

Terapia komórkowa w neurologii — obawy i nadzieje

Anna Sarnowska¹, Aleksandra Habich²,
Wojciech Maksymowicz², Krystyna Domańska-Janik^{1, 2}

¹Zakład Neurobiologii Naprawczej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

²Katedra Neurologii i Neurochirurgii Wydziału Nauk Medycznych Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie

STRESZCZENIE

Opracowanie standardów kontroli bezpieczeństwa i efektywności terapii chorób neurologicznych na podstawie unikatowych właściwości komórek macierzystych stanowi pilne zadanie dla środowiska lekarskiego. Większość z zarejestrowanych do tej pory badań klinicznych oparto na autologicznych przeszczepieniach mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC, *mesenchymal stem cells*, alternatywnie *mesenchymal stromal cells*) otrzymywanych w warunkach hodowlanych *in vitro* z różnych, dojrzałych i płodowych tkanek ludzkich, których pierwotne pochodzenie i precyzyjny rodowód pozostają przedmiotem dyskusji.

W przeprowadzonych badaniach klinicznych nad terapią komórkami macierzystymi, z których ponad 80% dotyczyło chorób układu nerwowego, nie zaobserwowano poważniejszych powikłań zagrażających życiu i zdrowiu pacjentów. Wskazuje to na wysoki stopień bezpieczeństwa terapii z zastosowaniem komórek macierzystych/progenitorowych pochodzenia tkankowego, jednak ostateczne potwierdzenie tego wniosku wymaga rozszerzonego zakresu badań podstawowych, a przede wszystkim dłuższego czasu obserwacji pacjentów.

Należy się także spodziewać, że lepsze poznanie mechanizmów terapeutycznego działania komórek macierzystych wraz z ustaleniem opartych na nich standardów postępowania lekarskiego doprowadzi do zwiększonej skuteczności tych terapii.

Polski Przegląd Neurologiczny 2014; 10 (1): 1–14

Słowa kluczowe: terapia komórkowa, komórki macierzyste, terapia regeneracyjna

Wprowadzenie

Od czasu pojawienia się pierwszych doniesień o możliwościach otrzymywania praktycznie nie-limitowanych ilości ludzkich komórek macierzystych *in vitro* [1] oraz ich dalszego różnicowania, obejmującego między innymi również podstawowe komórki układu nerwowego (neurony, astrocyty i oligodendrocyty), stało się oczywistym, że odkrycie to wytyczy całkiem nowy kierunek w terapii chorób neurologicznych [2, 3], tym bardziej że już stosunkowo wcześniej wykazano, że terapeutycznie kompetentne komórki neuralne można otrzymywać nie tylko ze wzbudzających zastrzeżenia etyczne macierzystych komórek zarodkowych, ale również wykorzystując w tym celu dojrzałe tkanki, na przykład szpik kostny czy krew pępowinową [4, 5]. Jednak już na tym najwcześniejszym etapie pojawiły się pierwsze ostrzeżenia przed nowymi zagrożeniami związanymi zarówno z niezwykle dużym potencjałem proliferacyjnym tych komórek, jak i z ich szerokim, a tym samym często wymykającym się kontroli, spektrum różnicowania do tkanek potomnych [6, 7].

W wyniku dalszych intensywnych badań część z tych niepokojących problemów udało się rozwiązać. Obecnie wiadomo, że użycie zarodków w celu otrzymania pluripotencjalnych komórek macierzystych nie jest bezwzględnie konieczne. Po pierwsze, w wielu grupach badawczych potwierdzono kwestionowane wcześniej polskie pionierskie doświadczenia nad krwią pępowinową [4] wykazujące, że komórki macierzyste o rozszerzonym zakresie różnicowania przekraczającego bariery listków zarodkowych występują również w innych niszach tkankowych i to na różnych etapach rozwoju organizmu [8–10]. Jednak

Adres do korespondencji:

prof. dr hab. n. med. Krystyna Domańska-Janik
Zakład Neurobiologii Naprawczej
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN
ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa
tel.: 22 608 66 04, faks: 22 668 55 32
e-mail: krystyna.dj@gmail.com
Polski Przegląd Neurologiczny 2014, tom 10, 1, 1–14
Wydawca: „Via Medica sp. z o.o.” sp. k.
Copyright © 2014 Via Medica

otrzymanie tych komórek w ilościach koniecznych do repopulacyjnej terapii komórkowej stanowi ciągle jeden z istotniejszych problemów praktycznych. Z tego powodu główne zainteresowanie klinicystów skupia się raczej na przeszczepieniach heterogennych frakcji mezenchymalnych komórek macierzystych (MSC, *mesenchymal stem cells*, alternatywnie *mesenchymal stromal cells*), które można izolować i hodować *in vitro* w nieporównywalnie większych ilościach. Występują one we względnie łatwo dostępnych niszach tkankowych, takich jak szpik kostny, tkanka tłuszczowa czy też tkanki płodowe uzyskiwane nieinwazyjnie w okresie okołoporodowym (w tym krew pępowinowa). Dzięki przełomowemu odkryciu, uhonorowanemu Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny [11], opracowano molekularne metody cofania różnicowania komórek somatycznych do ich pierwotnego stanu pluripotencjalności, tak zwanych indukowanych macierzystych komórek pluripotencjalnych (iPS, *induced-pluripotent stem cells*), w którym wykazują potencjał rozwojowy równy embrionalnym komórkom macierzystym (ESC, *embryonic stem cells*). Przy całym entuzjazmie dotyczącym znaczenia tego odkrycia należy jednak pamiętać, że również i te komórki, podobnie jak ESC, stwarzają wszystkie potencjalne zagrożenia w przypadku ich stosowania terapeutycznego. Jak wspomniano, jest to ich duży, praktycznie nielimitowany potencjał rozrostowy prowadzący, wraz z niestabilnością (epi)genetyczną i labilnością kierunków różnicowania, do wysokiego prawdopodobieństwa ektopicznego rozwoju tkanek niepożądanych, w tym również nowotworowych. W próbach klinicznych przeważają w dalszym ciągu o wiele bezpieczniejsze komórki macierzyste występujące samoistnie w różnych tkankach dojrzałych, które dzięki rozwojowi metod ich otrzymywania są ostatnio ogólnie dostępne.

Obecnie jesteśmy świadkami lawinowego pojawiania się doniesień o próbach zastosowania komórek macierzystych/progenitorowych w leczeniu licznych chorób, w ogromnej większości neurologicznych (www.ClinicalTrials.gov). Jednocześnie wokół tych innowacyjnych terapii, pozostających ciągle w początkowym stadium eksperymentu klinicznego, zaczęło powstawać wiele mitów, jak również często nieuzasadnionych oczekiwań społecznych i nadziei wywoływanych przez sensacyjne i nieodpowiedzialne przekazy medialne [12]. Skłania to pacjentów do bezkrytycznego poszukiwania możliwości tego typu leczenia w różnych ośrodkach leczniczych (tzw.

turystyka komórkowa) [13]. Ze względu na krótki okres stosowania terapii komórkami macierzystymi, jej szybki rozwój i towarzyszący temu „szum medialny” także lekarze mogą mieć trudności ze zdobyciem wiarygodnych informacji i udzielaniem kompetentnych porad w tym zakresie, zwłaszcza że istnieje nacisk ze strony pacjentów łączący się często z rzeczywistym postępowaniem i coraz szerszym stosowaniem tej innowacyjnej terapii w różnych, nie tylko neurologicznych, dziedzinach medycyny regeneracyjnej. Celem niniejszego opracowania jest przybliżenie aktualnych informacji na temat terapii komórkowej stosowanej w chorobach ośrodkowego układu nerwowego (OUN).

Rodzaje komórek macierzystych/ /progenitorowych i ocena ich przydatności w terapii chorób neurologicznych

O wykorzystaniu poszczególnych rodzajów komórek macierzystych/progenitorowych w terapii rozstrzygają ich trzy główne cechy:

- potwierdzony wysoki poziom bezpieczeństwa biologicznego po ich transplantacji;
- możliwości ich pozyskiwania w ilościach skutecznych terapeutycznie;
- potwierdzenie w badaniach przedklinicznych mechanizmu ich działania terapeutycznego (np. możliwość zasiedlenia uszkodzonej tkanki lub też określone w czasie cytoprotekcyjne działanie parakryne tych komórek).

Cechy te mogą występować w różnym stopniu zależnie od zastosowanego rodzaju komórek macierzystych oraz biotechnologicznego procesu ich izolacji i hodowli. Poniżej omówiono poszczególne rodzaje komórek macierzystych/progenitorowych w odniesieniu do cech determinujących ich wykorzystania w neurologicznej terapii komórkowej.

Neuralne komórki progenitorowe (hNPC, *human neural precursor cells*) otrzymywane z zarodkowych i indukowanych komórek macierzystych

Wielokierunkowość różnicowania, będąca immanentną cechą obu powyższych typów komórek macierzystych (ESC i iPS), w połączeniu z ich nieograniczonym (i praktycznie korzystnym) potencjałem proliferacyjnym stwarza jednak duże niebezpieczeństwo transformacji nowotworowej tego typu komórek. Zastosowanie tych komórek wymaga bezwzględnej konieczności pełnego ich zróżnicowania przed przeszczepieniem, co jest praktycznie trudne do potwierdzenia. Do tej pory

strategię opartą na zastosowaniu zróżnicowanych neuralnie ludzkich komórek pluripotencjalnych (hESC [*human embryonic stem cells*] i hiPS [*human induced pluripotent stem*]) sprawdzono jedynie na zwierzętach [14]. W badaniach tych wykazano, że po transplantacji nawet resztkowych ilości komórek niezróżnicowanych zagrożenie nowotworowe znacznie wzrasta, szczególnie — co istotne — w przypadku przeszczepienia w obrębie tego samego gatunku [15]. Z tego też powodu przerwano już rozpoczętą, pierwszą w Stanach Zjednoczonych, próbę kliniczną sponsorowaną przez firmę Geron, w której pacjenci po urazach rdzenia otrzymywali ludzkie komórki hNPC wywodzące się ze zróżnicowanych *in vitro* zarodkowych komórek macierzystych [16].

Innym zagadnieniem podnoszonym w przypadku przeszczepień zarodkowych komórek macierzystych jest problem etyczny korzystania z zarodków ludzkich. W miarę postępu wiedzy i możliwości otrzymywania komórek pluripotencjalnych o cechach zarodkowych, również innymi metodami (molekularnego indukowania w iPS lub tak zwanego klonowania terapeutycznego w [SCNT, *somatic cell nuclear transfer*]), problem ten traci na znaczeniu. Nadal są jednak dyskutowane zagrożenia związane z niekontrolowanymi aberracjami (epi)genetycznymi i kariotypowymi występującymi w komórkach iPS, co w efekcie może wyeliminować ich zastosowanie w praktyce klinicznej.

Ludzkie „nieśmiertelnione” lub nowotworowe linie neuralnych komórek macierzystych

Podjęmowane są liczne próby zastosowania ustalonych linii ludzkich komórek neuralnych wywodzących się z nowotworów (linia NT2 wyprowadzona z *teratocarcinoma* i zróżnicowana *in vitro* do postmitotycznej linii hNT) [17] lub z płodowych komórek neuralnych nieśmiertelnionych transfekcją onkogenów, na przykład cMyc (linia ReN001) [18]. Te ostatnie przeszły już pozytywnie pierwszą fazę badań klinicznych.

Somatyczne (dorosłe) komórki macierzyste/ /progenitorowe izolowane ze specyficznych nisz tkankowych ukształtowanych organizmów

Obecnie somatyczne komórki macierzyste tego typu, wywodzące się z nisz tkankowych w pełni dojrzałych (szpik kostny, tkanka tłuszczowa, mięśniowa, błony śluzowe), jak również płodowych i okołoporodowych tkanek (krew pępowinowa, łożysko, błony płodowe, galareta Whartona sznura

pępowinowego), stanowią użyteczny materiał do zastosowania w transplantacjach klinicznych. Wiele rodzajów tych komórek izolowanych od chorych przeszło pozytywnie badania I fazy, a niektóre z nich również fazy II [19–21]. Materiał komórkowy, niezależnie od jego pochodzenia tkankowego, zawsze stanowi heterogenną mieszaninę różnego typu komórek, z których można wyselekcjonować, zależnie od zastosowanych metod izolacji i hodowli, bardziej lub mniej jednorodne subpopulacje o określonych, często znacznie różniących się między sobą, cechach fenotypowych i funkcjonalnych. Jak już wspomniano, subpopulacje predysponowane do stosowania klinicznego powinny się cechować wysokim potencjałem nie tylko do różnicowania, ale także do proliferacji, która umożliwia otrzymanie ich w ilościach efektywnych terapeutycznie. Pod tym względem najbardziej obiecujące wydają się MSC, które we właściwych warunkach hodowli mogą ulegać nawet 50-krotnemu zwielokrotnieniu w czasie kilku tygodni. Wykazano, że niektóre rodzaje MSC hodowane w specyficznym środowisku i rosnące w pływających agregatach 3D [22] ulegają częściowemu reprogramowaniu do komórek o cechach pluripotencjalności, przyspieszając znacząco swoją proliferację i żywotność w hodowli. W badaniach własnych [22], po zastosowaniu wymuszonej nieadherentnej hodowli 3D komórek izolowanych z krwi pępowinowej, mimo zwiększenia proliferacji i ekspresji genów pluripotencjalności (*Oct4*, *Nanog*, *Sox2*, *Rex1*), nie zaobserwowano wystąpienia żadnych cech ich transformacji nowotworowej *in vitro*. Ten sam typ hodowli, zastosowany przez autorów do przeszczepienia w monitorowanym klinicznie eksperymencie medycznym [23], również okazał się bezpieczny w czasie ponad 5-letniej prospektywnej obserwacji tego przypadku (dane niepublikowane). Jednak problem ten wymaga jeszcze dalszych badań nad bezpieczeństwem mikrośrodowiska stosowanego zarówno w czasie hodowli *in vitro*, jak i po przeszczepieniu komórek *in vivo*.

Poza zdefiniowanymi do potrzeb terapii neurologicznych komórkami MSC stosuje się również inne typy komórek progenitorowych. Są to komórki należące do linii krwiotwórczych (HSC, *hematopoietic stem cells*) lub endotelialnych krwi (EPC, *endothelial progenitor cells*) [24], nieselekcjonowane komórki jednojądrzaste pochodzące z tych samych źródeł (hBMC, *human bone marrow cells*; PB-MNC, *peripheral blood mononuclear cells*; HUCB-MNC, *human umbilical cord mononuclear*

cells), jak i ich pochodne ukierunkowane liniowo w hodowlach *in vitro* [10, 23]. Bardzo obiecujące są również komórki izolowane z nabłonka węchowego (OEC, *olfactory ensheathing cell*) [25, 26] oraz z subfrakcjonowanego szpiku kostnego [27] stosowane we wspomagającej terapii uszkodzeń OUN. Stosowana w próbach naprawy uszkodzonego chorobą niedokrwienną mięśnia sercowego subpopulacja komórek typu embrionalnego (VSEL, *very small embryonic-like*), opisana przez polskich badaczy w 2006 roku [28], nie została do tej pory otrzymana w ilościach wymaganych do skutecznej terapii chorób neurologicznych oraz dostatecznie scharakteryzowana pod kątem ich funkcjonalnego potencjału *in vitro* [29, 30], aby mogła być rekomendowana do dalszych prób klinicznych.

Zachęcającą obserwacją w przypadku somatycznych, tkankowych komórek macierzystych używanych w monitorowanych przeszczepieniach klinicznych, może być fakt braku doniesień o pojawieniu się *in vivo* transformacji nowotworowych przeszczepianych komórek somatycznych. Opublikowany jedyny opis przypadku pojawienia się nowotworu po alogenicznym przeszczepieniu komórek pochodzenia płodowego [31] nie został wiarygodnie scharakteryzowany pod kątem wykorzystanego materiału komórkowego i procedur przeszczepienia. Nie wyklucza to jednak możliwości pośredniego wpływu przeszczepu MSC na rozwój endogennych nowotworów w trakcie leczenia.

Mechanizmy regeneracyjne w terapii komórkowej

Repopulacja tkanki i przejęcie funkcji przez przeszczepione komórki macierzyste

Początkowo nadzieje związane z terapią komórkową antycypowały uzupełnienie deficytów komórkowych i strukturalnych powstających w tkance w wyniku toczących się procesów chorobowych. Jednak już po pierwszych próbach okazało się, że zarówno stymulowane endogennie, jak i transplantowane komórki macierzyste przeżywają i różnicują się w docelowe fenotypy neuralne jedynie w niewielkim stopniu. Stosunkowo wolno proliferujące komórki macierzyste obecne w mózgu (w warstwie podkomorowej [SVZ, *subventricular zone*] na obrzeżu komór bocznych oraz w warstwie podziarnistej hipokampa [SGZ, *subgranular zone*]), nawet po stymulacji w wyniku procesu chorobowego lub działań farmakologicznych, mają tendencję do szybkiego obumierania. Zarówno endogenna neurogeneza, jak i ze-

wnętrzna suplementacja komórek macierzystych okazały się niewystarczające do przywrócenia prawidłowej struktury i funkcji uszkodzonego układu nerwowego. Jedyne pozytywne efekty transplantacji komórek macierzystych dotyczyły poprawy czynnościowej, najprawdopodobniej w wyniku wzmocnienia korzystnych oddziaływań środowiskowych opartych na produkowanych przez podane komórki neuroprotektorycznych czynnikach troficznych. Spodziewana w terapii chorób neurodegeneracyjnych specyficzna repopulacja określonych typów komórek patologicznych z ich funkcjonalną integracją z tkanką gospodarza pozostaje jednak w sferze niespełnionych marzeń.

Wspomaganie endogennych procesów naprawczych przez komórki macierzyste

Domózgowa transplantacja komórek macierzystych/progenitorowych, szczególnie wykonana w krótkim czasie po wystąpieniu szkodliwego bodźca, może powodować znamienne zmniejszenie rozmiarów uszkodzenia tkanki [32]. Poza bezpośrednią inkorporacją przeszczepianych komórek macierzystych do miejsca uszkodzenia i repopulacją tkanek objętych procesem chorobowym [33] może to następować w mechanizmie parakrynej produkcji czynników troficznych i neuroprotektorycznych [34] oddziałujących na otoczenie i hamujących nekrotyczną i apoptotyczną śmierć komórek.

Liczne doświadczalne badania przedkliniczne dostarczają mocnych dowodów na to, że przeszczepione komórki macierzyste mogą działać immunomodulatoryjnie i przeciwzapalnie, wspomagać endogenną neurogenezę poprzez dostarczanie czynników neurotroficznych, wzrostowych i proangiogennych, poprawiając w ten sposób metabolizm i unaczynienie uszkodzonej tkanki w ostrym i przewlekłym okresie pourazowym [27].

Zagadnienia metodologiczne związane z terapią komórkową

Wybór optymalnego rodzaju komórek do przeszczepienia

Mimo licznych badań prowadzonych w tym zakresie nadal nierozstrzygnięta pozostaje kwestia doboru optymalnego typu „materiału transplantacyjnego”. Problemy związane z wykorzystaniem komórek macierzystych pochodzących z różnych źródeł są nadal przedmiotem intensywnych badań. Dotyczą one ich plastyczności, klonalności, właściwości karcynogennych i funkcjonalnych.

Z perspektywy zaawansowania terapii klinicznych większość lekarzy skupia swoją uwagę na komórkach macierzystych występujących w homotopicznych niszach narządów i tkanek dojrzałych. Mimo odkrycia neuralnych komórek macierzystych w dorosłym mózgu, ich wykorzystanie w transplantacyjnej terapii schorzeń układu nerwowego jest mało prawdopodobne, przede wszystkim ze względu na ich trudną dostępność. Na szczęście zarówno w intensywnych badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* wykazano, że komórki pochodzące z innych tkanek wykazują, często wymuszoną warunkami środowiska, zdolność do różnicowania się w kierunku komórek układu nerwowego, jak również do produkowania wielu czynników troficznych i wzrostowych zaangażowanych w regenerację OUN.

Zarówno w przypadku ostrych uszkodzeń, jak i przewlekłych, systemowych procesów neurodegeneracyjnych, takich jak stwardnienie zanikowe boczne (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*), choroba Alzheimera (AD, *Alzheimer's disease*), choroba Parkinsona (PD, *Parkinson's disease*) czy stwardnienie rozsiane (SM, *sclerosis multiplex*), wydaje się, że jednym z kluczowych czynników prowadzących do skutecznych terapii komórkowych byłby dobór odpowiedniego typu komórek macierzystych o specyficznym dla danej choroby, parakrynnym działaniu adiuwantowym.

Ustalenie sposobu wprowadzenia komórek macierzystych do uszkodzonej tkanki/narządu

Kolejnym aspektem terapii z zastosowaniem komórek macierzystych jest wybór odpowiedniego sposobu ich podania. W licznych badaniach na modelach zwierzęcych przetestowano różne drogi podawania komórek — domózgową, dokomorową, dotętniczą czy dożylną — zależnie od rodzaju schorzenia oraz przypuszczalnego mechanizmu działania transplantowanych komórek. Sposób podania komórek terapeutycznych będzie miał określony wpływ na odpowiedź ze strony tkanki: pozytywny poprzez optymalną aktywację procesów naprawczych czy immunomodulacyjnych oraz obecnych w mózgu endogennych komórek macierzystych, ale również negatywny, związany z towarzyszącym transplantacji uszkodzeniem tkanki [35].

Inne niż śródmiąższowe drogi podawania komórek, na przykład do naczyń krwionośnych czy do przestrzeni płynowych OUN, muszą współistnieć z wydajnym procesem migracji komórek umożliwiającym ich dotarcie do miejsca działania

terapeutycznego. Jest on regulowany przez interakcje między powstającymi miejscowo związkami przyciągającymi (tzw. chemokinami) a obecnymi na błonach cytoplazmatycznych komórek macierzystych ich swoistymi receptorami. Dzięki obecności receptorów powierzchniowych dla różnych chemokin, takich jak czynnik pochodzenia stromalnego 1 (SDF-1, *stromal-derived factor 1*), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF, *vascular/endothelial growth factor*) czy czynnik hamujący białaczkę (LIF, *leukemia inhibitory factor*), komórki macierzyste/progenitorowe mogą aktywnie podążać w stronę miejsca urazu czy też innego swoistego ogniska patologicznego. Występowanie określonych typów receptorów zależy od rodzaju z natury heterogennych populacji komórek macierzystych. Skutkuje to bardzo zróżnicowaną reakcją transplantowanych komórek na ich „przyciąganie” przez gradient chemokin/czynników wzrostu. Z tego powodu, w przypadku większości układowych lub uogólnionych chorób neurodegeneracyjnych, bezpośrednie podanie komórek macierzystych do przestrzeni płynowych mózgu i rdzenia wydaje się lepszym rozwiązaniem, zarówno ze względu na szerokie rozprzestrzenienie zmian patologicznych, jak i na parakrynną, a więc niewymagającą bezpośrednio kontaktu międzykomórkowego, mechanizm działania terapeutycznego samych komórek [36].

Ze względu na niewystarczającą migrację komórek macierzystych do miejsca ich swoistego działania podejmuje się próby usprawnienia tego procesu poprzez wstępną stymulację i zwiększenie ekspresji odpowiednich receptorów [37], jak też molekularną modyfikację określonych osi migracyjnych [38]. Podejmuje się również próby oddziaływania na ten proces poprzez modyfikacje środowiska macierzy zewnątrzkomórkowej, na przykład poprzez aktywację enzymów proteolitycznych (metaloproteinaza macierzy (MMP, *matrix metalloproteinase*) 9 i 2) i zmniejszenie oporu („rozluźnienie” tkanki) w czasie migracji komórek [39]. Istnieją również próby nieswoistego oddziaływania fizykochemicznego, na przykład poprzez wzbudzanie miejscowego pola magnetycznego czy elektrycznego, które mogłyby oddziaływać pozytywnie na efekt migracyjny [40, 41].

Mimo tak licznych kierunków badań nadal nie opracowano w pełni efektywnej i mającej zastosowanie kliniczne metody kierowania i wspomagania docelowej migracji komórek macierzystych.

Przyżyciowe monitorowanie losu komórek po przeszczepieniu

Narzędziem z wyboru do monitorowania terapii komórkowej w klinice są nieinwazyjne metody przyżyciowego obrazowania i ewentualnej diagnostyki fenotypowej komórek w żywym organizmie. Procedury podania miejscowego czy obwodowego komórek macierzystych nie są, jak dotąd, ustalone i wciąż powodują wiele niejasności wymagających wyjaśnienia. W tym celu syntetyzuje się całą gamę innowacyjnych, reporterowych znaczników komórkowych, jak również skomplikowane aparaty/narzędzia ich detekcji konieczne do swobodnego zastosowania wprowadzonych metod.

Istnieją dwie metody przedtransplacyjnego znakowania komórek *in vitro* — pośrednia i bezpośrednia. Znakowanie pośrednie polega na wprowadzeniu do komórek genów wizualizujących. Dzięki temu zabiegowi zmodyfikowane komórki macierzyste po podaniu odpowiedniego substratu stają się odróżnialne od otoczenia. Przykładem takiej modyfikacji jest wprowadzenie genu kodującego enzym lucyferazę (odpowiedzialną za iluminację robaczka świetojańskiego), którego produkt można obserwować dzięki właściwościom bioluminescencyjnym (BLI, *bioluminescent imaging*) [42]. Inna metoda polega na wprowadzeniu do komórek kinazy tymidynowej typu I, w przypadku której pozytywny sygnał w pozytonowej tomografii emisyjnej (PET, *positron emission tomography*) jest generowany przez rozpad radioaktywnego substratu [43]. Znakowanie pośrednie komórek macierzystych stosuje się również w rezonansie magnetycznym (MR, *magnetic resonance*). W tym przypadku wprowadza się gen receptora dla transferyny (TfR, *transferrin receptor*) lub ferrytyny — białek kompleksujących jony żelaza i tym samym znakujących tym paramagnetykiem badane komórki [44]. Metoda bezpośrednia polega na wprowadzeniu gotowego znacznika do komórki macierzystej *in vitro*. Najbardziej popularne są znaczniki oparte na cząsteczkach tlenku żelaza, takie jak SPIO (*paramagnetic iron oxides*), które są widoczne w MR. W tym celu stosuje się również nanocząsteczki złota do detekcji w tomografii komputerowej (TK) lub izotopy [¹⁸F]-HFB (*hydrofera blue*) i [¹⁸F]-fluorodeoksyglukozy (FDG) w PET [45, 46]. Mimo szerokiego rozwoju tych badań jedynie cząsteczki tlenku żelaza wykorzystano do monitorowania losu komórek w przeszczepach u ludzi [23, 47, 48].

Zwiększenie tolerancji biorcy na przeszczep komórkowy

Wraz z rozwojem terapii opartych na wykorzystaniu komórek macierzystych pojawiło się pytanie o reakcję immunologiczną i tolerancję biorcy na przeszczep komórkowy wykonywany zarówno w reżimie autologicznym, jak i alogenicznym. Jak wykazano w badaniach grupy szwedzkiej, przeszczepy komórkowe, prawdopodobnie w związku z odmienną, bardziej „rozproszoną” strukturą przestrzenną, wywołują większą reakcję immunologiczną niż przeszczepy tkankowe. Z tego powodu wiele uwagi poświęca się możliwościom wzmocnienia tolerancji u biorcy przeszczepu komórkowego. Obecnie u pacjentów otrzymujących komórki niezgodne pod względem antygenów MHC stosuje się typowe leki immunosupresyjne. Najczęściej podawane preparaty immunosupresyjne przeciwdziałają prezentacji antygenów przez komórkę APC (*antigen-presenting cell*) i hamują proliferację oraz działanie limfocytów T [49]. Nie gwarantuje to jednak pełnej skuteczności postępowania immunosupresyjnego. Poza działaniem osłabiającym reaktywność endogennych komórek efektorowych odpowiedzialnych za odrzucenie przeszczepu dąży się więc do zmniejszenia immunogenności samych komórek terapeutycznych. Jak już wcześniej wspomniano, układowe infuzje komórek macierzystych/progenitorowych same z siebie mogą prowadzić do supresji immunologicznej u biorcy [50]. Inną strategią zwiększenia tolerancji biorcy może być przeszczepianie regulatorowych limfocytów T (Treg) o fenotypie CD4⁺CD25⁺ pochodzących od dawcy. Wstępne wyniki badań klinicznych nad zastosowaniem limfocytów Treg w zapobieganiu odrzucenia haploidentycznych komórek macierzystych wydają się optymistyczne. Zaobserwowano, że spośród 28 pacjentów tylko u 2 rozwinęła się w tym przypadku choroba przeszczep przeciw gospodarzowi (GvHD, *graft-versus-host disease*) [51]. Również połączenie leku immunosupresyjnego rapamycyny z interleukiną 2 (IL-2) umożliwiło ekspansję limfocytów Treg (nTreg) dawcy oraz konwersję komórek T CD25 do limfocytów (indukowanych) Treg (iTreg). Taka konwersja może potencjalnie hamować rozwój reakcji przeszczepu przeciw gospodarzowi, stanowiąc nową, obiecującą strategię kliniczną w transplantologii [50]. Również komórki naturalnej cytotoksyczności (NK, *natural killers*), poprzez wydzielanie znacznych ilości interleukiny 4 (IL-4), a tym samym wspomaganie ekspansji limfocytów Treg, mogą hamować reakcję GvHD [52], prawdopodobnie hamując zależną

od limfocytów T sekrecją cytokin prozapalnych interferonu gamma (INF-gamma) i czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α , *tumor necrosis factor α*) [53].

Zagrożenia i problemy neurologiczne związane ze stosowaniem terapii komórkowej

Mimo wielu wątpliwości wyrażanych przez środowisko medyczne [54] rozpoczęto pierwsze monitorowane, często wielośrodkowe, badania kliniczne z zastosowaniem ludzkich komórek macierzystych spełniających w większości tak zwane kryteria *treatment modality*. Podjęcie tych badań stało się konieczne w świetle pozytywnych wyników uzyskanych w badaniach na zwierzętach, których ostateczna weryfikacja nie jest możliwa bez przeprowadzenia prób klinicznych zgodnie z regułami medycyny opartej na dowodach (EBM, *evidence-based medicine*). Wśród około 200 zarejestrowanych badań klinicznych przeszczepów komórkowych (www.ClinicalTrials.gov) najczęściej występują zagadnienia dotyczące schorzeń neurologicznych (85%), w tym: MS (23 badania), guzów mózgu (53 badania), udarów mózgu (18 badań), ciężkich uszkodzeń rdzenia kręgowego (11 badań), ALS (7 badań), genetycznych i metabolicznych chorób OUN, w tym leukodystrofii (15 badań), jak również innych schorzeń neurozwyrodnieniowych [55, 56]. Do najczęściej stosowanych komórek terapeutycznych w tych badaniach należą komórki mezenchymalne (MSC w 56 próbach) i krwiotwórcze (HSC w 88 próbach). Większość z tych badań jest prowadzona w Ameryce Północnej — 60 badań (w Europie 12 badań). Finansowanie badań zapewniają głównie instytucje państwowe, a 23 badania (współ) finansowały również firmy prywatne. Oprócz tych monitorowanych badań klinicznych w wielu przypadkach tak zwanej terapii komórkami macierzystymi badania podejmowały ośrodki prywatne, przy czym uzyskiwane wyniki nie są udostępniane, kontrolowane ani opracowywane statystycznie.

Wyniki leczenia osiągnięte w niektórych schorzeniach neurologicznych, na przykład w regeneracji nerwów obwodowych, są niewątpliwie pozytywne, a nawet bardzo obiecujące, natomiast w większości innych schorzeń pozostają niepewne.

Ogniskowe uszkodzenie OUN

Do jednego z najczęstszych procesów uszkadzających OUN należą udary mózgu. Niestety, jedyna akceptowana współcześnie i uznana za skuteczną

terapia za pomocą rekombinowanego tkankowego aktywatora plazminogenu (rt-PA, *recombinant tissue plasminogen activator*) jest stosowana jedynie u 3–8% pacjentów, głównie ze względu na stosunkowo wąskie „okno terapeutyczne” (< 4,5 h). W badaniach przedklinicznych, w których oceniano zastosowanie komórek macierzystych, podawanych zarówno systemowo (dożylnie, dotętniczo, do przestrzeni płynowych mózgu), jak i domózgowo, uzyskano zachęcające wyniki, które zależały od zastosowanego schematu terapeutycznego [57].

Udar mózgu jest spowodowany wystąpieniem nagłego zaburzenia ukrwienia tkanki nerwowej. W obszarze, w którym doszło do zmniejszenia przepływu krwi przez mózg (< 15 ml/min), następuje nieodwracalna ogniskowa martwica tkanki, otoczona obszarem tak zwanego półcienia (ang. *penumbra*), w którym toczy się zwolniony, potencjalnie odwracalny proces destrukcyjny. Ostateczna wielkość uszkodzenia zależy od liczby komórek, które udało się uratować w obszarze penumbry. Zbliżony obraz patologiczny występuje również w uszkodzeniach ogniskowych innego typu, na przykład w urazach mózgu lub rdzenia. W miejscu mechanicznego urazu dochodzi do gwałtownej martwicy komórek. Natomiast w kolejnych dobach, w wyniku aktywacji miejscowego stanu zapalnego, obszar ten może się znacznie powiększyć, z wtórną śmiercią komórek. W obu przypadkach, zarówno w udarze, jak i w urazie OUN, powstaje ognisko martwicy otoczone obszarem tkanki potencjalnie zagrożonej. Na podstawie wyników badań przedklinicznych wiadomo, że przeszczepienie komórek macierzystych w pobliże zmiany ogniskowej mózgu inicjuje migrację komórek macierzystych do miejsca uszkodzenia oraz częściowe zasiedlenie i neuralne różnicowanie podanych komórek na obrzeżach ogniska martwiczego [33]. Domózgowe podanie komórek jest zabiegiem o znacznej inwazyjności i u chorego w ciężkim stanie klinicznym może być niewykonalne. Dlatego wydaje się, że podawanie komórek dożylnie, a najlepiej dotętniczo, jak również dokomorowo lub do płynu mózgowo-rdzeniowego może znaleźć szersze zastosowanie w ostrym ogniskowym uszkodzeniu mózgu. Dotychczasowe wyniki badań sugerują, że czas przeżycia oraz migracja przeszczepionych komórek do miejsca uszkodzenia w OUN trwają krótko i są trudne do monitorowania przyżyciowego [58]. Istnieją optymistyczne przesłanki wynikające z badań eksperymentalnych pozwalające oczekiwać, że nawet

przy tych ograniczeniach silne działanie immunomodulacyjne charakterystyczne dla komórek macierzystych [59, 60] oraz ich właściwości neurotroficzne i neuroprotektoryjne mogą wydatnie zwiększać procesy regeneracyjne w obszarze penumbry, zmniejszając zakres ogniska udarowego.

W przypadku rdzenia kręgowego intraparenchymalne podanie komórek macierzystych bezpośrednio powyżej oraz poniżej obszaru uszkodzenia ogniskowego jest łatwiejsze technicznie, mniej urazowe i było wielokrotnie opisywane w badaniach klinicznych [61, 62]. Wykazano w nich doogniskową migrację przeszczepionych komórek macierzystych, jak również (przy użyciu trakcyjnego MR) stymulację procesu odbudowy dróg rdzeniowych w wyniku przeprowadzonego przeszczepienia [63].

Uogólnione uszkodzenia tkanki w OUN

Do rozległego uszkodzenia mózgu może prowadzić zarówno niedotlenienie tkanki nerwowej w wyniku zaburzeń krążenia (niedotlenienie okołoporodowe, zaburzenia rytmu serca, nagłe zatrzymanie krążenia), jak i pierwotne uszkodzenie mózgu związane z procesami chorobowymi o różnej etiologii. W tym ostatnim celem podania komórek macierzystych byłoby pobudzenie własnych mechanizmów kompensacyjnych organizmu i wzmocnienia endogennej neurogenezy lub naturalnej plastyczności mózgu. W przypadku uszkodzeń obejmujących wiele struktur mózgu najskuteczniejsze wydaje się podawanie komórek macierzystych do układu komorowego lub też podpajęczynówkowo, do wybranych przestrzeni płynowych OUN. W piśmiennictwie opisano umiarkowanie pozytywne efekty przeszczepień jedynie w pojedynczych przypadkach podania autologicznych, ukierunkowanych neuralnie komórek macierzystych/progenitorowych krwi pępowinowej [23], jak również allogenicznych komórek neuralnych izolowanych z mózgu płodów [64]. W obu przypadkach komórki te podawano dokomorowo. Poza wykazaniem bezpieczeństwa stosowanej terapii opisano w nich nieznaczną poprawę kliniczną u dzieci poddanych tym zabiegom.

Choroby uszkadzające określoną populację komórek nerwowych

Choroby, w których dochodzi do ubytku konkretnego typu komórek nerwowych w ściśle określonych obszarach OUN, na przykład komórek dopaminergicznych w PD czy GABA-ergicznych

w chorobie Huntingtona (HD, *Huntington's disease*), kwalifikują się do terapii zastępczej zróżnicowanymi *in vitro* komórkami macierzystymi. Mimo jednostkowo-pozytywnych doniesień przedklinicznych [65] ciągle jeszcze nie istnieje metodyka pozwalająca na osiągnięcie porównywalnych wyników w badaniach klinicznych. Najlepsze wyniki uzyskano do tej pory, stosując implanty tkankowe zawierające płodowe komórki macierzyste lub po ich zróżnicowaniu *in vitro* do komórek dopaminergicznych lub GABA-ergicznych [66, 67]. Problemami są również aspekt etyczny takiego leczenia oraz ograniczona dostępność płodowego materiału transplantacyjnego.

Zachęcające, choć mniej przekonujące, wyniki terapii komórkowej w układowych chorobach neuronów otrzymano, stosując MSC. W tym postępowaniu mechanizmem wiodącym jest najprawdopodobniej mało specyficzne, lecz terapeutycznie efektywne oddziaływanie neurotroficzne i immunomodulacyjne (przeciwzapalne) komórek. Przeszczepiane komórki są podawane stereotaktycznie do struktur OUN zajętych procesem chorobowym lub też systemowo do przestrzeni płynowych na różnych obszarach mózgu i rdzenia kręgowego.

Podjęmowano również jednostkowe próby kliniczne przeszczepiania ludzkich komórek macierzystych izolowanych bezpośrednio ze specyficznych struktur układu nerwowego, na przykład z siatkówki oka lub nabłonka węchowego. W pierwszym przypadku podawano je do prądkowia (np. skorupy) chorych na PD [67], a w drugim — do różnych struktur OUN w różnych chorobach neurodegeneracyjnych [25]. U większości chorych wykazywano poprawę, a w nielicznych, towarzyszących badaniach PET obserwowano zwiększenie produkcji na przykład dopaminy w prądkowiu. Kolejnym problemem, który pojawił się już w trakcie celowanej terapii transplantacyjnej chorób neurodegeneracyjnych, jest niszczenie przeszczepów przez toczący się proces chorobowy. Coraz częściej PD jest opisywana jako choroba prionowa, w której prionem byłoby białko alfa-synukleiny. W związku z takim patomechanizmem choroby zarówno przeszczepione autologiczne, jak i allogeniczne komórki czy tkanki również po pewnym czasie ulegną uszkodzeniu. Jak dotąd wydaje się, że transplant tkankowe w PD mogą przetrwać około 25 lat [68]. Biorąc pod uwagę, że działania niepożądane lewodopy (L-dopy) ujawniają się już po około 5 latach leczenia, możliwość jego przerwania i zastąpienia

inną terapią może być obiecującą alternatywą. Innym działaniem niepożądanym, o którym należy pamiętać, planując suplementację komórkami dopaminergicznymi, jest możliwość wystąpienia dyskinez obserwowanych u niektórych pacjentów po przeszczepieniach tkankowych [69, 70].

Podobne zjawisko obserwowano również po przeszczepieniu komórek macierzystych *striatum* chorym z HD. Obserwowano u nich przejściową poprawę funkcjonowania trwającą od 18 miesięcy do 6 lat. W przeprowadzonych pośmiertnie badaniach mózgu stwierdzono obecność przeszczepionych komórek, które stworzyły sieć neuronów i interneuronów. Niestety, przeszczepione komórki wykazywały cechy degeneracji typowej dla HD, z uszkodzeniem neuronów i zaoszczędzeniem interneuronów. W badaniach genetycznych, inaczej niż u chorych z PD, w przeszczepionych komórkach nie znaleziono patologicznych białek typowych dla HD. Prawdopodobnie za degenerację przeszczepionych komórek odpowiadały przewlekła aktywacja mikrogleju oraz stres glutamatergiczny spowodowany zwiększoną projekcją korowych neuronów glutamatergicznych do rejonu przeszczepu. Powyższe obserwacje poddają w wątpliwość wartość stosowanej terapii w HD [71].

Choroby z uszkodzeniem określonej populacji komórek neuralnych

Do chorób tych należą między innymi SM, AD czy ALS. W przypadku leukodystrofii oraz innych chorób de(dys)mielinizacyjnych z punktu widzenia patomorfologicznego dochodzi do pierwotnego zaburzenia czynności oligodendrogleju. W SM, mimo nie do końca jasnej etiologii, czynnikiem zapoczątkowującym chorobę jest reakcja autoimmunologiczna wywołująca przewlekłe zmiany zapalne z wtórnym rozwojem zwyrodnienia komórek neuralnych, w tym głównie produkujących mielinę oligodendrocytów, ale również neuronów. Celem terapii komórkowej miałyby być uruchomienie korzystnych immunomodulacyjnych procesów naprawczych prowadzących do zmniejszenia dynamiki choroby i ewentualnej remielinizacji już powstałych ognisk rozpadu mieliny. Ze stosowanych komórek terapeutycznych najsilniejszymi właściwościami immunomodulującymi i immunosupresyjnymi charakteryzują się komórki mezenchymalne i one właśnie są głównie wykorzystywane w klinicznych próbach leczenia SM. W większości są to komórki świeżo izolowane ze swoistych nisz tkankowych bez ich dalszego

selekcjonowania *in vitro*. W zwierzęcym modelu SM (eksperymentalne autoimmunologiczne zapalenie mózgu [EAE, *experimental autoimmune encephalomyelitis*]) bardzo dobre wyniki uzyskano, stosując zarówno szpikowe MSC, jak i płodowe neuralne komórki macierzyste czy też izolowane z mózgu progenitory oligodendrocytów (OPC, *oligodendrocyte precursor cells*). Należy jednak zaznaczyć, że jedynie komórki ukierunkowane neuralnie *in vitro* czy też komórki progenitorowe oligodendrocytów (*geron* OPC) były w stanie odbudować uszkodzoną mielinę w przebiegu EAE lub chorób dysmielinizacyjnych [72].

Do chorób obejmujących różne struktury mózgu należą również leukodystrofie, w tym genetycznie uwarunkowana choroba Pelizaeusa-Merzbachera. W chorobie tej dochodzi do znacznego obniżenia lub braku syntezy jednego z głównych składników osłonki mielinowej — białka proteolipidu (PLP, *proteolipid*) [73]. W trakcie pierwszej fazy badania klinicznego dotyczącego leczenia choroby Pelizaeusa-Merzbachera transplantowano płodowe neuralne komórki macierzyste do istoty białej płata czołowego [74]. Badanie MR wykazało skrócenie czasu relaksacji zaobserwowane w sekwencjach T1 i T2 po 9 miesiącach od transplantacji neuralnych komórek macierzystych. Badanie dyfuzyjne (MR-DWI, *diffusion weighted-imaging magnetic resonance*) wskazywało na procesy remielinizacji w miejscu podania komórek.

Choroba Alzheimera jest przewlekłym schorzeniem neurodegeneracyjnym, w którym terapia komórkami macierzystymi wzbudza szczególnie duże nadzieje. U chorych dochodzi do zaniku korowego obejmującego głównie struktury związane z układem cholinergicznym. W próbach klinicznych terapii komórkowej zastosowano głównie MSC z tkanek płodowych uzyskiwanych w okresie okołoporodowym, na przykład z galarety Whartona sznura pępowiny [75] lub z krwi pępowinowej [76, 77]. Ponieważ proces patologiczny toczy się w całym mózgu i ma charakter przewlekłe postępujący, to testowane są różne, mało inwazyjne drogi podawania komórek, w tym również droga donosowa [78]. Podawanie komórek macierzystych donosowo stosowano również w niektórych próbach leczenia PD, HD, depresji, autyzmu czy udaru mózgu. W tej samej grupie schorzeń próbuje się wykorzystywać biotechnologicznie skonstruowane mikrosfery/pęcherzyki opłaszczane z zewnątrz przez komórki macierzyste, a wewnątrz zawierające substancje neuroprotektcyjne lub molekuly sygnałowe. W badaniach

przedklinicznych, po ich podaniu domózgowym, opisano redukcję depozytów beta-amyloidowych obserwowanych w AD [79].

Stwardnienie zanikowe boczne jest kolejną chorobą neurozwyrodnieniową prowadzącą nieodwracalnie do uszkodzenia zarówno górnego (drogi piramidowe), jak i dolnego (komórki rogów przednich rdzenia kręgowego) neuronu ruchowego i śmierci chorego. Ponieważ etiologia tej choroby nadal jest nieznaną, brakuje efektywnego leczenia przyczynowego. Z powodu dramatycznego przebiegu ALS próby leczenia z wykorzystaniem komórek macierzystych są prowadzone w licznych ośrodkach badawczych [80] i klinicznych, w tym również w Polsce (Uniwersytecki Szpital Kliniczny im. Jana Mikulicza-Radeckiego we Wrocławiu i Uniwersytecki Szpital Kliniczny w Olsztynie). Izolowane, przeważnie autologiczne, komórki macierzyste najczęściej są podawane dotkankowo lub do zbiorników płynowych mózgu i rdzenia. Podobnie jak w opisanych wcześniej schorzeniach neurologicznych stosuje się głównie MSC pozyskiwane ze szpiku pacjentów lub komórki neuralne pochodzące z mózgu płodów [81]. Celem większości przeprowadzonych badań było przede wszystkim wykazanie bezpieczeństwa stosowanej metody (faza I), ale w niektórych z nich opisano również znaczne wydłużenie średniego czasu przeżycia chorych z 3,5 roku do nawet 6 lat [82].

Choroby nerwowo-mięśniowe

Próby kliniczne dotyczące komórek macierzystych przeprowadzono również w genetycznie uwarunkowanych chorobach nerwowo-mięśniowych, między innymi w chorobie Duchenne'a. Dystrofia mięśniowa Duchenne'a to najczęstsza, dziedziczona recesywnie i sprzężona z płcią nieuleczalna choroba układu ruchowego. Jej istotą jest całkowity brak dystrofiny w mięśniach, z towarzyszącym, nieodwracalnym zanikiem mięśni i kardiomiopatią. W eksperymentalnych próbach klinicznych stosowano komórki macierzyste/progenitorowe (satelitarne) izolowane z mięśni płodów [83], jak również autologiczne komórki o fenotypie CD133⁺ izolowane z mięśni szkieletowych [84]. W badaniach tych potwierdzono bezpieczeństwo stosowanego leczenia. Zaobserwowano również wzrost i korzystną zmianę proporcji wolno- i szybko kurczliwych włókien mięśniowych. Zastosowana w tych badaniach populacja komórek macierzystych różnicujących się *in vitro* w prawidłowo funkcjonujące miocyty była

zbyt mała, aby mogła wpłynąć znacząco na rozwój choroby. Aby ominąć ten problem, w ostatnim czasie są prowadzone badania nad zastosowaniem iPSC z wywołaną nadekspresją miogennego czynnika transkrypcyjnego Pax7. Otrzymane w ten sposób mioblasty w badaniach *in vitro* wykazywały różnicowanie się w dojrzałe komórki mięśniowe zawierające ludzką dystrofinę, a w zwierzęcych modelach choroby po transplantacji zasiedlały przestrzenie komórek satelitarnych, dając populację komórek mięśniowych zawierających prawidłową dystrofinę. Te nowo powstałe i zawierające dystrofinę komórki mięśniowe obserwowano do 11 miesięcy od transplantacji [85].

Uwarunkowane genetycznie choroby zwyrodnieniowe układu nerwowego

Zmiany genetyczne prowadzące do wrodzonych dysfunkcji enzymów lizosomalnych lub peroksysomalnych są odpowiedzialne za występowanie rzadkich i ciężkich układowych chorób o manifestacji neurologicznej, takich jak: mukopolisacharozozoz typu I i III, mukolipidozy, adrenoleukodystrofie, leukodystrofie metachromatyczne (MLD, *metachromatic leukodystrophy*), choroba Krabbe'go, choroba Tay-Sachsa. W badaniu przeprowadzonym w grupie pacjentów z MLD po podaniu *i.v.* HSC pozbawionych limfocytów T wykazano wydłużenie średniego czasu przeżycia pacjentów i wzrost stężenia arylosulfatazy A (ASA, *arylsulfatase A*) — enzymu, którego brak lub obniżone stężenie odpowiada za wystąpienie choroby. Zaobserwowany efekt wiązano z powstaniem funkcjonalnych chimer komórek pacjenta z podanymi komórkami macierzystymi dawcy o prawidłowym poziomie ASA lub ewentualnie z zaobserwowaną poprzednio zdolnością przeszczepionych komórek do różnicowania w kierunku komórek Schwanna. Przeszczepienie komórek wiązało się, niestety, ze znacznym ryzykiem wystąpienia GvHD [86]. Ryzyko to obniżało się, gdy stosowano komórki macierzyste typu płodowego CD3⁺ i CD33⁺ izolowane z krwi pępowinowej niespokrewnionych dawców, co opisano w dużym badaniu klinicznym przeprowadzonym w latach 1999–2004 [87]. Prowadzono również badania dotyczące zmodyfikowanych genetycznie komórek macierzystych w MLD z wprowadzonym *ex vivo* genem ASA [88]. Oprócz pojawiających się doniesień o pozytywnych wynikach terapii z zastosowaniem komórek macierzystych część autorów podaje mniej optymistyczne dane oparte na przeprowadzonych badaniach klinicznych.

Schattenberg i wsp. [89] opisali postępującą degradację i rozwój choroby porównywalny z nieleczoną grupą, u niektórych pacjentów z objawowym MLD leczonych komórkami macierzystymi, mimo osiągnięcia normalizacji stężenia ASA.

Nieco bardziej optymistyczne wyniki uzyskano, stosując terapię komórkową w chorobie Krabbego [90]. Przyczyną tej uwarunkowanej genetycznie choroby zwyrodnieniowej układu nerwowego jest wrodzony niedobór enzymu — beta-galaktozydazy cerebrozydowej. U noworodków z wczesnodziecięcą postacią choroby Krabbego poddanych terapii za pomocą HSC nie zaobserwowano zmian w przebiegu choroby ani zmniejszenia śmiertelności w porównaniu z nieleczoną grupą. Natomiast wśród dzieci ze zdiagnozowaną genetycznie chorobą Krabbego, które bardzo wcześnie poddano terapii komórkami macierzystymi, przed wystąpieniem pierwszych objawów klinicznych, osiągnięto normalizację aktywności beta-galaktozydazy cerebrozydowej i aktywację procesów remielinizacyjnych. W przedstawionym badaniu u 32% pacjentów doszło jednak do ciężkiej reakcji GvHD [91].

Uszkodzenia nerwów obwodowych

Obecnie metodą z wyboru w chirurgicznej rekonstrukcji uszkodzonego nerwu obwodowego jest przeszczepienie własnego nerwu czuciowego pobranego od pacjenta. W latach 1990–2000 rozpoczęto pierwsze próby kliniczne rekonstrukcji nerwów obwodowych z zastosowaniem polimerowych szkieletów lub tak zwanych konduktów prowadzących [92, 93]. Jako materiał zastosowano silikonowe lub kolagenowe tuby lub fragmenty autologicznych naczyń żylnych. Wykorzystanie szkieletów o różnych parametrach biofizycznych nie tylko umożliwiło odbudowę uszkodzenia, ale pozwoliło również kontrolować kierunek wzrostu pojedynczych włókien nerwowych [94–96]. Wzbogacenie szkieletów polimerowych w składniki osocza pacjenta i komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej znacznie przyspieszyły obserwowaną w elektromiografii (EMG) prawidłową regenerację włókien nerwowych.

Na podstawie powyższych osiągnięć rekonstrukcyjnych rozpoczęto wstępne doświadczenia z zastosowaniem szkieletów kolagenowych opłaszczonych komórkami Schwanna [97] bądź też „konduktów” wypełnionych fibryną i komórkami macierzystymi izolowanymi z tkanki tłuszczowej lub szpiku kostnego pacjentów, po

ich wstępnym zróżnicowaniu *in vitro* w komórki Schwanna [98]. Zastosowanie komórek macierzystych znamienne przyspieszało proces regeneracji nerwów obwodowych.

Nowe problemy legislacyjne związane z terapią komórkową

Szybki rozwój terapii opartych na komórkach macierzystych, poza nowymi możliwościami leczenia chorób opornych na leczenie konwencjonalne, stwarza również wiele nowych problemów prawnych, które powinny być zawczasu rozwiązane przez wprowadzenie ścisłych regulacji ustawowych. Dotyczy to zarówno ochrony cywilnej lekarzy podejmujących się nowatorskich i często ryzykownych terapii eksperymentalnych, jak i odpowiedzialności prawnej firm biotechnologicznych, coraz częściej „produkujących” komórkowy materiał transplantacyjny na zamówienie medyczne. Ważnym i ciągle niedostatecznie dopracowanym zagadnieniem jest również ustalenie formalnego statusu prawnego otrzymywanych w wyniku procedur hodowlanych terapeutycznych „preparatów” komórkowych, zawierających pochodzące z różnych źródeł, często niedostatecznie scharakteryzowane i kontrolowane, populacje komórek macierzystych. W Europie somatyczne komórki macierzyste są traktowane jako „produkty komórkowe do zaawansowanych terapii” (ATMP, *advanced therapy cell products*) i jako takie podlegają europejskim regulacjom No. 1394/2007. Hodowla komórek terapeutycznych podlega europejskim wymogom dobrych praktyk medycznych (GMP, *good medical practices*) (Euralex) [99]. Zależnie od tego, czy w Polsce komórki terapeutyczne będą traktowane tak jak obecnie, jako „materiał transplantacyjny” zgodnie z istniejącą ustawą z 1 lipca 2005 roku (DzU nr 169, poz. 1411), czy też przyjmą status innowacyjnego leku „wyprodukowanego” drogą ustalonej procedury hodowlanej *ex vivo* (ATMP, *advanced therapeutic medical product*), będą one podlegać zupełnie innym przepisom ochronnym, procedurom kontrolnym i aktom prawnym. Agencja Europejska, a w Stanach Zjednoczonych — *Food and Drug Administration* (FDA), skłaniają się do tego drugiego rozwiązania, jednak w Unii Europejskiej ostateczną decyzję pozostawiono twórcom regulacji wewnętrznym państw członkowskich. Te decyzje nie są jednoznaczne i stają się przedmiotem gorących debat zainteresowanych podmiotów [100], w których jednak — jak do tej pory — Polska nie bierze udziału.

Podsumowanie

Należy zaznaczyć, że autorzy nie czują się kompetentni do podejmowania dyskusji nad aspektami prawnymi związanymi z klinicznym zastosowaniem komórek macierzystych, a jedynie mogą antycypować pojawianie się w niedalekiej przyszłości różnych problemów o istotnym znaczeniu dla środowiska lekarskiego. Zainteresowani mogą sięgnąć do lektury aktualnych opracowań specjalistycznych [101].

Dla jasności informacyjnej trzeba przypomnieć, że obecnie obowiązujące przepisy o specyfikacji i atestacji hodowanych w celach terapeutycznych komórek są związane z ustawą z 1 lipca 2005 roku i od 2013 roku mogą być realizowane jedynie na podstawie ważnych zezwoleń wydanych przez Ministerstwo Zdrowia. Ta ustawa obejmuje jednak wyłącznie standardy procedur izolacji, transportu, testowania i zamrażania tkanek źródłowych zawierających komórki macierzyste, lecz nie ustosunkowano się w niej do długotrwałych, przedtransplantacyjnych procedur hodowlanych stosowanych *in vitro*, a obecnie badanych klinicznie. Obecnie, przy nadal niejednoznacznym statusie terapii komórkowej, do jej rozpoczęcia jest wymagana zgoda lokalnej komisji bioetycznej.

Źródła finansowania

Praca powstała w ramach realizacji projektu grantowego Narodowego Centrum Nauki nr 2011/01/B/NZ3/05401 oraz 6430/B/P01/2011/40.

Podziękowania

Wyrażamy podziękowanie i wdzięczność Pani Profesor Irenie Hausmanowej-Petrusewicz za nieustający entuzjazm i stałe poparcie dla rozwoju terapii neurologicznych opartych na komórkach macierzystych.

PIŚMIENNICTWO

- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. i wsp. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145–1147.
- Domanska-Janik K. Stem cells — potential therapeutic use in neurological diseases. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2002; 6 (supl. 1): 107–117.
- Buzanska L., Jurga M., Stachowiak E.K. i wsp. Neural stem-like cell line derived from a nonhematopoietic population of human umbilical cord blood. *Stem Cells Dev.* 2006; 15: 391–406.
- Buzanska L., Machaj E.K., Zablocka B. i wsp. Human cord blood-derived cells attain neuronal and glial features *in vitro*. *J. Cell Sci.* 2002; 115 (Pt 10): 2131–2138.
- Storch A., Schwarz J. Neural stem cells and neurodegeneration. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2002; 3: 774–781.
- Kucia M., Ratajczak M.Z. Stem cells as a two edged sword — from regeneration to tumor formation. *J. Physiol. Pharmacol.* 2006; 57 (supl. 7): 5–16.
- Kuroda T., Yasuda S., Sato Y. Tumorigenicity studies for human pluripotent stem cell-derived products. *Biol. Pharm. Bull.* 2013; 36: 189–192.
- McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O. i wsp. Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif.* 2005; 38: 245–255.
- Kucia M., Machalinski B., Ratajczak M.Z. The developmental deposition of epiblast/germ cell-line derived cells in various organs as a hypothetical explanation of stem cell plasticity? *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 2006; 66: 331–341.
- Habich A., Jurga M., Markiewicz I. i wsp. Early appearance of stem/progenitor cells with neural-like characteristics in human cord blood mononuclear fraction cultured *in vitro*. *Exp. Hematol.* 2006; 34: 914–925.
- Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 678–684.
- Bianco P., Barker R., Brustle O. i wsp. Regulation of stem cell therapies under attack in Europe: for whom the bell tolls. *EMBO J.* 2013; 32: 1489–1495.
- Lindvall O., Hyun I. Medical innovation versus stem cell tourism. *Science* 2009; 324: 1664–1665.
- Hicks A.U., Lappalainen R.S., Narkilahti S. i wsp. Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural precursor cells and enriched environment after cortical stroke in rats: cell survival and functional recovery. *Eur. J. Neurosci.* 2009; 29: 562–574.
- Erdő F., Bührle C., Blunk J. i wsp. Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003; 23: 780–785.
- Aznar J., Gómez I. Possible clinical usefulness of embryonic stem cells. *Clin. Exp.* 2012; 212: 403–406.
- Newman M.B., Misiuta I., Willing A.E. i wsp. Tumorigenicity issues of embryonic carcinoma-derived stem cells: relevance to surgical trials using NT2 and hNT neural cells. *Stem Cells Dev.* 2005; 14: 29–43.
- Stroemer P., Hope A., Patel S. i wsp. Development of a human neural stem cell line for use in recovery from disability after stroke. *Front. Biosci.* 2008; 13: 2290–2292.
- MacMillan M.L., Auerbach A.D., Davies S.M. i wsp. Haematopoietic cell transplantation in patients with Fanconi anaemia using alternate donors: results of a total body irradiation dose escalation trial. *Br. J. Haematol.* 2000; 109: 121–129.
- Ghodsizad A., Niehaus M., Kögler G. i wsp. Transplanted human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells improve left-ventricular function and prevent left-ventricular dilation and scar formation after acute myocardial infarction. *Heart* 2009; 95: 27–35.
- Drela K., Siedlecka P., Sarnowska A. i wsp. Human mesenchymal stem cells in the treatment of neurological diseases. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 2013; 73: 38–56.
- Habich A., Domańska-Janik K. Aggregation-promoted expansion of neurally committed human umbilical cord blood progenitors *in vitro*. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 2011; 71: 1–11.
- Jozwiak S., Habich A., Kotulska K. i wsp. Intracerebroventricular transplantation of cord blood-derived neural progenitors in a child with severe global brain ischemic injury. *Cell Med. Part B Cell Transplant.* 2010; 1: 71–80.
- Park D.H., Eve D.J., Chung Y.G. i wsp. Regenerative medicine for neurological disorders. *Sci. World J.* 2010; 10: 470–489.
- Jarmundowicz W., Tabakow P., Czapiaga B. i wsp. Olfactory glial cells: hope in the treatment of spinal cord injuries. *Neurol. Neurochir. Pol.* 2004; 38: 413–420.
- Tabakow P., Jarmundowicz W., Czapiaga B. i wsp. Transplantation of autologous olfactory ensheathing cells in complete human spinal cord injury. *Cell Transplant.* 2013; 22: 1591–1612.
- Machalińska A., Lubiński W., Penkala K. i wsp. Functional improvement of injured retina following the adjuvant stem cell-based therapy. Preliminary report. *Klin. Oczna* 2011; 113: 117–121.
- Ratajczak M.Z., Zuba-Surma E.K., Machalinski B. i wsp. Very small embryonic-like (VSEL) stem cells: purification from adult organs, characterization, and biological significance. *Stem Cell Rev.* 2008; 4: 89–99.
- Danova-Alt R., Heider A., Egger D. i wsp. Very small embryonic-like stem cells purified from umbilical cord blood lack stem cell characteristics. *PLoS One* 2012; 7: e34899.
- Szade K., Bukowska-Strakova K., Nowak W.N. i wsp. Murine bone marrow Lin⁻Sca¹⁺CD45⁻ very small embryonic-like (VSEL) cells are heterogeneous population lacking Oct-4A expression. *PLoS One* 2013; 8: e63329.
- Amariglio N., Hirshberg A., Scheithauer B.W. i wsp. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med.* 2009; 6: e1000029.
- Gornicka-Pawlak E., Janowski M., Habich A. i wsp. Systemic treatment of focal brain injury in the rat by human umbilical cord blood cells being at different level of neural commitment. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 2011; 71: 46–64.

33. Kozłowska H., Jabłonska J., Janowski M. i wsp. Transplantation of a novel human cord blood-derived neural-like stem cell line in a rat model of cortical infarct. *Stem Cells Dev.* 2007; 16: 481–488.
34. Jabłonska A., Janowski M., Lukomska B. Different methods of immunosuppression do not prolong the survival of human cord blood-derived neural stem cells transplanted into focal brain-injured immunocompetent rats. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 2013; 73: 88–101.
35. Uccelli A., Laroni A., Freedman M.S. Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet Neurol.* 2011; 10: 649–656.
36. Mazzini L., Ferrero I., Luparello V. i wsp. Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I clinical trial. *Exp. Neurol.* 2010; 223: 229–337.
37. Jones G.N., Moschidou D., Lay K. i wsp. Upregulating CXCR4 in human fetal mesenchymal stem cells enhances engraftment and bone mechanics in a mouse model of osteogenesis imperfecta. *Stem Cells Transl. Med.* 2012; 1: 70–78.
38. Miller R.J., Banisadr G., Bhattacharyya B.J. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *J. Neuroimmunol.* 2008; 198: 31–38.
39. Suzuki T., Mandai M., Akimoto M. i wsp. The simultaneous treatment of MMP-2 stimulants in retinal transplantation enhances grafted cell migration into the host retina. *Stem Cells* 2006; 24: 2406–2411.
40. Li L., El-Hayek Y.H., Liu B. i wsp. Direct-current electrical field guides neuronal stem/progenitor cell migration. *Stem Cells* 2008; 26: 2193–2200.
41. Cheng G., Chen K., Li Z. i wsp. Enhancement of osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats by sinusoidal electromagnetic fields. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 2011; 28: 683–688.
42. Min J.J., Ahn Y., Moon S. i wsp. In vivo bioluminescence imaging of cord blood derived mesenchymal stem cell transplantation into rat myocardium. *Ann. Nucl. Med.* 2006; 20: 165–170.
43. Hung S.C., Deng W.P., Yang W.K. i wsp. Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 7749–7756.
44. Liu Y., Tao J., Li Y. i wsp. Targeting hypoxia-inducible factor-1-alpha with Tf-PEI-shRNA complex via transferrin receptor-mediated endocytosis inhibits melanoma growth. *Mol. Ther.* 2009; 17: 269–277.
45. Song M., Kim Y., Kim Y. i wsp. RM tracking of intravenously transplanted human neural stem cells in rat focal ischemia model. *Neurosci. Res.* 2009; 64: 235–239.
46. Bernsen M.R., Moelker A.D., Wielopolski P.A. i wsp. Labelling of mammalian cells for visualisation by RM. *Eur. Radiol.* 2010; 20: 255–274.
47. Karussis D., Karageorgiou C., Vaknin-Dembinsky A. i wsp. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis. *Arch. Neurol.* 2010; 67: 1187–1194.
48. Callera F., de Melo C.M. Magnetic resonance tracking of magnetically labeled autologous bone marrow CD34+ cells transplanted into the spinal cord via lumbar puncture technique in patients with chronic spinal cord injury: CD34+ cells' migration into the injured site. *Stem Cells Dev.* 2007; 16: 461–466.
49. Scherer M.N., Banas B., Mantouvalou K. i wsp. Current concepts and perspectives of immunosuppression in organ transplantation. *Langenbecks Arch. Surg.* 2007; 392: 511–523.
50. Wolf D., von Lilienfeld-Toal M., Wolf A.M. i wsp. Novel treatment concepts for graft-versus-host disease. *Blood* 2012; 119: 16–25.
51. Di Ianni M., Falzetti F., Carotti A. i wsp. Immunoselection and clinical use of T regulatory cells in HLA-haploidentical stem cell transplantation. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 2011; 24: 459–466.
52. Pillai A.B., George T.I., Dutt S. i wsp. Host natural killer T cells induce an interleukin-4-dependent expansion of donor CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells that protects against graft-versus-host disease. *Blood* 2009; 113: 4458–4467.
53. Leveson-Gower D.B., Olson J.A., Sega E.I. i wsp. Low doses of natural killer T cells provide protection from acute graft-versus-host disease via an IL-4-dependent mechanism. *Blood* 2011; 117: 3220–3229.
54. Smoke and mirrors. *Editorials. Nature* 2013; 496: 269–270.
55. Venkataramana N.K., Kumar S.K., Balaraju S. i wsp. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl. Res.* 2010; 155: 62–70.
56. Lee P.H., Lee J.E., Kim H.S. i wsp. A randomized trial of mesenchymal stem cells in multiple system atrophy. *Ann. Neurol.* 2012; 72: 32–40.
57. Janowski M., Walczak P., Date I. Intravenous route of cell delivery for treatment of neurological disorders: a meta-analysis of preclinical results. *Stem Cells Dev.* 2010; 19: 5–16.
58. Kalladka D., Muir K.W. Stem cell therapy in stroke: designing clinical trials. *Neurochem. Int.* 2011; 59: 367–370.
59. Sarnowska A., Braun H., Sauerzweig S. i wsp. The neuroprotective effect of bone marrow stem cells is not dependent on direct cell contact with hypoxic injured tissue. *Exp. Neurol.* 2009; 215: 317–327.
60. Sarnowska A., Jabłonska A., Jurga M. i wsp. Encapsulation of mesenchymal stem cells by bio-scaffolds protects cell survival and attenuates neuroinflammatory reaction in injured brain tissue after transplantation. *Cell Transplant.* 2013; 22 (supl. 1): S67–S82.
61. Yoon S.H., Shim Y.S., Park Y.H. i wsp. Complete spinal cord injury treatment using autologous bone marrow cell transplantation and bone marrow stimulation with granulocyte macrophage-colony stimulating factor: phase I/II clinical trial. *Stem Cells* 2007; 25: 2066–2073.
62. Deda H., Inci M.C., Kürekçi A.E. i wsp. Treatment of chronic spinal cord injured patients with autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: 1-year follow-up. *Cytotherapy* 2008; 10: 565–574.
63. Forostyak S., Jendelova P., Sykova E. The role of mesenchymal stromal cells in spinal cord injury, regenerative medicine and possible clinical applications. *Biochimie* 2013; 95: 2257–2270.
64. Luan Z., Liu W., Qu S. i wsp. Effects of neural progenitor cell transplantation in children with severe cerebral palsy. *Cell Transplant.* 2012; 21 (supl. 1): S91–S98.
65. Lescaudron L., Naveilhan P., Neveu I. The use of stem cells in regenerative medicine for Parkinson's and Huntington's diseases. *Curr. Med. Chem.* 2012; 19: 6018–6035.
66. Politis M., Lindvall O. Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Med.* 2012; 10: 1.
67. Yin F., Tian Z.M., Liu S. Transplantation of human retinal pigment epithelium cells in the treatment for Parkinson disease. *CNS Neurosci. Ther.* 2012; 18: 1012–1020.
68. Dunnett S.B., Rosser A.E. Challenges for taking primary and stem cells into clinical neurotransplantation trials for neurodegenerative disease. *Neurobiol. Dis.* 2014; 61: 79–89.
69. Lindvall O. Developing dopaminergic cell therapy for Parkinson's disease — give up or move forward? *Mov. Disord.* 2013; 28: 268–273.
70. Neto S.C., Salti A., Puschban Z. Cell fate analysis of embryonic ventral mesencephalic grafts in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *PLoS One* 2012; 7: e50178.
71. Cicchetti F., Saporta S., Hauser R.A. i wsp. Neural transplants in patients with Huntington's disease undergo disease-like neuronal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106: 12 483–12 488.
72. Walczak P., Ali A.H., Rumpal N. i wsp. Human glial-restricted progenitors survive, proliferate, and preserve electrophysiological function in rats with focal inflammatory spinal cord demyelination. *Glia* 2011; 59: 499–510.
73. Sypecka J., Domanska-Janik K. Hypomyelinated pt mutant rabbit as a new model of Pelizeaus-Merzbacher disease. *Neurol. Neurochir. Pol.* 1996; 30 (supl. 2): 43–47.
74. Gupta N., Henry R.G., Strober J. i wsp. Neural stem cell engraftment and myelination in the human brain. *Sci. Transl. Med.* 2012; 4: 155–137.
75. Liang J., Wu S., Zhao H. i wsp. Human umbilical cord mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly differentiate into cholinergic-like neurons in vitro. *Neurosci. Lett.* 2013; 532: 59–63.
76. Darlington D., Deng J., Giunta B. i wsp. Multiple low-dose infusions of human umbilical cord blood cells improve cognitive impairments and reduce amyloid- β -associated neuropathology in Alzheimer mice. *Stem Cells Dev.* 2013; 22: 412–421.
77. Nikolic W.V., Hou H., Town T. i wsp. Peripherally administered human umbilical cord blood cells reduce parenchymal and vascular β -amyloid deposits in Alzheimer mice. *Stem Cells Dev.* 2008; 17: 423–439.
78. Chapman C.D., Frey W.H. 2nd, Craft S. i wsp. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm. Res.* 2013; 30: 2475–2484.
79. Lee J.K., Jin H.K., Bae J.S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid- β deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neurosci. Lett.* 2009; 450: 136–141.
80. Habisch H.J., Janowski M., Binder D. i wsp. Intrathecal application of neuroectodermally converted stem cells into a mouse model of ALS: limited intraparenchymal migration and survival narrows therapeutic effects. *J. Neural. Transm.* 2007; 114: 1395–1406.
81. Glass J.D., Boulis N.M., Johe K. i wsp. Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells* 2012; 30: 1144–1151.
82. Moviglia G.A., Moviglia-Brandolino M.T., Varela G.S. i wsp. Feasibility, safety, and preliminary proof of principles of autologous neural stem

- cell treatment combined with T-cell vaccination for ALS patients. *Cell Transplant.* 2012; 21 (supl. 1): S57–S63.
83. Sakai H., Sato T., Sakurai H. i wsp. Fetal skeletal muscle progenitors have regenerative capacity after intramuscular engraftment in dystrophin deficient mice. *PLoS One* 2013; 8: e63016.
 84. Torrente Y., Belicchi M., Marchesi C. i wsp. Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients. *Cell Transplant.* 2007; 16: 563–577.
 85. Darabi R., Arpke R.W., Irion S. i wsp. Human ES- and iPS-derived myogenic progenitors restore DYSTROPHIN and improve contractility upon transplantation in dystrophic mice. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 610–619.
 86. de Hosson L.D., van de Warrenburg B.P., Preijers F.W. i wsp. Adult metachromatic leukodystrophy treated by allo-SCT and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46: 1071–1076.
 87. Martin C.H., Kaufman D.S. Synergistic use of adult and embryonic stem cells to study human hematopoiesis. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005; 16: 510–515.
 88. Batzios S.P., Zafeiriou D.I. Developing treatment options for metachromatic leukodystrophy. *Mol. Genet. Metab.* 2012; 105: 56–63.
 89. de Hosson L., van de Warrenburg B., Preijers F. i wsp. Adult metachromatic leukodystrophy treated by allo-SCT and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant.* 2011; 46: 1071–1076.
 90. Gelinis J., Liao P., Lehman A. i wsp. Child neurology: Krabbe disease: a potentially treatable white matter disorder. *Neurology* 2012; 79: e170–e172.
 91. Siemionow M., Bozkurt M., Zor F. Regeneration and repair of peripheral nerves with different biomaterials: review. *Microsurgery* 2010; 30: 574–588.
 92. Nectow A.R., Marra K.G., Kaplan D.L. Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2012; 18: 40–50.
 93. Bellamkonda R.V. Peripheral nerve regeneration: an opinion on channels, scaffolds and anisotropy. *Biomaterials* 2006; 27: 3515–3518.
 94. Moore K., MacSween M., Shoichet M. Immobilized concentration gradients of neurotrophic factors guide neurite outgrowth of primary neurons in macroporous scaffolds. *Tissue Eng.* 2006; 12: 267–278.
 95. Goldner J.S., Bruder J.M., Li G. i wsp. Neurite bridging across micropatterned grooves. *Biomaterials* 2006; 27: 460–472.
 96. Khademhosseini A., Langer R. Microengineered hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* 2007; 28: 5087–5092.
 97. Sabelman E.E., Hentz V.R. Clinical trial of peripheral nerve graft. Dostępna: ClinicalTrials.gov. Data dostępu 1999.
 98. di Summa P.G., Kingham P.J., Raffoul W. i wsp. Adipose-derived stem cells enhance peripheral nerve regeneration. *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.* 2010; 63: 1544–1552.
 99. Sensebe L., Gadelorge M., Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res. Ther.* 2013; 4: 66.
 100. Bianco P., Barker R., Brüstle O. i wsp. Regulation of stem cell therapies under attack in Europe: for whom the bell tolls. *EMBO J.* 2013; 32: 1489–1495.
 101. Munzer S.R. Risk and reward in stem cell products. A new model for stem cell product liability. *J. Sci. Tech. L.* 2012; 18: 102.