

Autologní transplantace kmenových krvetvorných buněk a její současná role v léčbě roztroušené sklerózy

Autologous Hematopoietic Stem Cells Transplantation and its Current Role in Multiple Sclerosis Treatment

Souhrn

Roztroušená skleróza (RS) představuje v našich zeměpisných šířkách nejčastější autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému. Onemocnění může vést k různému stupni neurologického postižení v závislosti na agresivitě průběhu vlastní RS, včasném zahájení léčby a jejím individuálním efektem. Zhruba u 3 % pacientů lze průběh RS označit za maligní, kdy jsou od počátku choroby přítomny ataky závažné neurologické symptomatiky s rychlým nárůstem trvalého neurologického postižení i přes adekvátní léčbu. V těchto případech je na místě individuálně zvážit léčbu tzv. vysokodávkovanou imunoablací s následnou podporou autologních krvetvorných kmenových buněk (ASCT). Princip léčby ASCT představuje snahu o eliminaci autoagresivního imunitního systému vysokou dávkou cytostatik následovanou navrácením vlastních kmenových buněk pacienta, které jsou zdrojem obnovy imunitního systému. Cílem léčby je umožnit obnovu potenciálně méně autoagresivního imunitního systému. U nejdéle sledovaného souboru pacientů z roku 1995 bylo dosaženo intervalu bez progresu deset let u 47 % pacientů, což je vynikající výsledek ve srovnání se všemi ostatními léčebnými postupy u RS. Na celém světě bylo dosud touto metodou léčeno již více než 400 pacientů. V současnosti představuje optimální indikaci k léčbě ASCT vysoce aktivní RS s délkou trvání choroby do pěti let a ještě zachovanou schopností chůze bez opory alespoň 100 metrů. Přes svá rizika (včetně mortality 2,3 %) ASCT zůstává nadějí pro pacienty s maligním průběhem RS, a to i v České republice, která se podílí na soustavném (a do budoucna stále nezbytném) výzkumu v této oblasti již od roku 1998.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is the most frequent autoimmune disorder of the central nervous system in our geographical region. The disease can lead to variable degree of neurological disability according to aggressiveness of MS course itself, early treatment initiation and its individual efficacy. In about 3% of the patients MS course can be classified as malignant with severe attacks from the beginning of the disease and rapid accumulation of neurological disability despite adequate treatment. In such cases the treatment with high-dose immunoablation with autologous hematopoietic stem cells support (ASCT) should be considered. The treatment rationale comprises the effort of autoaggressive immune system elimination by high-dose cytostatic treatment followed by return of patients' own hematopoietic stem cells as resources for a new immune system. The aim is to enable reconstitution of potentially less autoaggressive immune system. The progression free survival 10 years in 47% of the patients has been achieved in the first ASCT group with the longest follow-up since 1995 – great result in comparison with any other currently available MS drug. More than 400 patients worldwide have been treated with ASCT procedure so far. Nowadays optimal indication for ASCT treatment involves highly active MS within first five years of the disease and ability to walk at least 100 metres without aid. Despite its risks (including 2.3% mortality) ASCT presents promising treatment for malignant MS with poor prognosis also in the Czech Republic, where ASCT research – still so needful and essential – started in 1998.

Podpořeno granty IGA MZ ČR NR/9375-3/2007, IGA MZ ČR 1A8713-5/2005, GAČR 309/08/H079 a VZ-MSM0021620849.

Ilustrace Klára Zápotocká a Pavel Veselý.

**E. Krasulová¹, M. Trněný²,
T. Kozák³, E. Havrdová¹**

¹ Neurologická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

² I. interní klinika 1. LF UK
a VFN v Praze

³ Oddělení klinické hematologie
3. LF UK a FNKV, Praha



MUDr. Eva Krasulová
Centrum pro demyelinizační
onemocnění
Neurologická klinika 1. LF UK
a VFN v Praze
Kateřinská 32
128 01 Praha 2
e-mail: eva.krasulova@gmail.com

Přijato k recenzi: 19. 1. 2009

Přijato do tisku: 2. 3. 2009

Klíčová slova

roztroušená skleróza – maligní – imunoablace – transplantace kmenových buněk – ASCT

Key words

multiple sclerosis – malignant – immunoablation – stem cell transplantation – ASCT

Úvod

Roztroušená skleróza (RS) s prevalencí 100–150/100 000 obyvatel představuje nejčastější autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému (CNS) v České republice [1]. Onemocnění je multifaktoriálního původu – na jeho rozvoji se podílí jak predisponující genetická výbava, tak faktory zevního prostředí (infekce, hormonální změny, kouření, nedostatek vitamínu D aj.) [1,2]. V patogenezi autoimunitního zánětu CNS byly vždy na první místo stavěny CD4+ T lymfocyty, současný pohled však velmi komplexně zahrnuje i ostatní složky imunitního systému: cytotoxické CD8+ T lymfocyty schopné přerušit axon [3], přirozenou imunitu [4] i B lymfocyty a plazmatické buňky, které byly nalezeny na meningách pacientů s RS ve shlucích strukturou připomínajících lymfatické uzliny [5]. Ve svém průběhu začíná RS u 85 % pacientů relaps-remitentní fází, kdy se střídají akutně vzniklé neurologické příznaky s úplnou nebo částečnou remisí. Ataka je klinickým projevem zánětlivého ložiska v CNS. S pokračujícím zánětem dochází postupně (individuálně během 5–15 let) k vyčerpání rezerv CNS, které činí 30–40 %. Pozvolna nad zánětem převládá axonální ztráta – neurodegenerace, která je ireverzibilní. Klinickým korelátom je pozvolná progresivní neurologického postižení (tzv. sekundárně progresivní fáze RS) s minimálním účinkem současné protizánětlivé terapie. Zánět má v této fázi pouze malou aktivitu a je navíc umístěn za hematoencefalickou bariérou (HEB) v CNS již se zmíněnými shluky buněk B linie na meningách. Teoreticky mohou být tyto dlouho žijící plazmatické buňky zdrojem pokračující aktivity onemocnění i přes intenzivní cytostatickou léčbu, protože jsou terapeuticky při svém umístění za HEB obtížně postižitelné [6]. Navíc pro tuto fázi RS v současnosti zcela chybí léčba neuroregenerační. Pozvolným progresivním průběhem bez atak, s převažující neurodegenerací nad zánětem je typická primárně progresivní forma RS. Zhruba u 3 % pacientů lze průběh RS označit za agresivní až vysloveně maligní, kdy jsou od počátku choroby přítomny ataky závažné neurologické symptomatiky (hybné, mozečkové, kmenové) s trvalými rezidui i přes adekvátní léčbu. U těchto pacientů rychle narůstá neurologické postižení (tzv. relabující-progredující forma RS) i přes veškerou konvenční terapii, která je v současné době k dispozici. Právě v těchto

případech je na místě přísně individuálně zvážit léčbu tzv. vysokodávkovanou imunoablací s následnou podporou autologních hematopoetických kmenových buněk (ASCT, Autologous hematopoietic Stem Cells Transplantation).

Princip současné léčby roztroušené sklerózy

Cílem léčby RS je při našich současných terapeutických možnostech především její včasné zahájení (optimálně již po první atace klinických příznaků suspektních podle paraklinických vyšetření z rozvoje definitivní RS), pečlivé hodnocení účinnosti zvolené terapie a její včasná změna v případě nedostatečného efektu. Oddalování zahájení terapie nebo oddalování její změny/eskalace v případě neúčinnosti je postup zcela non lege artis. Podle dostupných dat u pacientů s přirozeným (neléčeným) průběhem RS dochází k rozvoji těžké invalidity (s neschopností chůze bez opory) u 50 % pacientů během 15 let trvání choroby [7], což s přihlédnutím k rozvoji prvních příznaků nemoci typicky mezi 20.–40. rokem věku činí RS nejčastější příčinou invalidity mladých osob.

Léčba zahrnuje jednak akutní protizánětlivý postup v případě ataky RS, kde zůstává zlatým standardem metylprednizolon (při nedostatečném efektu ještě s přidáním cytostatikem cyklofosfamidem), jednak léčbu dlouhodobou s cílem snížit počet atak a jejich závažnost, a oddálit progresivní fázi choroby s ireverzibilní neurodegenerací. Zde představují léky první volby u relaps-remitentní RS interferony beta a glatiramer acetát s navzájem srovnatelným efektem 30–40 % oproti placebo [8–14]. Léky druhé volby zahrnují monoklonální protilátku natalizumab s efektem 68 % na snížení počtu relapsů oproti placebo [15], která je indikována u pacientů s vysokou aktivitou onemocnění a nedostatečným efektem léků první volby, nebo u agresivní RS s rychle progredující invaliditou v začátku choroby, kde by zavedení léků první volby vedlo k nebezpečí z prodlení. Další alternativou druhé volby zejména pro imunodeficientní pacienty jsou intravenózní imunoglobuliny (IVIg) s efektem srovnatelným s léky první volby [16] a orální imunosupresiva (azatioprin, metotrexát, mykofenolát mofetil) [1]. Léčbu lze při nedostatečné účinnosti léků první a druhé volby eskalovat cytostatickými režimy – cyklofosfamid [17] a mi-

toxantron [18,19], ani tato eskalace však není schopna zastavit aktivitu RS v případě jejího maligního průběhu, kde je proto následně ke zvážení individuální léčebný postup, adekvátně agresivní vůči maligní RS (ASCT). V případě sekundárně progresivní fáze RS jsou léčebné možnosti již velmi omezené – na počátku této fáze při ještě přítomných relapsech může mít určitý význam interferon beta [20], dále pak pulzní léčba cyklofosfamidem [21] nebo mitoxantronem [22], IVIG či orální imunosupresiva [1]. Pokud je však zjevná pokračující progresivní fáze RS po šesti měsících zvolené léčby, je na místě terapii ukončit a nenavrhovat tak pouze riziko nežádoucích účinků. U primárně progresivní formy RS neexistuje žádný mezinárodní konsenzus léčby, i zde se však individuálně zkouší dostupná cytostatika, imunosupresiva a IVIG s pečlivým hodnocením vlivu terapie na zastavení progresivní fáze po šesti měsících léčby [1].

Autologní transplantace kmenových krvetvorných buněk u RS – základní poznatky o účinnosti a bezpečnosti

Stejně jako všechny terapeutické postupy u RS byla i vysokodávkovaná imunoablace s autologní transplantací krvetvorných kmenových buněk (ASCT) ve svém počátku založena na výsledcích preklinického výzkumu [23–28]. Autologní (syngenní) transplantace kmenových buněk kostní dřeně dokázala zabránit rozvoji či léčit již indukovanou experimentální alergickou encefalomyelitidu (myši a krysí model RS). Závěry těchto experimentů ukázaly, že léčba ASCT je efektivní v počáteční fázi onemocnění, zatímco má malý či žádný efekt u zvířat léčených po delším trvání choroby [26] – tento závěr je nyní po více než desetileté klinické zkušenosti obecně přijímán jako platný i v případě vlastní RS. Idea léčby ASCT u RS byla dále kromě zvířecích pokusů podpořena i kazuistikami s navozením stabilizace autoimunitních chorob po léčbě transplantací kostní dřeně pro hematologická onemocnění [29,30].

Pilotní klinická studie fáze III s ASCT u pacientů s progresivní RS začala v řecké Soluni v roce 1995 [31]. Následovala další centra po celém světě (Česká republika a jiná evropská centra, Rusko, Izrael, Čína a USA). Ve všech publikovaných zprávách [31–42] byli pacienti v pokročilé progresivní fázi choroby léčeni intenzivní vysokodávkovanou chemoterapií nebo celotělo-

Tab. 1. Prospektivní studie s autologní transplantací krvinek u roztroušené sklerózy.

	Počet pacientů	EDSS při ASCT	Délka trvání RS při ASCT (let)	ASCT režim	Délka sledování (let)	PFS (%)	Poznámka
Fassas et al [31,32,48]	24	4,5–8,0	2–28	BEAM	3,7	76	u 20 pacientů PFS po 10 letech 47% [48]
Kozák et al [33]	26	2,5–7,5	2–19	BEAM	6	53,2	+ vlastní data
Mancardi et al [52], Saccardi et al [54]	21	5,0–6,5	4–19	BEAM	8,5	58	
Nash et al [51]	26	5,0–8,0	0,8–23	celotělové ozáření + CPA	2	73	
Burt et al [40]	21	3,0–8,0	0,7–15	celotělové ozáření + CPA	1,8	61	
Su et al [34], Xu et al. [35]	22	4,5–7,5	1,2–13	BEAM	3	77	
Samijn et al [37]	14	5,5–6,5	2–12	celotělové ozáření + CPA	3	36	
Carreras et al [38], Saiz et al [46,47]	14	4,5–6,5	1–19	karmustin + CPA	6	62,5	
Shevchenko [36]	50	1,5–8,0	1–14	BEAM	6	72	

RS: roztroušená skleróza, ASCT: vysokodávkovaná imunoablace s následnou podporou autologních krvinek, EDSS: Expanded Disability Status Scale, PFS: interval bez progresu (Progression Free Survival), BEAM: imunoablativní chemoterapeutický režim (BCNU = carmustin, etoposid, cytosin arabinosid a melfalan), CPA: cyklofosfamid

vým ozáření [40] s následnou autologní transplantací krvinek. Celoevropská data shromažďovaná v registru EBMT (The European Group for Blood and Marrow Transplantation) byla publikována v rámci dvou shrnujících retrospektivních publikací v letech 2002 a 2006 [43,44]. V druhé z těchto publikací byla dokumentována léčba ASCT již u celkem 183 pacientů z 45 center [44]. Převažovali pacienti se sekundárně progresivní (54 %) a primárně progresivní RS (18 %), průměrná doba trvání RS byla 6,7 let (0,2–28,5 let), průměrný věk pacienta v době výkonu 34 let (15–58 let). Průměrný stupeň neurologického postižení vyjádřený pomocí Kurtzkeho Expanded Disability Status Scale (EDSS) [45] byl 6,5 (schopnost ujít bez zastavení 20 metrů s oboustrannou oporou). V rámci tříletého sledování bylo dosaženo intervalu bez progresu (PFS, Progression-Free Survival) u 63 % pacientů, což byl vynikající výsledek u skupiny pacientů s tímto stupněm postižení a progresí choroby minimálně o jeden stupeň škály EDSS v roce před ASCT. Výsledky dalších sledování jsou shrnuty v tab. 1. Tyto výsledky jednoznačně opravňují k pokračování ve výzkumu ASCT u léčbě RS,

neboť bylo dosaženo stabilizace u téměř 50 % pacientů po dobu 10 let. Přitom se jednalo o pacienty s natolik agresivní RS, že bylo možno podle předtransplantačního průběhu jejich choroby odhadovat progresi do stadia neschopnosti chůze a upoutání na invalidní vozík do jednoho roku (!). Celosvětově je v současné době odhadováno, že léčbu ASCT podstoupilo již více než 400 pacientů s touto diagnózou [48].

Ve všech dosavadních studiích se z logických důvodů nejednalo o klasickou, zaslepenou, placebem kontrolovanou, randomizovanou, klinickou studii. Proto je nyní snaha provést lépe naplánované srovnávací studie prokazující vyšší účinnost režimu ASCT u pacientů s agresivní RS, u kterých selhala konvenční terapie, ve srovnání s léčbou cytostatikem mitoxantronem (studie ASTIMS, Autologous Stem cell Transplantation International Multiple Sclerosis, www.astims.org). Stejně jako u dalších aktuálních studií fáze II, které probíhají v USA (HALT MS [49] a Stem Cell Therapy for Patients with Multiple Sclerosis Failing Interferon A Randomized Study [50]), jsou indikováni pacienti s nižším stupněm postižení (EDSS do 5,5 = schopnost chůze bez opory

a bez zastavení alespoň 100 metrů) nebo trváním RS do pěti let, tedy pacienti v závažné fázi choroby (viz dále).

Kromě klinických pozorování jsou k dispozici i výsledky magnetické rezonance (MR). Podle všech dostupných dat má léčba ASCT schopnost dlouhodobě snížit aktivitu zánětu v CNS měřenou počtem gadolinium vychytávajících lézí na MR [33,38,40,46,51,52,54], a to i v případě podání trojnásobné dávky gadolinia [52], která je pro detekci zánětlivých lézí s porušenou HEB o 75 % citlivější než standardní dávka [53]. Tento efekt lze pozorovat v průměru 3–5 let po ASCT [48]. Snížení zánětu v CNS bylo podpořeno i stabilizací nebo redukcí počtu T2 vážených lézí na MR [46,52,55]. Intenzivní diskuze je v posledních letech vedena na téma atrofie CNS ve vztahu k ASCT. Všechny práce, kde byla atrofie v rámci MR vyšetřena různými metodami měřena, prokázaly její nárůst v prvních dvou letech po ASCT [46,55–58]. Také histopatologické nálezy u malé skupiny pěti pacientů, kteří zemřeli do 1,5 roku po ASCT, odhalily aktivní demyelinizaci a axonální ztrátu i přes minimální přítomnost zánětlivých buněk v lézích CNS [59]. Tyto nálezy je však nutno

hodnotit velmi opatrně, protože se týkají pouhých pěti pacientů s dlouhým trváním RS (v průměru 13 let) a pouze jednorázového hodnocení krátce po ASCT [48,60,61]. Rozhodně nelze na základě těchto výsledků akceptovat závěr, že důvodem axonální ztráty je pouze neurotoxicita cytostatik užívaných v rámci ASCT. To vyvrací i MR data po delším než dvouletém sledování: italská skupina popsala u devíti pacientů nejprve dramatický nárůst atrofie s procentuální normalizovanou změnou objemu mozkové tkáně (PBVC, Percentage normalized Brain Volume Changes) během prvního roku $-1,10\%$ a druhého roku $-1,55\%$, následovalo však výrazné zpomalení atrofie s průměrným ročním PBVC $-0,45\%$ ve třetím až pátém roce sledování [57]. Po více než dvouletém pozorování se tedy hodnoty atrofie prakticky rovnají hodnotám atrofie pozorované u pacientů s méně agresivním průběhem RS [62]. Obdobné výsledky byly získány i u nizozemské skupiny pacientů léčených ASCT po tříletém pozorování [58]. Navíc pilotní výzkum vývoje gadolinium vychytávajících lézí u čtyř pacientů před ASCT a po ní pomocí nekonvenční MR metody – magnetizačního transferu (MTR, Magnetization Transfer Ratio) – prokázalo remyelinizační některých ložisek, tedy přítomnost funkčních oligodendroglálních prekurzorů i po intenzivní cytostatické léčbě při ASCT [63]. Mezi příčinami atrofie mozku bezprostředně po ASCT je tedy na místě zvažovat nejen potenciální neurotoxicitu ASCT režimu (zejména cytostatik etopozidu a cytarabinu [48]), ale také probíhající neurodegeneraci při vlastní RS nastartované již před léčbou (v žádné z pozorovaných skupin pacientů bohužel nemáme k dispozici vývoj PBVC před léčbou) či „pseudootrofii“ jako důsledek dramatického snížení edému a zánětlivé aktivity po ASCT [64].

Neméně důležitou otázkou indikace experimentální léčby je vedle účinnosti také její bezpečnost. Zásadním údajem je s výkonem spojená mortalita (TRM, Treatment-Related Mortality). Ta podle údajů EBMT z roku 2006 dosahovala u ASCT $5,3\%$ [44], kdy příčiny úmrtí zahrnovaly komplikující infekci ($n = 6$), kardiotoxicitu ($n = 1$), neurologickou progresi ($n = 1$) a získanou autoimunitu s tvorbou protilátek proti koagulačnímu faktoru VIII ($n = 1$). Byla pozorována statisticky významná korelace mezi TRM a ASCT režimem zahrnujícím cytostatikum busulfan,

a dále negativní trend k vyšší TRM v závislosti na věku pacienta a dvojnásobném čištění štěpu (viz dále) [44]. Poslední analýza dat EBMT (všechny případy ASCT v Evropě od roku 1997) ukázala hodnotu TRM $2,3\%$ [64], která je zřejmě důsledkem jak aktuální indikace méně postižených pacientů, tak výběru méně toxických režimů a především kvality a erudice provádějících hematologických pracovišť. Časné nežádoucí účinky v prvních 100 dnech po ASCT lze očekávat podle EBMT analýzy u 56% případů (febrilní neutropenie, sepse, infekce močových cest, gastroenteritis, mucositis, alergická reakce na antitymocyární globulin) a musí být samozřejmě součástí diskuze s pacientem v rámci indikace léčby. Taktéž může dojít k přechodnému neurologickému zhoršení (17%). Pozdní nežádoucí příhody byly zaznamenány u 6% pacientů po 4.–41. měsíci od ASCT a zahrnovaly infekci varicella zoster virem ($n = 3$), autoimunitní tyreoiditidu ($n = 3$) a získanou autoimunitu s tvorbou protilátek proti koagulačnímu faktoru VIII ($n = 2$) [44].

Autologní transplantace krvetvorných kmenových buněk u RS – imunologické poznatky a princip

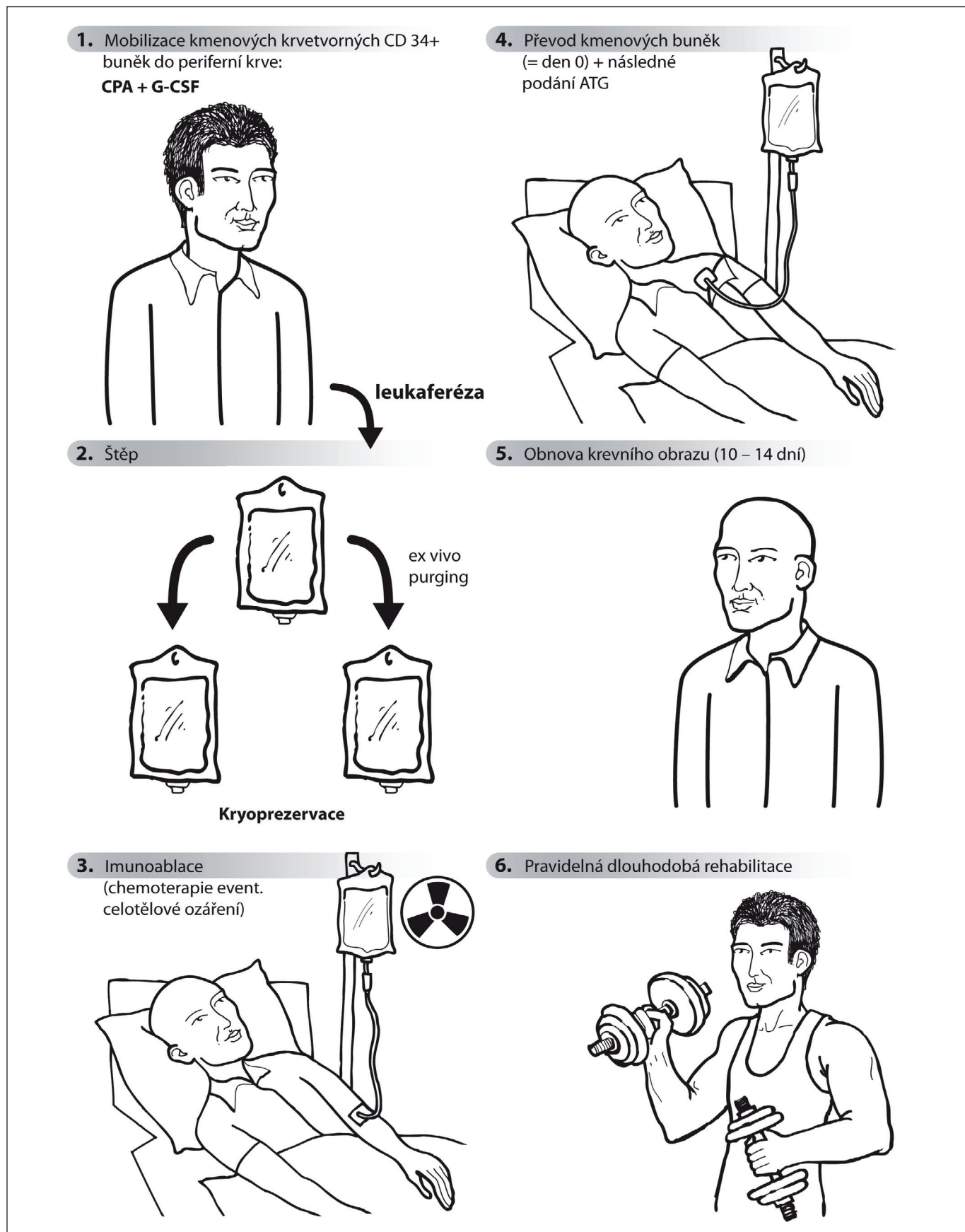
Základní představa o efektu ASCT u autoimunitních onemocnění je založena na principu zničení imunitního systému včetně autoreaktivních klonů T lymfocytů intenzivní cytostatickou léčbou s následnou rekonstitucí imunitního systému z vlastních kmenových buněk za jiných než původních ontogenetických podmínek [1,48]. Je však známo, že klony T lymfocytů rozpoznávající antigeny CNS (MBP) jsou po ASCT do jednoho roku opět vytvořeny [65], k obnově přirozených zabíječů (natural killers) a B lymfocytů dochází dokonce již do tří měsíců po ASCT [38,40,51]. Důležitý je ovšem charakter subpopulací obnovovaných imunitních buněk: po dvou letech od ASCT (režim cyklofosamid a celotělové ozáření) byla prokázána zvýšená tvorba naivních CD4+ lymfocytů původem z týmu na úkor nižšího zastoupení paměťových CD4+ lymfocytů. Zároveň byla průkazná větší receptorová diverzita T buněk ve srovnání s předtransplantačním vyšetřením [66]. V dospělém věku obnovená tymopoéza z kmenových buněk tak může být zodpovědná za nastavení autotolerance po ASCT. Možným důkazem navození autotolerance po ASCT byla i normali-

zace počtu regulačních T lymfocytů (CD4+, CD25+ a FoxP3+) po této léčbě u pacientů s autoimunitní juvenilní idiopatickou artritidou [67]. Zcela logická je úvaha, že by vyššího efektu léčby bylo možno dosáhnout využitím heterologní (alogenní) transplantace kmenových buněk dárců bez anamnézy autoimunitního onemocnění. Tato léčba je však spojena s mortalitou více než 20% , proto zatím není v léčbě autoimunitních chorob akceptovatelná [48].

Vedle hlavního imunologického principu účinnosti ASCT u RS stojí ještě úvaha o možném neuroregenačním potenciálu kmenových hematopoetických buněk. U čtyř pacientek, které dostaly v rámci heterologní transplantace kmenových buněk pro hematologická onemocnění hematopoetické kmenové buňky od dárců-mužů, byly post mortem nalezeny v CNS buňky obsahující Y chromozom. Tyto buňky byly tedy jednoznačně původem z dárcovských kmenových buněk a ukázaly schopnost diferenciace kmenových buněk v buňky nervové (především v oblasti hippocampu a kůry mozkové) [68]. Vedle toho však existují zprávy, které neurogenezi z hematopoetických kmenových buněk nepotvrdily [69,70]. Proto je v současné době efekt ASCT přičítán především intenzivní imunopresi a obnově kvalitativně odlišného imunitního systému [48].

Autologní transplantace krvetvorných kmenových buněk u RS – současná indikace k výkonu

Pacienti, kteří byli indikováni k výkonu ASCT v letech 1995–2006, byli především pacienti v pokročilém stadiu RS, většinou (80%) v sekundárně progresivní fázi choroby a s vyšším stupněm invalidity. Jedině takto postiženým pacientům bylo možno nabídnout experimentální léčbu s potenciálním rizikem mortality, která byla odhadována při prvních klinických pokusech kolem 5% [48]. V současnosti (2009) je však metoda ASCT díky dosud získaným datům ze souboru více než 300 pacientů bezpečně realizovatelná (TRM $2,3\%$) a jsme svědky vývoje indikačních kritérií pro tuto léčbu. Při uvážení principu ASCT je evidentní, že nejlepšími kandidáty k této terapii jsou pacienti s maximem autoimunitního zánětu v CNS, tedy pacienti v prvních pěti letech choroby v relaps-remitentní, relabující-progredující nebo počáteční sekundárně progresivní fázi, s objektivními



Obr. 1. Průběh léčby ASCT. CPA: cyklofosfamid, G-CSF: faktor stimulujiící granulocytární kolonie, ATG: antitymocyární globulin

Tab. 2. Soubory pacientů léčených autologní transplantací kmenových buněk na Neurologické klinice 1. LF UK v Praze v letech 1998–2006 a 2007–2008.

	1998–2006	2007–2008
Počet pacientů	18	7
Průměrný věk v době výkonu (let)	33,4 ± 6,7	29 ± 6,0
Průměrná délka trvání RS (let)	9,3 ± 3,9	5 ± 2,0
Průměrné EDSS před výkonem	6,5 ± 0,5	3,5 ± 0,7
Čištění štěpu ex vivo/ATG	6/12	0/7
Délka sledování k 08/2008 (měs.)	79 ± 35,4	7,4 ± 4,2
Aktuální průměrné EDSS	7 ± 1,0	3,6 ± 1,0

RS: roztroušená skleróza, EDSS: Expanded Disability Status Scale, ATG: antitymocytní globulin

známkami zánětlivé aktivity RS (ještě přítomné relapsy, gadolinium vychytávající léze na MR). Léčba ASCT není prováděna s představou neuroregenerace, ale s představou oddálení těžké ireverzibilní invalidity. Adekvátní je proto u pacientů ještě mobilních, do stupně EDSS 5,5 (schopnost ujit alespoň 100 metrů bez opory a bez zastavení).

Autologní transplantace krvetvorných kmenových buněk u RS – průběh a transplantační protokoly

Obecně má volba každé léčby následovat po diskuzi s pacientem, což tím více platí u „off-label“ léčby, jako je ASCT. Pacientovi – a optimálně i jeho blízkým – jsou podrobně neurologem a hematologem vysvětleny detaily průběhu léčby, očekávaný efekt i možné nežádoucí účinky, a pacient poté podepisuje informovaný souhlas s léčbou. Následují nejprve podrobná vyšetření k vyloučení orgánové patologie a asymptomatických infekčních fokusů. Vlastní proces léčby sestává z těchto fází (obr. 1): 1. priming: mobilizace kmenových buněk do periferní krve a jejich sesbírání cestou leukaferézy; 2. případné zpracování štěpu (ex vivo) a zamražení kmenových buněk; 3. conditioning – intenzivní chemoterapie; 4. vrácení kmenových buněk do krevního oběhu pacienta; 5. podání antitymocytního globulinu; 6. přihojení štěpu s obnovením krevního obrazu do 10–14 dnů; 7. cílená fyzioterapie: dle stavu pacienta v průběhu léčby a poté vždy dlouhodobě a pravidelně po léčbě. Kmenové hematopoetické buňky nesoucí povrchový znak CD34 lze získat jednak trepanobiopsií přímo z kostní dřeně, nebo je lze vyplavit (mobilizovat) do periferní krve,

a získat tak snadněji větší množství těchto buněk [48]. Proto je mobilizace kmenových buněk u ASCT preferována [44], a léčba by proto správně neměla být označována jako transplantace kostní dřeně. CD34+ buňky jsou nejčastěji mobilizovány pomocí cyklofosfamidu – CPA (2–4 g/m²) s následným subkutánním podáváním faktoru stimuluujícího granulocytární kolonie G-CSF (5–10 µg/kg/den) do dosažení potřebného počtu kmenových buněk [71,72]. Kmenové buňky lze mobilizovat i G-CSF samotným, ale pro popsané zhoršení RS při jeho podání [73] je výhodná výše uvedená kombinace s CPA. Kmenové buňky jsou z periferní krve sbírány leukaferézou, zamrazeny v tekutém dusíku (–196 °C) a uchovány až do transplantace. Za minimální, ještě dostačující počet získaných kmenových buněk (v případě autoimunitních onemocnění) je považována hodnota 3 × 10⁶ CD34+ buněk/kg [48]. Štěp může být ex vivo upraven – pozitivní selekcí CD34+ nebo negativní selekcí T lymfocytů. Toto čištění (in vitro purging) v kombinaci s následným podáním antitymocytního imunoglobulinu (dvojitě čištění štěpu) však nevedlo k vyšší účinnosti ASCT. Naopak patřilo mezi faktory zvyšující riziko s léčbou spojené mortality [44], proto se již ve většině center neprovádí. U RS představuje nejčastěji používaný imunoablativní chemoterapeutický režim tzv. BEAM (BCNU = carmustin, etoposid, cytosin arabinosid a melfalan) [44]. Tato kombinace cytostatik využívaná v léčbě lymfomů patří mezi středně intenzivní režimy s lymfoablativním a silně myelotoxickým (ale nikoli zcela myeloablativním) účinkem [74]. Cytostatika režimu BEAM přestupují hematocelulickou bariéru, a mohou tak zasáhnout autoreaktivní imunitní buňky v CNS

[48]. V Severní Americe je častěji využíván vysoce intenzivní režim jako v léčbě leukemií – celotělové ozáření (1 000–1 200 cGy) a vysokodávkovaný CPA (120 mg/kg) nebo busulfan (16 mg/kg) [51,74]. Na většině pracovišť je po ablativním režimu podáván ještě antitymocytní globulin (ATG, 4 mg/kg) s cílem odstranit potenciálně se štěpem vrácené autoreaktivní T lymfocyty (tzv. in vivo purging) [33,44,48]. Pravděpodobnost progresu RS po třech letech od ASCT je 43 % u středně intenzivních režimů a 31 % u vysoce intenzivních režimů, nicméně byl zároveň jednoznačně prokázán přímo úměrný vztah mezi intenzitou režimu a mortalitou spojenou s léčbou [74]. Proto je režim BEAM širší odbornou veřejností považován za optimálně účinný i bezpečný [48] a je používán také v ČR. Absolvováním celé výše uvedené procedury je sice ukončena farmakologická část vlastní ASCT léčby, nicméně nastává fáze intenzivní a dlouhodobé fyzioterapie, která je nedílnou součástí celého procesu. Pouze pacient předem motivovaný jak k léčbě, tak k fyzioterapii je vhodným kandidátem k ASCT.

Aktuální situace v České republice

Česká republika se se svým souborem 40 transplantovaných pacientů významně podílí na celosvětové léčbě a výzkumu ASCT. Léčba zde probíhá od roku 1998 s využitím ablativního režimu BEAM dosud s nulovou mortalitou ve spojitosti s výkonem. I v ČR došlo v posledních dvou letech k posunu indikace ASCT k pacientům v zánětlivé fázi choroby. Soubor pacientů léčených ASCT a dlouhodobě sledovaných v Centru pro demyelinizační onemocnění Neurologické kliniky 1. LF UK v Praze tak lze rozdělit na skupinu transplantovanou v letech 1998–2006 a skupinu transplantovanou 2007–2008 (tab. 2) se zřejmým posunem k pacientům indikovaným v prvních pěti letech choroby a ještě nedosahujícím těžké invalidity (průměrné EDSS 3,5 u druhé skupiny znamená pacienty bez omezení v chůzi narozdíl od průměrného EDSS 6,5 u původní skupiny pacientů odpovídající schopnosti chůze pouze do 20 metrů s oboustrannou oporou).

Závěr

Vysokodávkovaná imunoablace s následnou transplantací autologních krvetvorných kmenových buněk je v léčbě roz-

troušené sklerózy k dispozici od roku 1995. Ačkoliv se jedná o léčbu spojenou s rizikem mortality 2,3 %, je to zároveň aktuálně jediná léčebná metoda, která dokáže oddálit progresi maligní RS (u 47 % pacientů dokonce na 10 let), a tím rychle nastupující trvalou invaliditu. Protože se většinou jedná o mladé pacienty, je třeba pečlivě uvážit kvalitu hrozícího mnohalehého života s těžkou invaliditou ve srovnání s – dnes na erudovaných pracovištích již relativně malými – riziky léčby. Podle aktuálního pohledu na princip léčby ASCT je vhodným kandidátem pacient s agresivní RS i přes dostupnou konvenční terapii, s délkou trvání choroby do pěti let a ještě bez těžkého neurologického postižení (se zachovanou schopností chůze alespoň 100 metrů bez opory a bez zastavení, EDSS 5,5). Je úkolem všech ošetřujících neurologů, aby takovému pacientovi ve vysokém riziku rychlého rozvoje trvalé invalidity včas léčbu ASCT nabídli.

Literatura

- Havrdová E. Neuroimmunologie. Praha: Maxdorf 2001.
- Hawkes CH. Smoking is a risk factor for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Mult Scler* 2007; 13(5): 610–615.
- Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001; 159(3): 809–815.
- Sbsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM. Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2002; 61(11): 1013–1021.
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centres in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2004; 14(2): 164–174.
- Marmont AM, Gualandi F, Occhini D, Morandi F, Ferretti E, Pezzolo A et al. Catastrophic relapse of Evans syndrome five years after allogeneic BMT notwithstanding full donor chimerism. Terminal hemolytic-uremic syndrome. *Autoimmunity* 2006; 39(6): 505–511.
- Kremenutzky M, Rice GP, Baskerville J, Wingerchuk DM, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 9: observations on the progressive phase of the disease. *Brain* 2006; 129(3): 584–594.
- IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43(4): 655–661.
- Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43(4): 662–667.
- IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. *Neurology* 1995; 45(7): 1277–1285.
- Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39(3): 285–294.
- Simon JH, Jacobs LD, Campion M, Wende K, Simonián N, Cookfair DL et al. Magnetic resonance studies of intramuscular interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; 43(1): 79–87.
- PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352(9139): 1498–1504.
- Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. *Neurology* 1995; 45(7): 1268–1276.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdová E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006; 354(9): 899–910.
- Sorensen PS, Fazekas F, Lee M. Intravenous immunoglobulin G for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a meta-analysis. *Eur J Neurol* 2002; 9(6): 557–563.
- Smith DR, Weinstock-Guttman B, Cohen JA, Wei X, Gutmann C, Bakshi R et al. A randomized blinded trial of combination therapy with cyclophosphamide in patients with active multiple sclerosis on interferon beta. *Mult Scler* 2005; 11(5): 573–582.
- Edan G, Miller D, Clanet M, Confavreux C, Lyon-Caen O, Lubetzki C et al. Therapeutic effect of mitoxantrone combined with methylprednisolone in multiple sclerosis: a randomised multicentre study of active disease using MRI and clinical criteria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62(2): 112–118.
- Le Page E, Leray E, Taurin G, Coustans M, Chaperon J, Morrissey SP et al. Mitoxantrone as induction treatment in aggressive relapsing remitting multiple sclerosis: treatment response factors in a 5 year follow-up observational study of 100 consecutive patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008; 79(1): 52–56.
- European Study Group on interferon beta-1b in secondary progressive MS. Placebo-controlled multicentre randomised trial of interferon beta-1b in treatment of secondary progressive multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352(9139): 1491–1497.
- Weiner HL, Mackin GA, Orav EJ, Hafler DA, Dawson DM, LaPierre Y et al. Intermittent cyclophosphamide pulse therapy in progressive multiple sclerosis: final report of the Northeast Cooperative Multiple Sclerosis Treatment Group. *Neurology* 1993; 43(5): 910–918.
- Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet* 2002; 360(9350): 2018–2025.
- Karussis DM, Slavin S, Lehmann D, Mizrahi-Koll R, Abramsky O, Ben-Nun A. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis and induction of tolerance with acute immunosuppression followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J Immunol* 1992; 148(6): 1693–1698.
- Karussis DM, Slavin S, Ben-Nun A, Ovadia H, Vourka-Karussis U, Lehmann D et al. Chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CR-EAE): treatment and induction of tolerance, with high dose cyclophosphamide followed by syngeneic bone marrow transplantation. *J Neuroimmunol* 1992; 39(3): 201–210.
- van Gelder M, Kinwel-Bohré EP, van Bekkum DW. Treatment of experimental allergic encephalomyelitis in rats with total body irradiation and syngeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 1993; 11(3): 233–241.
- Burt RK, Padilla J, Begolka WS, Canto MC, Miller SD. Effect of disease stage on clinical outcome after syngeneic bone marrow transplantation for relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* 1998; 91(7): 2609–2616.
- Ikehara S, Good RA, Nakamura T, Sekita K, Inoue S, Oo MM et al. Rationale for bone marrow transplantation in the treatment of autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(8): 2483–2487.
- van Bekkum DW. Stem cell transplantation for autoimmune disorders. Preclinical experiments. *Best Pract Res Clin Haematol* 2004; 17(2): 201–222.
- McAllister LD, Beatty PG, Rose J. Allogeneic bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia in a patient with multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(4): 395–397.
- Snowden JA, Patton WN, O'Donnell JL, Hannah EE, Hart DN. Prolonged remission of longstanding systemic lupus erythematosus after autologous bone marrow transplant for non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19(12): 1247–1250.
- Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kapinas K, Sakellari I, Kimiskidis V et al. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 1997; 20(8): 631–638.
- Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kapinas K, Sakellari I, Kimiskidis V et al. Autologous stem cell transplantation in progressive multiple sclerosis – an interim analysis of efficacy. *J Clin Immunol* 2000; 20(1): 24–30.
- Kozák T, Havrdová E, Pitha J, Gregora E, Pytlík R, Maaloufová J et al. High-dose immunosuppressive therapy with PBPC support in the treatment of poor risk multiple sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25(5): 525–531.
- Su L, Xu J, Ji BX, Wan SG, Lu CY, Dong HQ et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Int J Hematol* 2006; 84(3): 276–281.
- Xu J, Ji BX, Su L, Dong HQ, Sun XJ, Liu CY. Clinical outcomes after autologous haematopoietic stem cell transplantation in patients with progressive multiple sclerosis. *Chin Med J (Engl)* 2006; 119(22): 1851–1855.
- Shevchenko YL, Novik AA, Kuznetsov AN, Afanasiev BV, Lisukov IA, Kozlov VA et al. High-dose immunosuppressive therapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation as a treatment option in multiple sclerosis. *Exp Hematol* 2008; 36(8): 922–928.
- Samijn JP, te Boekhorst PA, Mondria T, van Doorn PA, Flach HZ, van der Meché FG et al. Intense T cell depletion followed by autologous bone marrow transplantation for severe multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(1): 46–50.
- Carreras E, Saiz A, Marín P, Martínez C, Rovira M, Villamor N et al. CD34+ selected autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple sclerosis: report of toxicity and treatment results at one year of follow-up in 15 patients. *Haematologica* 2003; 88(3): 306–314.
- Loh SM, Ratnagopal P, Tan HC, Goh YT, Koh BC, Koh LP et al. Successful autologous hematopoietic stem cell transplantations for severe multiple sclerosis with fludarabine and cyclophosphamide conditioning. *Int J Hematol* 2006; 83(4): 368–369.
- Burt RK, Cohen BA, Russell E, Spero K, Joshi A, Oyama Y et al. Hematopoietic stem cell transplanta-

AUTOLOGNÍ TRANSPLANTACE KMENOVÝCH KRVETVORNÝCH BUNĚK

tion for progressive multiple sclerosis: failure of a total body irradiation-based conditioning regimen to prevent disease progression in patients with high disability scores. *Blood* 2003; 102(7): 2373–2378.

41. Openshaw H, Lund BT, Kashyap A, Atkinson R, Sniecinski I, Weiner LP et al. Peripheral blood stem cell transplantation in multiple sclerosis with busulfan and cyclophosphamide conditioning: report of toxicity and immunological monitoring. *Biol Blood Marrow Transplant* 2000; 6(5A): 563–575.

42. Gualandi F, Bruno B, Van Lint MT, Luchetti S, Uccelli A, Capello E et al. Autologous stem cell transplantation for severe autoimmune diseases: a 10-year experience. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1110: 455–464.

43. Fassas A, Passweg JR, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kozak T, Havrdova E et al. Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. A retrospective multicenter study. *J Neurol* 2002; 249(8): 1088–1097.

44. Saccardi R, Kozak T, Bocelli-Tyndall C, Fassas A, Kazis A, Havrdova E et al. Autologous stem cell transplantation for progressive multiple sclerosis: update of the European Group for Blood and Marrow Transplantation autoimmune diseases working party database. *Mult Scler* 2006; 12(6): 814–823.

45. Kurtzke JF. Disability rating scales in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1984; 436: 347–360.

46. Saiz A, Blanco Y, Carreras E, Berenguer J, Rovira M, Pujol T et al. Clinical and MRI outcome after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology* 2004; 62(2): 282–284.

47. Saiz A, Blanco Y, Berenguer J, Gómez-Choco M, Carreras E, Arbizu T et al. Clinical outcome 6 years after autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Neurologia* 2008; 23(7): 405–407.

48. Mancardi G, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem-cell transplantation in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7(7): 626–636.

49. Bowen J. High-Dose Immunosuppression and Autologous Transplantation for Multiple Sclerosis (HALT MS) Study. Dostupné z URL: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00288626?term=halt+ms&rank=1>.

50. Burt R. Stem Cell Therapy for Patients With Multiple Sclerosis Failing Interferon A Randomized Study. Dostupné z URL: <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00273364?term=transplantation+and+multiple+sclerosis&rank=10>.

51. Nash RA, Bowen JD, McSweeney PA, Pavletic SZ, Maravilla KR, Park MS et al. High-dose immunosuppressive therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation for severe multiple sclerosis. *Blood* 2003; 102(7): 2364–2372.

52. Mancardi GL, Saccardi R, Filippi M, Gualandi F, Murialdo A, Inglese M et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd-enhanced MRI activity in MS. *Neurology* 2001; 57(1): 62–68.

53. Filippi M, Rovaris M, Capra R, Gasperini C, Youstry TA, Sormani MP et al. A multi-centre longitudinal study comparing the sensitivity of monthly MRI after standard and triple dose gadolinium-DTPA for monitoring disease activity in multiple sclerosis. Implications for phase II clinical trials. *Brain* 1998; 121(10): 2011–2020.

54. Saccardi R, Mancardi GL, Solari A, Bosi A, Bruzzi P, Di Bartolomeo P et al. Autologous HSCT for severe progressive multiple sclerosis in a multicenter trial: impact on disease activity and quality of life. *Blood* 2005; 105(6): 2601–2607.

55. Inglese M, Mancardi GL, Pagani E, Rocca MA, Murialdo A, Saccardi R et al. Brain tissue loss occurs after suppression of enhancement in patients with multiple sclerosis treated with autologous haematopoietic stem cell transplantation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75(4): 643–644.

56. Chen JT, Collins DL, Atkins HL, Freedman MS, Galal A, Arnold DL. Brain atrophy after immunoablation and stem cell transplantation in multiple sclerosis. *Neurology* 2006; 66(12): 1935–1937.

57. Roccatagliata L, Rocca M, Valsasina P, Bonzano L, Sormani M, Saccardi R et al. The long-term effect of AHST on MRI measures of MS evolution: a five-year follow-up study. *Mult Scler* 2007; 13(8): 1068–1070.

58. Rocca MA, Mondria T, Valsasina P, Sormani MP, Flach ZH, Te Boekhorst PA et al. A three-year study of brain atrophy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in rapidly evolving secondary progressive multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 2007; 28(9): 1659–1661.

59. Metz I, Lucchinetti CF, Openshaw H, Garcia-Merino A, Lassmann H, Freedman MS et al. Autologous haematopoietic stem cell transplantation fails to stop demyelination and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Brain* 2007; 130(5): 1254–1262.

60. Martin R. Is haematopoietic stem cell transplantation a treatment option for severe MS or not? *Brain* 2007; 130(5): 1181–1182.

61. Nash RA, Stuve O, Bowen JD, Frohman EM, Griffith LM, Hutton GJ et al. Autologous HSCT for advanced MS: is the glass half-empty or really half-full? *Brain* 2008; 131(2): e89.

62. Miller DH, Barkhof F, Frank JA, Parker GJ, Thompson AJ. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain* 2002; 125(8): 1676–1695.

63. Chen JT, Collins DL, Atkins HL, Freedman MS, Arnold DL; Canadian MS/BMT Study Group. Magnetiza-

tion transfer ratio evolution with demyelination and remyelination in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 2008; 63(2): 254–262.

64. Fassas A, Mancardi GL. Autologous hemopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: Is it worthwhile? *Autoimmunity* 2008; 41(8): 601–610.

65. Sun W, Papat U, Hutton G, Zang YC, Krance R, Carrum G et al. Characteristics of T-cell receptor repertoire and myelin-reactive T cells reconstituted from autologous haematopoietic stem-cell grafts in multiple sclerosis. *Brain* 2004; 127(5): 996–1008.

66. Muraro PA, Douek DC, Packer A, Chung K, Gue-naga FJ, Cassiani-Ingoni R et al. Thymic output generates a new and diverse TCR repertoire after autologous stem cell transplantation in multiple sclerosis patients. *J Exp Med* 2005; 201(5): 805–816.

67. de Kleer I, Vastert B, Klein M, Teklenburg G, Arkesteijn G, Yung GP et al. Autologous stem cell transplantation for autoimmunity induces immunologic self-tolerance by reprogramming autoreactive T cells and restoring the CD4+CD25+ immune regulatory network. *Blood* 2006; 107(4): 1696–1702.

68. Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD, Crain B. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(3): 1364–1369.

69. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297(5590): 2256–2259.

70. Castro RF, Jackson KA, Goodell MA, Robertson CS, Liu H, Shine HD. Failure of bone marrow cells to transdifferentiate into neural cells in vivo. *Science* 2002; 297(5585): 1299.

71. Burt RK, Fassas A, Snowden J, van Laar JM, Kozak T, Wulffraat NM et al. Collection of hematopoietic stem cells from patients with autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 2001; 28(1): 1–12.

72. Statkute L, Verda L, Oyama Y, Traynor A, Villa M, Shook T et al. Mobilization, harvesting and selection of peripheral blood stem cells in patients with autoimmune diseases undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39(6): 317–329.

73. Openshaw H, Stuve O, Antel JP, Nash R, Lund BT, Weiner LP et al. Multiple sclerosis flares associated with recombinant granulocyte colony-stimulating factor. *Neurology* 2000; 54(11): 2147–2150.

74. Gratwohl A, Passweg J, Bocelli-Tyndall C, Fassas A, van Laar JM, Farge D et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diseases. *Bone Marrow Transplant* 2005; 35(9): 869–879.

www.csnn.eu