

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Pavλίna Jančová

Klinické aplikace kmenových buněk v léčbě neurodegenerativních onemocnění CNS
Clinical applications of stem cells for the treatment of neurodegenerative diseases of CNS

Bakalářská práce

Školitelka: PharmDr. Šárka Kubinová, Ph.D.

Praha, 2018

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce PharmDr. Šárce Kubinové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při zpracování této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 5. 2018

Pavčina Jančová

Abstrakt

Kmenové buňky mají díky své schopnosti diferenciovat se v různé tkáně velký léčebný potenciál. Jejich použití se zkoumá také u neurodegenerativních onemocnění, pro která je typické, že dochází k odumírání specifických skupin neuronů, jsou progresivní a kvůli složitě a zatím plně nepochopené patofyziologii pro ně není účinný lék, pouze terapie prodlužující a usnadňující život pacientů. Tato práce shrnuje výsledky dokončených klinických studií a informuje o probíhajících studiích, ve kterých se aplikuje léčba kmenovými buňkami u vybraných neurodegenerativních onemocnění. U roztroušené sklerózy a amyotrofické laterální sklerózy má léčba kmenovými buňkami poměrně dlouhou historii, některé studie prokázaly terapii kmenovými buňkami jako přínosnou. Zatím je známo jen málo dat o účincích kmenových buněk u pacientů s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou, protože první klinické studie byly dokončeny nedávno. Všechny klinické studie prokázaly bezpečnost aplikace kmenových buněk, ale nebyla u nich prokázána náhrada poškozených neuronů, jen ochrana těch zbývajících neurotrofickými a imunomodulačními látkami, které kmenové buňky produkují.

Klíčová slova: neurodegenerativní onemocnění, kmenové buňky, klinické studie, roztroušená skleróza, amyotrofická laterální skleróza, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba

Abstract

Stem cells have a huge therapeutic potential due to their ability to differentiate in multiple tissues. They could be used for neurodegenerative diseases treatment, which are typical for loss of specific groups of neurons, progressive course and lack of effective treatment due to their complicated pathophysiology, only therapies for elongation and simplification of patients' life are available. This thesis summarizes results of completed clinical studies and informs about ongoing studies, in which stem cell treatments are used for selected neurodegenerative diseases. Stem cell therapy for multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis have a long history, some of the studies has proven therapeutic efficiency of stem cells. We don't know much about effect of stem cell treatment for patients with Alzheimer's and Parkinson's diseases, because first clinical studies were finished recently. But all clinical trials have proven safety of stem cell treatment. Replacement of damaged neurons haven't been reached yet, just protection of remaining neurons by neurotrophic and immunomodulatory factors secreted by stem cells.

Keywords: neurodegenerative diseases, stem cells, clinical trials, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis, Alzheimer's disease, Parkinson's disease

Obsah

Seznam zkratk.....	1
1 Úvod.....	3
2 Kmenové buňky.....	3
2.1 Embryonální kmenové buňky.....	4
2.2 Neurální kmenové buňky.....	4
2.3 Hematopoetické kmenové buňky	4
2.4 Mezenchymální kmenové buňky.....	5
2.5 Indukované pluripotentní kmenové buňky	5
2.6 Způsoby doručení kmenových buněk do CNS	6
3 Klinické studie.....	7
3.1 Roztroušená skleróza.....	7
3.1.1 Léčba roztroušené sklerózy pomocí hematopoetických kmenových buněk	8
3.1.2 Léčba roztroušené sklerózy pomocí mezenchymálních kmenových buněk	11
3.1.3 Probíhající klinické studie.....	13
3.2 Amyotrofická laterální skleróza	14
3.2.1 Léčba amyotrofické laterální sklerózy pomocí mezenchymálních a hematopoetických kmenových buněk	15
3.2.2 Léčba amyotrofické laterální sklerózy pomocí neurálních kmenových buněk	19
3.2.3 Probíhající klinické studie.....	20
3.3 Alzheimerova choroba.....	20
3.3.1 Léčba Alzheimerovy choroby pomocí kmenových buněk	21
3.4 Parkinsonova choroba.....	21
3.4.1 Léčba Parkinsonovy choroby pomocí kmenových buněk	22
3.5 Probíhající klinické studie pro onemocnění CNS.....	24
4 Závěr.....	24
5 Přílohy.....	27
6 Použitá literatura.....	29

Seznam zkratek

AD	Alzheimerova nemoc (Alzheimer's disease)
ALS	amyotrofická laterální skleróza
ALSFRS	funkční ratingová stupnice pro amyotrofickou laterální sklerózu (amyotrophic laterar sclerosis functional rating scale)
ALSFRS-R	revidovaná funkční ratingová stupnice pro amyotrofickou laterální sklerózu (amyotrophic laterar sclerosis functional rating scale revised)
ATG	antithymocytární globulin (anti-thymocyte globulin)
AtHSCs	autologní hematopoetické kmenové buňky
BEAM	kombinace karmustinu, etoposidu, cytarabinu a melfalanu
BMNCs	mononukleární buňky izolované z kostní dřeně (bone marrow mononuclear cells)
CNS	centrální nervová soustava
DN	dopaminergní neurony
EAE	experimentální autoimunitní encefalomyelitida (experimental autoimmune encephalomyelitis)
EDSS	stupnice určující progresi roztroušené sklerózy (expanded disability status scale)
ESCs	embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells)
fNSCs	neurální kmenové buňky izolované z tkáně plodu (fetal derived neural stem cells)
FVC	usilovná kapacita plic (forced vital capacity)
GDNF	růstový faktor odvozený od gliových buněk (glial cell-derived neurotrophic factor)
NP-GDNF	neurální progenitory produkující GDNF
GRP	gliové progenitory (glial restricted progenitor)
HLA	lidské leukocytární antigeny (human leukocyte antigens)
HSCs	hematopoetické kmenové buňky (hematopoetic stem cells)
iPSCs	indukované pluripotentní kmenové buňky (induced pluripotent stem cells)
MMSE	test ke zhodnocení kognitivních funkcí (Mini Mental State Examination)
MSCs	mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells)
Ad-MSCs	izolované z tukové tkáně (adipose tissue derived MSCs)
BM-MSCs	izolované z kostní dřeně (bone marrow derived MSCs)
P-MSCs	izolované z placenty (placenta derived MSCs)
UCB-MSCs	izolované z pupečnickové krve (umbilical cord blood derived MSCs)
UC-MSCs	izolované z pupečníku (umbilical cord derived MSCs)
MSCs-NP	neurální progenitory izolované z mezenchymálních kmenových buněk
MSCs-NTF	mezenchymální kmenové buňky produkující neurotrofní růstové faktory
MTX	mitoxantron
MRI	magnetická rezonance (magnetic resonance imaging)

NSCs	neurální kmenové buňky (neural stem cells)
OECs	olfaktorické gliové buňky (olfactory ensheathing cells)
PD	Parkinsonova choroba (Parkinson's disease)
PP	primárně progresivní forma roztroušené sklerózy
RS	roztroušená skleróza
RR	relaps-remitentní forma roztroušené sklerózy
SC	kmenové buňky (stem cells)
SOD1	superoxid dismutáza 1
SP	sekundárně progresivní forma roztroušené sklerózy
T25FW	test chůze na 7,5 m (timed 25-foot walk)
UPDRS	unifikovaná škála pro hodnocení Parkinsonovy choroby (unified Parkinson's disease rating scale)
US FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv Spojených států amerických (Food and Drug Administration of the United States)
9HPT	test devíti jamek (nine hole peg test)

1 Úvod

Neurodegenerativní onemocnění zahrnují stavy, při kterých dochází k poškození a odumírání specifických skupin neuronů, což je spojeno s poruchami nebo až ztrátou hybnosti, kognitivních a vegetativních funkcí. Tato onemocnění představují velkou zátěž pro pacienty, jejich rodiny i společnost a se stárnoucí populací jejich prevalence stoupá. U většiny neurodegenerativních onemocnění je totiž hlavním rizikovým faktorem věk. I přes dlouhou dobu, která uběhla od jejich prvního popsání, není jejich patofyziologie kvůli své složitosti a komplexnosti plně pochopena. To brání nalezení léku, který by progresi nemocí zastavil. Momentálně dostupné léky mají omezený účinek, progresi zastaví nebo jen zpomalí dočasně a většinou jsou účinné pouze v počátečních stádiích nemocí. Některé mají navíc silné vedlejší účinky. K usnadnění života pacientů se používá symptomatická léčba. Jednou ze slibných nových terapií je léčba kmenovými buňkami, které mají schopnost produkovat řadu neurotrofních a imunomodulačních látek do místa poškození a tím ochránit neurony před další degenerací a tlumit zánět. Díky schopnosti diferenciaci mohou kmenové buňky nahradit již poškozené neurony. Na zvířecích modelech bylo provedeno mnoho preklinických studií dokazujících nejen bezpečnost, ale především účinnost této léčby. Klinických testů existuje o poznání méně a bude pravděpodobně trvat ještě několik let, než bude transplantace kmenových buněk schválenou terapií pro neurodegenerativní onemocnění. Tato práce se soustředí na klinické studie, při kterých se používají kmenové buňky k léčbě roztroušené sklerózy, amyotrofické laterální sklerózy, Alzheimerovy choroby a Parkinsonovy choroby. Roztroušená skleróza se sice klasicky řadí mezi autoimunitní onemocnění CNS, ale neurodegenerace při ní hraje důležitou roli.

2 Kmenové buňky

Kmenové buňky (stem cells, SCs) jsou nediferenciované buňky schopné regenerace prostřednictvím buněčného dělení a zároveň specializace v různé tkáně. Jednotlivé druhy SCs se liší svým původem a množstvím typů buněk, ve které se mohou diferenciovat, tzv. diferenciálním potenciálem. Zygota je totipotentní, protože dokáže generovat každou buňku, která je nutná pro vývoj embrya, zatímco diferenciaci ostatních kmenových buněk už je omezená. Mezi zdroje jejich získávání patří embryo ve stádiu blastocysty (pluripotentní embryonální kmenové buňky), extraembryonální tkáně (např. placenta, pupečnicková krev, plodová voda), kostní dřeň, tuková tkáň, dentální pulpa aj. (dospělé multipotentní kmenové buňky).

2.1 Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky (ESCs) jsou součástí vnitřní buněčné masy blastocysty a dávají vzniknout všem třem zárodečným listům – ektodermu, mezodermu a endodermu, proto je označujeme jako pluripotentní. Zdají se vhodné k léčbě onemocnění CNS, protože při kultivaci je možné je diferenciovat mj. v buňky neuroektodermální linie podobné neuronům, astrocytům a oligodendrocytům. Ale jak shrnul Rippon *et al.*¹, vzhledem ke svému zdroji je jejich použití kontroverzní z etického hlediska. Navíc díky jejich multidiferenčním potenciálům hrozí po transplantaci riziko vzniku teratomu, což je tumor tvořený částečně diferencovanými SCs. Kvůli allogennímu původu hrozí po jejich aplikaci riziko odmítnutí. V roce 2009 schválil Úřad pro kontrolu potravin a léčiv v USA (US FDA) první test používající embryonální kmenové buňky, konkrétně prekursor oligodendrocytů, pro léčbu poranění míchy.² Nicméně tato studie byla z finančních důvodů zastavena. Dále proběhly testy používající retinální pigmentový epitel odvozený z ESCs³ a pro neurodegenerativní onemocnění jsou schváleny studie na testování prekursorů astrocytů u pacientů s amyotrofickou laterální sklerózou (ClinicalTrials.gov, NCT03482050) a neurálních prekursorů u pacientů s Parkinsonovou chorobou (ClinicalTrials.gov, NCT03119636).

2.2 Neurální kmenové buňky

Neurální kmenové buňky (NSCs) jsou multipotentní buňky pocházející z neuroektodermu embryí ale v menším množství je také nalezneme ve fetální a dospělé nervové soustavě. Pro preklinické a klinické účely se izolují z mozku nebo míchy plodu (fNSCs), tudíž zde zůstává podobný etický problém a riziko odmítnutí jako u ESCs. Vhodnou náhradou by mohly být neurální progenitory odvozené z mezenchymálních kmenových buněk.⁴

2.3 Hematopoetické kmenové buňky

Hematopoetické kmenové buňky (HSCs) jsou multipotentní buňky, ze kterých vznikají buňky krevního a imunitního systému. Na rozdíl od ostatních jmenovaných SCs není hlavním cílem léčby pomocí HSCs neuroregenerace, ale spíše imunomodulační efekt. V případě onemocnění CNS je zkoumán jejich potenciál především při léčbě roztroušené sklerózy. Mohou být izolovány z kostní dřeně, ale častěji se používá jejich mobilizace do periferní krve např. cyklofosfamidem a následně granulocytárním kolonie stimulujícím faktorem.^{5,6} Před transplantací mohou být ze štěpu odstraněny potenciální autoreaktivní T buňky díky selekci CD34+ (exprimované na povrchu HSCs) nebo jejich odstraněním *ex vivo*.⁵ Autoreaktivní T buňky v těle, které přežily léčebný režim před transplantací (chemoterapie, radioterapie) nebo byly

znovu dodány ve štěpu, mohou být odstraněny *in vivo* infuzí antithymocytárního globulinu (ATG) nebo monoklonálními protilátkami.⁵

2.4 Mezenchymální kmenové buňky

Vedle HSCs lze z kostní dřeně lze také izolovat mezenchymální kmenové buňky (MSCs), které se mohou diferenciovat do buněk mezodermu, jako jsou osteoblasty, adipocyty a chondrocyty. Bylo prokázáno, že *in vitro* se mohou diferenciovat do buněk mimo mezodermální linii např. do neuronů podobných buněk a hepatocytů.⁷⁻⁹ Díky svým vlastnostem jsou to nejčastěji používané SCs v klinických testech – jsou snadno dostupné, mohou být izolovány i od pacientů s pokročilou fází nemoci, migrují do místa poškození, sekretují různé látky napomáhající regeneraci (růstové faktory, cytokiny) a mají imunomodulační účinky (shrnutí v review Galderisi *et al.*¹⁰).

Kromě kostní dřeně (BM-MSCs) je lze izolovat z dalších tkání včetně tukové tkáně (Ad-MSCs), pupečnickové krve (UCB-MSCs), pupečníku (UC-MSCs) a placenty (P-MSCs). Z tukové tkáně se izoluje stromální vaskulární frakce, která obsahuje MSCs s podobnými markery jako BM-MSCs a kromě toho také endoteliální progenitorové buňky (včetně CD34+), monocyty/makrofágy s protizánětlivou funkcí a pravděpodobně Treg (shrnutí v práci Riordan *et al.*¹¹)

2.5 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Poprvé byly indukované pluripotentní buňky (iPSCs) popsány v roce 2006 výzkumným týmem Yamanaky, který přeprogramoval myší fibroblasty pomocí virových vektorů obsahujících geny pro transkripční faktory *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* a *c-Myc*.¹² Od té doby byly použity i jiné kombinace genů a jiné zvířecí i lidské somatické tkáně (shrnutí v review Ye *et al.*¹³). Velký potenciál iPSCs pro regenerativní medicínu spočívá v tom, že kombinují výhody ESCs a MSCs – mohou se z nich diferenciovat buňky všech tří zárodečných listů a mohou být izolovány přímo od pacientů, tudíž nehrozí riziko odmítnutí. Před klinickými aplikacemi ale ještě musí být zodpovězeny některé otázky ohledně bezpečnosti a imunogenicity iPSCs (shrnutí v review Scheiner *et al.*¹⁴).

Technologie iPSCs může být ale užitečná i jinými způsoby, jak shrnuli Okano a Yamanaka.¹⁵ Buňky získané z tkání pacientů mohou sloužit jako buněčný model ke studování dané nemoci. Tento způsob se už aplikuje na mnoha onemocněních včetně amyotrofické laterální sklerózy, Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby a dalších onemocněních CNS. Pokud by se díky těmto modelům identifikovaly genetické predispozice pro sporadické formy, které obecně u neurodegenerativních onemocnění tvoří kolem 90 % případů, mohla by se nemoc

diagnostikovat dlouho před objevením symptomů díky sekvenování iPSCs derivovaných ze somatických buněk pacientů. Ještě lepším výsledkem by bylo zahájení preventivní neuroprotektivní léčby u časných presymptomatických fází nemoci pomocí genové nebo buněčné terapie. Oproti dnešním možnostem by to byl významný pokrok, protože například u Parkinsonovy nemoci se symptomy objeví, až když je téměř 70 % neuronů ztraceno, a Alzheimerova nemoc může mít asymptomatickou fázi 20 let.

2.6 Způsoby doručení kmenových buněk do CNS

V klinické praxi se u onemocnění CNS kmenové buňky doručují následujícími způsoby:

- intraspinálně/intracerebrálně (přímá aplikace do míchy/mozku v okolí poškození)
- intratekálně (injekce do subarachnoidálního prostoru)
- intraventrikulárně (injekce do mozkové komory/komor)
- nasálně
- intravenózně
- intramuskulárně u amyotrofické laterální sklerózy

Zřejmě nejideálnější metodou je injikování SCs přímo k místu léze v mozku nebo míše, protože k místu poranění se dostane větší množství buněk v porovnání s jinými metodami, ale zároveň nese největší rizika poranění. Nejčastějším následkem po stereotaktické operaci mozku je krvácení, které může způsobit i trvalá poškození.¹⁶ Před intraspinálními injekcemi musí být provedena laminektomie, tedy odstranění horní části obratle (laminy), což také nese svá rizika.

Díky schopnostem SCs migrovat do místa poškození se toto riziko může obejít injekcemi do subarachnoideálního prostoru, do mozkových komor nebo do žil. Intravenózní injekce jsou nejrychlejší, snadnou a bezpečnou metodou, nicméně jejich primární záchyt v plicích a játrech významně snižuje množství buněk, které jsou dostupné v místě poškození. V případě doručení SCs do CNS se používají v kombinaci s jiným způsobem doručení nebo samostatně pokud je porušená hematoencefalická bariéra např. při roztroušené skleróze.

Intratekální a intraventrikulární cesta obchází problém přechodu buněk skrz hematoencefalickou bariéru, protože buňky jsou injikovány do cerebrospinální tekutiny a nese menší rizika, než injekce přímo do parenchymu mozku a míchy.

V klinických testech s SCs je zatím málo používaný intranasální způsob doručení. Kmenové buňky projdou těsnými spoji mezi podpůrnými buňkami v čichovém epitelu nebo jsou přeneseny podpůrnými buňkami pomocí endocytosy, pinocytosy nebo pasivní difuzí (shrnutí v review Li *et al.*¹⁷). Intranasální doručení má mnoho výhod. Buňky se v porovnání

s intravenózními injekcemi velmi rychle dostanou do CNS a nedojde ke ztrátě při zachycení buněk v jiných orgánech, a navíc je to neinvazivní metoda, která snadno umožňuje opakované podání.¹⁷

3 Klinické studie

Po preklinických studiích na zvířecích modelech jsou nové léky (a léčebné postupy nebo diagnostické metody) testovány na lidských dobrovolnících s cílem zjistit bezpečnost a účinnost daného léku a srovnat ho s dosavadními schválenými alternativami. V případě, že je použita kontrolní skupina, bývají obvykle skupiny randomizované a testy mohou být otevřené, jednoduše nebo vícenásobně zaslepené. U otevřených studií pacient i jeho ošetřující lékař vědí, do které skupiny byl náhodně rozdělen, u jednoduše zaslepené to neví pacient, u dvojité zaslepené neví pacient ani lékař a u trojitě zaslepené to neví ani statistik, který studii vyhodnocuje. Je definováno několik fází* testu, kterými nový lék musí projít:

- fáze I: určení bezpečnosti a dávkování na malém množství zdravých nebo nemocných dobrovolníků (obvykle 20–80)
- fáze II: až stovky dobrovolníků s danou nemocí, cílem je zjistit účinnost a vedlejší účinky, může být srovnání s kontrolní skupinou, které je podáván jiný lék nebo placebo
- fáze III: určení bezpečnosti a účinnosti na různých populacích, účastní se obvykle několik stovek až tisíce lidí s danou nemocí, doba trvání několik let ke zjištění dlouhodobých účinků a vedlejších efektů
- fáze IV: po schválení léku a jeho uvedení na trh, rozšíření informací o působení léku na několika tisících lidech s danou nemocí

3.1 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (RS) je chronické autoimunitní a neurodegenerativní onemocnění. Začíná obvykle u mladých dospělých (20–40). Autoreaktivní T lymfocyty pronikají skrz hematoencefalickou bariéru a vyvolávají zánětlivou odpověď, v jejímž důsledku dochází k demyelinizaci a následnému poškození axonů a neuronů.¹⁸ Na různých místech v bílé hmotě mozku a míchy se tím tvoří sklerotické plaky (léze), které mohou být vizualizovány pomocí MRI. Příznaky bývají různorodé např. poruchy senzorických a kognitivních funkcí, ztráta koordinace, závratě, částečné ochrnutí, intolerance tepla, inkontinence moči a stolice.

* Popsána definice US FDA, protože je používána v databázi ClinicalTrials, ze které jsou v této práci čerpány informace o probíhajících testech. Dostupné na www.fda.gov

V roce 1996 byly Národní společnosti pro roztroušenou sklerózu (National Multiple Sclerosis Society) definovány 4 typy RS, které se liší průběhem, prognózou, možnostmi léčby a figurují také jako kritéria klinických testů. V roce 2013 byly na základě lepšího porozumění nemoci pozměněny definice těchto typů.¹⁹ Jako klinicky izolovaný syndrom se označuje první příhoda s charakteristikou RS, nemusí se však v RS vyvinout. Nejčastější forma je relaps remitentní (RR), charakteristická střídáním ataků (relapsů) a klidovými obdobími (remisí), během kterých můžou příznaky zcela nebo částečně vymizet díky probíhající remyelinizaci. RR se ve většině případů časem rozvine ve formu sekundárně progresivní (SP), při které už neprobíhá remyelinizace a po každém ataku dochází ke zhoršení, což je nejvíce znatelné na ztrátě pohyblivosti. Odlišný průběh má forma primárně progresivní (PP), kdy od prvního ataku vůbec nedochází k obdobím remisí, progresse může být pozvolná, ale každý nový atak zanechává poškození (do této skupiny se dnes řadí i typ původně definovaný jako relabující progresivní).

Ke kvantifikaci stupně poškození se používá mj. Expanded Disability Status Scale (EDSS) neboli Kurtzkeho stupnice poškození, která nabývá po půl bodech hodnot 0–10 (bez potíží–úmrtí na důsledky RS). Výsledná hodnota se určuje podle sedmi funkčních systémů (funkce pyramidové, mozečkové, mozkového kmene, senzitivní, zrakové, mozkové mentální a vegetativního nervového systému). Pro zjištění funkce dolních končetin se měří rychlost chůze, např. doba, za kterou pacient ujde 7,5 m (T25FW). Test devíti jamek (9HPT) hodnotí funkci horních končetin. Pacient musí dát do každé jamky v desce kolík ze zásobníku v co nejkratším čase za použití jedné ruky.

Léčí se především specifické příznaky nemoci, ke zmírnění množství a závažnosti ataků se používají různé imunomodulační a imunosupresivní látky jako interferon- β , glatiramer acetát, natalizumab a další, jsou však účinné jen v případě aktivního zánětu, tedy na RR formu. Pouze mitoxantron (MTX) dokáže zpomalit tempo progresse RS formy, ale také jen u pacientů s aktivním zánětem.²⁰ Terapeutickým cílem je najít léčbu, která by zastavila progresi nemoci a obnovila by poškozená neurální spojení.

3.1.1 Léčba roztroušené sklerózy pomocí hematopoetických kmenových buněk

Aplikace SCs při léčbě RS má poměrně dlouhou historii. Jako první byly používány HSCs, a to pro pacienty, kteří nereagovali na běžně používané imunomodulační látky. V prvních testech začínajících v roce 1995 dostali 3²¹ a 15 pacientů²² infuzi autologních HSCs (AtHSCs) se sníženým množstvím T buněk. Všichni 3 pacienti vykazovali zlepšení neurologických funkcí, z 15 se zlepšilo 7 a jen jeden se zhoršil.

Od prvních testů do roku 2008 bylo ve světě léčeno přes 400 pacientů.⁵ Farge *et al.* zhodnotili studie, které byly během let 1996–2008 registrovány v Evropské skupině pro transplantaci krve a kostní dřeně.⁶ AtHSCs byly transplantovány asi 900 pacientům s progresivními autoimunitními onemocněními (z toho 345 pacientů s RS). Pět let po transplantaci přežilo 92 % pacientů s RS a 45 % přežilo 5 let bez progresu nemoci (2 % zemřela na původní nemoc, zbytek následkem transplantace, nejčastěji na infekci). Allogenní HSCs byly použity jen v pár testech kvůli riziku vzniku reakce štěpu proti hostiteli.⁶

Muraro *et al.* jako první dokázali, že pozorované zlepšení po transplantaci AtHSCs není následkem předchozí imunosuprese, ale že vlivem transplantace dochází k obnovení imunitního systému.²³ Předtím, než jsou pacientovi transplantovány HSCs, podstupuje různě silnou chemoterapii, někdy v kombinaci s radioterapií (obecně nazývané léčebný režim, např. BEAM, cyklofosamid spolu s celotělovým ozářením, busulfanem nebo karmustinem) s cílem zničit autoreaktivní buňky v cílovém orgánu, krvi, kostní dřeni a lymfatických tkáních.⁵ Panovala obava, že pozitivní účinky přisuzované HSCs jsou pouze důsledkem dlouhodobě sníženého počtu lymfocytů léčebným režimem. V této studii se po transplantaci neobjevili žádné vážné následky a všech sedm pacientů dokončilo léčbu.²³ Pacienti byli sledováni průměrně dva roky od transplantace (21–36 měsíců) a data ukazují, že se zvýšil počet naivních CD4+ T lymfocytů, které pocházeli především z thymu, a ne přímo z krevního řečiště, a snížil se počet paměťových T lymfocytů. Podle analýzy repertoáru receptorů T buněk se zvýšila klonální diverzita. Po transplantaci AtHSCs byla tedy aktivována thymopoetická cesta regenerace T buněk.

Doposud byla řeč o pilotních studiích s malým množstvím pacientů. V letech 2006–2011 proběhla II. fáze otevřeného testu, který zahrnoval 95 pacientů s různými typy RS.²⁴ Čtyřicet dva pacientů bylo zařazeno do časně skupiny (transplantace brzy po diagnóze, EDSS 1,5–3), 50 do konvenční skupiny (progresivní forma, pacienti nereagují na obvyklou léčbu, EDSS 3,5–6,5) a 3 do pozdní (EDSS 7–8). Z dlouhodobého hlediska (48 měsíců) se zlepšilo nebo bylo stabilizováno 80 % zúčastněných. Žádný z pacientů nezemřel, u tří pacientů se objevila do týdne od transplantace sepse (u každého z jiných důvodů), ostatní následky byly mírné a krátkodobé. Po pěti letech se nemoc nezhoršila u 92 % pacientů z časně skupiny ale jen u 73 % ze skupiny konvenční nebo pozdní (měřeno na EDSS). Výsledky ukazují, že je výhodnější transplantovat HSCs v časných fázích RS, kdy hraje zánětlivá odpověď hlavní roli a axony ještě nejsou významně poškozené. To, že transplantace pro pacienty s EDSS >6 nemá účinek, ukázala už dřívější studie.²⁵ Dále výsledky na 95 pacientech ukazují, že transplantace HSCs při léčebném režimu o snížené intenzitě založená na BEAM (karmustin, cytarabin,

etoposid, melfalan) je bezpečná a nemá vážné vedlejší následky i přes neurotoxicitu cytarabinu a etoposidu.²⁴

Ještě lépe vypadají výsledky dalšího otevřeného testu II fáze používající BEAM.^{26,27} Musíme ale uvážit, že zde bylo zahrnuto mnohem menší množství pacientů, konkrétně 24 (EDSS 3–5,5). Po třech letech od zákroku bylo 91 % bez zhoršení EDSS (78 % bez zhoršení, nových relapsů nebo lézí) a po pěti letech 91 % bez zhoršení (69 % bez zhoršení, nových relapsů nebo lézí). Pět pacientů zemřelo, ale vzhledem k době smrti od transplantace (2,5–4,5 let) a postupnému zhoršování RS, to nebylo považováno za následek transplantace.

Nedávno byla dokončena druhá fáze studie probíhající ve 3 kanadských nemocnicích, při které byli pacienti sledováni po dobu až 13 let.²⁸ Mezi říjnem 2001 a prosincem 2009 byly transplantovány AtHSCs 24 pacientům se špatnou prognózou a EDSS 3–6. Léčebný režim zahrnoval busulfan, cyklofosfamid a králičí ATG. První pacient zemřel 2 měsíce po léčbě na následky nekrózy jater a sinusoidálního obstrukčního syndromu vyvolaného vysokou dávkou busulfanu (14,9 mg/kg), druhý pacient obdržel nižší dávku busulfanu a vyvinul se u něj stejný syndrom, ale uzdravil se; poté byla dávka ještě snížena a upraven způsob podání a následky byly mírnější a léčitelné. V tříletém pokračování bylo sledováno 21 pacientů a u 70 % byla nemoc bez progresu. Někteří pacienti byli sledováni v prodloužené době (3,9–12,7 let) a bez užití jiné léčby. Ve výsledku u 16 (70 %) z 21 pacientů nemoc negradovala po celou dobu sledování, u žádného z nich nenastal relaps, jen u jednoho pacienta se objevili na MRI skenu nové léze a někteří pacienti hlásili subjektivní zlepšení. Transplantace AtHSCs za použití silného léčebného režimu (busulfan s cyklofosfamidem) nese riziko vážných vedlejších následků, ale zároveň může být dlouhodobě účinná. Není však k dispozici studie, která by porovnávala více léčebných režimů, a tak nelze říct, zda se vyplatí riskovat nebo je lepší použít mírnější léčebný režim. Navíc existuje studie s nadějnými výsledky pro pacienty s RR formou, při které byl použit velmi mírný nemyeloablativní léčebný režim na základě myšlenky, že není nutné trvale zničit původní imunitní systém.²⁹

Randomizovaný test II. fáze ukázal, že imunosuprese pomocí BEAM následovaná transplantací AtHSCs je účinnější v zastavení tvorby nových lézí v porovnání s MTX.³⁰ Nakonec se oproti původnímu plánu zúčastnilo jen 21 pacientů s RR a SP formou (EDSS 3,5–6,5), přičemž 9 podstoupilo transplantaci AtHSCs a 12 dostávalo MTX jednou měsíčně po dobu 6 měsíců. Kvůli technickým problémům a odstoupení jednoho pacienta byly pro analýzu dostupné MRI skeny jen 17 pacientů (8 AtHSCs, 9 MTX). Po 4 letech měli pacienti ve skupině AtHSCs o 79 % méně nových lézí než ve skupině MTX. Na rozdíl od výsledků jiných testů ale nedošlo ke zlepšení ani v jedné skupině. Ačkoli má test určité pozitivní výsledky, probíhal

na malém vzorku a chybějí některá data (např. sledování kvality života a atrofie mozku), je tudíž potřeba testu III. fáze s větším počtem pacientů.

V prosinci 2018 by měla končit III. fáze randomizovaného testu srovnávající transplantaci AtHSCs (léčebný režim cyklofosfamid a ATG) s běžně podávanými léky (ClinicalTrials.gov, NCT00273364). Bylo plánováno 110 účastníků s EDSS 2–6 a minimální dobou sledování po transplantaci 5 let. Velmi podobný test (ClinicalTrials.gov, NCT03477500) bude srovnávat účinky AtHSCs a alemtuzumabu. Loni byl ohlášen randomizovaný test III. fáze plánující zahrnout 200 pacientů s RR formou a porovnat dva léčebné režimy: cyklofosfamid s králičím ATG v druhé skupině navíc doplněný o infuzi imunoglobulinu po transplantaci AtHSCs (ClinicalTrials.gov, NCT03342638).

3.1.2 Léčba roztroušené sklerózy pomocí mezenchymálních kmenových buněk

Dosavadní studie ukazují, že transplantace AtHSCs může zastavit zánět, ale ne neurodegeneraci. Proto se zájem obrátil také na MSCs a neurální progenitory odvozené z MSCs (MSCs-NP). Několik otevřených pilotních testů prokázalo bezpečnost BM-MSCs při intravenózním podání.^{31–33} Rice *et al.* na základě nadějných výsledků pilotního testu³¹ pokračují v II. fázi testu kontrolovaného placebem, do které je zahrnuto 80 pacientů s SP nebo PP formou³⁴ (podle údajů na ClinicalTrials.gov, NCT01815632, by měl končit v říjnu 2018).

Connick *et al.* léčili v otevřeném testu II. fáze 10 pacientů s SP formou (EDSS 5,5–6,5) a s poškozením optického nervu.³⁵ Po šesti měsících došlo u některých pacientů ke snížení EDSS, MRI neukázalo nové léze a výrazně se zlepšily optické funkce. Zvětšení plochy optického nervu navíc ukazuje na neuroprotektivní účinek MSCs.

Ve Španělsku proběhl randomizovaný, dvojité zaslepený, placebem kontrolovaný crossover test II. fáze, ale opět s malým počtem pacientů.³⁶ Léčeno bylo 9 pacientů s RR formou a EDSS 3–6,5. V první části dostalo 5 pacientů intravenózně BM-MSCs a 4 placebo, po 6 měsících naopak. Jeden pacient s placebem v první části odstoupil po 5 měsících kvůli 3 relapsům, do analýzy jsou tedy zahrnuta data 8 pacientů. Po transplantaci MSCs se neobjevili vážné následky. Smyslem designu testu jako crossoveru bylo zjistit, jak dlouho má účinek jedna dávka MSCs. Vzhledem k tomu, že po 6 měsících od léčby MSCs vykazovaly MRI skeny u skupiny s placebem v druhé části méně nových lézí a menší počet Th1 (CD4+ IFN- γ +) buněk v krvi než u skupiny s placebem v části první, je účinek delší než 6 měsíců. Rozdíl byl však statisticky neprůkazný. Navíc první skupině byly transplantovány čerstvé MSCs, druhé skupině kryoprezervované. Šest měsíců po léčbě MSCs měly obě skupiny podobné výsledky, což

naznačuje, že kryoprezervace nemá negativní vliv na účinek SCs, jak se někteří domnívají (shrnutí např. v review Harris *et al.*³⁷).

Otázkou je, zda při podání MSCs intravenózně pronikne do mozku a míchy dostatečné množství buněk, aby mělo jiné než systémové imunomodulační účinky. Karussis *et al.* ve své studii podali MSCs intratekálně 15 pacientům s progresivní RS. Pět z nich dostalo zároveň i intravenózní injekce a většina takto podaných buněk byla lokalizována v plicích, lymfatických uzlinách a dalších tkáních, což výrazně snižuje počet buněk, které mohly proniknout do CNS.³² Po 6 měsících bylo EDSS skóre stabilní u 4 pacientů, u zbylých 11 se zlepšilo o 0,5–2,5 stupně a nenastaly vážné vedlejší účinky. Bezpečnost intratekálního podání MSCs a určitou účinnost pro některé pacienty s RS ukázaly také dva pilotní testy,^{38,39} jediným vážnějším následkem byla léčitelná encefalitida u jednoho pacienta.³⁸ Bonab *et al.* navázali II. fází otevřeného testu, ve kterém bylo zahrnuto 22 pacientů s progresivní RS. Po 1 roce se EDSS zlepšilo u 4 a zhoršilo u 4 pacientů, u ostatních zůstalo stabilizováno.⁴⁰

Několik studií ověřovalo bezpečnost MSCs izolovaných z jiných zdrojů než z kostní dřeně. Riordan *et al.* dali 3 pacientům s RR dvě dávky Ad-MSCs intravenózně v kombinaci s intravenózními a intratekálními injekcemi CD34+ buněk a MSCs v rozsahu 9–10 dnů. Transplantace proběhla bez vedlejších následků a všichni 3 pacienti hlásili po 3 a po 6 měsících výrazné subjektivní zlepšení. MRI skeny neukázaly po 6 měsících žádné nové léze.¹¹ V novějším testu byly Ad-MSCs intratekálně transplantovány 13 pacientům s RR a 7 s SP formou.⁴¹ První dávka obsahovala čerstvé Ad-MSCs, další dávky po 3 a 6 měsících kryoprezervované. Ani v tomto případě nenastaly vážné vedlejší účinky. Během jednoho roku bylo EDSS stabilizováno u všech pacientů a 2 ze skupiny s RR měli relapsy a nové léze. Výsledky byly podobné i po 18 měsících (jen 1 další pacient měl relaps), ale 7 pacientů vykazovalo různé neurologické zlepšení.

Dvě skupiny testovaly bezpečnost MSCs izolovaných z pupečníku (Whartonova rosolu) (UC-MSCs). V testu Riordana *et al.* dostalo 20 pacientů (EDSS 2,5–7, 70 % s RR formou) 7 intravenózních injekcí 1–4 dny od sebe.⁴² Po transplantaci se objevili pouze mírné následky. Největší zlepšení nastalo po jednom měsíci, u některých pacientů trvalo i po jednom roce (T25FW, 9HPT, funkce močového měchýře, trávení, zmizení sexuální dysfunkce, únava a další aspekty kvality života). Průměrné EDSS se snižovalo z počátečních 5,2 na 4,8 po jednom měsíci a 4,6 po jednom roce. Nové léze se objevily jen u 2 pacientů. Většina pacientů se v různé míře vrátila k původním lékům, které po transplantaci přestali brát (pouze 5 ne). Li *et al.* srovnali působení UC-MSCs s běžnými protizánětlivými léky.⁴³ Všech 23 pacientů s RR a SP (EDSS 4–8) dostalo intravenózně metylprednisolon a orálně prednison a 13 náhodně vybraných

zároveň intravenózně 3 dávky UC-MSCs s dvoutýdenními odstupy. Po 3 měsících se u experimentální skupiny zvýšilo v séru množství hepatocytárního růstového faktoru a cytokinů produkovaných Th2 a výrazně snížilo množství cytokinů Th1/Th17. Do 1 roku nebyly pozorovány žádné vedlejší následky, pacienti z experimentální skupiny měly méně relapsů, ale EDSS se snížilo jen mírně.

Bezpečnost MSCs z placenty byla zkoumána v I. fázi randomizovaného, dvojité zasklepeného testu kontrolovaného placebem.⁴⁴ Šestnáct pacientů s RR a SP formou bylo rozděleno na 3 skupiny: 6 pacientů dostalo intravenózně dvě nižší dávky P-MSCs (150×10^6 buněk) s odstupem jednoho týdne a 6 pacientů vyšší dávky (600×10^6 buněk), 4 dostaly placebo. Po roce od transplantace se 1 pacient zhoršil (léze, EDSS), další se nezhoršili víc jak o 0,5 stupně EDSS a většina byla stabilní nebo se zlepšila. Léčba se zdá bezpečná, pouze 2 pacienti, kteří obdrželi vyšší dávku, měli vážnější následky, které ale odezněly bez nutnosti změny léčby (anaktofyloidní reakce a povrchová tromboflebitida). Nelze porovnat vliv transplantace na pacienty s RR a SP, protože byli do skupin rozděleni nerovnoměrně.

Harris *et al.* zkoumají použití MSCs-NP, které by mohly být vhodnější než MSCs, protože je u nich menší riziko ektopické diferenciaci v CNS.⁴ BM-MSCs byly odebrány 8 pacientům s progresivní RS a 4 zdravým kontrolám, kultivovány v živném médiu pro neurální progenitory, které bylo obohaceno o epidermální růstový faktor a bazický fibroblastový růstový faktor. Po charakterizaci buněk nebyl nalezen mezi dvěma skupinami rozdíl. Buňky měly povrchové molekuly typické pro neurony, omezenou možnost diferenciovat se v osteoblasty a adipocyty, imunomodulační účinky, a navíc svými sekrety indukovaly oligodendrogenézi u myších NSCs *in vitro*.⁴ V jiném testu se po opakovaném intratekálním podání MSCs-NP u myšího modelu EAE (tj. experimentální zvířecí model RS) zlepšili neurologické funkce a snížila se plocha demyelinizace, avšak jedna dávka neměla účinek.⁴⁵ Na základě těchto poznatků provedli otevřený test I. fáze.⁴⁶ Celkem 20 pacientů s SP (80 %) nebo PP dostalo 3 intratekální injekce s odstupem jednoho měsíce. Po transplantaci se ani do 1 roku od třetí dávky neprojevily žádné vážné vedlejší účinky. Navíc po 6 měsících od třetí dávky MRI skeny neukázaly žádné nové léze, u 75 % pacientů došlo k neurologickému zlepšení měřeném pomocí EDSS, svalového testu, T25FW a/nebo funkce močového měchýře. EDSS se zlepšilo u 8 (40 %) pacientů (o 2 nebo více stupňů u 4 z nich).

3.1.3 Probíhající klinické studie

Tabulka 1 shrnuje probíhající a schválené testy registrované na ClinicalTrials.gov. Jak už bylo zmíněno v oddíle 3.1.1., jsou registrovány tři testy III. fáze používající HCS k léčbě RS,

příčemž dva používají jako kontrolu pacienty léčené schválenými léky. Zatím největšího testu se zúčastnilo 286 pacientů s RS.⁴⁷ Transplantované HSCs byly na rozdíl od předchozích dokončených testů čerstvé (nekryoprezervované). Nenastaly vážné vedlejší účinky a někteří pacienti jsou stále sledováni ke zjištění účinnosti (NCT02674217).

Nejčastěji jsou používány BM-MSCs. V několika případech je zahrnutá placebo kontrola a zároveň větší množství pacientů (30–80), ale zatím není plánovaná studie srovnávající MSCs se schválenými léky. MSCs jsou většinou podávány intravenózně, avšak studie NCT03069170 má vedle zhodnocení bezpečnosti léčby za cíl porovnat intravenózní a intratekální podání BM-MSCs 50 pacientům s RR formou. Podobně ve studii NCT02166021 dostane 36 pacientů intravenózní nebo intratekální injekce nebo kombinaci obou.

Až 100 pacientů má být léčeno pomocí Ad-MSCs ve studii NCT02326935. Registrována je i další studie hodnotící bezpečnost a účinnost UC-MSCs (NCT03326505). První skupina vyčleněná ze 60 pacientů dostane intratekální injekce UC-MCS, druhá bude provádět pod dohledem fyzioterapeutická cvičení posilující rovnováhu, svaly a výdrž a třetí skupina zahrnuje kombinaci obojího.

Nově budou pacientům s RS transplantovány fNSCs izolované z mozku plodu. Studie NCT03269071 má zjistit bezpečnost a ideální dávku intratekálně podaných fNSCs. Podle původního plánu mělo být minimálně 12 pacientů rozděleno do 4 skupin s odlišnými dávkami buněk a test začít v květnu 2017, ale zatím jsou přihlášení jen 4 dobrovolníci. V další studii NCT03282760 spolupracují dvě italská a jedno švýcarské centrum. Do 4 skupin s různými dávkami má být rozděleno 24 pacientů s SP formou, buňky budou v tomto případě doručeny intraventrikulárně.

3.2 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS) je neurodegenerativní onemocnění motorického systému. Odumírání motoneuronů vede ke snižování funkčnosti svalů, poruše řeči a polykání, svalové atrofii a paralýze. Smrt nastává průměrně po 2–5 letech nejčastěji na selhání respiračního svalstva.⁴⁸ Pouze u 5–10 % případů se jedná o familiární formu. Identifikovány jsou mutace na několika genech, přičemž jednou z nejčastějších a nejprozkoumanějších je mutace na SOD1, který kóduje superoxid dismutázu.⁴⁹ Jak shrnuli Mancuso *et al.*, v rámci patofyziologie se zkoumá např. vliv glutamátové excitotoxicity, oxidativního stresu, poškození mitochondrií a axonálního transportu, špatného sbalování proteinů vlivem poškození endoplazmatického retikula, agregace TAR DNA-vázcího proteinu 43 (TDP-43), zánětu a důležitou roli zřejmě hrají gliové buňky (astrocyty a mikroglie).⁵⁰

Doposud je jediným schválným lékem riluzol, který tlumí excitaci glutamátem a může prodloužit život až o několik měsíců.⁵¹ Jedním z problémů ALS je opožděná diagnóza, protože počáteční symptomy mohou být zaměnitelné s jinými nemocemi⁵² a neexistuje biomarker, pomocí kterého by se dala nemoc s jistotou určit v počátcích. Do testů se tak dostávají pouze pacienti s pokročilou fází a je pravděpodobné, že časnější terapie by měla lepší účinky.⁵⁰ K pochopení patofyziologie nemoci, a tudíž vyvinutí léků nepomáhá ani fakt, že neexistuje vhodný zvířecí model. V preklinických testech se nejčastěji používá SOD1 transgenní myš nebo potkan, tento model ale reprezentuje jen minoritní příčinu ALS, a tak se podle preklinických výsledků nových léků nedá odhadnout účinnost při léčbě lidí.⁵³ Zdá se ale, že vhodný buněčný model sporadické formy mohou poskytnout iPSCs přeprogramované z fibroblastů pacientů s ALS. Motoneurony vzniklé z těchto buněk sdílejí patologické rysy motoneuronů pacientů.⁵⁴

Cílem prvních preklinických testů s SCs bylo nahradit poškozené neurony a obnovit funkci svalů. Avšak musely by být obnoveny motoneurony v mozkovém kmeni a kortexu, axonální spojení mezi nimi a motoneurony v předních kořenech míšních a poté axon vedoucí k cílovému svalu. K dostatečné inervaci svalu by to při rychlosti růstu 1-3 mm/den u člověka trvalo měsíce až roky.⁵⁵ Lepším přístupem je doručit vhodné SCs do místa poškození, kde budou působit neuroprotektivně a protizánětlivě, případně nahradí gliové buňky.

Ke sledování progresu nemoci se nejčastěji používá funkční ratingová stupnice ALSFRS, která hodnotí kvalitu života pacienta. Původní dotazník se skládá z 10 otázek o fyzickém stavu pacienta s výsledným součtem 0 (nejhorší) až 40 (nejlepší). Revidovaná forma ALSFRS-R je rozšířená o dvě otázky zaměřené na obtíže s dýcháním a spánkem (hodnota 0–48). Dalším významným a často používaným ukazatelem je usilovná vitální kapacita plic FVC a Norrisova škála, která hodnotí zvláště paralýzu končetin a bulbární paralýzu.

3.2.1 Léčba amyotrofické laterální sklerózy pomocí mezenchymálních a hematopoetických kmenových buněk

V klinických aplikacích jsou doposud nejpoužívanější MSCs a mononukleární buňky izolované autologně z kostní dřeně (BMNCs). Jedná se o heterogenní populaci složenou z buněk hematopoetické linie (monocyty, lymfocyty), HSCs a případně jiných kmenových a progenitorových buněk. Kvůli intaktní hematoencefalické bariéře se buňky podávají intraspinálně, případně intracerebrálně nebo intratekálně někdy v kombinaci s intravenózními nebo intramuskulárními injekcemi.

První intraspinální transplantaci SCs pro pacienty s ALS provedli Mazzini *et al.*⁵³ Zvolili tuto invazivní metodu, protože u jejich předešlých zvířecích modelů byla neúčinnější. Devět

pacientů dostalo injekci BM-MSCs do thorakální oblasti (T7–T9). Objevily se pouze mírné vedlejší účinky, které samy odezněly. Žádné nové vedlejší účinky se neobjevily během 4 let od transplantace a u 4 pacientů se dočasně zlepšila FVC a ALSFRS.⁵⁶ Stejná skupina provedla druhý test I. fáze téměř identickou metodou (intraspinální injekce do T4–T6), tentokrát se ale progrese nemoci před a po transplantaci nezměnila.⁵⁷ Všechny 19 pacientů z obou testů bylo sledováno až po dobu 9 let.⁵⁸ Na pravidelných MRI skenech nebyly nalezeny tumory ani jiné abnormální struktury a účast v testu se neodrazila na psychickém stavu pacientů. Osm pacientů zemřelo průměrně po 31,6 měsících od operace (9–74 měsíců) z příčin nesouvisejících s operací (6 kvůli progresi nemoci, 1 na hemoragickou cévní mozkovou příhodu a 1 na plicní embolii). U 6 pacientů se progrese nemoci dočasně zpomalila. Ve výsledku testy sice neprokázaly léčebný prospěch, ale potvrdily dlouhodobou bezpečnost intraspínální transplantace BM-MSCs. Autoři navíc předpokládají, že transplantace do jiné než thorakální oblasti, kterou zvolili kvůli nejmenšímu riziku spojenému s aplikací, může mít lepší výsledky.

Ostatní studie, při kterých byl zvolen intraspínální způsob doručení, také potvrdily bezpečnost této metody. Nafissi *et al.* transplantovali MSCs-NP do cervikální a thorakální oblasti (C7–T1) 8 pacientům s ALS.⁵⁹ Sedm z nich dokončilo roční sledování (jeden zemřel na plicní embolii), přičemž ALSFRS-R bylo stabilní u všech první 4 měsíce, u 5 z nich bylo stabilní 8 měsíců.

Do thorakální oblasti (T3–T4) byly také transplantovány autologní BMNCs.⁶⁰ Ani u jednoho z pacientů nenastalo zlepšení, nemoc progredovala stejným tempem jako 6 měsíců před transplantací. Do 1 roku od operace zemřeli 3 pacienti následkem progrese nemoci. Histologický rozbor ukázal, že v místě injekce BMNCs bylo více motoneuronů než v jiných thorakálních segmentech. Navíc byly tyto motoneurony obklopeny CD90+ kmenovými buňkami a zároveň neobsahovaly ubiquitinová ložiska a nevykazovaly morfologické známky degenerace, což potvrzuje neurotropní efekt BMNCs. Na tento test navazuje II. fáze, pro kterou zatím nejsou publikované výsledky, ale má za cíl porovnat intraspínální a intratekální doručení spolu s intratekálně podávaným placebem na 63 pacientech s ALS (ClinicalTrials.gov, NCT01254539).

Deda *et al.* zahrnuli do pilotního testu 11 pacientů s formou ALS s bulbárním počátkem, proto zvolili intraspínální injekce HSCs do cervikální oblasti (C1–C2).⁶¹ Stejně buňky byly zároveň před ukončením operace injikovány do subarachnoideálního prostoru a podány intravenózně. Jeden pacient zůstal během ročního pozorování stabilní, 3 zemřeli následkem progrese nemoci. U zbylých 9 pacientů bylo zaznamenáno dočasné zlepšení (Norrisova škála,

bulbární funkce), progresse nemoci poté pokračovala, ale po jednom roce byl stav pacientů stále lepší než v době před operací.

Martinez *et al.* transplantovali 10 pacientům s ALS CD133+ buňky z periferní krve pomocí stereotaktické operace do frontálního motorického kortexu.⁶² V kontrolní skupině bylo 13 pacientů, kteří brali pouze zavedené léky, z nich během jednoho roku 3 pacienti zemřeli na respirační selhání a u zbývajících se ALSFRS-R zhoršilo z 31,4 na 15,7. V experimentální skupině zemřeli 2 pacienti (jeden 10 dní po operaci na infarkt myokardu a druhý na a respirační selhání po 6 měsících), u ostatních bylo ALSFRS-R stabilizováno (24,6 na začátku, 24 po jednom roce) a zároveň bylo u některých pozorováno zlepšení trvajícím až 6 měsíců. Pro potvrzení bezpečnosti stejnou operaci podstoupilo dalších 67 pacientů s ALS.⁶³ Jedna pacientka zemřela měsíc po operaci na subdurální hematom, ale místo operace bylo vyloučené jak zdroj krvácení. Následky u ostatních pacientů byly pouze mírné a během několika dní odezněly. Rok od transplantace přežilo 90 % pacientů a dva roky 52 %.

V několika testech byly MSCs nebo BMNCs podávány intratekálně. Všechny potvrdily léčbu jako bezpečnou, výsledky v různé míře ukazují krátkodobá zlepšení nebo zpomalení progresse, tudíž účinnost musí být prokázána ve větších testech. V České republice proběhl jeden test, při kterém byly BM-MSCs intratekálně transplantovány 26 pacientům s ALS.⁶⁴ Pacienti byli sledováni 6 měsíců před a 18 měsíců po transplantaci a u 12 z nich nemoc postupovala pomaleji. Oh *et al.* transplantovali 7 pacientům také BM-MSCs ale dvě dávky 26 dnů od sebe.⁶⁵ Během 6 měsíců od transplantace bylo ALSFRS stabilní (38,3 tři měsíce před a 34,1 v době transplantace, 34,0 po 6 měsících). Autoři plánují ověřit účinnost opakovaného intratekálního podání ve větším testu. Stejná skupina už dříve dokončila test s 37 pacienty, který měl ale za cíl najít markery MSCs, podle kterých by se dalo predikovat, zda má léčba u daného pacienta šanci na úspěch.⁶⁶ Intratekálně byly doručeny 2 dávky BM-MSCs s měsíčním odstupem, pacienti byly 6 měsíců sledováni a podle změny ALSFRS-R rozděleni na ty, kteří na léčbu reagovali a nereagovali. Zpětně byly charakterizovány MSCs od 13 na léčbu odpovídajících a 8 neodpovídajících pacientů. Buňky odpovídajících pacientů produkovaly více vaskulárního endoteliálního růstového faktor, angiogeninu a transformujícího růstového faktoru β .

Staff *et al.* podali intratekálně 27 pacientům 2 dávky Ad-MSCs s měsíčním odstupem.⁶⁷ Pacienti byly sledováni 2 roky a 17 z nich cítilo mírné zlepšení po dobu 2 měsíců. Stejná skupina vede II. fázi otevřeného testu. Předpokládá se účast 60 pacientů, kteří dostanou intratekální injekce Ad-MSCs každé 3 měsíce, dohromady tedy 4 dávky, a budou sledováni 2 roky od poslední dávky (ClinicalTrials.gov, NCT03268603).

Karussis *et al.* zahrnuli do testu 19 pacientů s ALS a 15 pacientů s RS, všem byly podány BM-MSCs intratekálně a některým i intravenózně (viz 3.1.2.), přičemž pacienti s ALS zůstali stabilní po dobu 6 měsíců.³² Rushkevich *et al.* také kombinovali intratekální a intravenózní podání BM-MSCs.⁶⁸ Experimentální skupina zahrnovala 10 pacientů, kontrolní skupina 15 pacientů se symptomatickou léčbou. Nejprve byly BM-MSCs podávány intravenózně a po týdenní kultivaci v neurogenním médiu intratekálně. U 4 pacientů byl postup opakován po 5–7 měsících. U experimentální skupiny nemoc progredovala pomaleji, ALSFRS-R kleslo po jednom roce z 40 na 34, u kontrolní skupiny z 41 na 16.

Sharma *et al.* publikovali výsledky zpětně kontrolované nerandomizované studie.⁶⁹ V experimentální skupině dostalo 37 pacientů intratekální a intramuskulární injekce BMNCs, do kontrolní skupiny bylo zahrnuto 20 pacientů podstupující schválenou léčbu. Pacienti ve dvou skupinách měli podobnou úmrtnost, ale průměrná doba přežití u experimentální skupiny byla 88 měsíců (15 pacientů přežilo víc než 5 let a 6 víc než 8 let) a u kontrolní 57 měsíců (3 pacienti přežili víc než 5 let).

V několika preklinických a klinických studiích byly použity BM-MSCs indukované, aby sekretovaly neurotrofické růstové faktory (MSCs-NTF) především růstový faktor odvozený od gliových buněk, růstový faktor odvozený od mozku, vaskulární endoteliální růstový faktor a hepatocytární růstový faktor.⁷⁰ První test pro pacienty s ALS započal v roce 2011 a skládal se ze dvou částí.⁷⁰ Fáze I/II se zúčastnilo 12 pacientů, šesti byly MSCs-NTF podané pouze intramuskulárně a šesti s pokročilejší fází ALS byly buňky podány intratekálně. S léčbou nebyly spojeny žádné vážné vedlejší následky. Během 6 měsíčního pozorování bylo vidět zlepšení nebo stabilizaci ALSFRS-R a FVC pouze u skupiny s intratekálním podáním. Ve fázi IIa proto všech 14 zúčastněných pacientů dostalo MSCs-NF intratekálně i intramuskulárně, ale byly rozděleny na 3 skupiny podle rostoucí dávky. Během šesti měsíců nastala u všech výraznější stabilizace ALSFRS-R a FVC než u pacientů, kteří se zúčastnili fáze I/II. Nebyly pozorovány rozdíly mezi jednotlivými dávkami. Buňky byly injikovány pouze do svalů na pravé ruce a po 6 měsících byl znatelný rozdíl v úbytku svalové hmoty mezi levou a pravou stranou v prospěch léčené strany. V červenci 2016 byla dokončena II fáze dvojité zaslepeného testu kontrolovaného placebem.⁷¹ Zúčastnilo se 48 pacientů a byly náhodně rozděleny do dvou skupin. V experimentální skupině obdrželo 36 pacientů jednu intratekální injekci a intramuskulární injekce MSCs-NTF, 12 pacientů dostalo injekce s placebem. Během následujících 6 měsíců progredovala nemoc u léčených pacientů pomaleji než 3 měsíce před transplantací, u kontrolní skupiny se rychlost nezměnila. Momentálně probíhá v šesti centrech v USA III. fáze

testu kontrolovaného placebem. Zapojit se má 200 pacientů a experimentální skupina dostane tři intratekální injekce MSCs-NTF s odstupem 2 měsíců (ClinicalTrials.gov, NCT03280056).

3.2.2 Léčba amyotrofické laterální sklerózy pomocí neurálních kmenových buněk

V roce 2010 byly fetální NSCs transplantovány intraspinálně prvním pacientům s ALS.⁷² Buňky byly izolovány z míchy jediného 8 týdnů starého plodu a pacientům byly před a po transplantaci podávány imunosupresivní látky. Dohromady podstoupilo 15 pacientů 18 zákroků do lumbální (L2–L4) a/nebo cervikální (C3–C5) oblasti.⁷³ U žádného z pacientů se neobjevili nežádoucí účinky způsobené fNSCs, pozorované potíže byly přisouzeny operaci samotné nebo jako reakce na imunosupresivní látky. Všechny potíže odezněly nebo byly vyléčeny, pouze u jednoho pacienta se rozvinula cervikální kyfóza.^{74,75} V první části dostalo 12 pacientů 5 unilaterálních nebo 5 bilaterálních (dohromady 10) injekcí do lumbální oblasti.⁷² ALSFRS-R se výrazně zlepšilo u jednoho pacienta, u ostatních byla hodnota stabilní nebo se rychlost progresu před a po operaci nezměnila (3 měsíce před operací sledována jen polovina pacientů). V druhé části byly fNSCs transplantovány do cervikální oblasti (5 unilaterálních injekcí) 3 novým pacientům a 3 z původních dvanácti.⁷³ U žádného z pacientů se nezrychlila progresse nemoci, dlouhodobě se zlepšilo ALSFRS-R u dvou pacientů, přičemž oba podstoupili lumbální i cervikální transplantace. U více než 50 % pacientů dosáhlo minimálně 5 z 8 měřených parametrů (včetně ALSFRS-R a FVC) lepších hodnot, než byly predikovány, měřeno po dobu 15 měsíců po operaci.

Bezpečnost fNSCs a stejné operativní metody prokázala další studie.⁷⁶ V tomto případě byly buňky izolovány z předního mozku plodů v 15. až 16. týdnu vývoje. Byly použity slabší imunosupresivní látky a transplantována vyšší dávka fNSCs než v předchozím testu, ale ani zde neměla transplantace vedlejší účinky. Bylo zahrnuto 6 pacientů – polovina dostala 3 unilaterální injekce do thorakální oblasti (T8–T11) a druhá polovina 3 bilaterální injekce (celkem 6). Pacienti byly pozorováni 6–18 měsíců, progresse nemoci se nezrychlila u žádného. Dvěma pacientům se zlepšilo ALSFRS po dobu 1 a 3 měsíců. Autoři plánují rozšířit poznatky testu v pokračování, kde dostane 12 pacientů cervikální injekce (C3–C4).⁷⁶

Z fetálního mozku byly také izolované olfaktorické gliové buňky (OECs) a je zkoumána možnost jejich použití při léčbě poranění páteře nebo ALS. Čínská skupina provedla několik testů s ALS pacienty, při kterých byly OECs transplantovány intracerebrálně a/nebo intraspinálně.^{77–79} Léčba byla bezpečná a u některých pacientů se během 4 měsíců zlepšilo nebo stabilizovalo ALSFRS. Dánská skupina při stejném postupu pozitivní účinky léčby nezaznamenala, ale bylo sledováno pouze 7 pacientů.⁸⁰

3.2.3 Probíhající klinické studie

Momentálně probíhá nebo je schváleno několik menších testů, ve kterých budou intratekálně transplantovány BM-MSCs, Ad-MSCs a v jedné studii UC-MSCs. Studie NCT01758510 zjišťuje bezpečnost allogenních BM-MSCs se shodným histokompatibilním komplexem HLA (lidské leukocytární antigeny). Allogenní transplantace by zkrátila proces před samotnou operací a mohla by být účinnější pro starší pacienty, jejichž SCs nemusí být tolik kvalitní. Na zvířecích modelech jsou už delší dobu testované neurální prekuzory izolované z fetálního mozku, které jsou geneticky modifikované, aby produkovaly neurotrofní faktor odvozený od gliových buněk (NP-GDNF). V studii NCT02943850 jsou tyto buňky poprvé testovány na 18 pacientech s ALS, podávány intraspinálně do lumbální oblasti. Poprvé budou studovány na pacientech s ALS také gliové progenitory (GRP) v studii NCT02478450, která má začít v listopadu 2018. Tyto buňky jsou izolované z předního mozku plodů a mohou se diferencovat v astrocyty a oligodendrocyty. Předpokládá se účast 30 pacientů, GRP budou podány intraspinálně nejdříve do lumbální poté do cervikální oblasti ve zvyšujících se dávkách. Intratekálně budou podány zvyšující se dávky astrocytů odvozených z ESCs ve studii NCT03482050. Začátek studie je naplánovaný na srpen 2018 a předpokládá se účast 21 pacientů s ALS. Všechny probíhající testy registrované na ClinicalTrials.gov shrnuje Tabulka 3.

3.3 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) je nejčastější typ demence charakteristický tvorbou plaků amyloidu β , neurofibrilárními klubky (tangles) a odumíráním neuronů v mozkové kůře a limbickém systému. Amyloid β vzniká štěpením APP (amyloidový prekurzorový protein), přičemž při AD je štěpen jinou cestou β - a γ -sektretázou a vzniklé řetězce jsou delší a nerozpustné. V oblasti A β plaků je chronický zánět vyvolaný aktivovanými mikroglie a astrocyty. Klubka vznikají agregací hyperfosforilovaného proteinu Tau (intracelulární s mikrotubuly asociovaný protein). V patogenezi familiární formy (10–15 % případů) hrají pravděpodobně velkou roli mutace APP, apolipoproteinu E, presenilinu-1 a dalších. V případě příčin sporadické formy se uvažuje např. o roli poškození mitochondrií, lysosomů, oxidativním stresu a zánětu (v review shrnuli Crews a Masliah⁸¹).

Z počátku se AD projevuje neschopností si zapamatovat nové věci, zapomínáním, změnami v chování jako je podrážděnost a deprese, obtížným hledáním slov, dezorientací. Ve střední fázi se tyto příznaky zhoršují, přidává se potřeba pomoci s běžnými činnostmi jako je oblékání a vykonávání osobní hygieny. V pozdním stádiu vyžaduje nemocný neustálou péči,

protože není schopen vykonávat každodenní činnosti, běžná je agitovanost a inkontinence moči a stolice. Častými příčinami smrti je zápal plic, komplikace z infekce močových cest a pádů.

Léčba se soustředí především na počáteční stádia AD. Jako měřítko progresu je používáno např. MMSE (Mini Mental State Examination), které dělí AD na lehkou (20–23), střední (10–19) a těžkou (0–9). Nyní je schváleno pouze 5 léků zahrnující inhibitory acetylcholinesterázy a antagonistu N-methyl-D-aspartového receptoru, které pouze dočasně potlačí symptomy.⁸²

3.3.1 Léčba Alzheimerovy choroby pomocí kmenových buněk

Informací o účincích kmenových buněk u pacientů s AD je zatím málo. Během let 2011–2013 proběhla I. fáze otevřeného testu, který potvrdil bezpečnost použití UCB-MSCs.⁸³ Zúčastnilo se 9 korejských žen a mužů ve věku 50–75 let, jejichž MMSE skóre bylo 10–24 (lehká až střední demence). SCs byly doručeny stereotaktickou operací do hippocampu a precunea. Pacienti byli rozděleni na 2 skupiny; 3 dostali nižší dávku (3×10^6 buněk) a 6 vyšší dávku (6×10^6 buněk). Po dobu 12 týdnů se neobjevili žádné vedlejší účinky. Nebyly pozorovány ani v prodloužené době 24 měsíců, do které se pro srovnání zapojilo dalších 6 pacientů splňující stejná kritéria jako pacienti léčení SCs. Po léčbě však nenastalo zlepšení nebo zastavení progresu nemoci, které bylo pozorováno u zvířecích modelů. Autoři předpokládají, že vliv by mohl mít malý počet účastníků a rozdílné metody; u lidí neurovizuální techniky a u zvířat biochemické analýzy post mortem.⁸³

V současné době je na ClinicalTrials.gov zaregistrováno dalších 6 testů (Tabulka 2). Pět z nich by mělo být dokončeno do příštího roku. Všechny testují bezpečnost a v druhé řadě účinnost MSCs izolovaných z různých zdrojů (pupečnicková krev, kostní dřeň, tuková tkáň a placenta) a budou se podávat nitrožilně. Výjimkou je test NCT02054208, při kterém budou UCB-MSCs doručeny intratekálně pomocí Ommaya rezervoáru, což je stereotakticky umístěný katetr, který vede z mozkové komory do rezervoáru v podkoží hlavy a umožňuje opakované podání léků.⁸⁴

3.4 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD) je druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění po AD a jeho prevalence výrazně stoupá s věkem.⁸⁵ Jedná se o poruchu hybnosti způsobenou odumíráním dopaminergních neuronů (DN) v substantia nigra. Typickým znakem jsou Lewiho tělíška s agregovaným α -synukleinem v cytoplazmě postižených neuronů. Zbývající neurony nestíhají vytvářet dostatek neurotransmiteru dopaminu a v důsledku toho dochází k narušení funkce

bazálních ganglií. To se projevuje třesem, svalovou ztuhlostí, zpomalením pohybu, zhoršením rovnováhy. Jako u jiných neurodegenerativních onemocnění existuje minoritní familiární forma a sporadická forma a uvažuje se o roli genových mutací, oxidativního stresu, mitochondriálního poškození, poruchy degradace proteinů a zánětu (shrnutí v review Maiti *et al.*⁸⁶).

Hlavním měřítkem progresu nemoci je unifikovaná škála pro hodnocení Parkinsonovy choroby (UPDRS), která má rozsah 0–147 (0 nejlepší, 147 nejhorší). Nejčastěji se používá k léčbě prekurzor dopaminu levodopa v kombinaci s různými látkami podporující její účinky, dále agonisté DA, inhibitory monoamin oxidázy. Všechny léky mají ale dočasné účinky a většině pacientů působí mnoho vedlejších účinků (shrnutí Maiti *et al.*⁸⁶). Jako alternativní léčba se používá hluboká mozková stimulace (deep brain stimulation), při které se do postižené oblasti mozku implantuje elektroda vysílající elektrické impulsy, podobně jako kardiostimulátor.⁸⁷ Je nutné najít lék, který nebude pouze dodávat chybějící dopamin, ale zastaví progresi nemoci. Buněčnou terapií poté mohou být nahrazeny poškozené DA.

3.4.1 Léčba Parkinsonovy choroby pomocí kmenových buněk

V prvních buněčných terapiích se používali DN izolované z ventrálního mesencefalu plodů starých 6–11 týdnů. Jsou to sice nezralé buňky, ale na rozdíl od kmenových buněk už diferenciované. Nemůžou sloužit jako lék, protože nezabrání progresi nemoci, ale můžou se začlenit do transplantovaného místa a produkovat dopamin. Předpokládalo se tedy, že budou efektivnější a s menšími vedlejšími účinky než levodopa. Výzkum na zvířecích modelech začal už v 70. letech předešlého století. První klinická studie proběhla ve Švédsku a do roku 1991 podstoupilo transplantaci těchto buněk do striata 6 pacientů. Následovaly malé otevřené studie v mnoha dalších zemích (historie výzkumu shrnuta v review Barker *et al.*⁸⁸ a Morizane a Takahashi⁸⁹). Výsledky jsou různorodé v míře účinnosti, a navíc se v některých studiích u pacientů vyvinula štěpem indukovaná dyskineze např. ve dvou placebem kontrolovaných studiích (falešná operace bez narušení tvrdé pleny). V první z nich Freed *et al.* léčili 40 pacientů a dyskineze vznikla u 15 % pacientů v experimentální linii, mezi 2 skupinami nebyl rozdíl, ke zlepšení došlo pouze u pacientů mladších 60 let.⁹⁰ Ve studii Olanowa *et al.* bylo zahrnuto 34 pacientů, mezi dvěma skupinami byl minimální rozdíl a u 57 % léčených se vyvinula dyskineze.⁹¹ Dalšími problémy této léčby jsou etické otázky a dostupnost DN k transplantování, protože pro jednoho pacienta je třeba 4–10 embryí ve vhodném týdnu vývoje.⁸⁹ Pozitivní ale je, že transplantované buňky se dokáží dlouhodobě integrovat do mozku, jak ukázaly pitvy pacientů, kteří v minulosti transplantaci podstoupili.⁸⁸ Také proběhla studie, při které byly neurální prekurzory z retinálního pigmentového epitelu izolované z oční tkáně 10-20 týdnů

starých plodů transplantovány do putamenu.⁹² Z 12 pacientů se 11 zlepšilo UPDRS po dobu jednoho roku a po 6 měsících od operace bylo v místě transplantace produkováno více dopaminu.

Testy s fetálními DN probíhají stále např. studie TRANSEURO (ClinicalTrials.gov, NCT01898390), ve které spolupracuje několik evropských center. Vedle bezpečnosti transplantace má tato studie vyřešit otázky jací pacienti by se měli testů zúčastnit, s jakým typem a fází PD, jak dlouho, v jakém množství a které imunopresivní látky spolu s transplantací používat.

Aby byly preklinické poznatky aplikovány v klinice co nejrychleji a nejefektivněji, vznikla mezinárodní spolupráce s názvem G-Force PD,⁹³ která diskutovala mj. podmínky pro první klinické testy, ve kterých se bude PD léčit pomocí neurálních progenitorů odvozených z kmenových buněk.

První testy s SCs k léčbě PD už jsou dokončené a další probíhají. Zatím to jsou jen malé pilotní studie prověřující bezpečnost několika druhů SCs. Ve dvou studiích byly použity BM-MSCs. Brazzini *et al.* podávali BM-MSCs intraarteriálně 50 pacientům s PD.⁹⁴ Cílem byla podpora a ochrana přeživších DN. Během průměrné doby sledování 7,4 měsíců (1–18 měsíců) se asi u poloviny pacientů zlepšilo UPDRS a další aspekty kvality života a nebyly pozorovány vážné nežádoucí účinky. Venkataramana *et al.* transplantovali BM-MSCs do subventrikulární zóny, kde v dospělém mozku dochází k neurogenезi.⁹⁵ Transplantace byla dobře tolerovaná, pacienti byli pozorováni 12–36 měsíců a minimálně u 3 došlo k výraznému zlepšení. Průměrné UPDRS se změnilo z 50,6 na začátku na 38 po jednom roce (měřeno ráno, před podáním levodopy). Mechanismus pozorovaného zlepšení není jistý, podíl můžou mít neurotrofní a imunomodulační faktory a zesílení endogenní neurogenезe.

Dále byly testovány neurální prekursorů izolované z 10–20 týdnů starých plodů.⁹⁶ Transplantaci do striata podstoupilo 21 pacientů a operace byla opakována po 7–57 měsících. Nenastaly žádné vážné následky a nebyly použity imunopresivní látky. Před první operací bylo UPDRS průměrně 80,7 a před druhou operací 72,8. Momentálně jsou registrované na ClinicalTrial.gov 3 studie používající fNSCs. Ve studii NCT02780895 budou transplantovány 8 pacientům a ve studii NCT03309514 12 pacientům, v obou případech do putamenu. Studie NCT03128450 zkouší především účinnost intranasálního doručení. Dvanáct pacientů dostane 4 dávky fNSCs s měsíčním rozestupem.

V největší studii probíhající v Číně podstoupí 50 pacientů transplantaci neurálních prekursorů odvozených z ESCs do striata (ClinicalTrials.gov, NCT03119636). Pacienti budou rozděleni na 3 skupiny – buď obdrží HLA shodné buňky, HLA neshodné anebo HLA nerozlišené. Pooperativní sledování by mělo být ukončeno v prosinci 2020.

Zajímavá, ale ve vědecké obci poměrně kontroverzní je australská studie s lidskými partenogenetickými NSCs (ClinicalTrials.gov, NCT02452723), které jsou transplantovány do striata a substantia nigra 12 pacientům a výsledky by měly být v březnu 2019. Používané NSCs jsou derivované od buněk vnitřní buněčné masy vzniklých partenogenezí – neoplozené oocyty byly chemicky indukovány k dělení, což dalo vzniku buňkám s vlastnostmi ESCs ale s obejitím etických problémů, protože z takto indukovaného oocyty nevznikne života schopné embryo.⁹⁷ Problém je, že pro jejich použití do klinických testů nejsou dostatečná preklinická data a není jisté, jestli můžou mít pro pacienty s PD nějaký účinek.⁹⁸

Registrovaná je dále studie NCT02611167 využívající allogenní BM-MSCs podávané intravenózně 20 pacientům s PD. Všechny probíhající studie registrované na Clinical.Trials.gov shrnuje Tabulka 4.

3.5 Probíhající klinické studie pro onemocnění CNS

Na ClinicalTrials.gov jsou také registrovány komplexní studie využívající SCs, ve kterých jsou léčeni pacienti s různými neurologickými onemocněními. Ve studii NCT02795052 jsou transplantovány autologní BMNCs intravenózně nebo intravenózně v kombinaci s intranasálním podáním. Zahrnuto má být 300 pacientů s Parkinsonovou chorobou, roztroušenou sklerózou, cévní mozkovou příhodou, zraněním mozku nebo neuropatií. Studie pokračuje do června 2021.

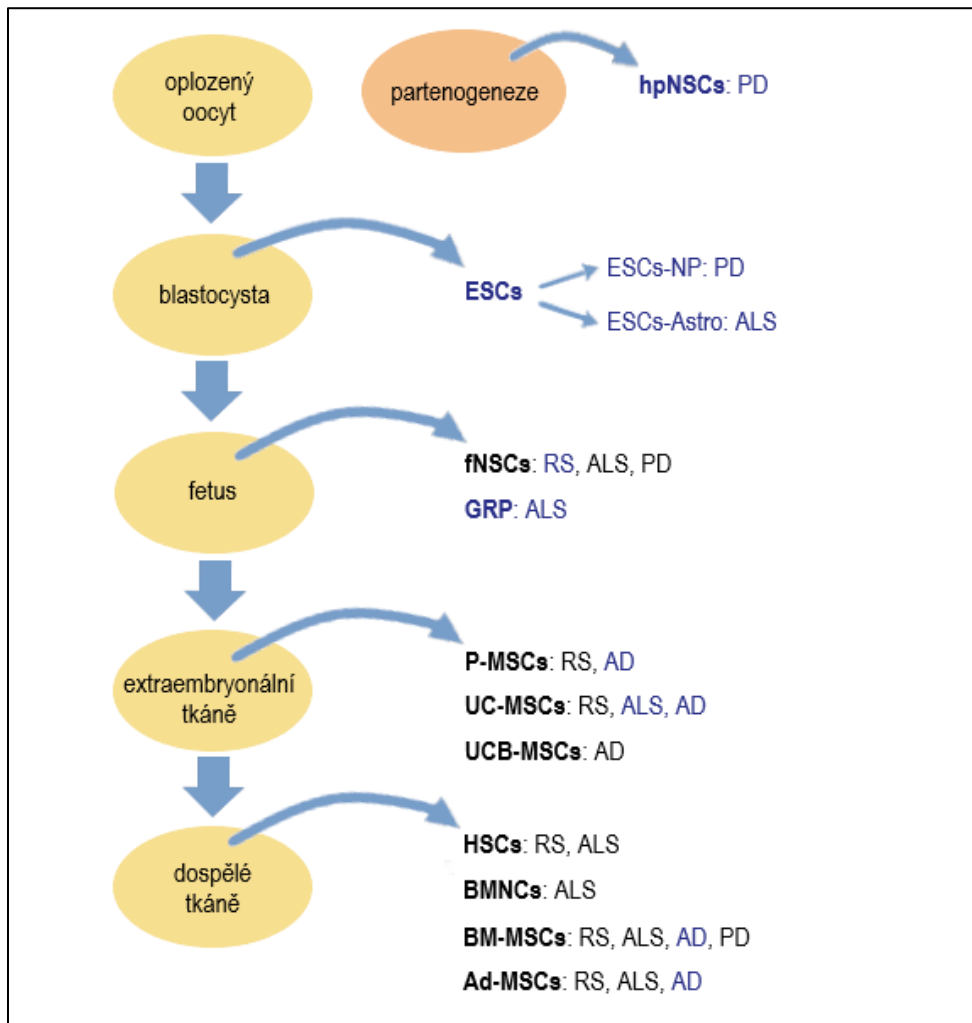
Ve studii NCT03297177 jsou intravenózně aplikovány Ad-MSCs nebo placebo. Předpokládá se účast 300 pacientů s různými typy demencí, Parkinsonovou chorobou, Huntingtonovou chorobou, autoimunitními demyelinizačními onemocněními, neuropatiemi a dalšími onemocněními CNS. Pacienti jsou sledováni 5 let od transplantace do ledna 2023.

Autologní Ad-MSCs jsou transplantovány intravenózně a intraartikulárně ve studii NCT01953523. V tomto případě jsou léčeni pacienti nejen s různými neurodegenerativními onemocněními, ale také s vybranými ortopedickými, urologickými a kardiovaskulárními onemocněními, dohromady 3000 pacientů. Sledování pacientů bylo plánováno do března 2018.

4 Závěr

Cílem práce bylo shrnout dosavadní poznatky v klinických studiích využívajících SCs u vybraných neurodegenerativních onemocnění jako je RS, ASL, AD a PD. Nejvíce používané kmenové buňky jsou HSCs, BM-MSCs, Ad-MSCs a fNSCs (shrnuje Obrázek 1).

U roztroušené sklerózy jsou do testů přijímáni pacienti, na které nepůsobí schválené léky. Jako alternativa imunomodulačních látek se už přes 20 let testují HSCs. Výsledky jsou pozitivní, ale jednotlivé výzkumné skupiny se neshodnou, jak silnou chemoterapii před transplantací použít. Velké testy srovnávající schválené léky teprve probíhají. Dále jsou testovány MSCs z různých zdrojů, převažuje intravenózní podání nad intratekálním. V budoucnu je potřeba určit, jestli není intratekální podání účinnější. Testy s jinými druhy SCs zatím nebyly dokončeny.



Obrázek 1: Využití kmenových buněk v klinických testech pro vybrané neurodegenerativní onemocnění (probíhající testy jsou modře vyznačené)

Zkratky: **AD** Alzheimerova choroba; **Ad-** izolované z tukové tkáně; **ALS** amyotrofická laterální skleróza; **BM-** izolované z kostní dřeně; **BMNCs** mononukleární buňky izolované z kostní dřeně; **ESC**s embryonální kmenové buňky; **ESC**s-Astro prekurzory astrocytů derivované z ESCs; **ESC**s-NP neurální prekurzory derivované z ESCs; **fNSC**s neurální kmenové buňky; **GRP** gliové progenitory; **hpNSC**s lidské partenogenetické prekurzory neurálních kmenových buněk; **HSC**s hematopoetické kmenové buňky; **MSC**s mezenchymální kmenové buňky; **PD** Parkinsonova choroba; **P-** izolované z placenty; **RS** roztroušená skleróza; **UCB-** izolované z pupečnickové krve; **UC-** izolované z pupečníku

V případě amyotrofické laterální sklerózy proběhlo mnoho testů s MSCs a BMNCs. Prokazují různě trvající zpomalení progresu nemoci, v některých případech zlepšení. Z těchto druhů kmenových buněk mají největší potenciál MSCs upravené, aby sekretovaly neurotrofické faktory. Hotové jsou i testy používající NSCs izolované z mozku nebo míchy plodu. Pro některé pacienty byly úspěšné, chystají se další a také test s prekuzory derivovanými z ESCs. Probíhající testy pro Alzheimerovu chorobu se soustředí na intratekální podání MSCs, u Parkinsonovy choroby převažuje intracerebrální podání fNSCs a prekuzorů odvozených z ESCs.

Všechny studie prokázaly bezpečnost dané terapie. Vážnější následky se objevili jen výjimečně u některých jednotlivců. Zatím však nelze udělat závěry o účinnosti léčby. Pro určité procento pacientů přinesla léčba ve většině studií prospěch, ale výsledky musí být interpretovány opatrně, protože se až na výjimky jednalo o otevřené testy a mohl být pozorovaný pouze placebo efekt. Navíc převažují studie s méně než 20 zahrnutými pacienty a liší se použitím dávků, metodou doručení a dalšími parametry.

Je třeba realizovat studie kontrolovaných placebem a srovnávající účinnost s běžnými léky s velkým množstvím pacientů, čehož může být dosaženo spoluprací několika center. U všech diskutovaných nemocí musí být stanoven ideální typ kmenových buněk a způsob jejich doručení, množství buněk v jedné dávce a časový rozestup mezi dávkami, protože pravděpodobně bude potřeba opakovaného podání. V mnoha testech bylo pozorováno zlepšení nebo stabilizace po určitou dobu a poté nemoc dále progredovala – odtud se může odvíjet určení rozestupu dávek. Zatím to vypadá, že léčba pomocí SCs bude účinnější pro počáteční stádia nemocí. Buněčné modely z iPSCs izolovaných z tkání pacientů by mohly být užitečné k diagnostice onemocnění již v jeho počátcích.

S pokračujícím preklinickým výzkumem se zvyšuje také počet klinických studií a začínají se používat kmenové buňky kultivované v takových podmínkách, aby měly pro danou nemoc co největší účinnost např. diferenciací v neurální a gliové prekuzory nebo zvýšenou sekrecí určitých faktorů. Průlom v terapii můžou do budoucna představovat iPSCs, které mají díky svým vlastnostem největší diferenciací potenciál, ale zatím je jejich použití v klinických studiích velmi omezeno.

5 Přílohy

Tabulka 1: Probíhající testy pro léčbu roztroušené sklerózy pomocí kmenových buněk registrované na ClinicalTrials.gov

ID (ClinicalTrials.gov)	Plánované dokončení	Druh SCs	Kontrola	Způsob doručení	Fáze	Počet účastníků
NCT00273364	12/2018	HSCs	schválené léky	IV	3	110
NCT02674217	12/2019	HSCs	ne	IV	N	200
NCT03342638	01/2024	HSCs	ne	IV	3	200
NCT03477500	03/2024	HSCs	alemtuzumab	IV	3	100
NCT03113162	05/2025	HSCs	ne	IV	1	15
NCT02166021	03/2018	BM-MSCs	ne	IT/IV/IT+IV	2	36
NCT02403947	05/2018	BM-MSCs	placebo	IV	1/2	12
NCT01815632	10/2018	BM-MSCs	placebo	IV	2	80
NCT01745783	12/2018	BM-MSCs	placebo	IV	1/2	30
NCT02326935	01/2019	Ad-MSCs	ne	IV	1	100
NCT02239393	12/2019	BM-MSCs	placebo	IV	2	40
NCT03069170	01/2020	BM-MSCs	ne	IT/IV	1/2	50
NCT03326505	05/2020	UC-MSCs	fyzioterapie	IT	1/2	60
NCT02495766	06/2020	BM-MSCs	placebo	IV	1/2	8
NCT03355365	11/2023	BM-MSCs	placebo	IT	2	50
NCT03269071	08/2020	fNSCs	ne	IT	1	4
NCT03282760	02/2021	fNSCs	ne	IVC	1	24

Ad- izolované z tukové tkáně; **BM-** izolované z kostní dřeně; **fNSCs** neurální kmenové buňky izolované z mozku plodu; **HSCs** hematopoetické kmenové buňky; **IT** intratekálně; **IV** intravenózně; **IVC** intra-ventrikulárně; **MSCs** mezenchymální kmenové buňky; **N** nespecifikováno; **UC-** izolované z pupečnicku

***all.** allogenní (v případě HSCs, MSCs pokud není uvedeno, je zdroj autologní)

Tabulka 2: Probíhající testy pro léčbu Alzheimerovy choroby pomocí kmenových buněk registrované na ClinicalTrials.gov

ID (ClinicalTrials.gov)	Plánované dokončení	Druh SCs	Kontrola	Způsob doručení	Fáze	Počet účastníků
NCT02899091	06/2018	P-MSCs	placebo	IV	1/2	24
NCT02833792	06/2018	BM-MSCs all. isch.t.	placebo	IV	2	40
NCT03117738	11/2018	Ad-MSCs all.	placebo	IV	1/2	60
NCT02672306	10/2019	UC-MSCs	placebo	IV	1/2	40
NCT02600130	10/2019	BM-MSCs	placebo	IV	1	30
NCT02054208 (NCT03172117)	07/2019 (12/2021)	UCB-MSCs	placebo	IT	1/2	45

Ad- izolované z tukové tkáně; **BM-** izolované z kostní dřeně; **isch.t.** ischemicky tolerantní; **IT** intratekálně; **IV** intravenózně; **MSCs** mezenchymální kmenové buňky; **P-** izolované z placenty; **UCB-** izolované z pupečnickové krve; **UC-** izolované z pupečnicku

***all.** allogenní (pokud není uvedeno, je zdroj autologní)

Tabulka 3: Probíhající testy pro léčbu amyotrofické laterální sklerózy pomocí kmenových buněk registrované na ClinicalTrials.gov

ID (ClinicalTrials.gov)	Plánované dokončení	Druh SCs	Kontrola	Způsob doručení	Fáze	Počet účastníků
NCT01609283	04/2018	Ad-MSCs	ne	IT	1	27
NCT02881489	10/2018	BM-MSCs	ne	IT	1	30
NCT02881476	10/2018	UC-MSCs	ne	IT	1	30
NCT01758510 (NCT03214146)	06/2018 (12/2018)	BM-MSCs all. HLA shodné	ne	IT	1	6
NCT02943850	04/2019	NP-GDNF	ne	IS	1	18
NCT03280056	06/2019	MSCs-NTF	placebo	IT	3	200
NCT03067857	08/2019	BM-MSCs	ne	IV+IT	1/2	40
NCT02917681	08/2019	BM-MSCs	ne	IT	1/2	28
NCT03268603	12/2019	Ad-MSCs	ne	IT	2	60
NCT03482050	07/2020	ESCs-Astro	ne	IT	1/2	21
NCT02478450	12/2020	GRP	ne	IS	1/2	30
NCT02290886	02/2021	Ad-MSCs	placebo	IV	1/2	40

Ad- izolované z tukové tkáně; **BM**- izolované z kostní dřeně; **ESCs-Astro** astrocyty derivované z embryonálních kmenových buněk; **GRP** gliové progenitory; **HLA** lidský leukocytární antigen; **IS** intraspinálně; **IT** intratekálně; **IV** intravenózně; **MSCs** mezenchymální kmenové buňky; **MSCs-NTF** mezenchymální kmenové buňky produkující neurotrofické růstové faktory; **NP-GDNF** neurální progenitory produkující růstový faktor odvozený od gliových buněk; **UC**- izolované z pupečníku

*all. allogenní (v případě MSC pokud není uvedeno, je zdroj autologní)

Tabulka 4: Probíhají testy pro léčbu Parkinsonovy choroby pomocí kmenových buněk registrované na ClinicalTrials.gov

ID (ClinicalTrials.gov)	Plánované dokončení	Druh SC	Kontrola	Způsob doručení	Fáze	Počet účastníků
NCT03128450	11/2018	fNSCs	ne	IN	2/3	12
NCT02780895	12/2018	fNSCs	ne	IC	1	8
NCT02452723	03/2019	hpNSCs	ne	IC	1	12
NCT03309514	06/2019	fNSCs	ne	IC	1/2	12
NCT02611167	11/2019	BM-MSCs all.	ne	IV	1/2	20
NCT03119636	12/2020	ESCs-NP	ne	IC	1/2	50

all. allogenní; **BM-MSCs** mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřeně; **ESCs-NP** neurální progenitory odvozené z embryonálních kmenových buněk; **fNSCs** fetální neurální kmenové buňky; **hpNSCs** lidské partenogenetické neurální kmenové buňky; **IC** intracerebrálně; **IN** intranasálně; **IV** intravenózně

6 Použitá literatura

- 1.* Rippon, H. J. & Bishop, A. E. Embryonic stem cells. *Cell Prolif.* **37**, 23–34 (2004).
2. Watson, R. A. & Yeung, T. M. What is the potential of oligodendrocyte progenitor cells to successfully treat human spinal cord injury? *BMC Neurol.* **11**, 113 (2011).
3. Schwartz, S. D. *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt’s macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet (London, England)* **385**, 509–16 (2015).
4. Harris, V. K., Farouqi, R., Vyshkina, T. & Sadiq, S. A. Characterization of autologous mesenchymal stem cell-derived neural progenitors as a feasible source of stem cells for central nervous system applications in multiple sclerosis. *Stem Cells Transl. Med.* **1**, 536–47 (2012).
5. Mancardi, G. & Saccardi, R. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis. *Lancet. Neurol.* **7**, 626–36 (2008).
6. Farge, D. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases: an observational study on 12 years’ experience from the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party on Autoimmune Diseases. *Haematologica* **95**, 284–92 (2010).
7. Yin, L. *et al.* Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiated into hepatocyte-like cells in vivo and in vitro. *Mol. Med. Rep.* **11**, 1722–32 (2015).
8. Borkowska, P. *et al.* Differentiation of adult rat mesenchymal stem cells to GABAergic, dopaminergic and cholinergic neurons. *Pharmacol. Reports* **67**, 179–186 (2015).
9. Liu, Q. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiate into nerve-like cells in vitro after transfection with brain-derived neurotrophic factor gene. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **51**, 319–27 (2015).
- 10.* Galderisi, U., Squillaro, T. & Peluso, G. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* **25**, 829–848 (2016).
11. Riordan, N. H. *et al.* Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis. *J. Transl. Med.* **7**, 29 (2009).
12. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–76 (2006).
- 13.* Ye, L., Swingen, C. & Zhang, J. Induced pluripotent stem cells and their potential for basic and clinical sciences. *Curr. Cardiol. Rev.* **9**, 63–72 (2013).
- 14.* Scheiner, Z. S., Talib, S. & Feigal, E. G. The potential for immunogenicity of autologous induced pluripotent stem cell-derived therapies. *J. Biol. Chem.* **289**, 4571–7 (2014).
- 15.* Okano, H. & Yamanaka, S. iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease. *Mol. Brain* **7**, 22 (2014).
16. Potts, M. B., Silvestrini, M. T. & Lim, D. A. Devices for cell transplantation into the central nervous system: Design considerations and emerging technologies. *Surg. Neurol. Int.* **4**, S22–30 (2013).
- 17.* Li, Y., Feng, L., Zhang, G.-X. & Ma, C. Intranasal delivery of stem cells as therapy for central nervous system disease. *Exp. Mol. Pathol.* **98**, 145–151 (2015).

18. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)* **372**, 1502–17 (2008).
19. Lublin, F. D. *et al.* Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* **83**, 278–86 (2014).
- 20.* Atkins, H. L. & Freedman, M. S. Hematopoietic stem cell therapy for multiple sclerosis: top 10 lessons learned. *Neurotherapeutics* **10**, 68–76 (2013).
21. Burt, R. *et al.* T cell-depleted autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: report on the first three patients. *Bone Marrow Transplant.* **21**, 537–541 (1998).
22. Fassas, A. *et al.* Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant.* **20**, 631–638 (1997).
23. Muraro, P. A. *et al.* Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J. Exp. Med.* **201**, 805–16 (2005).
24. Shevchenko, J. L. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in multiple sclerosis. *Exp. Hematol.* **40**, 892–8 (2012).
25. Burt, R. K. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: failure of a total body irradiation-based conditioning regimen to prevent disease progression in patients with high disability scores. *Blood* **102**, 2373–8 (2003).
26. Nash, R. A. *et al.* High-dose immunosuppressive therapy and autologous hematopoietic cell transplantation for relapsing-remitting multiple sclerosis (HALT-MS): a 3-year interim report. *JAMA Neurol.* **72**, 159–69 (2015).
27. Nash, R. A. *et al.* High-dose immunosuppressive therapy and autologous HCT for relapsing-remitting MS. *Neurology* **88**, 842–852 (2017).
28. Atkins, H. L. *et al.* Immunoablation and autologous haemopoietic stem-cell transplantation for aggressive multiple sclerosis: a multicentre single-group phase 2 trial. *Lancet (London, England)* **388**, 576–85 (2016).
29. Burt, R. K. *et al.* Association of Nonmyeloablative Hematopoietic Stem Cell Transplantation With Neurological Disability in Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *JAMA* **313**, 275 (2015).
30. Mancardi, G. L. *et al.* Autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis: a phase II trial. *Neurology* **84**, 981–8 (2015).
31. Rice, C. M. *et al.* Safety and Feasibility of Autologous Bone Marrow Cellular Therapy in Relapsing-Progressive Multiple Sclerosis. *Clin. Pharmacol. Ther.* **87**, 679–685 (2010).
32. Karussis, D. *et al.* Safety and Immunological Effects of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Arch. Neurol.* **67**, 1187–1194 (2011).
33. Cohen, J. A. *et al.* Pilot trial of intravenous autologous culture-expanded mesenchymal stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 135245851770380 (2017). doi:10.1177/1352458517703802
34. Rice, C. M. *et al.* Assessment of bone marrow-derived Cellular Therapy in progressive Multiple Sclerosis (ACTiMuS): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials* **16**, 463 (2015).

35. Connick, P. *et al.* Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. *Lancet. Neurol.* **11**, 150–6 (2012).
36. Llufriu, S. *et al.* Randomized Placebo-Controlled Phase II Trial of Autologous Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis. *PLoS One* **9**, e113936 (2014).
- 37.* Harris, V. K. & Sadiq, S. A. Stem cell therapy in multiple sclerosis: a future perspective. *Neurodegener. Dis. Manag* **5**, 167–170 (2015).
38. Yamout, B. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: A pilot study. *J. Neuroimmunol.* **227**, 185–189 (2010).
39. Bonab, M. M., Yazdanbakhsh, S. & Lotfi, J. Does Mesenchymal Stem Cell Therapy Help Multiple Sclerosis Patients ? Report of a Pilot Study. *Iran.J.Immunol.* **4**, 50–57 (2007).
40. Bonab, M. M. *et al.* Autologous mesenchymal stem cell therapy in progressive multiple sclerosis: an open label study. *Curr Stem Cell Res Ther* **7**, 407–414 (2012).
41. Stepien, A. *et al.* Clinical Application of Autologous Adipose Stem Cells in Patients with Multiple Sclerosis: Preliminary Results. *Mediators Inflamm.* **2016**, 5302120 (2016).
42. Riordan, N. H. *et al.* Clinical feasibility of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis. *J. Transl. Med.* **16**, 57 (2018).
43. Li, J.-F. *et al.* The Potential of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells as a Novel Cellular Therapy for Multiple Sclerosis. *Cell Transplant.* **23**, 113–122 (2014).
44. Lublin, F. D. *et al.* Human placenta-derived cells (PDA-001) for the treatment of adults with multiple sclerosis: a randomized, placebo-controlled, multiple-dose study. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **3**, 696–704 (2014).
45. Harris, V. K. *et al.* Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **313**, 167–177 (2012).
46. Harris, V. K. *et al.* Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. *EBioMedicine* **29**, 23–30 (2018).
47. Ruiz-Argüelles, G. J. *et al.* A Feasibility Study of the Full Outpatient Conduction of Hematopoietic Transplants in Persons with Multiple Sclerosis Employing Autologous Non-Cryopreserved Peripheral Blood Stem Cells. *Acta Haematol.* **137**, 214–219 (2017).
48. Rowland, L. P. & Shneider, N. A. Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1688–1700 (2001).
49. Kiernan, M. C. *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **377**, 942–955 (2011).
- 50.* Mancuso, R. & Navarro, X. Amyotrophic lateral sclerosis: Current perspectives from basic research to the clinic. *Prog. Neurobiol.* **133**, 1–26 (2015).
51. Cetin, H. *et al.* Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis and effect of riluzole on disease course. *Neuroepidemiology* **44**, 6–15 (2015).
52. Kraemer, M., Buerger, M. & Berlit, P. Diagnostic problems and delay of diagnosis in amyotrophic lateral sclerosis. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **112**, 103–105 (2010).
53. Mazzini, L. *et al.* Stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis: a methodological approach in humans. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **4**, 158–61 (2003).

54. Burkhardt, M. F. *et al.* A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol. Cell. Neurosci.* **56**, 355–364 (2013).
55. Papadeas, S. T. & Maragakis, N. J. Advances in stem cell research for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 545–551 (2009).
56. Mazzini, L. *et al.* Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **265**, 78–83 (2008).
57. Mazzini, L. *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp. Neurol.* **223**, 229–237 (2010).
58. Mazzini, L. *et al.* Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy* **14**, 56–60 (2012).
59. Nafissi, S. *et al.* Intraspinal delivery of bone marrow stromal cell-derived neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: A safety and feasibility study. *J. Neurol. Sci.* **362**, 174–181 (2016).
60. Blanquer, M. *et al.* Neurotrophic Bone Marrow Cellular Nests Prevent Spinal Motoneuron Degeneration in Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients: A Pilot Safety Study. *Stem Cells* **30**, 1277–1285 (2012).
61. Deda, H. *et al.* Treatment of amyotrophic lateral sclerosis patients by autologous bone marrow-derived hematopoietic stem cell transplantation: a 1-year follow-up. *Cytotherapy* **11**, 18–25 (2009).
62. Martinez, H. R. *et al.* Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis patients. *Cytotherapy* **11**, 26–34 (2009).
63. Martínez, H. R. *et al.* Stem Cell Transplantation in Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients: Methodological Approach, Safety, and Feasibility. *Cell Transplant.* **21**, 1899–1907 (2012).
64. Syková, E. *et al.* Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell Transplant.* **26**, 647–658 (2017).
65. Oh, K. W. *et al.* Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med* **4**, 590–597 (2015).
66. Kim, H. Y. *et al.* Biological Markers of Mesenchymal Stromal Cells as Predictors of Response to Autologous Stem Cell Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: An Investigator-Initiated Trial and In Vivo Study. *Stem Cells* **32**, 2724–2731 (2014).
67. Staff, N. P. *et al.* Safety of intrathecal autologous adipose-derived mesenchymal stromal cells in patients with ALS. *Neurology* **87**, 2230–2234 (2016).
68. Rushkevich, Y. N. *et al.* The Use of Autologous Mesenchymal Stem Cells for Cell Therapy of Patients with Amyotrophic Lateral Sclerosis in Belarus. *Bull. Exp. Biol. Med.* **159**, 576–581 (2015).
69. Sharma, A. K. *et al.* The effect of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation on the survival duration in Amyotrophic Lateral Sclerosis - a retrospective controlled study. *Am. J. Stem Cells* **4**, 50–65 (2015).
70. Petrou, P. *et al.* Safety and clinical effects of mesenchymal stem cells secreting neurotrophic factor transplantation in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA Neurol.* **73**, 337–344 (2016).

71. Gothelf, Y. *et al.* Safety and efficacy of transplantation of nurown (autologous mesenchymal stromal cells secreting neurotrophic factors) in patients with ALS: A phase 2 randomized double blind placebo controlled trial. *Cytotherapy* **19**, S23 (2017).
72. Glass, J. D. *et al.* Lumbar intraspinal injection of neural stem cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis: Results of a phase I trial in 12 patients. *Stem Cells* **30**, 1144–1151 (2012).
73. Feldman, E. L. *et al.* Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: Phase 1 trial outcomes. *Ann. Neurol.* **75**, 363–373 (2014).
74. Riley, J. *et al.* Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A phase i safety trial, technical note, and lumbar safety outcomes. *Neurosurgery* **71**, 405–416 (2012).
75. Riley, J. *et al.* Intraspinal Stem Cell Transplantation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurosurgery* **74**, 77–87 (2014).
76. Mazzini, L. *et al.* Human neural stem cell transplantation in ALS: Initial results from a phase I trial. *J. Transl. Med.* **13**, 17 (2015).
77. Chen, L. *et al.* Short-term outcome of olfactory ensheathing cells transplantation for treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* **21**, 961–6 (2007).
78. Huang, H. *et al.* Fetal olfactory ensheathing cells transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients: A controlled pilot study. *Clin. Transplant.* **22**, 710–718 (2008).
79. Chen, L. *et al.* Olfactory Ensheathing Cell Neurorestoration for Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients: Benefits from Multiple Transplantations. *Cell Transplant.* **21**, 65–77 (2012).
80. Piepers, S. & van den Berg, L. H. No benefits from experimental treatment with olfactory ensheathing cells in patients with ALS. *Amyotroph. Lateral Scler.* **11**, 328–330 (2010).
81. Crews, L. & Masliah, E. Molecular mechanisms of neurodegeneration in Alzheimer’s disease. *Hum. Mol. Genet.* **19**, R12–20 (2010).
82. Du, X., Wang, X. & Geng, M. Alzheimer’s disease hypothesis and related therapies. *Transl. Neurodegener.* **7**, 2 (2018).
83. Kim, H. J. *et al.* Stereotactic brain injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer’s disease dementia: A phase I clinical trial. *Alzheimer’s Dement. Transl. Res. Clin. Interv.* **1**, 95–102 (2015).
84. Kennedy, B. C., Brown, L. T., Komotar, R. J. & McKhann, G. M. Stereotactic catheter placement for Ommaya reservoirs. *J. Clin. Neurosci.* **27**, 44–47 (2016).
85. Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A. & Steeves, T. D. L. The prevalence of Parkinson’s disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov. Disord.* **29**, 1583–1590 (2014).
- 86.* Maiti, P., Manna, J. & Dunbar, G. L. Current understanding of the molecular mechanisms in Parkinson’s disease: Targets for potential treatments. *Transl. Neurodegener.* **6**, 28 (2017).
87. Wichmann, T. & Delong, M. R. Deep brain stimulation for neurologic and neuropsychiatric disorders. *Neuron* **52**, 197–204 (2006).
- 88.* Barker, R. A., Barrett, J., Mason, S. L. & Björklund, A. Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson’s disease. *Lancet Neurol.* **12**, 84–91 (2013).
- 89.* Morizane, A. & Takahashi, J. Cell Therapy for Parkinson’s Disease. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. **56**, 102–9 (2016).

90. Freed, C. R. *et al.* Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease. *N. Engl. J. Med.* **344**, 710–719 (2001).
91. Olanow, C. W. *et al.* A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann. Neurol.* **54**, 403–414 (2003).
92. Yin, F. *et al.* Transplantation of Human Retinal Pigment Epithelium Cells in the Treatment for Parkinson Disease. *CNS Neurosci. Ther.* **18**, 1012–1020 (2012).
93. Barker, R. A., Studer, L., Cattaneo, E., Takahashi, J. & consortium, G.-F. P. G-Force PD: a global initiative in coordinating stem cell-based dopamine treatments for Parkinson's disease. *npj Park. Dis.* **1**, 15017 (2015).
94. Brazzini, A. *et al.* Intraarterial Autologous Implantation of Adult Stem Cells for Patients with Parkinson Disease. *J. Vasc. Interv. Radiol.* **21**, 443–451 (2010).
95. Venkataramana, N. K. *et al.* Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl. Res.* **155**, 62–70 (2010).
96. Lige, L. & Zengmin, T. Transplantation of neural precursor cells in the treatment for parkinson disease: an efficacy and safety analysis. *Turk. Neurosurg.* **378**, 378–383 (2015).
97. Revazova, E. S. *et al.* Patient-Specific Stem Cell Lines Derived from Human Parthenogenetic Blastocysts. *Cloning Stem Cells* **9**, 432–449 (2007).
98. Barker, R. A. *et al.* Are Stem Cell-Based Therapies for Parkinson's Disease Ready for the Clinic in 2016? *J. Parkinsons. Dis.* **6**, 57–63 (2016).