Hinojosa A. i wsp. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature* 2004; 427: 740–744.
21. Quinones-Hinojosa A., Sanai N., Soriano-Navarro M. i wsp. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.* 2006; 494: 415–434.
22. Vaynman S., Gomez-Pinilla F. License to run: exercise impacts functional plasticity in the intact and injured central nervous system by using neurotrophins. *Neurorehabil. Neural Repair* 2005; 19: 283–295.
23. Tonchev A., Yamashita T., Guo J. i wsp. Expression of angiogenic and neurotrophic factors in the progenitor cell niche of adult monkey subventricular zone. *Neuroscience* 2007; 144: 1425–1435.
24. Yagita Y., Kitagawa K., Ohtsuki T. i wsp. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 2001; 32: 1890–1896.
25. Zhang R.L., Zhang Z.G., Roberts C., Letourneau Y., Lu M., Zhang L., Wang Y., Chopp M. Lengthening the G(1) phase of neural progenitor cells is concurrent with an increase of symmetric neuron generating division after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008; 28: 602–611.
26. Abramova N., Charniga C., Goderie S.K., Temple S. Stage-specific changes in gene expression in acutely isolated mouse CNS progenitor cells. *Dev. Biol.* 2005; 283: 269–281.
27. Liu X.S., Zhang Z.G., Zhang R.L. i wsp. Stroke induces gene profile changes associated with neurogenesis and angiogenesis in adult subventricular zone progenitor cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27: 564–574.
28. Zhang R., Zhang Z., Wang L. i wsp. Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004; 24: 441–448.
29. Parent J.M., Vexler Z.S., Gong C., Derugin N., Ferriero D.M. Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann. Neurol.* 2002; 52: 802–813.
30. Thored P., Arvidsson A., Cacci E. i wsp. Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 2006; 24: 739–747.
31. Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., Florio T., Schettini G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 2001; 22: 147–184.
32. Ohab J.J., Fleming S., Blesch A., Carmichael S.T. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J. Neurosci.* 2006; 26: 13007–13016.
33. Robin A.M., Zhang Z.G., Wang L. i wsp. Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006; 26: 125–134.
34. Hill W.D., Hess D.C., Martin-Studdard A. i wsp. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63: 84–96.
35. Shen L.H., Li Y., Chen J. i wsp. Therapeutic benefit of bone marrow stromal cells administered 1 month after stroke. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 2007; 27: 6–13.
36. Chen J., Li Y., Katakowski M. i wsp. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. *J. Neurosci. Res.* 2003; 73: 778–786.
37. Wang Y., Deng Y., Zhou G.Q. SDF-1alpha/CXCR4-mediated migration of systemically transplanted bone marrow stromal cells towards ischemic brain lesion in a rat model. *Brain Res.* 2008; 1195: 104–112.
38. Arvidsson A., Collin T., Kirik D., Kokaia Z., Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* 2002; 8: 963–970.
39. Yamashita T., Ninomiya M., Hernandez A., Costa P. i wsp. Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J. Neurosci.* 2006; 26: 6627–6636.
40. Hou S.W., Wang Y.Q., Xu M. i wsp. Functional integration of newly generated neurons into striatum after cerebral ischemia in the adult rat brain. *Stroke* 2008; 39: 2837–2844.
41. Macas J., Nern C., Plate K.H., Momma S. Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J. Neurosci.* 2006; 26: 13114–13119.
42. Jin K., Wang X., Xie L. i wsp. Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 13198–13202.
43. Minger S.L., Ekonomou A., Carta E.M., Chinoy A., Perry R.H., Ballard C.G. Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen. Med.* 2007; 2: 69–74.
44. Yagita Y., Kitagawa K., Ohtsuki T. i wsp. Neurogenesis by progenitor cells in the ischemic adult rat hippocampus. *Stroke* 2001; 32: 1890–1896.
45. Dempsey R., Sailor K., Bowen K. i wsp. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: effect of exogenous IGF-1 and GDNF. *J. Neurochem.* 2003; 87: 586–597.
46. Zhu D., Liu S., Sun H., Lu Y. i wsp. Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus. *J. Neurosci.* 2003; 23: 223–229.
47. Zhang Z.G., Zhang L., Jiang Q. i wsp. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J. Clin. Invest.* 2000; 106: 829–838.
48. Zhang Z.G., Zhang L., Tsang W. i wsp. Correlation of VEGF and angiotensin II expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22: 379–392.
49. Zhang Z.G., Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiotensin II in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002; 12: 62–66.
50. Morris D.C., Davies K., Zhang Z., Chopp M. Measurement of cerebral microvessel diameters after embolic stroke in rat using quantitative laser scanning confocal microscopy. *Brain Res.* 2000; 876: 31–36.
51. Zhang Z.G., Tsang W., Zhang L., Powers C., Chopp M. Up-regulation of neuropilin-1 in neovasculature after focal cerebral ischemia in the adult rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001; 21: 541–549.
52. Ohab J.J., Fleming S., Blesch A., Carmichael S.T. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J. Neurosci.* 2006; 26: 13007–13016.
53. Teng H., Zhang Z.G., Wang L. i wsp. Coupling of angiogenesis and neurogenesis in cultured endothelial cells and neural progenitor cells after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008; 28: 764–771.
54. Thored P., Wood J., Arvidsson A., Cammenga J., Kokaia Z., Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 2007; 38: 3032–3039.
55. Palmer T.D., Willhoite A.R., Gage F.H. Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J. Comp. Neurol.* 2000; 425: 479–494.
56. Wang L., Zhang Z., Wang Y., Zhang R., Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 2004; 35: 1732–1737.
57. Garcia J., Cox J., Hudgins W. Ultrastructure of the microvasculature in experimental cerebral infarction. *Acta Neuropathol.* 1971; 18: 273–285.
58. Zhang Z.G., Zhang L., Tsang W. i wsp. Correlation of VEGF and angiotensin II expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22: 379–392.
59. Krupinski J., Kaluza J., Kumar P., Kumar S., Wang J.M. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 1794–1798.
60. Slevin M., Krupinski J., Slowik A., Kumar P., Szczudlik A., Gaffney J. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 1863–1870.
61. Wang L., Zhang Z.G., Gregg S.R. i wsp. The Sonic hedgehog pathway mediates carbamylated erythropoietin-enhanced proliferation and differentiation of adult neural progenitor cells. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 32462–32470.
62. Jiang Q., Zhang Z.G., Ding G.L. i wsp. Investigation of neural progenitor cell induced angiogenesis after embolic stroke in rat using MRI. *Neuroimage* 2005; 28: 698–707.

63. Zhang R., Wang L., Zhang L. i wsp. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ. Res.* 2003; 92: 308–313.
64. Chen J., Zhang C., Jiang H. i wsp. Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005; 25: 281–290.
65. Zacharek A., Chen J., Cui X. i wsp. Angiopoietin1/Tie2 and VEGF/Flk1 induced by MSC treatment amplifies angiogenesis and vascular stabilization after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007; 27: 1684–1691.
66. Wang L., Chopp M., Gregg S.R. i wsp. Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008; 28: 1361–1368.
67. Zhang R., Wang Y., Zhang L. i wsp. Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. *Stroke* 2002; 33: 2675–2680.
68. Chen J., Zhang Z.G., Li Y. i wsp. Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann. Neurol.* 2003; 53: 743–751.
69. Lu D., Goussev A., Chen J. i wsp. Atorvastatin reduces neurological deficit and increases synaptogenesis, angiogenesis, and neuronal survival in rats subjected to traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 2004; 21: 21–32.
70. Shyu W.C., Lin S.Z., Yang H.I. i wsp. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation* 2004; 110: 1847–1854.
71. Jin K., Sun Y., Xie L., Childs J., Mao X.O., Greenberg D.A. Post-ischemic administration of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) reduces infarct size and modifies neurogenesis after focal cerebral ischemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2004; 24: 399–408.
72. Taguchi A., Soma T., Tanaka H. i wsp. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 2004; 114: 330–338.
73. Willing A.E., Vendrame M., Mallery J. i wsp. Mobilized peripheral blood cells administered intravenously produce functional recovery in stroke. *Cell Transplant.* 2003; 12: 449–454.
74. Dirnagl U., Iadecola C., Moskowitz M.A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999; 22: 391–397.
75. Chen C.P., Lee Y.J., Chiu S.T., Shyu W.C., Lee M.Y., Huang S.P., Li H. The application of stem cells in the treatment of ischemic diseases. *Histol. Histopathol.* 2006; 21: 1209–1216.
76. Capone C., Frigerio S., Fumagalli S. i wsp. Neurosphere-derived cells exert a neuroprotective action by changing the ischemic microenvironment. *PLoS One* 2007; 4: 1–11.
77. Kondziolka D., Steinberg G.K., Wechsler L. i wsp. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J. Neurosurg.* 2005; 103: 38–45.
78. Jin K., Sun Y., Xie L. i wsp. Comparison of ischemia-directed migration of neural precursor cells after intrastriatal, intraventricular, or intravenous transplantation in the rat. *Neurobiol. Dis.* 2005; 18: 366–374.
79. Hadani M., Freeman T., Munsiff A., Young W., Flamm E. Fetal cortical cells survive in focal cerebral infarct after permanent occlusion of the middle cerebral artery in adult rats. *J. Neurotrauma* 1992; 9: 107–112.
80. Veizovic T., Beech J.S., Stroemer R.P., Watson W.P., Hodges H. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* 2001; 32: 1012–1019.
81. Modo M., Stroemer R.P., Tang E., Patel S., Hodges H. Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke* 2002; 33: 2270–2278.
82. Bliss T., Guzman R., Daadi M., Steinberg G.K. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007; 38 (supl. 2): 817–826.
83. Bang O.Y., Lee J.S., Lee P.H., Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann. Neurol.* 2005; 57: 874–882.
84. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S., Meltzer C. i wsp. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000; 55: 565–569.
85. Rabinovich S.S., Seledtsov V.I., Banul N.V. i wsp. Cell therapy of brain stroke. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2005; 139: 126–128.
86. Savitz S.I., Dinsmore J., Wu J., Henderson G.V., Stieg P., Caplan L.R. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc. Dis.* 2005; 20: 101–107.
87. Yang Q.-C., Liang C.-C., Li M.-X., Zhang X.D., Ma D.F. Neural stem cell transplantation for treating stroke sequela in 59 cases. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 2007; 11: 4033–4035.
88. Li J.-B., Man Y., Shan H., Zhao L.N., Duan Y.L. Sterile preparation of umbilical cord derived mesenchymal stem cells with multiple bags: Method and effect. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 2007; 11: 4781–4784.
89. Meng X.-G., Zhu S.-W., Gao H. i wsp. Treatment of cerebral infarction using autologous marrow mesenchymal stem cells transplantation: A six-month follow-up. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research* 2007; 13: 6374–6378.
90. Nelson P.T., Kondziolka D., Wechsler L. i wsp. Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am. J. Pathol.* 2002; 160: 1201–1206.
91. Meltzer C.C., Kondziolka D., Villemagne V.L. i wsp. Serial [18F] fluorodeoxyglucose positron emission tomography after human neuronal implantation for stroke. *Neurosurg.* 2001; 49: 586–591.
92. Rafii S., Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat. Med.* 2003; 9: 702–712.
93. Stem Cell Therapies as an Emerging Paradigm in Stroke (STEPS): bridging basic and clinical science for cellular and neurogenic factor therapy in treating stroke. *Stroke* 2009; 40: 510–515.