

Komórki macierzyste w leczeniu udaru mózgu: nadzieje i wyzwania

John D. Sinden,¹ Keith W. Muir²

¹ ReNeuron Limited, Guildford, Wielka Brytania

² Institute of Neuroscience and Psychology, University of Glasgow, Szkocja, Wielka Brytania

Adres do korespondencji:

John D. Sinden,
ReNeuron Limited,
10 Nugent Road, Guildford,
Surrey GU2 7AF, UK.

e-mail: john-sinden@reneuron.com

Int J Stroke 2012; 7: 426-434

Neurologia po Dyplomie
2012; 7 (6): 20-30

Udar mózgu, choroba, w której doskonalenie metod leczenia farmakologicznego było przez kilka ostatnich lat zaniedbywane, stał się ostatnio jednym z ważnych obszarów badań poświęconych terapii z użyciem komórek macierzystych. Wynika to z lepszego zrozumienia potencjalnych możliwości terapeutycznych zarówno w ostrej, jak i przewlekłej fazie udaru, a także z rozpoczęcia w wielu krajach nowych, będących aktualnie we wczesnej fazie badań klinicznych, bazujących na obiecujących danych uzyskanych na podstawie wyników badań przeprowadzonych na odpowiednich modelach zwierzęcych. Bodźcem do prac nad produktami wykorzystującymi komórki macierzyste jest także zainteresowanie samych chorych, z których wielu poszukuje niesprawdzonych metod terapeutycznych. Niniejszy artykuł poświęcono problemom związanym z rozwojem terapii z zastosowaniem komórek macierzystych u chorych z udarem mózgu. Omówiono w nim charakterystykę produktu leczniczego, kwestie finansowe, bezpieczeństwo oraz skuteczność pozakliniczną. Przedstawiono też wynikające z przepisów wymagania związane z rozpoczęciem badań z udziałem pacjentów oraz z uzyskaniem maksymalnych korzyści z badań oceniających skuteczność leku przez staranne ich zaprojektowanie.

SŁOWA KLUCZOWE: choroba przewlekła, obrazowanie czynnościowe, udar niedokrwienny mózgu, komórki macierzyste, udar, leczenie

Wprowadzenie

U co najmniej 50% chorych z udarem mózgu dochodzi do trwałego inwalidztwa obejmującego całe spektrum dysfunkcji neurologicznych. Nie ulega zatem wątpliwości, że konieczne jest opracowanie metod terapeutycznych o działaniu wzmacniającym i regenerującym. Ograniczoną poprawę, jaką można uzyskać nawet przy optymalnej fizjoterapii i leczeniu farmakologicznym, odzwierciedla krzywa plateau, przedstawiająca punktację uzyskaną przez pacjentów w teście oceny aktywności dnia codziennego lub podobnych testach oznaczających prawdopodobieństwo uzyskania przez chorego niezależności. Za pomocą konwencjonalnych metod leczenia farmakologicznego i rehabilitacji dąży się do zmaksymalizowania endogennego procesu zdrowienia, zapobieżenia nawrotowi udaru i zaadaptowania się pacjenta do utraty funkcji i unikania zachowań związanych z nieprzystosowaniem. Jednak mimo stosowania tej strategii faza plateau jest podtrzymywana przez trwały ubytek tkanki mózgu, którego obecnie nie potrafimy odbudować. Aktualnie prowadzone są badania oceniające potencjał związków drobnocząsteczkowych i innych strategii leczniczych wspomagających proces zdrowienia, ale największe nadzieje wiążą się z możliwościami komórek macierzystych, które przyciągają ogromną uwagę mediów jako „cudowna terapia”.

Zastosowanie komórek macierzystych jako metody leczniczej

Komórki macierzyste można zdefiniować jako komórki samoodnawiające się i mające zdolność przekształcania się w komórki określonego typu, swoistego dla danej tkanki. Różnią się one pod wieloma względami, z których dwa mają kluczowe znaczenie dla właściwego postępowania terapeutycznego. Pierwszym z nich jest potencjał komórki do różnicowania się. Komórki pluripotencjalne, do których należą macierzyste komórki embrionalne (embryonic stem, ES) i indukowane macierzyste komórki pluripotencjalne (induced pluripotent stem, iPS), zwykle są zdolne do tworzenia wszystkich linii tkankowych. W przeciwieństwie do nich zdolność komórek multipotencjalnych (uzyskanych od dorosłego osobnika) do różnicowania się jest ograniczona do typu komórek swoistych dla tkanek, z których zostały pierwotnie wyizolowane. W celu klinicznego wykorzystania komórek pluripotencjalnych konieczne jest stosowanie odtwarzalnych protokołów różnicowania komórek, ponieważ nieodróżniane komórki po przeszczepieniu tworzą potworniaki (łagodne guzy wielokomórkowe). Dlatego prowadzone są intensywne badania oceniające bezpieczeństwo stosowania komórek macierzystych wywodzących się z komórek pluripotencjalnych, skupiające się na ich skłonności do nowotworzenia i formowania tkanki ektopowej.

Na podstawie tego samego podziału na komórki pluri- i multipotencjalne drugi kluczowy pod względem terapii aspekt związany jest ze strategią terapeutyczną zależną od typu komórki. Embrionalne komórki macierzyste i komórki iPS stanowią ważne narzędzie strategii odbudowy utraconych komórek i tkanek. Jest to kluczowa, stanowiąca ogromne wyzwanie strategia leczenia z użyciem komórek macierzystych. Przykładami jej zastosowania i rozwoju są: odtwarzanie neuronów dopaminergicznych w leczeniu pacjentów z chorobą Parkinsona, komórek wysp β stosowanych w cukrzycy typu 1 i fotoreceptorów w leczeniu ślepoty. Komórki macierzyste powinny być podane precyzyjnie do określonego obszaru. Jednak *in vivo* większość dojrzałych komórek macierzystych wykazuje małą wydajność pod względem produkcji funkcjonalnych typów komórek. W celach terapeutycznych komórki te zwykle są dostarczane i przyciągane do zmian chorobowych, obszarów uszkodzenia i zapalenia przez chemokiny lub inne przekaźniki immunologiczne. Rolą tych komórek jest raczej pobudzenie regeneracji przez pobudzenie układu parakrynnego, troficznego i immunologicznego oraz aktywację naturalnych mechanizmów naprawczych niż zastąpienie uszkodzonej tkanki. W odróżnieniu od komórek pluripotencjalnych, które są w pewnym stopniu wytworem sztucznym i niezależnym od otoczenia, przeżycie dojrzałych komórek macierzystych w organizmie biorcy jest całkowicie

uzależnione od warunków obszaru, do którego zostaną wprowadzone, zarówno zdrowego, jak i zmienionego chorobowo, zbudowanego głównie z naczyń i innych elementów troficznymi.

W terapii najczęściej stosowane są multipotencjalne mezenchymalne komórki podścieliska (multipotent mesenchymal stromal cells, MSC). Pochodzą one z wielu źródeł, takich jak szpik kostny, krew pępowinowa, łożysko i tkanka tłuszczowa. Autologiczne lub alogeniczne MSC mogą być wprowadzone do organizmu drogą wewnątrznaczyniową natychmiast po wystąpieniu zawału tkanki. Zadaniem tych komórek jest ochrona tkanki, pobudzanie aktywności układu immunomodulującego przez wydzielanie cytokin i czynników wzrostu, przy czym ich długoterminowe przeżycie w obszarze objętym zawałem nie jest konieczne. Ze względu na ich bardziej „naturalne” pochodzenie, ograniczoną zdolność do wszczepienia i przeżycia po implantacji, zastosowanie tych komórek pociąga za sobą znacznie mniej problemów związanych z bezpieczeństwem niż stosowanie produktów z macierzystych komórek pluripotencjalnych.

Nerwowe komórki macierzyste (neural stem cells, NSC) są multipotencjalnymi komórkami wywodzącymi się z rozwijającego się lub dojrzałego mózgu, zdolnymi do symetrycznego podziału komórkowego w powtarzalnych cyklach i w odpowiednich warunkach hodowli do tworzenia swoich własnych, identycznych kopii. Alternatywnie, co często ma miejsce w różnych warunkach (w tym po transplantacji komórek), po zatrzymaniu wzrostu komórki będą do pewnego stopnia różnicować się w neurony, astrocyty i oligodendrocyty.¹ Mają one również silne właściwości regeneracyjne, stymulując angiogenezę i modulując reakcje immunologiczne. Właściwości te mogą być bardzo istotne dla terapii.²

Rola komórek macierzystych w leczeniu udaru mózgu

Komórki macierzyste stanowią z wielu powodów atrakcyjną opcję terapeutyczną udaru mózgu. Po pierwsze, konieczne są poszukiwania nowych metod leczenia udaru. Jak wiadomo, mimo prowadzonych przez lata badań i dokonanych postępów, poza sukcesem leczenia trombolitycznego stosowanego w ciągu 4,5 godziny po wystąpieniu udaru niedokrwienego próby stworzenia związków drobnocząsteczkowych i leków biologicznych mających chronić uszkodzone komórki w obszarze niedokrwienia mózgu okazały się ostatecznie bezowocne.^{3,4}

Koncepcja zastosowania komórek macierzystych w leczeniu chorób neurologicznych została opracowana na podstawie wyników badań prowadzonych na modelach zwierzęcych, w których przeszczepiano populacje pierwotnych płodowych komórek mózgu. Celem tych badań było zastąpienie utraconej tkanki i połączenie jej z tkanką gospodarza. Na przykład

plodowa tkanka dopaminergiczna i przeszczep komórkowy funkcjonowały na tyle dobrze na zwierzęcych modelach niedoboru dopaminy, że szybko przeniesiono je do klinicznych badań nad chorobą Parkinsona, chociaż wyniki ostatecznych randomizowanych badań kontrolowanych nie były jednoznaczne.^{5,6} Zastosowanie tego modelu terapii w udarze mózgu jest dużo bardziej złożone ze względu na konieczność odwzorowania różnych typów komórek nerwowych, glejowych i endotelialnych zniszczonych na skutek zawału. Ten pierwotnie główny cel,⁷ czyli zastąpienie zniszczonych tkanek i utworzenie sieci komórek, okazał się odległy zarówno z naukowego punktu widzenia, jak i perspektyw rozwoju.^{8,9}

Uszkodzenie mózgu związane z udarem niedokrwiennym obejmuje szereg typów komórek i wiąże się z wieloma procesami patologicznymi. Obecnie wiadomo, że komórki macierzyste działają na wielu szlakach funkcjonalnych, co oznacza, że terapia z użyciem komórek macierzystych może korzystnie wpłynąć na następstwa uszkodzenia związanego z udarem.^{10,11} Na przykład komórki macierzyste mogą różnicować się we właściwe komórki docelowe i (lub) wydzielac regulowane, ale silnie działające czynniki, hormony i inne przekazy chemiczne o potencjalnej aktywności biologicznej, wywierając istotny wpływ na wiele układów komórkowych gospodarza.

Wieloczynnikowy charakter terapii z użyciem komórek macierzystych ma wiele korzystnych skutków. Po pierwsze, charakteryzują się naturalnym tropizmem do ognisk zapalenia, uszkodzenia, a nawet przewlekłego procesu chorobowego. Po drugie, odpowiadają na wiele bodźców biologicznych powstających w środowisku topologicznie heterogennym i ulegającym szybkim przemianom, ich zastosowanie może więc być bezpieczniejsze niż użycie klasycznych związków drobnocząsteczkowych, których celem są jedynie określone szlaki. Chociaż do potencjalnych zagrożeń należy się odnieść w badaniach przedklinicznych i wczesnych badaniach klinicznych, co zostanie omówione poniżej, komórki macierzyste mogą być skierowane do miejsc uszkodzenia przez ukierunkowany transport lub przy wykorzystaniu ich naturalnego tropizmu chemicznego. Zatem jest mało prawdopodobne, aby doszło do wystąpienia niepożądanych działań ogólnoustrojowych. Po trzecie, komórki można produkować z komórek własnych pacjenta (np. autologicznych komórek szpiku kostnego) lub mogą być pobierane od jednego dawcy i służyć do leczenia tysięcy niespokrewnionych pacjentów (terapia alogeniczna). Wreszcie komórki macierzyste mogą być przekształcane w hodowli lub poddane modyfikacji genetycznej w celu uzyskania unikalnych właściwości i potencjału leczniczego.

W badaniach przedklinicznych prowadzonych na modelach zwierzęcych udaru zidentyfikowano wiele typów komórek, które mogą stymulować odbudowę uszkodzonych tkanek.^{8,12-14} Obejmowały one NSC (wywodzące się z tkanki nerwowej lub powstałe w wyniku różnicowania się macierzystych komórek embrionalnych lub indukowanych

macierzystych komórek pluripotencjalnych), a także komórki krwi pępowinowej, MSC, komórki jednojądrzaste (mononuclear cells, MNC), komórki tłuszczowe i komórki pozyskiwane z krwi menstruacyjnej. Wyselekcjonowane komórki szpiku kostnego identyfikowane na podstawie ekspresji antygenu CD34⁺ i aktywności dehydrogenazy aldehydowej lub genetycznie modyfikowane MSC (aktywowane Notch-1) wykazały skuteczność w badaniach przedklinicznych: obecnie trwają prace nad wykorzystaniem ich w terapii komórkowej. Heterogenność źródeł komórek macierzystych zapoczątkowała poszukiwania wspólnych mechanizmów ich działania, których różnorodność stanowi główne wyzwanie dla planujących rozpocząć badania kliniczne dalszej fazy.

Badania przedkliniczne dotyczące udaru mózgu skupiły się raczej na ostrej i podostrej fazie choroby niż na udarze w fazie przewlekłej (tab. 1). Głównym działaniem terapii komórkowych w tych punktach czasowych jest raczej zmiana środowiska obszaru mózgu w obrębie penumbry poniedokrwiennnej niż zastąpienie tkanki, co może być bardziej istotne w przypadku dokonanego uszkodzenia. Trwający do tygodnia po udarze okres ochrony tkanki, charakteryzujący się apoptozą niedokrwiennych komórek, reaktywną angiogenezą i aktywacją miejscowej odpowiedzi immunologicznej jest prawdopodobnie najbardziej obiecującym celem terapii z użyciem komórek macierzystych, kiedy to proangiogenne, antyapoptotyczne i immunomodulujące działanie komórek macierzystych, jest jak się wydaje, najsilniejsze (rycina).^{13,16,17}

Z drugiej strony aktywność komórek macierzystych w ciągu tygodni, miesięcy i być może lat po wystąpieniu udaru skupia się na naprawie funkcjonalnej stabilnych lub ulegających degeneracji układów neuronalnych. Pod tym względem opcję terapeutyczną stanowi regeneracja (rycina), obejmująca neurogenezę, angiogenezę, wydzielanie czynników wzrostu, różnicowanie komórek i wszczepienie.^{12,18,19} Przedmiotem tej pracy jest rozwój metod terapii z użyciem komórek macierzystych na potrzeby leczenia osób z trwałą niesprawnością spowodowaną udarem mózgu.

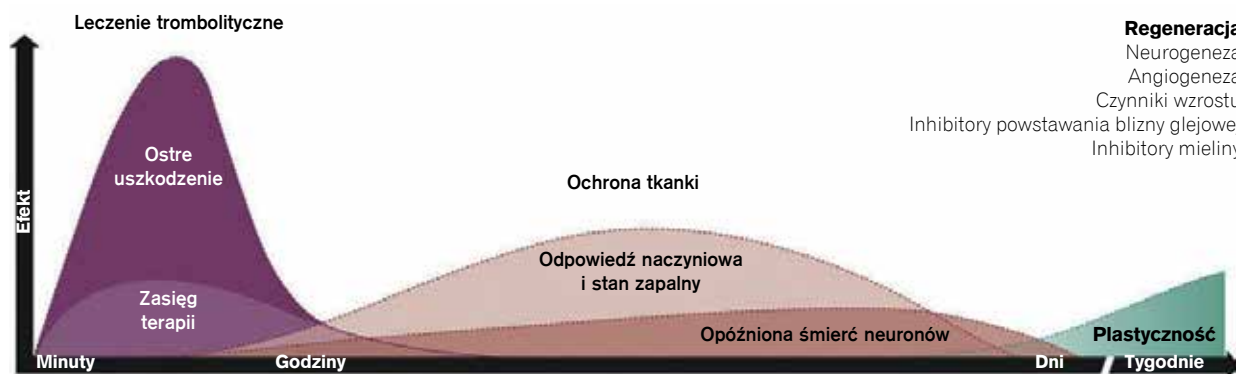
Techniczne wyzwania związane z klinicznym zastosowaniem komórek

Największy problem techniczny związany z terapeutycznym zastosowaniem komórek macierzystych dotyczy dwóch różnych obszarów. Pierwszy odnosi się do produktu leczniczego – jego definicji, charakterystyki, siły działania i jakości, a także produkcji i przechowania w warunkach zapewniających jego trwałość i stabilność przez długi czas. Wpływa to na wszystkie aspekty programu rozwoju, od fazy przedklinicznej, przez wczesną do późniejszej fazy klinicznej i na pełne zastosowanie komercyjne. Z perspektywy producenta leku na powodzenie

TABELA 1. LISTA BADAŃ DOTYCZĄCYCH TERAPII Z UŻYCIEM KOMÓREK MACIERZYSTYCH U PACJENTÓW Z UDAREM MÓZGU – DANE UZYSKANE Z ELEKTRONICZNEJ BAZY CLINICALTRIALS.GOV

Sponsor	Faza	Komórki	Droga podania	n	http://www.Clinicaltrials.gov (dane z dnia 15.02.2012)
Athersys Inc.	2	Allogeniczne MSC (multipotencjalne dojrzałe komórki progenitorowe, MAPC)	i.v.	140	NCT01436487
Aldagen Inc.	2	Autologiczne ALDH+ve	i.a.	100	NCT01273337
Stempeutics	1/2	Allogeniczne MSC	i.v.	78	NCT01091701
China Medical University Hospital	2 (ukończone)	Autologiczne CD34+ve	i.c.	30	NCT00950521
Stemmedica	1/2	Autologiczne MSC	i.v.	35	NCT01297413
University of Grenoble	2	Autologiczne MSC	i.v.	30	NCT00875654
University of Texas	1	Autologiczne MNC	i.v.	30	NCT00859014
University Hospital Central de Asturias	½ (ukończone)	Autologiczne CD34+ve	i.a.	20	NCT00761982
SanBio Inc.	1/2	Genetycznie modyfikowane MSC (aktywowany gen <i>Notch-1</i>)	i.c.	18	NCT01287936
University of Rio de Janeiro	1 (ukończone)	Autologiczne MNC	i.a/i.v	12	NCT00473057
Imperial College of London	1/2	Autologiczne CD34+ve	i.a.	?	NCT00535197

Większość badań dotyczyła pacjentów w ostrej i podostrej fazie udaru mózgu. i.c. – domózgowo, i.v. – dożylnie, i.a. – dotętniczo, ALDH – aktywność dehydrogenazy aldehydowej, MSC – multipotencjalna komórka mezenchymalna, MNC – komórka jednojądrzasta.



RYCINA. Terapeutyczne okno czasowe w udarze mózgu. Na podstawie Zaleska i wsp.¹⁵

finansowe produktu składa się przede wszystkim decyzją o rozpoczęciu projektu, poznanie docelowego profilu klinicznego, kosztów towaru i kosztów poniesionych przez pacjenta lub firmę ubezpieczeniową. Istotny jest też stosunek ryzyka i korzyści, zwłaszcza jeśli podanie komórek do organizmu wymaga interwencji chirurgicznej. Komórki macierzyste powinny jednak zapewniać istotniejszą poprawę pacjentowi niż np. kurs fizjoterapii. Tak zwany profil produktu docelowego obejmuje wszystkie te aspekty i stanowi istotną kwestię w kontekście poważnej choroby, takiej jak udar mózgu.

Kolejne wyzwanie stanowią przedkliniczne badania oceniające bezpieczeństwo i skuteczność terapii. Pod względem bezpieczeństwa zakres koniecznych badań produktu komórkowego zależy od ryzyka związanego z terapią i na tym polega interesująca różnica. Jeśli chodzi o autologiczne komórki macierzyste izolowane ze szpiku kostnego, wymagać one będą przeprowadzenia niewielu badań oceniających ich bezpieczeństwo w fazie przedklinicznej, ze względu na wieloletnie doświadczenia nad transplantacją szpiku. Komórki macierzyste wywodzące się ze szpiku kostnego przekształcone

TABELA 2. TABELA PODSUMOWUJĄCA TESTY BEHAVIORALNE I WYNIKI LECZENIA Z UŻYCIEM KOMÓREK MACIERZYSTYCH U PACJENTÓW PO UDARZE MÓZGU

Test behawioralny	Częstość stosowania (%)	Korzystne wyniki leczenia (%)
Skala mNSS (Modified Neurological Severity Score), oceniająca funkcje ruchowe i czuciowe, równowagę i odruchy	29/69 (42)	28/29 (97)
Test usuwania taśmy klejącej	23/69 (33)	21/23 (91)
Test na bieżni Rotarod	18/69 (26)	17/18 (94)
Układanie kończyn i stymulacja dotykowa	11/69 (16)	9/11 (82)
Test cylindra (spontaniczne używanie przednich kończyn)	8/69 (12)	4/8 (50)
Test na bieżni i chód	5/69 (7)	5/5 (100)
Chodzenie po belce	3/69 (4)	0/3 (0)
Test Montoya	1/69 (1)	0/1 (0)
Labirynt wodny, aktywne unikanie (poznawcze)	14/69 (20)	11/14 (79)
Inne (cykl apomorfina/amfetamina)	20/69 (29)	
Objętość ogniska zawałowego	55/69 (80)	28/55 (51)

Na podstawie tabeli 1 i materiałów uzupełniających Hicks i wsp.¹⁴

w alogeniczny produkt komórkowy, np. MSC, wymagają oceny pod kątem bezpieczeństwa. Jednak ponieważ zwykle wykazują one niewielki stopień wszczepienia, głównym obiektem zainteresowania jest raczej ich ostra toksyczność niż długoterminowe działanie onkogenne. W przypadku komórek macierzystych, zwłaszcza tych wywodzących się z komórek pluripotencjalnych, które po implantacji mogą tworzyć potworniki, ich działanie onkogenne w fazie przedklinicznej stanowi główny problem i wymaga badań z długim okresem obserwacji. Na przykład koszty i obciążenie czasowe związane z produkcją komórek ES jako produktu leczniczego, jakie spoczęły na firmie Geron Inc., były przyczyną niespodziewanego zawieszenia działalności firmy w listopadzie 2011 roku po ponad 10 latach funkcjonowania.

Modele zwierzęce

Mimo opracowania na podstawie wyników badań na gryzoniach różnych eksperymentalnych modeli niedokrwiennego i krwotocznego udaru mózgu, najlepiej potwierdzonym modelem uszkodzenia wynikającego z niedokrwienia i jego konsekwencji funkcjonalnych jest zamknięcie tętnicy środkowej mózgu u szczura lub myszy. Zamknięcie tej tętnicy powoduje u zwierzęcia ciężką dysfunkcję neurologiczną, którą można ocenić za pomocą obserwacji zachowań stymulowanych i niestymulowanych. Większość z tych zaburzeń wycofuje się samoistnie w ciągu dni do tygodni,²⁰ a związane z tym zachowania, które ulegają samoistnej poprawie, mogą utrudniać ocenę procesu zdrowienia związanego z leczeniem. W celu wykazania trwałych zaburzeń nieustępujących samoistnie z upływem czasu opracowano testy behawioralne, obejmujące

test dwustronnej asymetrii, test na labiryncie wodnym Morrisa i próbę z użyciem rotametu.²¹

W przeglądzie Hicksa i wsp.¹⁴ autorzy przedstawili częstość stosowania i wskaźnik skuteczności różnych testów behawioralnych w ocenie efektów terapii z użyciem komórek w 69 przedklinicznych badaniach dotyczących udaru mózgu. Liczba badań, w których zastosowano każdy test behawioralny, i częstość uzyskanych w nich dodatnich wyników leczenia przedstawiono w tabeli 2.

Jak przedstawiono w tej tabeli, standardową praktyką w ocenie skuteczności leczenia chorób ośrodkowego układu nerwowego w badaniach przedklinicznych prowadzonych na modelu zwierzęcym jest stosowanie więcej niż jednego testu. Dla pełnej oceny wielu złożonych i skoordynowanych funkcji sensomotorycznych, do upośledzenia których może dojść w przypadku zamknięcia tętnicy środkowej mózgu powodującego uszkodzenie kory i zwojów podstawy, konieczne jest przeprowadzenie wielu różnych testów behawioralnych. Nawet w dobrze kontrolowanych badaniach zmienność anatomiczna unaczynienia i drobne różnice proceduralne przyczyniają się do różnic w rozległości i lokalizacji ogniska zawałowego oraz oczekiwanych deficytów behawioralnych. Wskaźnik skuteczności niektórych najczęściej stosowanych testów odzwierciedla możliwość ich zastosowania raczej w ostrym okresie po udarze niż w ocenie trwałych lub stabilnych deficytów u zwierząt z okluzją tętnicy. Wielu badaczy^{22,23} podkreśla potrzebę oceny przebiegu procesu zdrowienia za pomocą każdego testu funkcjonalnego przed rozpoczęciem jakichkolwiek badań dotyczących interwencji terapeutycznych.

Zaden model zwierzęcy nie jest w stanie odzwierciedlić różnorodności rozległości i lokalizacji udarowego ogniska

Ramka. Testy służące do oceny przewlekłej niesprawności po udarze mózgu i poprawy funkcjonalnej u szczurów z zamkniętą tętnicą środkową mózgu

Test dwustronnej asymetrii: Czas potrzebny do zetknięcia się i (lub) zdjęcia bransoletek taśmowych z porażonej w porównaniu do nieporażonej tylnej łąki stanowi wiarygodną metodę oceny utrwalonej dysfunkcji sensomotorycznej w przewlekłej fazie udaru. Po implantacji nerwowych komórek macierzystych (NSC) tożsamość i przeciwstronnie obserwowano zmniejszenie dysfunkcji, która osiągnęła stabilny stan w 6-18 tygodniu po podaniu leku.^{24,25} Test ten był następnie stosowany w kolejnych badaniach klinicznych, dotyczących stosowania implantów z komórek NSC u ludzi.^{19,26}

Test z użyciem rotametry: Test z użyciem rotametry jest powszechnym narzędziem służącym do oceny dysfunkcji prążkowiec.²⁴ Skłonność do rotacji nie ustępuje samoistnie po jego wykonaniu (nawet po roku od wystąpienia udaru). Jest on również szeroko stosowany w przypadku choroby Parkinsona, w celu oceny trwałych zmian w dopaminergicznym układzie nigrostriatalnym.

Test na labiryncie wodnym Morrisa: Labirynt wodny Morrisa stosowany był w wielu badaniach w celu monitorowania zaburzeń pamięci przestrzennej po przebyciu udaru i implantacji komórek. Test ten jest szeroko stosowany w przypadku uszkodzenia i regeneracji kory mózgu i hipokampów. Badanie różnych miejsc implantacji komórek NSC wykazało, że miejsce podania leku ma istotny wpływ na wynik leczenia. Implantacja komórek śródmiąższowo (prążkowe i kora mózgu, tożsamość lub przeciwstronnie do niedokrwionej półkuli) nie powoduje istotnej poprawy wyników tego testu. Jednak implantacja komórek do komór bocznych powoduje poprawę funkcjonalną.¹⁸

niedokrwienne u ludzi ani różnorodności w zakresie niesprawności ludzkiego organizmu po udarze lub wpływu chorób współistniejących w starzejącej się populacji chorych z udarem mózgu. Wszystkie modele dostarczają informacji potwierdzających, że implanty z komórek macierzystych mogą wykazywać odpowiednią aktywność biologiczną, co stanowi wskazówkę dla organów ustawodawczych i sponsorów o zasadności prowadzenia badań klinicznych (ramka).

Analiza przypadku w pracy nad rozwojem produktu

Trwający ponad 10 lat proces przekładania wyników badań naukowych na praktykę kliniczną nie stanowi na polu terapii z użyciem komórek macierzystych wyjątku. Badanie Glasgow PISCES przeprowadzone z udziałem firmy ReNeuron (Pilot Investigation of Stem Cells in Stroke 2010; <http://www.ClinicalTrials.gov>, Identifier No. NCT01151124) jest pierwszym w pełni kontrolowanym badaniem dotyczącym leczenia z użyciem komórek macierzystych przeprowadzonym w Wielkiej Brytanii i jednym z pierwszych na świecie w pełni kontrolowanych badań dotyczącym zastosowania komórek NSC. Na podstawie wyników badania dotyczącego

NSC przeprowadzonego na gryzoniach, po wprowadzeniu zmian w technologii i wielu opóźnieniach w produkcji, a także z wykorzystaniem wyników długoterminowych badań przedklinicznych, w listopadzie 2010 roku pierwszy pacjent z udarem mózgu otrzymał leczenie z użyciem komórek NSC pochodzących z linii komórkowej CTX0E03.

W celu opracowania produktu klinicznego i komercyjnego autorzy przeprowadzili modyfikację genetyczną ludzkich płodowych komórek NSC, używając pojedynczej kopii genu *c-Myc* połączonego ze zmodyfikowanym receptorem estrogenowym, którego ligand stanowi syntetyczny związek chemiczny 4-hidroksytamoksyfen (4OHT).^{27,28} Białko *c-Myc* umożliwia klonowanie komórek i pobudza ich proliferację, jak również przez zwiększoną ekspresję i aktywność telomerazy powoduje ich intensywny, stabilny wzrost. Aktywność fuzyjnego białka regulowana jest przez dodanie 4OHT do pożywki hodowli komórkowej, co umożliwia jego translokację do jądra komórki. Historię rozwoju *c-MycER^{TAM}* z linii komórkowej NSC przez firmę ReNeuron opisano w innym miejscu.²⁹

Hodowla komórek linii CTX0E03 na skalę przemysłową jest (względnie) łatwa i możliwa do prowadzenia zgodnie z standardami jakości, jakie obowiązują przy produkcji konwencjonalnych środków biologicznych. Pozwala to na przechowywanie komórek z linii CTX0E03 z uwzględnieniem wszystkich zasad dobrej praktyki produkcyjnej (good manufacturing practice, GMP), zgodnie z którymi wszystkie kluczowe badania przedkliniczne oceniające bezpieczeństwo i skuteczność terapii, jak również badania prowadzone z udziałem pierwszych pacjentów, były lub będą prowadzone z użyciem tego samego surowca do produkcji substancji leczniczej, co powinno mieć miejsce w każdym kolejnym badaniu klinicznym i z każdym autoryzowanym lub znakowanym produktem.³⁰ Produkt nie będzie ponownie uzyskiwany, ponieważ na każdym etapie produkcji dostępna jest wystarczająca liczba próbek, co umożliwia w zasadzie nieograniczone zastosowanie substancji leczniczej/produktu leczniczego. Ostatnio pozytywnie zweryfikowano pomysł automatyzacji produkcji CTX0E03,³¹ co dodatkowo potwierdziło potencjał tej linii komórkowej do efektywnego i bezpiecznego powielania w warunkach przemysłowych.

Badania przedkliniczne

BEZPIECZEŃSTWO

Pozwolenie na rozpoczęcie badań klinicznych z użyciem nowego produktu z komórek macierzystych, w tym NSC, wymagało z jednej strony obszernych danych dotyczących jakości, produkcji i charakterystyki produktu, a z drugiej serii badań oceniających jego krótko- i długoterminową toksyczność i bezpieczeństwo.

Krótkotrwałe działanie biologiczne, takie jak bezpośredni wpływ na układ immunologiczny, może być ocenione

w standardowo zaprojektowanych badaniach toksykologicznych, wykorzystujących jako punkt końcowy wyniki obserwacyjnych testów funkcjonalnych, badań hematologicznych i nekroskopii. Kluczowy problem bezpieczeństwa i skuteczności terapii stanowi migracja i wszczepianie komórek. Konieczne jest przeprowadzenie w warunkach *in vivo* pełnej analizy biodystrybucji komórek za pomocą czasowej oceny atestowanych markerów komórek macierzystych. Zwykle osiąga się to przez połączenie analizy immunohistochemicznej, metody hybrydyzacji *in situ* lub ilościowej oceny reakcji łańcuchowej polimerazy w celu oceny swoistych cech komórek macierzystych lub ich macierzystej tkanki lub markerów swoistych dla komórek macierzystych. W celu wyeliminowania wyników fałszywie dodatnich badania te wymagają wstępnej oceny ich wykonalności i prawdziwości oraz prowadzenia odpowiednich kontroli.

Potwierdzenie bezpieczeństwa terapii w perspektywie długoterminowej wymaga przeprowadzenia badań oceniających jej potencjał nowotworzenia na dużej liczbie permissywnych (o upośledzonej odporności) myszy obu płci. Czas trwania badań będzie się różnił w zależności od czasu przeżycia komórek. Może on wynosić od około 3 miesięcy w przypadku typu komórek niewszczepiających się do 12 miesięcy lub dłużej w przypadku komórek o dużym odsetku przeżycia w warunkach *in vivo*.

Ponadto, ze względu na obecność genu *c-Myc* i jego wstawki retrowirusowej, przeprowadzono dalsze badania, mające na celu wykazanie zmniejszenia ekspresji receptorów *c-MycER* i jego epigenetycznego uspienia.³² Dodatkowo, w celu wyeliminowania ryzyka zakażenia, wykonano badania banku komórek na obecność retrowirusa.

SKUTECZNOŚĆ

W celu oceny możliwości dopuszczenia testów klinicznych zaprojektowanych przez firmę ReNeuron przeprowadzono dwa w pełni monitorowane badania oceniające skuteczność produktu leczniczego CTX, opracowanego zgodnie z protokołem GMP. Po recenzji specjalistów z tej dziedziny, opublikowano wyniki obu. W pierwszym z nich,¹⁹ w którym trzem grupom terapeutycznym podano różną liczbę komórek (grupie czwartej podano placebo), wykazano, że stopień poprawy funkcji sensomotorycznych zależy od dawki leku. Wykazano też, że indukowane przez komórki angio- i neurogeneza były wiarygodnym mediatorem poprawy funkcjonalnej. W drugim badaniu,²⁶ aby wyjaśnić, czy miejscowe stereotaktyczne wprowadzenie leku jest konieczne do zapewnienia jego skuteczności, porównano efekty działania implantów wszczepianych do struktur prążkowania w pobliżu ognisk zawału (jak w badaniu klinicznym PISCES) ze skutecznością tych podawanych do komór mózgowych. Dodatkowo wykonano obrazowanie metodą rezonansu magnetycznego (MR), w celu ułatwienia procedury stereotaktycznej i stratyfikacji zwierząt w zależności od stopnia uszkodzenia, a także monitorowania jakichkolwiek zmian strukturalnych zachodzących

w ciągu 3 miesięcy po implantacji. Obszerna analiza histologiczna oraz analiza stereologiczna wprowadzonych do mózgu szczura komórek objęła również fenotypowanie przetrwałych komórek i ocenę pod kątem wszystkich zmian zachodzących w obrębie mózgu biorcy. Wykazano istotne zmniejszenie deficytu sensomotorycznego u osobników, którym wszczepiono komórki w pobliżu ogniska zawałowego, ale nie u tych, którym wstrzyknięto je do komór mózgowych, co potwierdza znaczenie miejscowego podania tego typu komórek. Poprawa była większa u szczurów, u których obszar uszkodzenia ograniczał się do prążkowania, niż u szczurów, u których doszło również do zniszczenia kory mózgu.

W kolejnych badaniach wykazano, że kluczową cechą produktu CTX są jego właściwości proangiogenne i immunomodulujące, które odgrywają ważną rolę w procesie gojenia – podobnie jak komórki NSC w niedokrwionej tkance.^{8,32}

Problemy kliniczne

KONTROLA

Według obiegowej opinii nadmierna kontrola opóźnia kliniczne zastosowanie terapii komórkowych (które wydają się łatwo dostępne do zakupu przez internet). Są jednak istotne obawy dotyczące zastosowania substancji biologicznie czynnych u ludzi, zwłaszcza gdy może się to wiązać z pewnego stopnia trwałym wszczepieniem implantu, a obecnie dysponujemy ograniczoną liczbą (z wyjątkiem przypadków nowotworów układu krwionośnego) danych na temat skutków terapii z użyciem jakichkolwiek komórek u ludzi. Proces kontroli musi uwzględniać wiele problemów, w tym weryfikację źródła pierwotnych komórek i przestrzeganie w procesie produkcji preparatów komórkowych standardów GMP. Równie ważne są potencjalne dodatkowe problemy związane z bezpieczeństwem, wynikające z genetycznej modyfikacji produkowanych komórek (np. wprowadzenie genów pobudzających wzrost komórek, takich jak *c-MycER* stosowany w linii komórkowej CTX0E03 lub licznych genów kodujących czynniki wzrostu komórek, wywodzących się z komórek iPS, jak również stosowanie wektorów wirusowych w celu modyfikacji niektórych typów komórek), a także problemy związane z potencjalną skłonnością komórek do nowotworzenia oraz kwestie wyboru metody wszczepienia preparatu. Ponadto, ocena pod względem spełnienia wymogów etycznych wymaga oszacowania współczynnika ryzyka i korzyści w obszarze zaniedbanym pod względem zasobu danych klinicznych. Tymczasem wnioski, jakie można wyciągnąć z wyników badań prowadzonych na modelu zwierzęcym, są niejednoznaczne. Niewątpliwie usprawnienie procesów regulacyjnych przyczyniłoby się do zwiększenia liczby danych, ale odpowiedni nadzór będzie wymagał przeprowadzenia dokładnej analizy przez wiele osób posiadających odpowiednią wiedzę.

Opóźnienia wynikające z procedur regulacyjnych wiążą się z ryzykiem wzrostu liczby przypadków wykorzystywania chorych przez firmy prowadzące niekontrolowaną działalność komercyjną, co może zarówno stanowić ryzyko dla pacjentów, jak również utrudniać postęp naukowy przez eliminowanie potencjalnych uczestników badań klinicznych, jednocześnie przy trudnym ich porównaniu.

BEZPIECZEŃSTWO

Możliwość rozwoju potworniaków lub potworniakoraków z niezróżnicowanych komórek ES wykazana w badaniach przeprowadzonych na modelu zwierzęcym nie została udokumentowana w odniesieniu do komórek macierzystych innego pochodzenia, niemniej pozostaje ona teoretycznym problemem i stanowi podstawę ustalenia dolnej granicy wieku uczestników badania PISCES na poziomie 60 lat (młodsze osoby o dłuższej przewidywanej długości życia charakteryzują się większym potencjalnym ryzykiem wystąpienia tego powikłania). Nie jest jasne, czy dane pochodzące z badań przeprowadzonych na modelu zwierzęcym, głównie na gryzoniach o obniżonej odporności, mogą rzeczywiście dostarczać informacji na temat ryzyka rozwoju nowotworu u ludzi. Głośne było doniesienie o przypadku rozwoju rzadkich guzów u człowieka,³³ ale dotyczyło ono bardzo rzadkiej sytuacji, w której przez długi czas, w niekontrolowanych warunkach, dokonywano wielokrotnych implantacji płodowych komórek macierzystych niejasnego pochodzenia u młodego chorego z zespołem ataksja-teleangiektazja, który to zespół oprócz występowania zaburzeń neurologicznych wiąże się z upośledzeniem układu immunologicznego.

Po zastosowaniu terapii monitoruje się stan pacjenta z wykorzystaniem w tym celu skal oceny neurologicznej, obejmujących szczegółową analizę funkcji czuciowych, ruchowych i poznawczych. Odnotowuje się inne potencjalne zdarzenia niepożądane związane z wszczepieniem materiału neuronalnego do mózgu, np. ból lub aktywność padaczkową.

Ryzyko immunologicznego odrzucenia implantu, nawet komórek alogenicznych, wydaje się niewielkie i może być związane z wrodzonymi właściwościami immunomodulacyjnymi komórek macierzystych. W przypadku podania implantu bezpośrednio do mózgu w późnym okresie po wystąpieniu udaru bariera krew-mózg może chronić przed reakcją układu immunologicznego, natomiast w przypadku podania komórek w podostrej fazie choroby odpowiedź mogłaby być inna. Stosowanie leków immunosupresyjnych niesie potencjalnie istotne ryzyko chorobowości, szczególnie u osób z udarem mózgu, u których upośledzeniu odporności towarzyszy ryzyko infekcji, w tym zakażeń szpitalnych, zachyłstowego zapalenia płuc i zakażenia dróg moczowych, a także u osób zwykle otrzymujących wiele leków i w związku z tym narażonych na dodatkowe ryzyko wystąpienia interakcji lekowych. Znaczenie hipotetycznej korzyści immunologicznej wynikającej z zastosowania autologicznych komórek macierzystych nie jest jasne. Immunogenność

komórek alogenicznych nie jest określona, ponieważ niezróżnicowane komórki macierzyste nie wykazują wybitnej ekspresji powierzchniowych markerów zgodności tkankowej, przy czym ta ekspresja może być modyfikowana przez interakcje z komórkami biorcy. Często zaleca się monitorowanie reakcji przeciwciał przeciwko komórkom.

Komórki lub ich pożywki mogą być źródłem infekcji zakaźnych, a badania przesiewowe wykonywane przed implantacją komórek mogą nie obejmować pełnego zakresu znanych czynników chorobotwórczych. Komórki autologiczne często są hodowane na pożywkach zawierających bydłęcą surowicę płodową, co stanowi potencjalne źródło choroby odzwierzęcej. Można tego uniknąć poprzez używanie surowicy ludzkiej lub pożywek niezawierających surowicy.

Głównym elementem bezpośredniej oceny bezpieczeństwa terapii jest prawdopodobnie sposób podania komórek.³⁴ W aktualnie prowadzonym badaniu PISCES wykonuje się iniekcje bezpośrednio do mózgu, wykorzystując w tym celu technikę chirurgii stereotaktycznej, podobnie jak w poprzednich małych badaniach z użyciem komórek pochodzących z potworniakoraka, płodowych komórek świńskich i autologicznych komórek pochodzących ze szpiku kostnego.³⁵⁻³⁸ Metoda ta pociąga za sobą ryzyko związane ze znieczuleniem ogólnym, hospitalizacją i zabiegiem neurochirurgicznym, głównie u osób starszych, prawdopodobnie przyjmujących w ramach profilaktyki wtórnej leki przeciwplatekcyjne lub przeciwkrzepliwne. Doświadczenia zdobyte w badaniach dotyczących implantacji komórek u chorych z chorobą Huntingtona lub Parkinsona, jak również z udarem mózgu, dotyczą iniekcji komórek do struktur zwojów podstawy w liczbie od 0,5 do 10 milionów o objętości 10-200 μ l. W przeglądzie dotyczącym tych badań znalazła się informacja o wystąpieniu zdarzeń niepożądanych związanych z zabiegiem chirurgicznym u 12 z 238 chorych, co jest zgodne z danymi z piśmiennictwa dotyczącymi zabiegów z zastosowaniem technik chirurgii stereotaktycznej, które wiążą się z ryzykiem krwawienia śródczaszkowego około 1,7%, głównie krwotoku podtwardówkowego i ryzykiem wystąpienia napadów padaczkowych, przy całkowitej śmiertelności wynoszącej 0,3% i chorobowości 1,4%.³⁹

W dwóch małych badaniach klinicznych, w których chorym w podostrej fazie udaru autologiczne komórki macierzyste pochodzące ze szpiku kostnego podawano drogą dożylną,^{34,40,41} do dzisiaj nie odnotowano żadnych poważnych zdarzeń niepożądanych zarówno w ostrym okresie po podaniu leku, jak i w 5-letnim okresie obserwacji, którą objęto 16 osób,⁴¹ ani też w 24-miesięcznym okresie obserwacji obejmującej sześciu innych badanych.⁴⁰ Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że dożylna podanie komórek wiązało się z szybkim ich usuwaniem przez płuca i układ siateczkowo-śródbłonkowy i w związku z tym małym stopniem wszczepienia komórek do ośrodkowego układu nerwowego.⁴²⁻⁴⁴ Mimo to efekt terapeutyczny był widoczny, a działanie troficzne komórek podanych drogą systemową stanowi

najpewniej podstawę mechanizmu działania takiej terapii. U chorych w przewlekłej fazie po przebytych udarach mózgu, ta droga podania leku nie wydaje się optymalna.

W badaniach prowadzonych zarówno na modelu zwierzęcym, jak i w aktualnym badaniu z udziałem ludzi, oceniano skuteczność terapii z użyciem komórek macierzystych podawanych dotętniczo, ponieważ ta droga podania, w porównaniu z iniekcją dożylną, wydaje się zwiększać prawdopodobieństwo wszczepienia komórek do mózgu.⁴⁴ Niemniej, z uwagi na obserwowane na modelu zwierzęcym przypadki udaru mózgu spowodowanego dotętnicznym podaniem komórek, metody bezpiecznego podania leku tą drogą mogą wymagać dalszego udoskonalenia.

W dotychczasowych badaniach klinicznych grupy kontrolne charakteryzowały się bardzo ograniczoną liczebnością. Jedynie w dwóch z nich stosowano randomizację,^{36,41} w jednym brała udział nierandomizowana grupa kontrolna;⁴⁰ pozostałe były badaniami obserwacyjnymi, w których wszystkich badanych poddano terapii komórkowej. Jak dotąd tylko dwa badania zawierały grupy kontrolne, które jednak nie otrzymywały placebo, były więc one niedoskonałe. Mała liczba uczestników we wszystkich tych badaniach (mniej niż 100 osób w każdym) bardzo ogranicza możliwość wyciągnięcia jakichkolwiek wniosków na temat bezpieczeństwa terapii.

OCENA SKUTECZNOŚCI I PROTOKÓŁ BADANIA

Podczas gdy w pierwszej fazie badań, w których pierwotnym punktem końcowym jest bezpieczeństwo terapii, pominięcie grupy kontrolnej lub grupy otrzymującej placebo może być usprawiedliwione, w przypadku oceny pod kątem skuteczności leczenia jest zupełnie inaczej. Wybór odpowiednich grup kontrolnych nastroża wiele trudności. Utworzenie grup kontrolnych wiąże się z wieloma problemami. Taka równoległa grupa, w której stosowane są jedynie konwencjonalne metody leczenia farmakologicznego i rehabilitacyjnego, również nie jest doskonała, ponieważ procedury inwazyjne (i najprawdopodobniej dodatkowa aura, jaka otacza samą terapię komórkową) powodują silny efekt placebo.⁴⁵ W związku z tym pojawia się problem stworzenia takiego typu grupy kontrolnej, koniecznej do potwierdzenia skuteczności biologicznej terapii komórkowej. To, czy wykonywanie pozorowanego zabiegu neurochirurgicznego w grupie kontrolnej w przypadku badań, w których komórki podawane są domózgowo, jest usprawiedliwione z etycznego punktu widzenia, jest kwestią najbliższej przyszłości. Leczenie z użyciem komórek autologicznych również wiąże się z pewnymi trudnościami, ponieważ pobranie szpiku kostnego jest procedurą inwazyjną, obciążoną pewnym ryzykiem chorobowości, a w przypadku podania komórek drogą dotętniczną dodatkową chorobowością związaną z zabiegiem. Konwencjonalne badania porównawcze charakteryzują się prawdopodobnie zbyt mało efektywnymi metodami oceny skuteczności terapii komórkowej we wczesnym stadium fazy 2. W badaniach dotyczących neurochirurgicznych zabiegów ablacji lub stymulacji

głębokich struktur mózgu u osób z chorobą Parkinsona,⁴⁶ pacjenci są randomizowani do leczenia w trybie odroczonego lub natychmiastowego, co może stanowić kompromis, który mógłby mieć zastosowanie u chorych z udarem mózgu.

Kwestią problematyczną jest również to, czym jest standardowa terapia medyczna w grupie kontrolnej. Biorąc pod uwagę potencjał regeneracyjny terapii komórkowej, ułatwieniem lub nawet koniecznością mogłyby być dodatkowe zajęcia rehabilitacyjne. Leczenie to jest często porównywane z fizjoterapią, w rzeczywistości jednak jest zbiorem złożonych i indywidualnie dostosowanych rozmaitych procedur, przy czym każda poparta jest różnymi dowodami i znajduje różne zastosowanie w różnych systemach opieki zdrowotnej. Jeśli nie można zdefiniować standardowej terapii, wdrożenie jednolitej, popartej wynikami badań opieki w grupie kontrolnej i leczonej może stanowić istotną przeszkodę. Jeśli proponowana interwencja lecznicza przekracza zakres działań uważanych za rutynowe lub udowodnione, niezależne efekty terapii komórkowej nie mogą być określone.

WYBÓR PACJENTÓW I OCENA WYNIKÓW LECZENIA

Ograniczenia wynikające z wydajności produkcji lub procedur związanych z podawaniem leku dużej liczbie pacjentów objętych badaniem, nawet przed uwzględnieniem czynników eliminujących, oznaczają, że liczba uczestników we wczesnej fazie II badania będzie dużo mniejsza niż w konwencjonalnych badaniach dotyczących zastosowania małych molekuł u chorych z udarem mózgu, choć nawet te badania charakteryzują się zbyt małą siłą dowodu na potencjalną skuteczność terapii. Dlatego wybór pacjentów mający na celu optymalizację szans na prawidłową ocenę biologicznych skutków terapii komórkowej przy najmniejszej liczbie chorych jest sprawą kluczową, jednak metody identyfikacji tej potencjalnie odpowiadającej na leczenie populacji przy jednoczesnym zminimalizowaniu uczestnictwa osób, u których prawdopodobnie dojdzie do samodzielnego wyzdrowienia, nie zostały jeszcze opracowane.⁴⁷ Kryteria stosowane często w badaniach z udziałem osób w ostrej fazie choroby nie mają prawdopodobnie zastosowania w przypadku osób w fazie podostrej, a tym bardziej przewlekłej udaru.

Optymalny czas wdrożenia terapii u pacjentów z udarem mózgu pozostaje niejasny. Przekonanie, że typ komórek, sposób ich podania i potencjalny mechanizm działania stanowią istotne czynniki, które należy brać pod uwagę przy określaniu właściwego czasu podania leku,⁴⁸ potwierdzone jest bardzo małą liczbą systematycznych badań. Założenia dotyczące potencjału naprawczego komórek macierzystych i mechanizmów związanych z różnymi punktami czasowymi po przebytych udarach (rycina) są prawdopodobnie zbyt dużym uproszczeniem. Najnowsze wyniki długoterminowej obserwacji szczurów z udarem mózgu badanych za pomocą MR,⁴⁹ trwałość odpowiedzi endogennych komórek macierzystych u zwierząt w starszym wieku⁵⁰ (i prawdopodobnie również u ludzi),⁵¹ długotrwała korzyść wynikająca z podania leku

w trybie odroczonym mimo gorszego przeżycia komórek i brak zależności wyniku leczenia od dawki⁵² wskazują, że wiele tych założeń może być błędnych.

Szeroko stosowane skale oceny wyników leczenia udaru, takie jak zmodyfikowana skala Rankina, obejmują całe spektrum potencjalnych deficytów neurologicznych i wyników leczenia, w związku z tym nie mają odpowiedniej czułości w wykrywaniu zmian w obrębie małych grup badanych. Zastosowanie mniej swoistych metod oceny klinicznej opracowanych w niektórych badaniach dotyczących rehabilitacji oznacza, że rekrutacja uczestników badania ograniczy się do jeszcze mniejszej populacji pacjentów ze szczególnym uszczerbkiem na zdrowiu (np. tych z niedowładem kończyny górnej o określonym stopniu ciężkości w badaniu Extremity Constraint Induced Therapy Evaluation [EXCITE]),⁵³ choć uogólnianie staje się wtedy nieuchronnie problematyczne.⁵⁴ Stąd konieczność opracowania biomarkerów, które mogłyby ułatwić „weryfikację koncepcji” we wczesnej II fazie badań. Obiecujące są badania obrazowe mózgu, jednak liczba osób po udarze poddanych prospektywnej ocenie w badaniach oceniających naturalny przebieg choroby jest bardzo mała, a czułość i wartość predykcyjna różnych metod oceny nie została ustalona. W poprzednich badaniach nad terapią komórkową, obrazowanie mózgu ograniczało się głównie do techniki strukturalnego MR lub pozytonowej tomografii emisyjnej z użyciem fluorodeoksyglukozy,^{37,38,41,55} przy czym żadna z tych metod nie pozwala odróżnić takich zmian jak odpowiedź zapalna na miejscowe podanie komórek od ich efektu terapeutycznego. W badaniach takich jak PISCES wykorzystywane są nowsze techniki obrazowania (np. funkcjonalny rezonans magnetyczny, obrazowanie tensora dyfuzji), pozostaje więc czekać, czy przyniosą one jakąkolwiek korzyść pod względem siły badania przewyższającą wartość oceny klinicznej.

PERSPEKTYWY

Ocena skuteczności terapii komórkowych opartych na wykorzystaniu linii komórkowych produkowanych zgodnie ze standardem GMP lub hodowli komórek autologicznych pochodzących ze szpiku kostnego wchodzi obecnie w fazę badań klinicznych. Wstępne badania skupiają się na kwestii bezpieczeństwa terapii, ale w bliskiej przyszłości konieczne będą badania fazy II zaprojektowane do oceny skuteczności lub potwierdzenia biologicznej aktywności komórek. Obecnie weryfikowane są założenia dotyczące odpowiedniej populacji badanej i momentu wdrożenia terapii po udarze; w obliczu ewolucji wiedzy na temat szerokiego zakresu działań biologicznych komórek macierzystych modyfikacji uległa też pierwotna koncepcja zastąpienia komórek jako celu terapii. Do zakończenia badań potrzeba kilku lat pracy, a ostatecznie konieczne będzie odniesienie stopnia poprawy funkcjonalnej do ryzyka i kosztów leczenia.

Konflikt interesów: J.S. jest założycielem, pracownikiem i współdziałalwcem w firmie ReNeuron Limited,

produkującej komórki macierzyste do celów terapeutycznych w programie leczenia udaru mózgu. K.M. otrzymuje fundusze naukowe od firmy ReNeuron Limited.

Finansowanie: ReNeuron Limited.

Copyright © 2012 International Journal of Stroke. Reproduced with permission of John Wiley & Sons, Inc

PIŚMIENNICTWO

- Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000; 287:1433–8.
- Horie N, Pereira MB, Niizuma K et al. Transplanted stem cell-secreted VEGF effects post-stroke recovery, inflammation, and vascular repair. *Stem Cells* 2011; 29:274–85.
- Gilman S. Pharmacologic management of ischaemic stroke: relevance to stem cell therapy. *Exp Neurol* 2006; 199:28–36.
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008; 359:1317–29.
- Freed CR, Greene PE, Breeze RE et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344:710–9.
- Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54:403–14.
- Lindvall O, Kokaia Z. Recovery and rehabilitation in stroke: stem cells. *Stroke* 2004; 35:2691–4.
- Miljan EA, Sinden JD. Stem cell treatment of ischemic brain injury. *Curr Opin Mol Ther* 2009; 11:394–403.
- Lindvall O, Kokaia Z. Stem cell research in stroke: how far from the clinic? *Stroke* 2011; 42:2369–75.
- Sinden JD, Stroemer P, Grigoryan G, Patel S, French SJ, Hodges H. Functional repair with neural stem cells. *Novartis Found Symp* 2000; 231:270–83.
- Burns TC, Steinberg GK. Stem cells and stroke: opportunities, challenges and strategies. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11:447–61.
- Bliss T, Guzman R, Daadi M, Steinberg GK. Cell transplantation therapy for stroke. *Stroke* 2007; 38:817–26.
- Andres RH, Choi R, Steinberg GK, Guzman R. Potential of adult neural stem cells in stroke therapy. *Regen Med* 2008; 3:893–905.
- Hicks A, Schallert T, Jolkonen J. Cell-based therapies and functional outcome in experimental stroke. *Cell Stem Cell* 2009; 5:139–40.
- Zaleska MM, Mercado ML, Chavez J, Feuerstein GZ, Pangalos MN, Wood A. The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translational challenges. *Neuropharmacology* 2009; 56:329–41.
- Chopp M, Li Y, Zhang ZG. Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. *Stroke* 2009; 40: S143–S145.
- Bliss TM, Andres RH, Steinberg GK. Optimizing the success of cell transplantation therapy for stroke. *Neurobiol Dis* 2010; 37:275–83.
- Modo M, Stroemer RP, Tang E, Patel S, Hodges H. Effects of implantation site of stem cell grafts on behavioral recovery from stroke damage. *Stroke* 2002; 33:2270–8.
- Stroemer P, Patel S, Hope A, Oliveira C, Pollock K, Sinden J. The neural stem cell line CTX0E03. promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after experimental stroke in a dosedependent fashion. *Neurorehabil Neural Repair* 2009; 23:895–909.
- Markgraf CG, Green EJ, Watson B et al. Recovery of sensorimotor function after distal middle cerebral artery photothrombotic occlusion in rats. *Stroke* 1994; 25:153–9.
- Modo M, Stroemer RP, Tang E, Veizovic T, Sowniski P, Hodges H. Neurological sequelae and long-term behavioural assessment of rats with transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurosci Methods* 2000; 104:99–109.
- Hunter AJ, Hatcher J, Virley D et al. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 2000; 39:806–16.
- Schallert T. Behavioral tests for preclinical intervention assessment. *NeuroRx* 2006; 3:497–504.
- Veizovic T, Beech JS, Stroemer RP, Watson W, Hodges H. Resolution of stroke deficits following contralateral grafts of conditionally immortal neuroepithelial stem cells. *Stroke* 2001; 32:1012–9.

25. Modo M, Rezaie P, Heuschling P, Patel S, Male DK, Hodges H. Transplantation of neural stem cells in a rat model of stroke: assessment of short-term graft survival and acute host immunological response. *Brain Res* 2002; 958:70–82.
26. Smith EJ, Stroemer RP, Gorenkova N et al. Implantation site and lesion topology determine efficacy of a human neural stem cell line in a rat model of chronic stroke. *Stem Cells* 2012; 30:785–96.
27. Pollock K, Stroemer P, Patel S et al. A conditionally immortal clonal stem cell line from human cortical neuroepithelium for the treatment of ischemic stroke. *Exp Neurol* 2006; 199:143–55.
28. Littlewood TD, Hancock DC, Danielian PS, Parker MG, Evan GI. A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucleic Acids Res* 1995; 23:1686–90.
29. Hodges H, Pollock K, Stroemer P et al. Making stem cell lines suitable for transplantation. *Cell Transplant* 2007; 16:101–15.
30. Pollock K, Sinden J. Progressing neural stem cell lines to the clinic; in Shi Y, Clegg DO, SpringerLink (eds): *Stem Cell Research and Therapeutics*. Dordrecht, Springer, 2008:105–22.
31. Thomas RJ, Hope AD, Houd P et al. Automated, serum-free production of CTX0E03: a therapeutic clinical grade human neural stem cell line. *Biotech Lett* 2009; 31:1167–72.
32. Stevanato L, Corteling RL, Stroemer P et al. c-MycERTAM transgene silencing in a genetically modified human neural stem cell line implanted into MCAo rodent brain. *BMC Neurosci* 2009; 10:86–99.
33. Amariglio N, Hirshberg A, Scheithauer B et al. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS Med* 2009; 6:e1000029.
34. Kalladka D, Muir KW. Stem cell therapy in stroke: designing clinical trials. *Neurochem Int* 2011; 59:367–70.
35. Savitz SI, Dinsmore J, Wu J, Henderson GV, Stieg P, Caplan LR. Neurotransplantation of fetal porcine cells in patients with basal ganglia infarcts: a preliminary safety and feasibility study. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20:101–7.
36. Kondziolka D, Steinberg GK, Wechsler L et al. Neurotransplantation for patients with subcortical motor stroke: a phase 2 randomized trial. *J Neurosurg* 2005; 103:38–45.
37. Kondziolka D, Wechsler L, Goldstein S et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000; 55:565–9.
38. Suarez-Monteaugudo C, Hernandez-Ramirez P, Alvarez-Gonzalez L et al. Autologous bone marrow stem cell neurotransplantation in stroke patients. An open study. *Restor Neurol Neurosci* 2009; 27:151–61.
39. Muir KW, Sinden J, Miljan E, Dunn L. Intracranial delivery of stem cells. *Transl Stroke Res* 2011; 2:266–71.
40. Bhasin A, Srivastava MVP, Kumaran SS et al. Autologous mesenchymal stem cells in chronic stroke. *Cerebrovasc Dis Extra* 2011; 1:93–104.
41. Lee JS, Hong JM, Moon GJ, Lee PH, Ahn YH, Bang OY. A long-term follow-up study of intravenous autologous mesenchymal stem cell transplantation in patients with ischemic stroke. *Stem Cells* 2010; 28:1099–106.
42. Chen J, Li Y, Wang L et al. Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2001; 32:1005–11.
43. Detante O, Moisan A, Dimastromatteo J et al. Intravenous administration of ^{99m}Tc-HMPAO-labeled human mesenchymal stem cells after stroke: in vivo imaging and biodistribution. *Cell Transplant* 2009; 18:1369–79.
44. Pendharkar AV, Chua JY, Andres RH et al. Biodistribution of neural stem cells after intravascular therapy for hypoxic-ischemia. *Stroke* 2010; 41:2064–70.
45. Diederich NJ, Goetz CG. The placebo treatments in neurosciences: new insights from clinical and neuroimaging studies. *Neurology* 2008; 71:677–84.
46. Williams A, Gill S, Varma T et al. Deep brain stimulation plus best medical therapy versus best medical therapy alone for advanced Parkinson's disease (PD SURG trial): a randomised, open-label trial. *Lancet Neurol* 2010; 9:581–91.
47. Coupar F, Pollock A, Rowe P, Weir C, Langhorne P. Predictors of upper limb recovery after stroke: a systematic review and meta-analysis. *Clin Rehabil* 2011; 26:291–313.
48. Savitz SI, Chopp M, Deans R, Carmichael ST, Phinney D, Wechsler L. Stem Cell Therapy as an Emerging Paradigm for Stroke (STEPS) II. *Stroke* 2011; 42:825–9.
49. Karki K, Knight RA, Shen LH et al. Chronic brain tissue remodeling after stroke in rat: a 1-year multiparametric magnetic resonance imaging study. *Brain Res* 2010; 1360:168–76.
50. Darsalia V, Heldmann U, Lindvall O, Kokaia Z. Stroke-induced neurogenesis in aged brain. *Stroke* 2005; 36:1790–5.
51. Minger SL, Ekonomou A, Carta EM, Chinoy A, Perry RH, Ballard CG. Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med* 2007; 2:69–74.
52. Darsalia V, Allison SJ, Cusulin C et al. Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31:235–42.
53. Wolf SL, Winstein CJ, Miller JP et al. Effect of constraint-induced movement therapy on upper extremity function 3 to 9 months after stroke: the EXCITE randomized clinical trial. *JAMA* 2006; 296:2095–104.
54. Langhorne P, Coupar F, Pollock A. Motor recovery after stroke: a systematic review. *Lancet Neurol* 2009; 8:741–54.
55. Bang OY, Lee JS, Lee PH, Lee G. Autologous mesenchymal stem cell transplantation in stroke patients. *Ann Neurol* 2005; 57:874–82.

Piśmiennictwo ze str. 18

PIŚMIENICTWO

1. Fick A. Ueber Diffusion. *Annalen der Physik* 1855; 94:59-86.
2. Brown R. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August, 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *Phil Mag* 1828; 4: 161-173.
3. Einstein A. Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, *Annalen der Physik* 1905; 17: 549-560.
4. Le Bihan D, Breton E. Imagerie de Diffusion in Vivo par Resonance Magnetique Nucleaire (In Vivo Magnetic Resonance Imaging of Diffusion). *Comptes rendus de l'Academie des Sciences. La vie des sciences* 1985; 301: 1109-1112.