

ABSTRAKT

Navzdory obrovskému pokroku v medicíně zůstává poranění centrálního nervového systému bez uspokojivého řešení. Regenerativní medicína využívá tkáňové inženýrství, buněčnou terapii, zdravotní protetiku, genovou terapii nebo růstové faktory s cílem přemostit lézi, opravit poškozená spojení a zlepšit endogenní regeneraci tak, aby došlo k obnově neurální funkce.

Cílem mé práce bylo zhodnotit terapeutický potenciál dvou přístupů, transplantace lidských mezenchymálních stromálních buněk (hMSC) a biologických hydrogelů získaných z extracelulární matrix (ECM) v regeneraci nervové tkáně u modelů míšního poranění.

První část práce je věnovaná charakterizaci hMSC z různých zdrojů – kostní dřevě (KD), tukové tkáně (AT) a Whartonova rosolu (WJ). Všechny typy buněk splnily minimální kritéria pro fenotyp MSC a vykazovaly podobné vlastnosti z hlediska exprese povrchových markerů, diferenciačního potenciálu, migrační kapacity a sekrece cytokinů a růstových faktorů. Pupečnicková a tuková tkáň však vzhledem ke kostní dřevě poskytovaly významně vyšší výtěžky buněk a MSCs izolované z těchto tkání proliferovaly lépe než hBM-MSCs.

Terapeutický účinek intratekální aplikace hWJ-MSCs byl posléze vyhodnocen na kompresním modelu míšního poranění u potkanů. Byl porovnán účinek nízké (0,5 milionu) a vysoké (1,5 milionu) dávky hWJ-MSCs v jedné nebo opakované (3x) aplikaci. Jednorázová i opakovaná transplantace vysoké dávky buněk měla zjevný příznivý účinek na regeneraci nervové tkáně a vyústila ve větší zachování šedé hmoty a zvýšení počtu GAP43+ axonů, snížení astrogliózy, snížení exprese zánětlivých a apoptotických markerů. Významné obnovení funkčního výsledku bylo pozorováno ve všech buněčných skupinách s výjimkou jednorázové aplikace nízkého počtu buněk. Pozorovali jsme, že účinek hWJ-MSCs se zvyšoval v závislosti od dávky a byl dále potencován opakovanou aplikací.

Ve třetí části tohoto projektu jsme připravili biologické ECM hydrogely decelularizací tkáně centrální nervové soustavy (CNS: prasečího mozku a míchy) a jiných tkání (prasečí močový měchýř a lidská pupeční šňůra). Tyto byly implantovány samostatně a v kombinaci s hWJ-MSCs, aby přemostili lézi míšního poranění. Hydrogely ze všech typů ECM byly charakterizovány z hlediska složení, mechanických a biologických vlastností.

In vitro srovnání ECM hydrogelů ukázalo, že i přes různý původ, topografii a složení mají všechny ECM hydrogely podobné biologické účinky na migraci hMSC, diferenciaci neurálních kmenových buněk a růst axonů.

ECM hydrogely připravené z prasečí míchy (SC) a močového měchýře (UB) byly hodnoceny *in vivo* po jejich implantaci do míšní hemisekce u potkanů. Oba typy ECM hydrogelů byly dobře integrovány do léze a stimulovaly neovaskularizaci a axonální růst. Analýza genové exprese prokázala významné snížení exprese genů souvisejících s imunitní odpovědí a zánětem u obou typů hydrogelů. Nebyl však prokázán benefiční účinek tkáňově specifického ECM hydrogelu izolovaného z SC. Kombinace hWJ-MSC s SC-ECM více nepodpořila vrůstání axonů a krevních cév do léze ve srovnání s implantací samotného hydrogelu.

Závěrem, výsledky této práce ukazují, že oba studované přístupy, transplantace hWJ-MSC i přemostění léze pomocí ECM hydrogelů mají pozitivní vliv na regeneraci nervové tkáně a jsou proto silnými kandidáty na translaci do klinického prostředí. Potvrdili jsme hypotézu, že opakované intratekální podání hWJ-MSC vedlo k potenciaci terapeutického efektu kmenových buněk po míšním poranění a tento léčebný postup je také vhodný pro klinickou praxi. Zatímco transplantace hWJ-MSC je již ověřována v klinických studiích, přípravu ECM hydrogelů je třeba dále optimalizovat, zejména pokud jde o jejich rychlou *in vivo* degradaci.

Klíčová slova: regenerace, nervová tkáň, míšní poranění, mezenchymální stromální buňky, kostní dřev, tuková tkáň, Whartonův rosol, extracelulární matrix, hydrogel, pupečník