

# Terapie komórkami macierzystymi

## Pomysł:

Odkrycie i opisanie pierwszych komórek macierzystych obito się głośnym echem w nauce. Wróżono rychłą erę medycyny regeneracyjnej. Mimo ogromnego potencjału, terapie komórkami macierzystymi są obarczone ryzykiem i (jak każda nowa metoda lecznicza) wymagają lat testów przed wprowadzeniem do ogólnodostępnej medycyny. Obecnie podejmuje się coraz odważniejsze próby z tymi komórkami. Dotyczy to również SLA (stwardnienie zanikowe boczne - sclerosis lateralis amyotrophica).

Czym w ogóle są komórki macierzyste? Komórkami macierzystymi nazywamy takie komórki, które mogą<sup>1</sup>:

- Tworzyć inne komórki macierzyste (poprzez podział).
- Mają zdolność do różnicowania się w inne komórki organizmu.

W czasie embriogenezy (rozwoju zarodkowego) z pojedynczej, zapłodnionej komórki jajowej powstaje cały organizm, który składa się z wielu różnych typów komórek. W tym początkowym stadium rozwoju komórki są najbardziej plastyczne i mogą przekształcić się praktycznie w każdą inną komórkę ciała (co ostatecznie robią, tworząc dziecko). Są to komórki embrionalne. Wraz z rozwojem organizmu komórki macierzyste zaczynają się różnicować (dojrzewać) w komórki wątroby, kości, neurony, które nie mają już takich zdolności do przekształcania się, ale mają za to specyficzne, przypisane do swojego typu role i właściwości. Pomimo że stanowią one zdecydowaną większość, można wśród nich znaleźć również komórki macierzyste, jednak te komórki nazywamy komórkami nieembrionalnymi (somatycznymi)<sup>2</sup>.

Komórki macierzyste można podzielić na kilka rodzajów, ze względu na zdolność do różnicowania się<sup>2,3</sup>:

- Komórki totipotencjalne - są to komórki macierzyste embrionalne w pierwszym stadium rozwoju (do około 8 komórek zarodkowych). Są one w stanie utworzyć cały nowy organizm razem z tak zwanym płodem (na który składają się łożysko, sznur pępowinowy, owodnia).
- Komórki pluripotencjalne - są w stanie wytworzyć cały organizm, jednak bez płodu.
- Komórki multipotencjalne - mogą się różnicować w tkanki i narządy w obrębie jednego z trzech listków zarodkowych: ektodermalnego (z którego rozwijają się m.in. naskórek, centralny układ nerwowy, niektóre elementy oka i ucha), endodermalnego (z którego rozwijają się m.in. części układu pokarmowego, płuca, niektóre gruczoły dokrewne, pęcherz moczowy i cewka moczowa) i mezodermalnego (z którego rozwijają się m.in. układ krwionośny, wydalniczy, kostny, mięśnie i somatyczne części gonad).
- Komórki oligopotencjalne - mogą różnicować się jedynie w kilka rodzajów komórek o podobnej charakterystyce (na przykład krwiotwórcze komórki macierzyste różnicujące się na 8 różnych dojrzałych elementów morfotycznych krwi).
- Komórki macierzyste somatyczne mono- i unipotencjalne - są zdolne do odtwarzania komórek jedynie w obrębie danej tkanki i dojrzewać w komórki tylko jednego typu.

Obecnie najlepiej poznane są krwiotwórcze komórki macierzyste i jako jedyne mają zastosowanie w standardowych procedurach medycznych. Jednak nawet w układzie nerwowym, który ma bardzo małą zdolność do regeneracji, znajdują się miejsca, gdzie można znaleźć komórki macierzyste unipotencjalne, które mogą przekształcać się w nowe neurony<sup>2</sup>.

Zastosowanie terapii komórkami macierzystymi w przypadku chorób neurodegeneracyjnych takich jak SLA wymaga pokonania szeregu problemów. Pierwszym z nich jest toksyczne środowisko, w którym znajdować się będą nowe komórki. Upośledzona funkcja komórek wspomagających, takich jak astrocyty i zbyt zaktywowany mikroglej mogą powodować śmierć komórek macierzystych lub komórek z nich powstałych. Dodatkowo dochodzi problem stresów ekscytotoksycznego (spowodowanego zbyt wysokim stężeniem pobudzającego kwasu glutaminowego) i oksydacyjnego (spowodowanego przez reaktywne formy tlenu i azotu). Warunki te sprawiają, że przeszczepione komórki mogą obumrzeć, zanim będzie można zaobserwować jakikolwiek efekt ich stosowania. Bardzo możliwe, że w docelowej terapii komórkami macierzystymi będzie wymagane

wspomaganie farmakologiczne, mające na celu zapewnienie odpowiednich warunków do rozwoju i różnicowania wprowadzonych komórek<sup>4</sup>.

Kolejnym wyzwaniem jest integracja nowych komórek ze skomplikowanym systemem. W przypadku SLA uszkodzone zostają zarówno górne (znajdujące się w korze lub pniu mózgu), jak i dolne (unerwiające mięśnie) motoneurony. W skład układu wchodzi także połączone z nimi interneurony i mięśnie. Wprowadzone komórki, aby pełnić swoją funkcję, będą więc nie tylko musiały przeżyć w trudnym środowisku i przekształcić się w odpowiednie neurony, ale również zintegrować się z resztą elementów układu. Zbyt mała ilość komórek lub niewłaściwe miejsce (lub zbyt mała liczba miejsc) ich wprowadzenia może skutkować niepowodzeniem terapii. Dlatego też optymalizacja miejsc wprowadzania komórek macierzystych i ich ilości stanowią bardzo ważne pytania, na które trzeba odpowiedzieć<sup>4</sup>.

Inną komplikacją jest ryzyko odrzucenia wszczepionych komórek macierzystych. Problem jest podobny jak w przypadku innych przeszczepów (na przykład nerek, wątroby czy serca). Rozwiązaniem może być autoprzeszczep (przeszczep komórek pochodzących od samych pacjentów). Dostęp do niektórych typów komórek jest dobrze opracowany (na przykład tych pochodzących ze szpiku kostnego). W niektórych przypadkach te komórki mogą nie spełniać wymagań terapii. Na przykład te 'łatwo dostępne' komórki nie mogą się różnicować w niektóre typy dorosłych komórek. Obecnie jednak istnieją metody (które są również ciągle udoskonalane) pozwalające na 'cofnięcie w rozwoju' komórek pacjentów. Dzięki temu procesowi nabierają one cech komórek macierzystych pluripotencjalnych. Mówi się na nie indukowane komórki pluripotencjalne. Jeśli komórki wyjściowe (czyli te, które zostały przekształcone w indukowane komórki pluripotencjalne) pochodzą od samego pacjenta, to nie powinny zostać odrzucone przez ciało. Jednak metoda ma pewne ograniczenia. Jeśli wszczepione komórki będą miały predyspozycje do zachorowania (na przykład w przypadku osób posiadających mutacje wywołujące SLA), mogą nie spełniać swojej roli. Obecnie są prowadzone rozważania i badania nad możliwością 'leczenia' komórek pacjenta przed ponownym wszczepieniem za pomocą terapii genowych (naprawianie uszkodzonego genu), jednak ze względów etycznych i technicznych posuwają się one powoli<sup>4-7</sup>.

Wszczepianie komórek macierzystych może nieść ze sobą ryzyko wytworzenia nowotworu. Dotyczy to zwłaszcza indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (choć nie tylko), gdzie przy przywracaniu pluripotencji ('cofnięciu w rozwoju' do stanu pluripotencjalnego) mogą pojawić się niebezpieczne mutacje w DNA. Istnieje kilka metod indukcji komórek. Naukowcy opracowując terapie bazujące na komórkach macierzystych, wykorzystują takie techniki przygotowywania komórek, aby jak najbardziej zmniejszyć ryzyko poważnych efektów ubocznych dla pacjentów. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że stoimy dopiero na początku drogi medycyny regeneracyjnej. Często frustrujące powolne tempo badań wynika z troski o pacjentów. Jak w przypadku każdej nowej terapii, należy uważnie obserwować osoby poddawane zabiegom, aby wyłapać potencjalne zagrożenia związane z ich stosowaniem i ograniczyć liczbę osób, u których mogą pojawić się poważne efekty uboczne<sup>5,7,8</sup>.

W przypadku każdej nowej terapii będącej w fazie prób klinicznych pacjenci powinni być dokładnie poinformowani o możliwych skutkach ubocznych przez lekarza przeprowadzającego dane badanie. Efekty uboczne mogą się różnić w zależności od typu wszczepianych komórek, technik przygotowywania, metod wszczepiania oraz innych czynników. Obecnie w internecie można znaleźć wiele firm i ośrodków oferujących komercyjnie terapie komórkami macierzystymi. W reklamach i ulotkach można przeczytać, że są one skuteczne i bezpieczne. Często są to firmy prywatne nastawione na zysk, które nie brały udziału w żadnych próbach klinicznych potwierdzających bezpieczeństwo i skuteczność danej metody. Decydując się na tego typu niesprawdzone zabiegi, pacjenci muszą liczyć się z możliwością wystąpienia bolesnych i niebezpiecznych skutków ubocznych, braku widocznych efektów terapii, nie wspominając oczywiście o znacznych kosztach finansowych. W przypadku nierejestrowanych i niekontrolowanych terapii komórkami macierzystymi należy liczyć się z faktem, że w przypadku wystąpienia dodatkowych powikłań (na przykład w wyniku błędów lekarskich czy zakażeń), pociągnięcie do odpowiedzialności osoby/instytucji winnej danej sytuacji, może być znacznie

utrudnione lub wręcz niemożliwe <sup>8</sup>.

### **Mechanizm działania:**

Istnieje kilka mechanizmów, które mogą przyczynić się do poprawy stanu pacjentów w przypadku terapii z udziałem komórek macierzystych. Pierwszym i najbardziej oczywistym jest zastąpienie obumarłych i uszkodzonych komórek nowymi. Przy czym może tu chodzić zarówno o neurony, jak i komórki wspomagające (glejowe). W przypadkach, gdy dana terapia koncentruje się na konkretnych typach komórek, które mają zostać zastąpione, można zastosować wstępne różnicowanie komórek jeszcze przed wszczepieniem, co oczywiście wydłuży proces przygotowań do samej procedury wszczepienia komórek pacjentom <sup>4</sup>.

Inną potencjalną terapią może okazać się przeszczep komórek macierzystych mezenchymalnych (można je pozyskać między innymi ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej, krwi pępowinowej, miazgi zębowej czy mięśni szkieletowych) lub innych komórek pochodzących ze szpiku. Te komórki mają zdolność do wytwarzania wielu ważnych związków, których zadaniem byłoby wspomaganie przeżywalności jeszcze żyjących neuronów, przeciwdziałanie procesom zapalnym i apoptozie. Dzięki temu żyjące jeszcze neurony mają większą szansę przeżycia i potencjalnie mogą zostać uruchomione procesy naprawcze spowalniające/zatrzymujące chorobę <sup>4,9,10</sup>.

W przyszłości bardzo możliwe będzie stosowanie terapii łączonych, gdzie wszczepiane komórki macierzyste nie tylko będą zastępować umierające neurony, ale również wydzielać związki mające na celu zapewnienie ochrony starym i nowo rozwijającym się komórkom <sup>11,12</sup>.

Komórki macierzyste są niezmiernie ciekawym tematem. Dlatego też wiele grup naukowych przeprowadziło eksperymenty na zwierzętach (głównie myszach i szczurach noszących zmutowany gen SOD1, który wywołuje SLA), aby zweryfikować skuteczność tych komórek. Sprawdzano różne typy komórek macierzystych. Na przykład w przypadku gryzoni, którym wszczepiono komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego, nastąpiło znaczne spowolnienie choroby, poprawienie sprawności i przedłużenie życia. Uważa się, że efekt ten osiągnięto dzięki kilku mechanizmom, między innymi zwiększonej ekspresji transporterów kwasu glutaminowego (są one odpowiedzialne za usuwanie kwasu glutaminowego z przestrzeni międzykomórkowej) czy zwiększonej ekspresji GDNF (glial cell line derived neurotrophic factor - czynnik neurotroficzny pochodzenia glejowego) <sup>13,14</sup>. Podobne obserwacje (poprawę kondycji i przedłużenie życia zwierząt) poczyniono również w przypadku przeszczepu komórek mezenchymalnych <sup>14-19</sup>.

Gryzoniom z sukcesem wszczepiano również komórki mające na celu zastępowanie uszkodzonych w wyniku choroby neuronów. Chodzi na przykład o progenitorowe komórki neuronalne. Neuronom powstałym ze wszczepionych neuronalnych komórek macierzystych udało się zintegrować z układem motorycznym zwierząt, obserwowano pobudzenie procesów ochronnych w przypadku motoneuronów, obserwowano powstawanie nowych komórek wspomagających (na przykład astrocytów) oraz regulację procesów apoptozy. Dodatkowo badane zwierzęta w wielu przypadkach żyły dłużej, a postępy choroby uległy spowolnieniu <sup>20-24</sup>.

W przypadku gryzoni skuteczną terapią okazało się również wszczepienie komórek macierzystych wyizolowanych z pępowiny. Wszczepiane komórki różnicowały się zarówno w neurony, jak i komórki wspomagające (astrocyty i mikroglej), postępy choroby spowalniały i obserwowano przedłużenie życia chorujących zwierząt <sup>25-27</sup>.

Analizując wyniki otrzymane ze zwierząt laboratoryjnych, trudno powstrzymać narastający optymizm związany z tego typu terapiami. Należy jednocześnie pamiętać, że organizm gryzoni znacznie różni się od ludzkiego, przede wszystkim rozmiarem. Ma to ogromne znaczenie, zwłaszcza przy terapii nastawionej na zastępowanie uszkodzonych neuronów. Komórki nerwowe rosną w podobnym tempie u obu organizmów, jednak u myszy/szczurów mają znacznie krótszą drogę do przebycia. Wytworzenie nowych aksonów u ludzi i zaobserwowanie znaczącej poprawy (o ile terapia okaże się skuteczna) może zabrać znaczącą ilość czasu.

### **Próby kliniczne:**

Od samego początku zainteresowanie komórkami macierzystymi i ich potencjalnym zastosowaniem

w medycynie było olbrzymie. Lekarze i naukowcy pokładają ogromne nadzieje w tych komórkach. Ten trend myślowy jest odzwierciedlony w liczbie prób klinicznych, które odbyły się/odbywają się na świecie, w tym również w Polsce<sup>28-30</sup>. W związku z ilością dostępnych danych, poniżej zostanie przedstawiony jedynie skrócony opis badań klinicznych z udziałem pacjentów chorujących na SLA z podziałem na świat i Polskę.

### **Próby kliniczne na świecie:**

W wielu krajach naukowcy podejmowali próby leczenia pacjentów SLA za pomocą komórek macierzystych różnych typów i z różnymi wynikami. Pacjentom aplikowano komórki macierzyste wyizolowane z krwi obwodowej, komórki mezenchymalne, komórki mononuklearne wyizolowane ze szpiku kostnego, neuronalne komórki progenitorowe oraz komórki macierzyste wyizolowane z nabłonka węchowego. Stosowano różne miejsca aplikacji i dawki<sup>28,31-63</sup>. W większości przypadków procedury były dobrze tolerowane i nie zaobserwowano efektów ubocznych, które zmusiłyby do przerwania badań<sup>32-35,38-40,42,45,46,48-54,56-63</sup>. Zdarzyły się jednak wyjątki. W jednej z prób klinicznych doszło nawet do śmierci pacjenta w wyniku komplikacji po zabiegu powiązanim z terapią<sup>31,44,47,55</sup>.

Większość prób klinicznych na komórkach macierzystych dotyczyła niewielkiej liczby pacjentów, choć zdarzały się wyjątki, gdzie terapię przetestowano na ponad 60ciu pacjentach. W znaczącej większości przypadków nie używano również grupy kontrolnej typu placebo. Głównym celem przeprowadzonych badań było zweryfikowanie właśnie bezpieczeństwa. W wielu testach jednocześnie kontrolowano w czasie stan pacjentów i porównywano do parametrów sprzed rozpoczęcia terapii i danych historycznych. Wśród najczęściej stosowanych metod weryfikacji postępów choroby była skala ALSFRS-R (ALS functional rating scale - skala oceny czynnościowej stosowana w SLA). Oczywiście w stosowano również inne techniki, między innymi: FVC (forced vital capacity - nasiloną pojemność życiowa), manualne testy siły mięśni, EMG (elektromiografia - diagnostyka czynności elektrycznej mięśni i nerwów obwodowych), testy spirometryczne, MRI (magnetic resonance imaging - rezonans magnetyczny), czas inicjacji wspomaganego oddychania, czas śmierci pacjenta oraz inne<sup>28,31-61</sup>.

W części publikacji naukowych opisujących próby kliniczne nadmieniano o komentarzach pacjentów dotyczących ich subiektywnej oceny pogorszenia/poprawy stanu zdrowia. Tego typu 'samooceny' należy analizować ostrożnie, ze względu na efekt placebo. Efekt placebo definiuje się jako reakcje pacjenta na lek lub procedurę medyczną, która nie powinna w jego przypadku zadziałać. Na przykład zmniejszenie bólu po podaniu tabletki z cukru. Chory przechodząc taką 'terapię' wierzy, że powinna mu one pomóc i rzeczywiście czuje się lepiej, przy czym efektowi psychologicznemu może towarzyszyć realna zmiana fizyczna dotycząca ciała pacjenta (na przykład zmiana ciśnienia krwi, czy zmiana ilości jakiegoś związku w organizmie). Efekt placebo jest dobrze udokumentowany. Świadczyć może również o tym, jak niezwykle jest nasz umysł i jak ważne jest nastawienie samego chorego do choroby i procesów leczenia. Jednocześnie fakt istnienia podobnego zjawiska sprawia, że w przypadku testowania nowej terapii potrzebna jest odpowiednia metoda weryfikacji efektywności podjętych interwencji<sup>64,65</sup>.

W przypadku komórek macierzystych pobranych z krwi obwodowej w kilku przeprowadzonych badaniach zaobserwowano poprawę stanu pacjentów mierzonych za pomocą ALSFRS-R lub czasu przeżycia pacjentów (badanie obejmowało grupę placebo). W przypadku jednego z testów, mimo braku zauważalnych zmian w postępach choroby, zaobserwowano obniżenie poziomów markerów stanów zapalnych<sup>38,44,46,61</sup>. W kilku innych badaniach na tych samych komórkach nie odnotowano znaczącej poprawy stanu pacjentów<sup>31,35,54</sup>.

W badaniach z udziałem komórek mezenchymalnych część grup badawczych opublikowała wyniki swoich badań, w których zaobserwowano poprawę stanu pacjentów po podjęciu terapii<sup>49,51,52,62</sup>. Dwa inne badania z udziałem tych komórek również wspominały o pozytywnych efektach leczenia, jednak nie przeprowadzono niezależnej analizy (subiektywna ocena) lub nie podano jasnych metod weryfikacji stanu pacjentów<sup>39,56</sup>. W przypadku reszty badań nie zaobserwowano znaczącej poprawy u badanych osób<sup>33,34,49,50,53,63</sup>.

W przypadku komórek macierzystych pochodzących z nabłonka węchowego artykuły opublikowane na podstawie badań informowały o spowolnieniu procesów choroby po zastosowaniu terapii <sup>36,37,43</sup>. Kolejna próba kliniczna nie potwierdziła tych wyników <sup>63</sup>.

Publikacje naukowe opisujące wyniki badań z użyciem neuronalnych komórek progenitorowych sugerowały spowolnienie choroby u części pacjentów. Jedno z badań zaobserwowało zmiany u osób bez symptomów opuszkowych (zaburzenia mowy, połykania), a w przypadku drugiej próby spowolnienie choroby dotyczyło trzech z sześciu pacjentów <sup>40,42,57-59</sup>.

Przedstawione powyżej badania, nawet jeśli dotyczyły podobnych komórek macierzystych, różniły się między sobą metodami i miejscami podawania, częstotliwością i ilością podawanych komórek.

W bazach danych prób klinicznych można znaleźć informacje o próbach klinicznych z wykorzystaniem komórek macierzystych, które obecnie prowadzą aktywną rekrutację. Poniżej znajdują się linki do odpowiednich stron (wszystkie strony są w języku angielskim).

### **Próby kliniczne w Polsce:**

Obecnie można znaleźć informacje o dwóch próbach klinicznych odbywających się w Polsce. Pierwsza z nich odbywa się na Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie. Rozpoczęła się ona w 2010 roku, a zakończenie jest planowane na grudzień 2017 roku. Uczestnikom badania mają zostać wszczepione komórki macierzyste pobrane z ich własnego szpiku kostnego. Próba ma charakter zamknięty i pacjenci nie mogą zgłaszać samodzielnie udziału (enrolment by invitation - zapisy na zaproszenie; stan na maj 2016 roku) <sup>66</sup>.

Drugim ośrodkiem zajmującym się terapiami komórkami macierzystymi na SLA w Polsce jest Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. Badania prowadzi Prof. Maksymowicz. Obecnie trwa proces publikacji artykułu naukowego opisującego wyniki przeprowadzonych badań. Artykuł będzie opisywał skutki podania komórek macierzystych mezenchymalnych wyizolowanych ze szpiku pacjentów i namnożonych w hodowli. W badaniu wzięło udział 25 pacjentów, u których szybkość postępów choroby była mierzona za pomocą ALSFRS-R. Wyniki były optymistyczne, a grupa zaobserwowała spowolnienie postępów choroby <sup>67</sup>.

Grupa Profesora Maksymowicza obecnie kończy również próby kliniczne z komórkami macierzystymi pobranymi z pępownicy (Galarety Whartona) z pojedynczym i wielokrotnym podaniem. Rekrutacja została już zakończona, a w próbie bierze udział około 20-30 pacjentów. Przewidywana jest kontynuacja podobnych badań na większej liczbie osób. Rekrutacja jest w toku, jednak koszty tej eksperymentalnej terapii są pokrywane komercyjnie (stan na kwiecień 2016 roku) <sup>67</sup>.

### **Próby kliniczne z aktywną rekrutacją lub mające się dopiero rozpocząć (maj 2016 roku):**

#### ***Chiny:***

#### **Komórki mezenchymalne pochodzące z pępownicy (rekrutacja na zaproszenie):**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01494480?term=%27stem+cell%27+AND+%27ALS%27&rank=4>

#### ***Hiszpania:***

#### **Komórki mezenchymalne pochodzące z adipocytów (tkanka tłuszczowa):**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02290886?term=%27stem+cell%27+AND+%27ALS%27&rank=234>

#### **Komórki pochodzące ze szpiku kostnego:**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02286011?term=%27stem+cell%27+AND+%27ALS%27&rank=49>

#### ***Indie:***

#### **Komórki pochodzące ze szpiku kostnego:**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02242071?term=%27stem+cell%27+AND+%27ALS%27&rank=39>

**Iran:**

**Komórki mezenchymalne pochodzące z adipocytów (tkanka tłuszczowa):**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02492516?term=%27stem+cell%27+AND+%27ALS%27&rank=8>

**Polska:**

**Komórki pochodzące ze szpiku kostnego (rekrutacja na zaproszenie):**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02193893?term=%27stem+cell%27+AND+%27ALS%27&rank=11>

**Stany Zjednoczone Ameryki:**

**Komórki progenitorowe komórek glejowych (rekrutacja miała się dopiero rozpocząć - informacja na maj 2015 roku):**

<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02478450?term=%27stem+cell%27+AND+%27ALS%27&rank=37>

**Bibliografia:**

1. Maldonado-Soto, A. R. *et al.* Stem cells in the nervous system. *Am. J. Phys. Med. Rehabil. Assoc. Acad. Physiatr.* **93**, S132–144 (2014).
2. Bogusław Machaliński. Nieembrionalne komórki macierzyste a regeneracja układu nerwowego. *Polski Przegląd Neurologiczny* **4**, 15–19 (2008).
3. <http://encyklopedia.pwn.pl/>. Available at: <http://encyklopedia.pwn.pl/haslo/ektoderma;3897157.html>. (Accessed: 2nd May 2016)
4. Thonhoff, J. R., Ojeda, L. & Wu, P. Stem Cell-Derived Motor Neurons: Applications and Challenges in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **4**, 178–199 (2009).
5. Diecke, S., Jung, S. M., Lee, J. & Ju, J. H. Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. *Korean J. Intern. Med.* **29**, 547–557 (2014).
6. Dimos, J. T. *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**, 1218–1221 (2008).
7. Herberts, C. A., Kwa, M. S. & Hermsen, H. P. Risk factors in the development of stem cell therapy. *J. Transl. Med.* **9**, 29 (2011).
8. Lodi, D., Iannitti, T. & Palmieri, B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR* **30**, 9 (2011).
9. Joyce, N. *et al.* Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen. Med.* **5**, 933–946 (2010).

10. Murphy, M. B., Moncivais, K. & Caplan, A. I. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp. Mol. Med.* **45**, e54 (2013).
11. Lunn, J. S., Hefferan, M. P., Marsala, M. & Feldman, E. L. Stem cells: comprehensive treatments for amyotrophic lateral sclerosis in conjunction with growth factor delivery. *Growth Factors Chur Switz.* **27**, 133–140 (2009).
12. Suzuki, M. & Svendsen, C. N. Combining growth factor and stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis. *Trends Neurosci.* **31**, 192–198 (2008).
13. Corti, S. *et al.* Systemic transplantation of c-kit<sup>+</sup> cells exerts a therapeutic effect in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3782–3796 (2010).
14. Pastor, D. *et al.* Comparative effects between bone marrow and mesenchymal stem cell transplantation in GDNF expression and motor function recovery in a motorneuron degenerative mouse model. *Stem Cell Rev.* **8**, 445–458 (2012).
15. Kaspar, B. K. Mesenchymal stem cells as trojan horses for GDNF delivery in ALS. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **16**, 1905–1906 (2008).
16. Kim, H. *et al.* Dose-dependent efficacy of ALS-human mesenchymal stem cells transplantation into cisterna magna in SOD1-G93A ALS mice. *Neurosci. Lett.* **468**, 190–194 (2010).
17. Suzuki, M. *et al.* Direct muscle delivery of GDNF with human mesenchymal stem cells improves motor neuron survival and function in a rat model of familial ALS. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **16**, 2002–2010 (2008).
18. Vercelli, A. *et al.* Human mesenchymal stem cell transplantation extends survival, improves motor performance and decreases neuroinflammation in mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **31**, 395–405 (2008).
19. Zhao, C.-P. *et al.* Human mesenchymal stromal cells ameliorate the phenotype of SOD1-G93A ALS mice. *Cytotherapy* **9**, 414–426 (2007).
20. Hwang, D. H. *et al.* Intrathecal transplantation of human neural stem cells overexpressing VEGF provide behavioral improvement, disease onset delay and survival extension in transgenic ALS mice. *Gene Ther.* **16**, 1234–1244 (2009).
21. Lunn, J. S. *et al.* Stem cell technology for the study and treatment of motor neuron diseases. *Regen. Med.* **6**, 201–213 (2011).
22. Park, S. *et al.* Growth factor-expressing human neural progenitor cell grafts protect motor

- neurons but do not ameliorate motor performance and survival in ALS mice. *Exp. Mol. Med.* **41**, 487–500 (2009).
23. Suzuki, M. *et al.* GDNF secreting human neural progenitor cells protect dying motor neurons, but not their projection to muscle, in a rat model of familial ALS. *PloS One* **2**, e689 (2007).
  24. Xu, L., Ryugo, D. K., Pongstaporn, T., Johe, K. & Koliatsos, V. E. Human neural stem cell grafts in the spinal cord of SOD1 transgenic rats: differentiation and structural integration into the segmental motor circuitry. *J. Comp. Neurol.* **514**, 297–309 (2009).
  25. Garbuzova-Davis, S. *et al.* Human umbilical cord blood treatment in a mouse model of ALS: optimization of cell dose. *PloS One* **3**, e2494 (2008).
  26. Garbuzova-Davis, S. *et al.* Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **12**, 255–270 (2003).
  27. Rizvanov, A. A. *et al.* Genetically modified human umbilical cord blood cells expressing vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor 2 differentiate into glial cells after transplantation into amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice. *Exp. Biol. Med. Maywood NJ* **236**, 91–98 (2011).
  28. Goutman, S. A., Chen, K. S. & Feldman, E. L. Recent Advances and the Future of Stem Cell Therapies in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* **12**, 428–448 (2015).
  29. <https://clinicaltrials.gov/>.
  30. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>.
  31. Appel, S. H. *et al.* Hematopoietic stem cell transplantation in patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **71**, 1326–1334 (2008).
  32. Baek, W. *et al.* Stem cell transplantation into the intraventricular space via an Ommaya reservoir in a patient with amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosurg. Sci.* **56**, 261–263 (2012).
  33. Blanquer, M. *et al.* Neurotrophic bone marrow cellular nests prevent spinal motoneuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis patients: a pilot safety study. *Stem Cells Dayt. Ohio* **30**, 1277–1285 (2012).
  34. Blanquer, M. *et al.* A surgical technique of spinal cord cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurosci. Methods* **191**, 255–257 (2010).
  35. Cashman, N. *et al.* Pilot study of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)-mobilized



- peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Muscle Nerve* **37**, 620–625 (2008).
36. Chen, L. *et al.* Olfactory ensheathing cell neurorestoration for amyotrophic lateral sclerosis patients: benefits from multiple transplantations. *Cell Transplant.* **21 Suppl 1**, S65–77 (2012).
  37. 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 Zhongguo Xiufu Chongjian Waike Zazhi Chin. J. Reparative Reconstr. Surg.* **21**, 961–966 (2007).
  38. Chiò, A. *et al.* Repeated courses of granulocyte colony-stimulating factor in amyotrophic lateral sclerosis: clinical and biological results from a prospective multicenter study. *Muscle Nerve* **43**, 189–195 (2011).
  39. 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).
  40. Feldman, E. L. *et al.* Intraspinal neural stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: phase 1 trial outcomes. *Ann. Neurol.* **75**, 363–373 (2014).
  41. Giordana, M. T. *et al.* Neuropathology of olfactory ensheathing cell transplantation into the brain of two amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **20**, 730–737 (2010).
  42. 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 Dayt. Ohio* **30**, 1144–1151 (2012).
  43. Huang, H. *et al.* Fetal olfactory ensheathing cells transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients: a controlled pilot study. *Clin. Transplant.* **22**, 710–718 (2008).
  44. Janson, C. G., Ramesh, T. M., During, M. J., Leone, P. & Heywood, J. Human intrathecal transplantation of peripheral blood stem cells in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Hematother. Stem Cell Res.* **10**, 913–915 (2001).
  45. 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 (2010).
  46. Martinez, H. R. *et al.* Stem-cell transplantation into the frontal motor cortex in amyotrophic

lateral sclerosis patients. *Cytotherapy* **11**, 26–34 (2009).

47. Martínez, H. R. *et al.* Stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis patients: methodological approach, safety, and feasibility. *Cell Transplant.* **21**, 1899–1907 (2012).
48. Mazzini, L. *et al.* Human neural stem cell transplantation in ALS: initial results from a phase I trial. *J. Transl. Med.* **13**, 17 (2015).
49. Mazzini, L. *et al.* Mesenchymal stromal cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a long-term safety study. *Cytotherapy* **14**, 56–60 (2012).
50. Mazzini, L. *et al.* Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial. *Exp. Neurol.* **223**, 229–237 (2010).
51. Mazzini, L. *et al.* Stem cell treatment in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **265**, 78–83 (2008).
52. Mazzini, L. *et al.* Autologous mesenchymal stem cells: clinical applications in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol. Res.* **28**, 523–526 (2006).
53. Moviglia, G. A. *et al.* Feasibility, safety, and preliminary proof of principles of autologous neural stem cell treatment combined with T-cell vaccination for ALS patients. *Cell Transplant.* **21 Suppl 1**, S57–63 (2012).
54. Nefussy, B. *et al.* Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor administration for treating amyotrophic lateral sclerosis: A pilot study. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* **11**, 187–193 (2010).
55. Piepers, S. & van den Berg, L. H. No benefits from experimental treatment with olfactory ensheathing cells in patients with ALS. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* **11**, 328–330 (2010).
56. Prabhakar, S. *et al.* Autologous bone marrow-derived stem cells in amyotrophic lateral sclerosis: a pilot study. *Neurol. India* **60**, 465–469 (2012).
57. Riley, J. *et al.* Intraspinal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: a phase I trial, cervical microinjection, and final surgical safety outcomes. *Neurosurgery* **74**, 77–87 (2014).
58. 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; discussion 416 (2012).

59. Tadesse, T. *et al.* Analysis of graft survival in a trial of stem cell transplant in ALS. *Ann. Clin. Transl. Neurol.* **1**, 900–908 (2014).
60. Tarella, C. *et al.* Consistent bone marrow-derived cell mobilization following repeated short courses of granulocyte-colony-stimulating factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis: results from a multicenter prospective trial. *Cytotherapy* **12**, 50–59 (2010).
61. Zhang, Y. *et al.* Preliminary investigation of effect of granulocyte colony stimulating factor on amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph. Lateral Scler. Off. Publ. World Fed. Neurol. Res. Group Mot. Neuron Dis.* **10**, 430–431 (2009).
62. Petrou, P. *et al.* Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurol.* **73**, 337–344 (2016).
63. Gamez, J. *et al.* Cellular transplants in amyotrophic lateral sclerosis patients: an observational study. *Cytotherapy* **12**, 669–677 (2010).
64. Meissner, K. *et al.* The placebo effect: Advances from different methodological approaches. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 16117–16124 (2011).
65. Miller, F. G., Colloca, L. & Kaptchuk, T. J. The placebo effect: illness and interpersonal healing. *Perspect. Biol. Med.* **52**, 518 (2009).
66. <https://clinicaltrials.gov/>.
67. Na podstawie bezpośredniej korespondencji z Profesorem Maksymowiczem.