

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Roman Gajdoš

Indukované pluripotentní kmenové buňky
a jejich využití k léčbě míšního poranění a ALS

The use of induced pluripotent stem cells in the treatment of spinal cord injury and ALS

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Pavla Jendelová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jitka Žurmanová, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení

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

V Praze, 12. 5. 2016

Podpis.....

Poděkování

Chtěl bych poděkovat zejména své školitelce doc. RNDr. Pavlě Jendelové, Ph.D. za její cenné rady, vstřícnost a trpělivost poskytovanou během psaní této bakalářské práce. Poděkování také patří mé studijní kolegyni Bc. Markétě Hoškové za finální revizi textu.

Abstrakt

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs) se staly novým fenoménem regenerativní medicíny. Je zřejmé, že sdílejí některé společné vlastnosti s embryonálními kmenovými buňkami (ESCs), jako jsou kmenovost, sebeobnova, diferenciační potenciál. iPSCs mají navíc tu vlastnost, že mohou být derivovány na míru pacientovi, a není proto nutné podávat imunosupresiva. S ESCs se dále pojí kontroverze s jejich získáváním výhradně z embryí. U iPSCs můžeme jako jejich zdroj použít kteroukoliv somatickou buňku (preferenčně jsou využívány fibroblasty díky své snadné dostupnosti). Jejich reprogramováním transkripčním koktejlem (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC / OCT4, SOX2, NANOG, LIN28) se získá linie nediferencovaných iPSCs, které se dále diferencují například do neuronálních prekurzorů (iNPs). Takto připravené buňky lze transplantovat do místa poranění, kde pomáhají regeneraci tkáně příjemce různými mechanismy, jako jsou buněčná náhrada či podpora tvorby trofických faktorů. Přesto ale stále existuje riziko tumorigeneze či nízké výtěžnosti při samotné přípravě, což omezuje využití těchto buněk v klinické praxi. Ve své bakalářské práci se proto především zaměřím na to, jaký je terapeutický efekt iPSCs v preklinických studiích, jak jsou využívány pro léčbu neurodegenerativních onemocnění, jako je amyotrofická laterální skleróza (ALS), a akutního poškození míchy.

Klíčová slova: iPSCs, diferenciace, neuronální prekurzory, neurodegenerativní onemocnění, ALS, míšní poranění

Abstract

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have become a new phenomenon of regenerative medicine. It is obvious that they share some common characteristics with embryonic stem cells (ESCs) such as stemness potential, self-renewal p., differentiation p. iPSCs retain their epigenetic memory, allowing becoming patient-specific and so it is not necessary to apply immunosuppressants. The use of ESCs is controversial, because their acquisition is associated with embryo destruction. As a cell source for iPSCs derivation we can use any somatic cells, however, fibroblasts are preferably used due to their easy availability. With transcriptional reprogramming cocktail (OCT4, SOX2, KLF4, c- MYC / OCT4, SOX2, NANOG, LIN28) we can obtain required iPSCs line, which is then further differentiated into neural precursors (NPCs). These cells can be grafted into lesion site, where they can facilitate regeneration by several mechanisms (cell replacement, protective effect, facilitation the expression of trophic factors). Nevertheless, here we are still dealing with the risk of tumorigenesis or low cell derivation efficiency that limits the use of iPSCs in clinical practice. In this thesis we will therefore mainly focus on the therapeutic potential of iPSCs in preclinical studies, their use in the treatment of neurodegenerative diseases such as amyotrophic lateral sclerosis and in the treatment of acute spinal cord injury.

Key words: iPSCs, differentiation, neural precursors, neurodegenerative diseases, ALS, spinal cord injury

OBSAH

1. Úvod	1
2. Pluripotentní kmenové buňky	2
2.1. Historie ESCs	2
2.2. Historie iPSCs.....	3
2.3. Charakteristika ESCs.....	4
2.4. Charakteristika iPSCs	5
3. Derivace iPSCs	6
3.1. Cesta k pluripotenci	6
3.2. Pluripotentní faktory a jejich přenos do buněk.....	7
3.3. Nové metody zvyšující účinnost derivace iPSCs	8
3.4. Přenos faktorů do somatických buněk.....	9
4. Tvorba buněčných prekurzorů	10
5. Poškození CNS	14
5.1. Amyotrofická laterální skleróza (též Lou Gehrigova nemoc, ALS).....	14
5.2. Míšní poranění (MP)	16
6. Experimentální modely pro MP a ALS	18
6.1. Modely pro MP.....	18
6.2. Transgenní modely pro ALS	20
7. Transplantace buněk	21
8. Evaluace účinku prekurzorů iPSCs	22
3.1. Behaviorální testy (Sledování neurologických funkcí)	22
8.1.1. Basso-Beattie-Bresnehan test („BBB“, „Open Field“).....	22
8.1.2. Chůze po kladině („Beam Walk“)......	22
8.1.3. Plantární test („Plantar test“)	23
8.1.4. Rotarod	23
8.1.5. „Grip Strenght“ test	24
8.2. Přežívání a diferenciací buněk a jejich imunohistochemická analýza	24
8.3. Srovnání výsledků vybraných preklinických studií.....	26
9. Diskuze a závěr	27
10. Přehled použité literatury	28

SEZNAM ZKRATEK

iPSCs	– indukované pluripotentní buňky
ESCs	– embryonální kmenové buňky
EC	– embryonální karcinoma buňky
MSCs	– mesenchymální kmenové buňky
CNS	– centrální nervová soustava
ALS	– amyotrofická laterální skleróza
MP	– míšní poranění
IVF	– <i>in vitro</i> fertilizace
OSKM	– čtyři transkripční faktory OCT4, SOX2, NANOG a Lin28
BAM	– transdiferenciační koktejl faktorů Brn2/Pou3f2, Ascl1/MASH1 a Myt11
FGF	– fibroblastový růstový faktor
iNPs	– indukované neuronální prekurzory
iPSCs-NPs	– derivované neuronální prekurzory z iPSCs
FALS	– familiární forma ALS
SALS	– sporadická forma ALS
SOD1	– superoxid dismutáza 1

1. ÚVOD

Lidské embryonální kmenové buňky (ESCs), získávané z embryoblastu blastocyst (Thomson *et al.*, 1998), jsou pluripotentní buňky schopné sebeobnovy s neomezeným diferenciacním potenciálem v rámci tří zárodečných vrstev – ektodermu, mezodermu a entodermu. Zároveň umožňují dlouhodobou kultivaci *in vitro*. Ve výzkumu i preklinických studiích jsou využívány v buněčné terapii zejména pro buněčnou náhradu či trofickou podporu, jmenovitě pro terapeutickou léčbu různých poruch centrální nervové soustavy (poškození míchy, neurodegenerativní onemocnění...), autoimunitních onemocnění (revmatoidní artritida, cukrovka...) i léčbu rakoviny. Ve své bakalářské práci se zaměřím na indukované pluripotentní buňky (iPSCs), které otevřely nové perspektivy regenerativní medicíny.

Limitace zisku a využití lidských ESCs vedly k hledání alternativní cesty získávání lidských kmenových buněk s pluripotentním charakterem, což se zdařilo v roce 2007 v Japonsku, kde vědecký tým získal iPSCs pomocí zvýšené exprese kombinace čtyř transkripčních faktorů OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC (Takahashi *et al.*, 2007) nebo OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 (Yu *et al.*, 2007). iPSCs svými vlastnostmi připomínají lidské ESCs, jelikož mají stejný diferenciacní potenciál, schopnost sebeobnovy, kmenovost, ale navíc jsou určeny specificky pro jednotlivého pacienta, čímž vylučují nutnost použití imunosupresiv. Existují tu však i stejná rizika jako u linií lidských ESCs, kterými jsou tvorba tumoru, nízká výtěžnost přípravy buněk, možný přenos zvířecích virů a podobně.

Teoretické využití iPSCs je takřka neomezené. Startovací buněčnou linií pro jejich vznik může být jakákoliv somatická buňka. Preferovaným typem jsou fibroblasty, kvůli své snadné izolaci a početnosti (Takahashi *et al.*, 2007). Získaná nediferencovaná buněčná linie iPSCs se diferencuje pomocí různých faktorů v buněčné prekurzory sloužící k transplantaci. Sleduje se doba přežití transplantovaných buněk, jejich migrace, diferenciacce a komunikace s hostitelskou tkání a v neposlední řadě i jejich terapeutický potenciál.

Především láká využití iPSCs při léčbě poškození mozku a míchy. Centrální nervová soustava (CNS) je limitována schopností neurogeneze, což neumožňuje potřebnou reparaci tkáně. K neurogenезi v dospělém mozku savců čitelně dochází pouze v hippokampu (Gage *et al.*, 1995; Palmer *et al.*, 1997) a subventrikulární zóně (Reynolds & Weiss, 1992; Richards *et al.*, 1992). S trendem stárnoucí populace se stále častěji objevují neurodegenerativní onemocnění, která zatím nejsou účinně léčitelná.

Ve své práci se zaměřím především na akutní poškození míchy a amyotrofickou laterální sklerózu (ALS), tedy na typy traumatického a neurodegenerativního onemocnění, a na možnosti jejich terapeutické léčby. Cílem je zjistit, zda preklinické studie dosahují očekávaných výsledků a bezpečnosti, zdali jsou iPSCs vhodné pro léčbu poškozeného mozku a míchy v regenerativní medicíně a zda jsou momentálně dostupné metody, spojené s transplantacemi iPSCs, dostačující pro budoucí klinické studie.

2. PLURIPOTENTNÍ KMENOVÉ BUŇKY

Pod pojmem pluripotentní kmenová buňka se skrývá buňka s téměř neomezeným diferenciačním potenciálem. Může tvořit tkáň všech tří zárodečných listů, s výjimkou extraembryonální tkáň, což neumožňuje vznik nového jedince. Úplný diferenciační potenciál nabízí pouze zygota nebo totipotentní buňka, jež jsou součástí jeden až tři dny starého embrya (čtyř až osmibuněčné stadium blastuly).

2.1. Historie ESCs

Pokud bychom hledali první zmínky o kmenových buňkách, našly bychom je kolem roku 1878, kdy Ernestem Haeckelem použil pojem „stammzelle“, jako označení pro nediferencované buňky (Ramalho-Santos & Willenbring, 2007).

Významným mezníkem byl až rok 1960, kdy se během studia teratokarcinomů poprvé objevila **embryonální karcinoma buňky (EC)**, jako dosud neznámý typ kmenových buněk, tehdy považovaných za multipotentní (Kleinsmith *et al.*, 1964). Teratokarcinom je zhoubný typ teratomu, často tvořící tkáň ze všech tří typů zárodečných vrstev. Teratom sice dokazuje, že buňky mají pluripotentní charakter, ale zároveň je jedním z vyskytujících se rizikových faktorů použití kmenových buněk (Semintore *et al.*, 2010). EC tvoří ojedinělý typ tumoru v rámci pohlavních buněk, vyskytujících se u spermií i oocytů, a na základě schopnosti tvorby tkáňově specifických typů buněk byly mylně charakterizovány jako multipotentní. V 70. letech ale došlo k zásadní změně v chápání diferenciačního potenciálu EC, což podnítilo jejich injikování do blastocysty a následně i vývoj chimerické myši (Martin, 1980). Chiméru tvoří geneticky odlišné tkáň, což popřelo domněnku o multipotenci EC. Od té doby jsou považovány za pluripotentní.

Ke kýženému objevu ESCs, derivovaných z vnitřní buněčné masy blastocysty myši, a vytvoření vhodných podmínek pro *in vitro* kultivaci došlo v roce 1981. Linie ESCs byla potvrzena tím, že po transplantaci do myši vytvářela teratomy (Evans *et al.*, 1981; Martin, 1981).

Tematika EC se objevuje znovu, ale tentokrát se jednalo o buňky odvozené z buněčné linie Tera-2 testikulárního karcinomu. Poprvé byly udržovány v *in vitro* podmínkách a jejich morfologie, povrchové markery a jiné znaky vypovídaly o tom, že se jedná o lidské EC. Jde o první popsanou linii, která si zachovává schopnost diferenciaci v jiné somatické buňky, například „neuron-like“ buňky (Andrews *et al.*, 1984; Thompson *et al.*, 1984).

Thomson o několik let později uskutečnil pokusy s izolací lidských ESCs z vnitřní buněčné masy blastocysty, která byla darována pro výzkum z nepoužitých *in vitro* fertilizací (IVF). Stanovil podmínky pro jejich růst v médiu, testoval jejich karyotyp, telomerázovou aktivitu, expresi stanovených markerů i po několikátém pasážování, a tím dokázal jejich nediferencovaný stav (Thomson *et al.*, 1998).

V dalších letech se objevuje mnoho nových vědeckých studií pojednávajících o dokonalejších metodách. Rozpracovaly se metody diferenciacních protokolů, například do kardiomyocytů či pankreatických buněk pro transplantační účely. Přesto se s ESCs pojí kontroverze s jejich získáváním z IVF blastocyst, protože se procesem destruuji. Je známo, že proto v roce 2001 tehdejší prezident George Bush zastavil výzkum embryonálních buněk financovaný státem. Ve svých projevech vyzýval k hledání jiné alternativy, kde by nebyla používána lidská „embrya“. Barack Obama ale v roce 2009 financování výzkumu obnovil. V USA a v některých evropských zemích tak zůstává používání ESCs problémem.

2.2. Historie iPSCs

Za první případ indukované pluripotence lze považovat pokus s klonováním ovce Dolly, kdy se jednalo o přenos jádra z dospělé somatické buňky do oocyty. Pokus se sice zdařil, ale ovce brzy zahynula na multiorgánové selhání (Wilmut *et al.*, 1997). Od té doby se tematice indukované pluripotence věnovali vědci intenzivněji, hledající způsob bez nutného jaderného transféru.

V roce 2006 přišel s průlomovým objevem Shinya Yamanaka, když získal linii nediferencovaných iPSCs pomocí indukce čtyř transkripčních faktorů u myších fibroblastů. Na začátku tým stanovili 24 genů, které by potenciálně měly zajistit pluripotenci známé

z linie ESCs. Pro transfer byla využita retrovirální transfekce. Jak jsem již zmínil, „genoví“ kandidáti zůstali nakonec čtyři (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) (Takahashi & Yamanaka, 2006). Po roce se zdařil experiment i na lidských adultních fibroblastech se stejnou čtveřicí faktorů (Takahashi *et al.*, 2007).

Další skupině vědců, pod vedením Thomsona, se podařilo vyvolat indukovanou pluripotenci s jinou kombinací transkripčních faktorů (**OSKM**), kdy faktory KLF4 a c-Myc byly nahrazeny za NANOG a Lin28 kvůli onkogenímu charakteru c-Myc (Yu *et al.*, 2007).

V následujících letech se vědecké skupiny pokoušely o jiné alternativy indukce pluripotence, využívající méně rizikový typ transferu faktorů, menší počet faktorů či jejich úplné náhrady za chemické látky. Nadějnou cestou je i takzvaná **transdiferenciace**, která úplně vynechává nediferencované stadium pluripotence a hned vytváří ze somatické linie například kardiomyocyty nebo nervové buňky (Vierbuchen, 2010; Ieda, 2010; Abdullah *et al.*, 2012). Tyto výzkumy probíhají dodnes, přesto ale ESCs stále zůstávají stále „zlatým standardem“ pro výzkum indukované pluripotence.

2.3. Charakteristika ESCs

ESCs se nacházejí v buněčné masě uvnitř blastocysty staré čtyři až pět dní. Z ní postupně vzniká primitivní ektoderm, později se diferencující během procesu gastrulace v zárodečné vrstvy ektodermu, mezodermu a entodermu. Blastocysty se získávají z darovaných nepoužitých preimplantačních embryí. Po vyjmutí vnitřní buněčné masy neboli embryoblastu dojde k destrukci embrya, což s sebou nese etické problémy. Takto izolované ESCs se přenesou na kultivační médium s podpůrnou vrstvou fibroblastů, kde rostou a proliferyjí. Jako důkaz své schopnosti pluripotence musí ESCs po vyjmutí tvořit embryoidní tělíska a teratomy (Thomson *et al.*, 1998).

Mezi základní vlastnosti ESCs patří kmenovost, schopnost sebeobnovy, pluripotentní diferenciací potenciál a schopnost proliferace. Sdružení International Stem Cell Initiative, kam mimo jiné patří i oddělení biologie lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně, charakterizovalo 59 embryonálních linií, které se používají celosvětově (tři jsou z ČR). Spojují je podobné expresní znaky typické pro ESCs linie. Patří sem glykolipidové antigeny SSEA3 a SSEA4, keratan sulfátové antigeny TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM2, GCT343 a proteinové antigeny CD9, Thy1, tkáňově nespecifická alkalická fosfatáza, HLA třídy 1 a geny NANOG, POU5F1 (OCT4), TDGF1, DNMT3B, GABRB3, GDF3 a další (Adewumi

et al., 2007). Účelem uvedeného celosvětového sdružení bylo poskytnout systematický a srovnávací průzkum všech linií ESCs.

Vlastností ESCs se využívá zejména v oblasti buněčné terapie především dvojitým způsobem. Zprvce slouží k vytváření buněčných prekurzorů, které v tkáni diferencují do specifických buněk pro danou oblast nebo mohou nahrazovat poškozené buňky, dopomáhat jim k regeneraci přes růstové faktory, cytokiny a podobně. A za druhé mohou sloužit i jako modely pro léčbu různých nemocí či poškození, neboť na nich lze zkoumat účinnost nově vyvíjených farmaceutik, toxicitu a různé mechanismy související s vývojem.

Jsou popsány případy, kdy se podařilo diferencovat buňky pluripotentní do buněk s typickou patofyziologií daných poruch, jakou jsou Parkinsonova choroba (Lindvall & Kokaia, 2009), ALS (Dimos *et al.*, 2008), Huntingtonova choroba (Park *et al.*, 2008), diabetes mellitus (Kroon *et al.*, 2008), Duchenneova a Beckerova muskulární dystrofie (Ebert *et al.*, 2009), infarkt myokardu (Pal, 2009), iktus (Semintore *et al.*, 2010) a míšní poranění (MP) (Aznar & Sanchez, 2011). ESCs se bohužel omezují jen na allogenní podání. Navíc je etiologie uvedených chorob velice komplikovaná, a proto se stává, že zvířecí modely nemusí podávat objektivní hledisko pro klinické terapie. Každopádně iPSCs by mohly tento problém osvětlit a být přínosem pro hlubší porozumění i léčbu zmíněných poruch.

2.4. Charakteristika iPSCs

iPSCs se získávají dediferenciací somatických buněk. Přednostně se využívají fibroblasty pro nejméně invazivní způsob izolace a snadnou expanzi (Abdullah *et al.*, 2012). iPSCs mají podobné vlastnosti jako ESCs, to jest kmenovost, schopnost proliferace, schopnost sebeobnovy a pluripotentní potenciál. Získáním nediferencované linie iPSCs pomocí čtyř transkripčních faktorů OSKM (Yu *et al.*, 2007), vnesených retrovirálními, entivirálními, adenovirálními, plasmidovými či proteinovými vektory (Wang *et al.*, 2010), nezískáme pouze buňky vykazující vysoký stupeň podobnosti s ESCs, ale navíc epigeneticky identické s dárcovskou tkání. Je proto možné pacientovi například odebrat vzorek kůže, z něj vytvořit „na míru ušité“ iPSCs. Pomocí nich ho bude možné léčit, neboť iPSCs lze dále diferenciovat do buněk specifických, jako jsou neurony, kardiomyocyty, insulin produkující buňky, endoteliální a hematopoetické buňky (Chambers *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009a; Zhang *et al.*, 2009b; Choi *et al.*, 2009).

Vědci zkoumají iPSCs, jejich vlastností, omezení, podobnosti a rozdíly s ESCs už od roku 2006 (Takahashi & Yamanaka, 2006; Yamanaka, 2012). Roste také řada reprogramovacích protokolů do iPSCs linií, které buď alternují již objevené techniky, nebo zkoušejí nové, s cílem zlepšit výtěžnost a čistotu linií. Za zmínku stojí například transdiferenční protokol, který úplně pomíjí nediferencované stadium iPSCs a rovnou vytváří indukované prekurzory použitím **BAM koktejlu** (Brn2/Pou3f2, Ascl1/MASH1 a Myt11) (Abdullah *et al.*, 2012). Zkoumané techniky by mohly pomoci vyřešit jeden z problémů možného tumorogenního charakteru iPSCs. V léčebné praxi by v budoucnu iPSCs mohly nahradit ESCs. První klinické testy již ve světě probíhají. Prvním schváleným testováním byla léčba věkem podmíněné makulární degenerace, provedené v Japonsku v roce 2013 (Mead *et al.*, 2015), studie ale byla pozastavena z důvodu výskytu mikromutací u jednoho z pacientů.

3. DERIVACE iPSCs

3.1. Cesta k pluripotenci

Doklady pluripotence nalezneme už v klonování savců (Wilmut *et al.*, 1997), které dokazuje, že buněčné jádro obsahuje potřebnou dědičnou informaci pro vývoj a oocyt potřebné faktory pro reprogramování jádra somatických buněk. Dlouhou dobu převládal názor, že proces reprogramování buněčného jádra souvisí s demetylací CpG ostrůvků, a tím s aktivací klíčových pluripotentních genů. Metylace má totiž významný vliv na transkripční aktivitu. V ESCs jsou pluripotentní geny nemetylované a naopak v somatických buňkách jsou tyto geny již metylovány, a tím umlčeny (Pfannkuche *et al.*, 2010). Mezi vědci se vytvořilo několik skupin zkoumajících buněčné jaderné reprogramování a hledající hlavní regulační faktory. Jedním z takovýchto regulátorů byl **transkripční faktor MyoD**, který umí reprogramovat fibroblast do myocytu (Davis *et al.*, 1987). Základní přelom se odehrál v roce 2006, kdy byly získány iPSCs použitím transkripčního koktejlu OSKM. Význam objemu podtrhlo získání Nobelovy ceny. Úspěchu by ale nebylo dosaženo bez výzkumů v oblasti ESCs, které se na této tematice zásadně podílejí. S první derivací ESCs se totiž stanovily podmínky pro jejich dlouhodobou kultivaci **fibroblastovým růstovým faktorem (FGF)** (Evans *et al.*, 1981; Martin, 1981), bez kterých by nebylo možné pokročit ve výzkumu kmenových buněk.

3.2. Pluripotentní faktory a jejich přenos do buněk

Metodika přípravy iPSCs zahrnuje dvě oblasti zkoumání. První se zabývá samotnou studií vzniku pluripotence, tedy genů či různých aditivních prostředků, a druhá přenosem zmíněných faktorů do somatických buněk. Pokusím se shrnout všechny významnější přístupy. Kombinace faktorů zajišťující pluripotenci byla objevena v roce 2006 (Takahashi & Yamanaka, 2006). Jejich vlastnosti jsou uvedeny níže:

- **Oct 3/4** (také **Pou5f1**) reguluje sebeobnovovací potenciál ESCs a také nejspíš blokuje diferenciaci
- **Sox2** má rovněž sebeobnovovací potenciál a společně s Oct 3/4 udržuje pluripotentní stadium
- **Klf4** umožňuje proliferační vlastnosti ESCs, působí jako tumorsupresorový faktor a má onkogenní charakter
- **c-Myc** umožňuje proliferaci, blokuje diferenciaci a také má onkogenní charakter

Přesně touto kombinací se získala první linie nediferencovaných iPSCs. Pro dopravení zmíněných faktorů do buňky bylo jako vektorů využito **retrovirů**. Výťažnost této metody byla 0,02% (Takahashi *et al.*, 2007). Faktory KLF4 a c-Myc mají onkogenní charakter a proto je jejich použití nevhodné pro přechod do klinické praxe. Thomsonovi s kolektivem se podařila náhrada těchto dvou problematických faktorů (Yu *et al.*, 2007) následovně:

- **NANOG** urychluje reprogramovací proces a podporuje proliferaci
- **Lin28** je exprimován jak v ESCs, tak EC a je spojován s diferenciací a proliferací buněk

Výzkumníci použili jiný vektorový systém, a to přes **lentiviry**, a získali v závislosti na použité startovací buněčné linii výtěžnosti 0,022% a 0,0095% (Yu *et al.*, 2007). Zajímavé je, že Thomsonova skupina shledala faktor KLF4 nepodstatným pro proces indukce, ale Yamanakova zaznamenala obdobný výsledek s NANOG faktorem.

V jiných studiích se vědci pokoušeli najít kompletní alternativu k uvedeným faktorům. Všechny měly společný původ v ESCs v souvislosti s pluripotentním charakterem (PRDM14, Sall4, Esrrb, Utl1, Tet2, Glis1). Výzkumy vlastně probíhají neustále, každý rok je založeno

několik nových iPSCs linií (Yamanaka, 2012), které se samozřejmě liší vlastnostmi a diferenciačním potenciálem.

Na základě testování a porovnávání s ESCs liniemi se došlo k závěru, že některé buněčné linie tvořené z iPSCs jsou získávány se stejnou výtěžností, například motoneurony, a jiné naopak s horší výtěžností, např. Pax6+ buňky (Hu *et al.*, 2010). Lze tedy konstatovat, že iPSCs mají mírně odlišný diferenciační potenciál než ESCs. Před třemi lety byla publikována studie, v níž byly nahrazeny klíčové transkripční faktory Oct3/4 a Sox2 za liniově specifické, které také vyvolávají pluripotentní stadium (Shu *et al.*, 2013). Zajímavé je zjištění, že **liniově specifické faktory** jsou přesným opakem pluripotentních faktorů známých z ESCs. Hranice mezi využíváním genů pluripotence pro získávání iPSCs a liniově specifických genů pro generování buněčných prekurzorů se už nejeví tak ostrá jako před devíti lety. Posledním velice nadějným přístupem k dané problematice je nový způsob získávání indukovaných prekurzorů, kdy se vynechá stadium nediferencovaných iPSCs (Vierbuchen, 2010; Ieda, 2010; Abdullah *et al.*, 2012). Důkladnější rozbor bude proveden v kapitole 4.

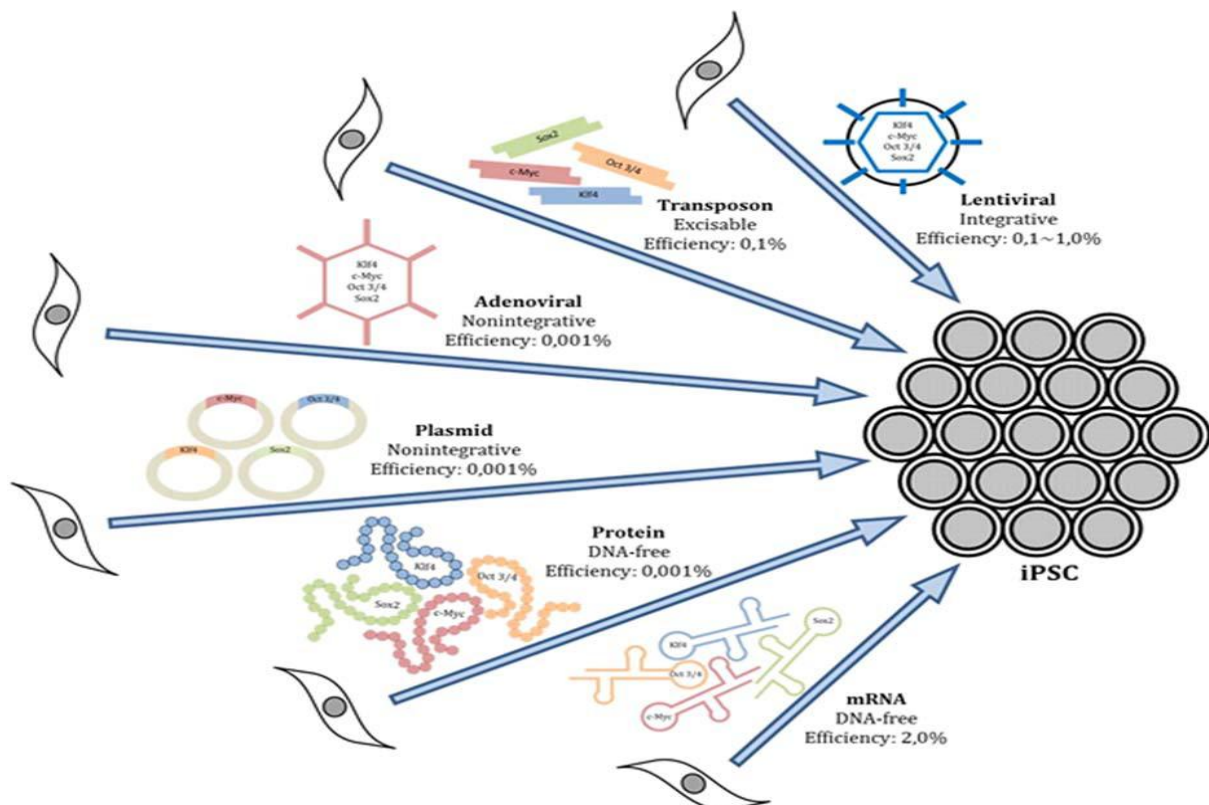
3.3. Nové metody zvyšující účinnost derivace iPSCs

Procentuální výtěžnost je jedním z handicapů při reprogramování buněk. Vědce zajímalo, jak tento proces zdokonalit. Látky, které pozitivně ovlivňují celý průběh procesu, pocházejí z nejrůznějších zdrojů, od chemikálií až po vitaminy. Zhao *et al.* (2008) použili **faktory p53 siRNA** a **UTF1**, které vykazovaly navýšení počtu získaných buněk až stonásobně. Zlepšení reprogramování buněk inhibicí p53 potvrdilo více laboratoří. Kladných výsledků se docílilo i při použití **kyseliny valproové (VPA)**. Jejím použitím došlo nejen k deseti až dvacetinásobnému zvýšení výtěžnosti, ale také došlo k nahrazení faktoru c-Myc použitím pouze faktorů Oct4 a Sox2 (Huangfu *et al.*, 2008). Jiné studie hovoří o inaktivaci TGFβ a MEK-ERK dráhy příslušnými receptory, což vede k dvěstěnásobnému navýšení výtěžnosti (Lin *et al.*, 2009). Posledními látkami, které bych zmínil, jsou **vitamín C** či různé kombinace jiných antioxidantních složek (Esteban *et al.*, 2010). Ty většinou cílí na enzymy regulující histony, které účinkují jako enhacery celého reprogramovacího mechanismu a zároveň umožňují náhradu za některé reprogramující faktory.

3.4. Přenos faktorů do somatických buněk

Druhá oblast zkoumání ideální metodiky přípravy iPSCs se zabývá problémem dopravováním reprogramovacích faktorů do somatické buňky. Jedná o transfekci, při které se používají vektory různého původu. Vektory se obecně využívají pro přenos genetické informace do buňky s cílem pomnožení a exprese cílené části DNA. V podkapitole 3.2. bylo zmíněno, že se nejdříve využívalo virových vektorů, jmenovitě retrovirů a lentivirů. Jednoduchost metody umožnila dosažení stejných výsledků i v jiných laboratořích. S uvedenými viry se ale pojí jisté riziko nežádoucí integrace do genomu (mutageneze), projevující se také například v genových terapiích (Hacein-Bey-Abina *et al.*, 2003).

Výtěžnost procesu transfekce retroviru a lentiviru byla vždy nízká, blížila se maximálně jednomu procentu reprogramovaných fibroblastů. Kromě zmíněné získané mutageneze navíc mohou uvedené linie iPSCs působit imunogenně. Proto se hledaly „integrative-free“ způsoby dopravy bez těchto nežádoucích vlastností. Patří mezi adenoviry, Sendai viry a plasmidy (Okita *et al.*, 2008; Fusaki *et al.*, 2009). Dále lze využít „virus-free“ metod, kam patří mRNA, transpozony a proteiny (Warren *et al.*, 2010; Woltjen *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009). Shrnutí zmíněných metod znázorňuje obrázku 1.



Obr. 1 – Hlavní reprogramovací strategie pro transfekci somatických buněk na iPSCs (převzato Coatti *et al.*, 2015)

Rutině jsou jako vektory využívány zvláště plasmidy a Sendai viry (Yamanaka, 2012), vše ale nasvědčuje tomu, že se v budoucnu bude využívat především mRNA, protože při jejím použití je výtěžnost zatím nejvyšší a nevytvářejí se genové alternace. mRNA má ale i nevýhody, jedná se totiž o nejdražší metodu (Tavernier *et al.*, 2013) a buňky se stávají po opakované transfekci mRNA imunogenní.

4. TVORBA BUNĚČNÝCH PREKURZORŮ

Tvorba buněčných prekurzorů je nedílnou součástí derivace iPSCs, jejichž potenciál se skrývá především v možných transplantačních náhradách regenerativní medicíny. Zatím popsané metodiky často využívají podpůrnou vrstvu fibroblastů, kde se kultivují nediferencované iPSCs, jež jsou schopné vytvářet embryoidních tělísek, která dokazují jejich pluripotentní potenciál.

Imunochemické analýzy prokázaly přítomnost markerů na těchto embryoidních tělíscích, typických pro diferencující se entoderm (α -fetoprotein), mesoderm (desmin) i ektoderm (β III-tubulin). Fibroblasty mají tu výhodu, že oproti jiným používaným buňkám sdílí neuroektodermální původ s neurony, čímž se stávají ideálním nástrojem pro tvorbu neuronálních prekurzorů či specifických neuronů (Abdulah *et al.*, 2012).

Během diferenciací se ve fázi nediferencovaných iPSCs přidávají koktejly faktorů, které následně indukují vývoj v určitý buněčný typ zárodečné vrstvy. Ze získaných dat těchto imunochemických analýz je pak možné vyhodnotit, zda se opravdu jedná o plně diferencované buňky jako ty, které vznikají přirozeně během vývoje zárodku. Při hodnocení dat se využívají imunofluorescenční metody, průtoková cytometrie, RT-PCR, „DNA microarray“ a mnohé další. Popsány byly diferenciací iPSCs téměř do všech buněčných typů. Dostupné jsou protokoly pro diferenciaci iPSCs do adipocytů, kardiomyocytů, neuronů, pankreatických buněk produkujících inzulin, hematopoetických progenitorů a endoteliálních buněk.

Proces diferenciací jednotlivých typů buněk je časově různorodý, pohybuje se v rámci týdnů až měsíců, například u adipocytů trvá pouhých 10 dnů za přidání podpůrných látek. Buněčnými markery adipogenního charakteru jsou C/EBP α , PPAR γ 2, leptin, ap2 a jejich lipidová akumulace (Taura *et al.*, 2009). Z iPSCs lze rovněž diferencovat hematopoetické progenitory či endoteliální buňky. Choi s kolektivem se podařilo získat linie CD43⁺

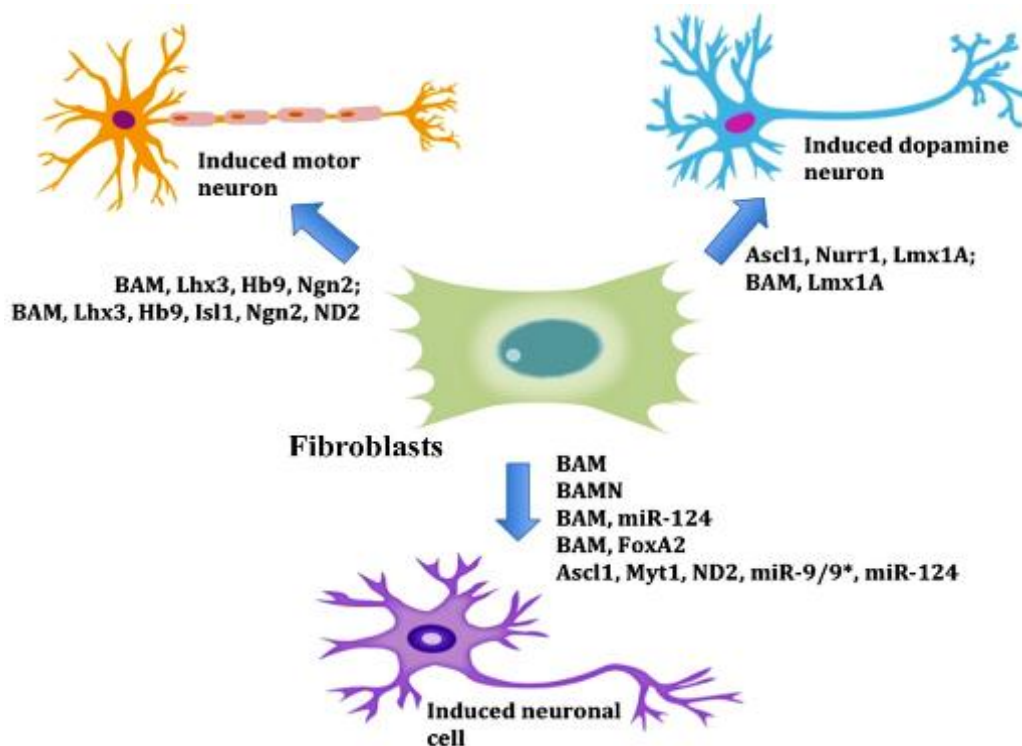
hematopoetických, CD31⁺ a CD43⁻ endoteliálních buněk, které by mohly v budoucnu sloužit k autologním transplantacím kostní dřeně (Choi *et al.*, 2009).

Kromě zmíněných evaluačních metod je také nutné vyhodnocovat fenotyp a stáří buněk, což je důležité zejména při diferenciaci do pankreatických buněk produkujících insulin. Funkční specifikou těchto dospělých buněk je koexprese C-peptidu, PDX1 a NKX6-1 a také schopnost vyvolat sekreci insulinu podmíněnou glukózovým stimulem (Zhang *et al.*, 2009a). V případě diferenciaci do kardiomyocytů je situace obdobná, dochází například k samovolnému vzniku sarkomerního uspořádání, diferenciaci do buněčných atriálních, nodálních a ventrikulárních fenotypů a sledují se elektrofyziologické vlastnosti a stimulace β -adrenálních receptorů, která vede ke chronotropnímu efektu (Zhang *et al.*, 2009b).

V neposlední řadě bych zmínil neurony, kterým věnuji větší pozornost, neboť ústředním tématem mé práce je léčba CNS. V současnosti je popsáno již mnoho metod indukujících tvorbu neuronálních prekurzorů z iPSCs, vždy se ale využívá stadia embryoidních tělísek, ze kterých se následně diferencují neuronální prekurzory. Ty jsou charakteristické multipotentním potenciálem, jenž zajišťuje následnou diferenciaci do astrocytů, oligodendroglíí a specifických neuronů. Pro neuronální diferenciaci se využívají postupy, založené na různých kombinacích kyseliny retinové (RA) a „sonic hedgehog“ (SHH) (Dimos *et al.*, 2008). Dále byly postulovány metody zlepšující celý průběh vývoje regulací FGF a BMP („bone morphogenic protein“) (Hu *et al.*, 2010). Navíc synergickou inhibicí SMAD dráhy dvěma inhibitory Noggin a SB431542 bylo možné získat až 80% výtěžnost (Chambers *et al.*, 2009). Noggin působí jako jeden z inhibitorů k BMP a indukuje vývoj v neurální ploténku v embryu. SB431542 zvyšuje neurální indukci z embryoidních tělísek inhibicí fosforylace TGF β /Activin/Lefty dráhy. Další možností pro derivaci neurální je využití neurálních rozet, které se spontánně tvoří po vyjmutí FGF z media. Jedná se o neuroektodermální struktury, jež exprimují například β III-tubulin (Tuj1), což jen dokazuje jejich diferenciací potenciál směrem k vývoji neuronů (Hu *et al.*, 2010).

Řada studií, publikovaných v nedávné době, se nově zmiňuje o principu transdiferenciaci **indukovaných neuronálních prekurzorů (iNPs)** přímo z fibroblastů bez použití pluripotentního stádia. Za pomoci koktejlu transkripčních faktorů BAM, jenž obsahoval Brn2/Pou3f2, Ascl1/MASH1 a Myt1l, bylo možné transdiferenciovat fibroblast na iNPs (Abdulah *et al.*, 2012). Z těchto prekurzorů se podařilo přidáním další faktorů (Lmx1, FoxA2) indukovat vývoj v dopaminergní neurony (Vierbuchen *et al.*, 2010), motoneurony

(pomocí faktorů Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2 a NeuroD1) (Son *et al.*, 2011) a neurální kmenové buňky (Pang *et al.*, 2011), jak je znázorněno na obrázku 3.



Obr. 3 – Přímá diferenciace fibroblastů do iNPs s použitím BAM koktejlu (převzato z Abdulah *et al.*, 2012)

Takto derivované buňky byly podrobeny důkladnější analýze, aby se ukázalo, zda vykazují typickou morfologii, exprimují příslušné neuronální markery, jestli jsou schopné akčního potenciálu a tvorby synaptických váčků. Ze získaných dat vyplynulo, že se opravdu jednalo o iNPs. Bude však nutné provést další analýzy, jelikož v několika studiích narazily na několik komplikací. Dimos *et al.* (2008) derivovali motorické a dopaminergní neurony pacienta postiženého ALS a zjistili přítomnost genetických alternací (duplikace a translokace chromozomů, bodové mutace). Další překážkou může být také epigeneticky podmíněná náchylnost buněk k určité patofyziologii. Jedna ze souvisejících studií také pojednává o motoneuronech derivovaných z iPSCs, jejichž geny TARDBP a C9ORF72 se staly dysfunkčními na základě hyperexcitability, následované ztrátou synaptické aktivity (Devlin *et al.*, 2015).

Proces diferenciacie iPSCs je v podstatě stresovou událostí, je proto potřeba bedlivě sledovat reziduální exprese pluripotentních genů, dále zbytkovou expresi startovací buněčné linie, ze které iPSCs původně pocházejí, a způsob, jakým v dlouhodobém horizontu komunikují s hostitelskou tkání. Při vyhodnocování správnosti průběhu diferenciačního procesu se také využívá srovnání s buňkami somatickými a diferencovanými z ESCs.

5. POŠKOZENÍ CNS

Poruchy CNS představují velký problém v oblasti medicíny. Mozek a mícha jsou omezeny svou plasticitou a mnoho poruch zatím neumíme léčit. Jejich incidence narůstá s rostoucím počtem populace. Zhoršení kvality života postiženého ovlivňuje nejen jeho samého, ale i jeho rodinu, zatěžuje i státní finance (náklady na terapii, zdravotní pomůcky, dávky v nemoci, invalidní důchody...). Pacienti s diagnózou ALS jsou postupem doby upoutáni na lůžko a intubací dýchacích cest, vždy ale předčasně umírají. Při míšním poranění mohou postižení skončit dlouhodobě na kolečkovém křesle, nebo v horším případě zemřít. V obou uvedených příkladech je společnou příčinou porušená funkce míchy. Kmenové buňky otevírají nové možnosti terapie a v budoucnu snad i úspěšné léčby postižených, a to společně s dalšími oblastmi výzkumu, jako jsou tkáňové inženýrství či nanotechnologie. Ty zatím jako jediné mohou pomoci s neuroprotekcí a neuroregenerací buněčné tkáně, a tím i zachování neurologických funkcí.

5.1. Amyotrofická laterální skleróza (též Lou Gehrigova nemoc, ALS)

ALS patří mezi neurodegenerativní onemocnění postihující horní i dolní motoneurony, jenž vede k jejich progresivní degeneraci. Se zánikem motoneuronů souvisí různé symptomy, jako spasticita, svalová atrofie či fascikulace, které vedou k postupnému ochabnutí svalstva, komplikujícímu mluvu, polykání a dýchání postiženého. Nejčastěji se vznik ALS a její progresse objevuje u padesáti až sedmdesátiletých pacientů, jen vzácněji před čtyřicátým rokem života. V celosvětovém průměru onemocní ALS dva až čtyři lidé ze statisíc (Moura *et al.*, 2016), bohužel jde chorobu nevyléčitelnou. Postižení umírají zhruba po třech až pěti letech od projevu prvních symptomů.

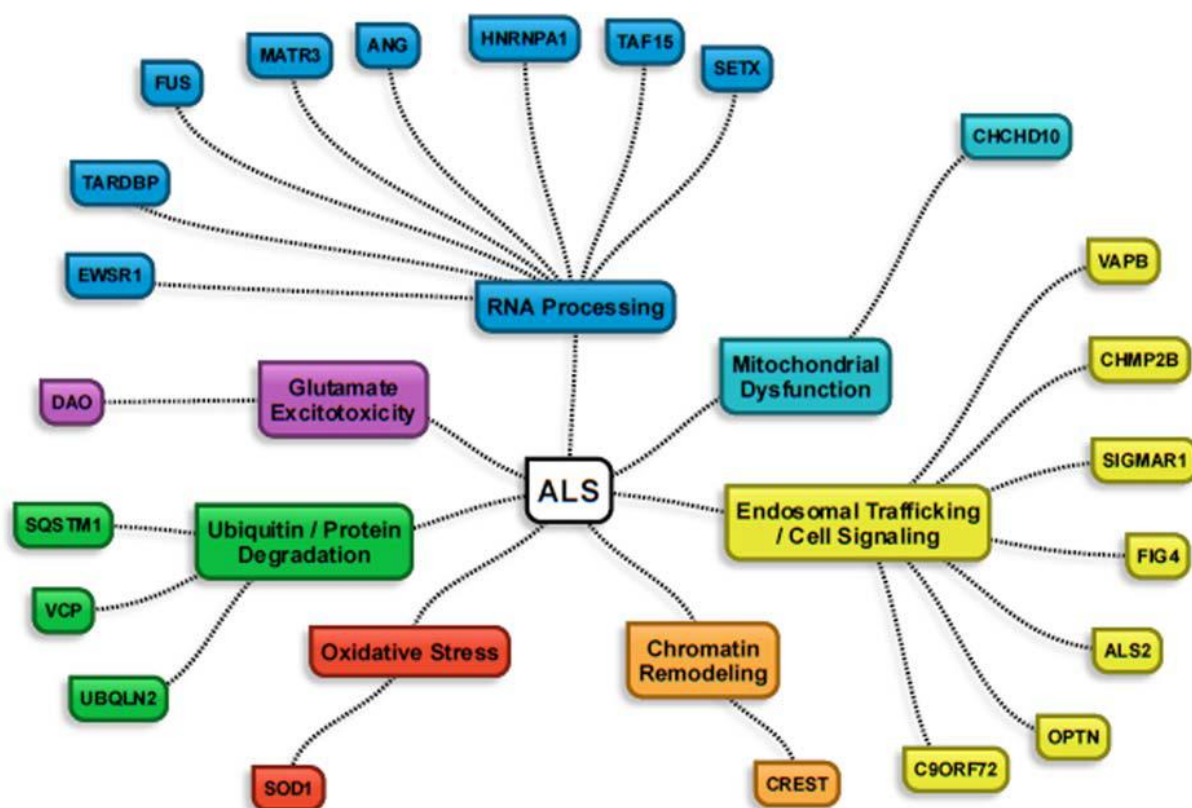
Existují dvě popsané formy ALS, dědičná **forma familiární** (FALS) a nedědičná **sporadická** (SALS), u níž většinou nelze určit kauzální gen. Familiární typ se vyskytuje

pouze v 5-10% případů, u zbylých 90-95% je příčina neznámá. Malé množství informací v rámci etiologie ALS komplikuje lékařům stanovení diagnózy i léčbu samotnou.

Obecná charakteristika a způsob diagnózy ALS byly poprvé zdokumentovány v El Escorial v roce 1994 (Brooks *et al.*, 2000). Ze získané patologie vyplývá, že onemocnění postihuje neurony centrální i periferní motorické dráhy. Typické pro ně jsou sférické útvary v oblasti jader či cytoplazmy buněk, vytvářející tzv. inkluzní tělíska. Ta jsou tvořena proteinovými složkami, obsahujícími ubiquitin, často také protein superoxid dismutáza (SOD1) či TARDBP, a mohou tak sloužit jako jeden z markerů ALS (Coatti *et al.*, 2015). Vznikem inkluzních tělísek postupně dochází k degeneraci buněk, jež vyvolávají svalovou atrofii. Postiženými oblastmi bývají přední rohy míšni, motorická kůra, motoneurony hlavových nervů především v mozkovém kmeni a kortikospinální dráha, což může vést k progresivní bulbární paralýze (PBP), primární laterální skleróze (PLS) nebo progresivní muskulární atrofii (PMA).

Symptomy zahrnující degeneraci motorických neuronů mohou rovněž navodit **frontotemporální demenci (FTD-ALS)**, způsobující progresivní ztrátu neuronálních buněk ve frontálním a temporálních lalocích (Ringholz *et al.*, 2005). Léčba sice zatím neexistuje, ale jsou už známy prostředky s terapeutickým účinkem alespoň na některý ze zmiňovaných symptomů. Jediným používaným lékem je **riluzole**, který blokuje napětově řízené sodíkové kanály a tím brání glutamátové excitotoxicitě. Tento lék je však účinný jen v raném stadiu ALS (Miller *et al.*, 2009; Hugon *et al.*, 1995). Nově objevené markery – jednak vysoká exprese pro ephrinový receptor EphA4 činící motoneurony zranitelnějšími, jednak nízký počet T-regulačních lymfocytů pomáhající při zánětu – by mohly v budoucnu přispět k rozvoji etiologii ALS.

Z molekulárních výzkumů je známo 33 kauzálních genů, které vedou k propuknutí ALS. Některé z nich jsou spojovány i s jinými neurodegenerativními chorobami, což znamená, že ALS je spíše nemoc syndromálního charakteru. Tyto geny jsou součástí buněčných drah, které souvisí s oxidativním stresem, buněčným transportem, signalizací, RNA úpravami, glutamátovou excitotoxicitou a dalšími, jež jsou uvedeny na obrázku 2.



Obr. 2 – Kauzální geny ALS a jejich souvislost s buněčnými procesy (převzato Coatti *et al.*, 2015)

Nejčastěji se vyskytuje mutace genu C9ORF72 – u FALS 33%, u SALS 8%. Odborná literatura však často zmiňuje mutaci proteinu SOD1 (20% u FALS), kterou lze zkoumat pomocí modelů transgenních myši a potkanů. SOD1 je součástí obranného mechanismu, který chrání buňku před kyslíkovými radikály. Mutací dochází k tomu, že kyslíkové radikály produkované mitochondriemi nejsou v dostatečném množství likvidovány, a proto buňku poškozují. Jiné studie spekulují o vlivu mutace SOD1 na neurotoxické narušení homeostaze Zn^{+} a Cu^{2+} .

Studium pluripotentních buněk umožnilo vytvoření buněčných modelů pro ALS specifické neurony a glie, čímž se získaly další informace o patologii ALS. Tím se i prohloubily znalosti o různých mechanismech vzniku a průběhu nemoci a účincích léků *in vitro* (Egawa *et al.*, 2014). Indukované specifické motoneurony navíc umožnily zkoumat i dosud nepopsané SALS modely. Dostupné informace o preklinických studiích na zvířecích modelech potvrzují, že buněčná transplantace má neuroprotektivní význam (Lunn *et al.*, 2014). iPSCs tematika je stále novinkou a výzkumy ji věnují pozornost až v současnosti. V minulosti proběhla řada preklinických i klinických testů na myších a potkanech s buňkami

mezenchymálními (MSCs), mononukleárními kmenovými buňkami z pupečníku, neuronálními prekuzory bohatými na tvorbu glií a neurálními ESCs, které prodloužily život testovaných a zpomalily progresivitu jejich nemoci bez zjevných vedlejších účinků (Moura *et al.*, 2016).

Otázkou zůstává, jak dalece je možné převést výsledky získané z testování laboratorních zvířat na lidi, jelikož obě skupiny nereagují stejně na podávaná léčiva, rozdílně reagují jednotlivá pohlaví a elektrofyziologické změny se objevují mnohem dříve, než je možné během behaviorálních testů pozorovat patologické projevy motoriky (Alves *et al.*, 2011). Výzkumy s laboratorními zvířaty navíc používají FALS modely, zatímco ALS je charakteru syndromálního, což může zahrnovat mnohem širší škálu patofyziologických procesů, z nichž mnohé nejsou zatím známy (Moura *et al.*, 2016).

5.2. Míšní poranění (MP)

Traumatické poranění míchy může vést k funkčním změnám dočasným nebo permanentním. Symptomy MP se liší podle oblasti a stupně poškození, jde o poruchy funkcí motorických (paraplegie, teraplegie) i senzitivních (dysestezie, hypestezie, anestezie), o poruchy sfinkterů (inkontinence) a respiračního či vegetativního systému. Mezi nejčastější příčiny poranění patří zejména autonehody, pády a úrazy při sportovních aktivitách. Ve Spojených státech se incidence akutního a chronického poranění míchy pohybuje kolem deseti tisíců případů za rok, jde tedy o 720 nových případů na milión obyvatel. Suma nákladů na léčbu jednoho pacienta se může vyšplhat až na 4 miliardy dolarů ročně (Varma *et al.*, 2013). Postižení bývají častěji muži (oproti ženám v poměru 4:1) ve věku 20-40 let. Sdružení American Spinal Injury Association (ASIA) zavedlo klasifikaci MP podle stupnice A-E, která posuzuje motorické funkce ve vybraných svalových skupinách a senzitivitu v dermatomech (Maynard *et al.*, 1997).

Záleží na lokalizaci konkrétního poranění, na rozsahu a úrovni poškození, dle nichž se odvíjí konkrétní terapeutický postup. Při poškození míchy v oblasti obratle C3 a výše respirační systém selhává a je potřebný okamžitý zákrok. Od C5 segmentu je sice zachována funkce diafragmy, ale postupem času zůstává jediným funkčním dýchacím svalem, jelikož přestávají fungovat svaly interkostální i abdominální svalový tonus.

MP probíhá ve dvou fázích. V primární fázi jde o akutní mechanickou deformaci míchy (tržné rány, pohmožděniny, komprese, kontrakce), což přímo poškozuje cévy,

membrány nervových buněk a přerušuje axonová vlákna (Farooqui, 2010). Vzniká tím tlak na páteřní míchu, objevuje se ischemická reakce, kvůli nahromaděnému buněčnému obsahu zničených buněk, což vede k hypotenzi (Winter & Pattani, 2011). Organismus už není schopen autoregulace, ischemická reakce pokračuje. To vše se odehrává jen během několika minut. Dále dochází k uvolňování neurotoxinů a spouštění sekundární fáze, při níž ložisko léze expanduje a dochází k omezení reparačních mechanismů. Pro tuto fázi jsou typické: zánět vyvolaný vlivem změn v cytokinech a chemokinech, ztráta regulace krevního tlaku, porušení hematoencefalické bariéry, penetrace sérových proteinů do míchy, apoptóza, excitotoxicita, zvýšená produkce volných radikálů spojených s peroxidací lipidů a akumulace neurotransmiterů. Tyto symptomy pak vedou k již zmiňované ischemické reakci, k nekróze, apoptóze míšní tkáně a v neposlední řadě také k demyelinizaci (Dumont *et al.*, 2001).

Jediným dosud schváleným lékem pro klinickou praxi je **metylprednisolon**, nevykazuje ale signifikantní zlepšení a jeho zvýšené intravenózní dávkování má četné vedlejší účinky (Bracken *et al.*, 1990). Proběhly i klinické studie o účincích naloxonu, tirilazadu a mnohým dalších léků (Bracken *et al.*, 1990). V neurochirurgii má pozitivní ohlas včasná dekomprese a stabilizace míchy pro zlepšení neurologických funkcí (El Tecle *et al.*, 2016).

V obecné rovině se klinické studie zaměřují na neuroprotekcí s cílem minimalizovat škody způsobené sekundární fází, která může mít chronický průběh, a na reparaci axonálních drah pro zlepšení neurologických funkcí. Jako příklad uvádím **nimopidine** (blokátor Ca^{2+} kanálů), zlepšující krevní průtok, **gacyclidine** blokující glutamát indukovaný výlev Ca^{2+} , **tyreotropin uvolňující hormon (THR)**, který stabilizuje membrány buněk, má i antioxidační účinky a zároveň podporuje krevní průtok v oblasti postižení, dále **kyselý fibroblastový růstový faktor (aFGF)**, podporující hojení alogenního transplantátu a autologní terapii pomocí MSCs (shrnutí ve Varma *et al.*, 2013).

V širším měřítku terapie kmenovými buňkami vede ke zvyšování hladiny neurotrofinů v poraněné tkáni, která pozitivně ovlivňuje velikost léze a axonální růst. Existuje efekt neuroprotekcí a neuroregenerace, kam patří axonální a gliální tropismus, inhibitory bránící tvorbě gliové jizvy, remyelinizace axonů, protizánětlivé účinky redukující NK buňky a makrofágy, a formování synapsí. Nutno podotknout, že buněčná terapie vlastně simuluje tělu známé endogenní procesy. Endogenní regenerace zahrnuje multipotentní NSCs (neuronální kmenové buňky), které proliferují do progenitorových buněk, z nichž se později diferencují neuronální linie. K regeneraci poškozených buněk je však třeba více. Výsledky

hovoří o preferenční tvorbě astroglíí z progenitorových buněk (Thuret *et al.*, 2006). Aby došlo k účelné neuroregeneraci budou potřebné i astrocyty, oligodendrocyty a neurony samotné. Úspěšná léčba vyžaduje multimodální přístup, kdy budou důležitou roli hrát právě kmenové buňky.

6. EXPERIMENTÁLNÍ MODELY PRO MP A ALS

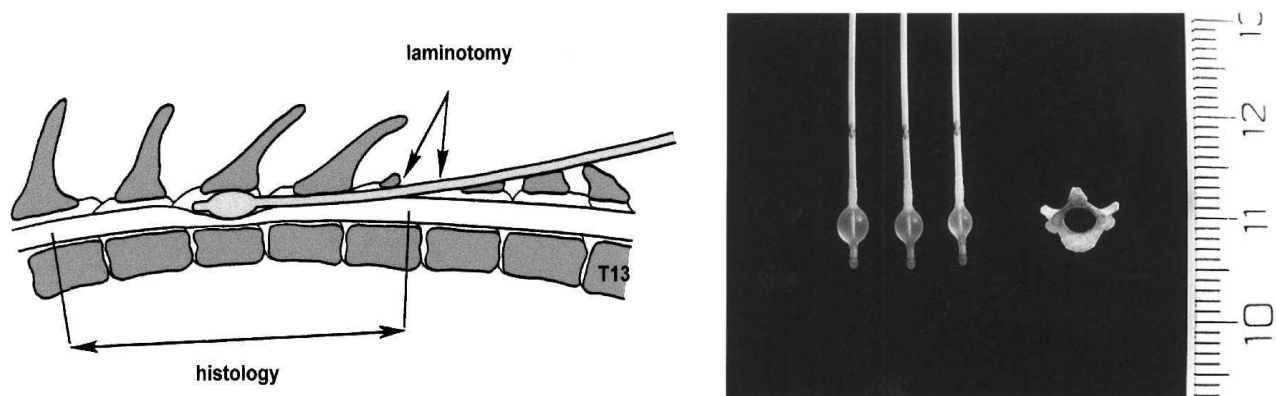
6.1. Modely MP

Obecně jsou nejčastěji využívanými modelovými organismy potkani a myši. Pro výzkumy MP se upřednostňuje potkan, jenž vzhledem ke své velikosti usnadňuje chirurgické zákroky pro navození příslušných patologií. Modelových typů MP existuje celá škála od chirurgických až po chemické. V buněčné terapii poškozené míchy jsou preferenčně používány **modely kontuzní, kompresní a transekční** či **hemisekční**.

Kontuzní model simuluje mechanické poškození náhlým úderem. Nejstarším typem tohoto modelu je „weight drop model“, který do dnešní doby prošel řadou inovací (Allen, 1911). Momentálně se ale používají tři novější typy a to NYU („New York University“) (Walker *et al.*, 2015), OSU („Ohio State University“) (Mann *et al.*, 2010) a IH („Infinite Horizon“) (Streijger *et al.*, 2013). Každý z nich využívá pevné těleso, jež udeří na odhalenou část míchy určitou silou, výškou a v určitém časovém intervalu. Pro vytvoření takovéto léze nutná laminektomie, nesoucí s sebou riziko infekce (Chung *et al.*, 2013).

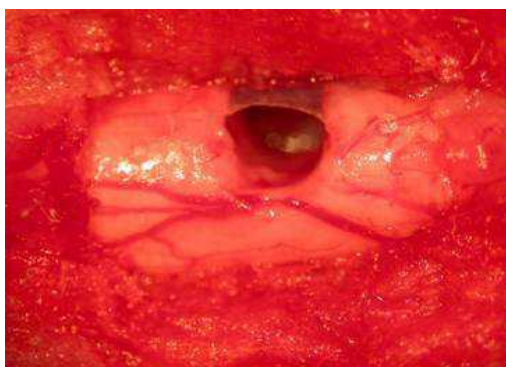
Kompresní typ MP je nejspíše nejpřesnějším modelem simulujícím reálnou klinickou situaci. Včetně mechanického poškození také totiž stlačením míchy vyvolává i sekundární fázi MP a s ní spojené patofyziologické procesy. Při stlačení míchy se používají tři typy komprese: komprese aneurismální svorkou (Rivlin & Tator, 1978), balónková kompresní léze (Urdzikova *et al.*, 2014; Vanicky *et al.*, 2001) a statický kompresní model (Huang *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013). Ze všech zmíněných typů kompresních modelů je balónková komprese nejbližší skutečnému stavu MP pacientů, jelikož je schopná simulovat frakturu obratle či výhřez obratlové ploténky. Tato metoda je celkem nenáročná a není tak potřeba mít nijak draze vybavenou laboratoř. Pro řádnou simulaci MP pomocí balónkové komprese je nutné vložit 2F-Fogartova katétru do epidurálního prostoru o dva obratle níže, než se bude nacházet plánovaná léze, a následným naplněním katétru, na jehož konci je umístěný balónek, se

vytvoří kompresi na míšní tkáň (viz obrázek 4). Komprese balónkovou lézí má navíc tu výhodu, nevyžaduje laminektomii.



Obr. 4 – Vlevo vyobrazena metody balónkové komprese a vpravo velikostní srovnání jednotlivých objemů katétrů (10-20 μ l) vůči obratli T9 (převzato a upraveno z Vanický *et al.*, 2001).

Transekční a hemisekční modely jsou vhodné spíše pro sledování růstu nových axonů, nežli pro simulaci patologie u pacientů. Při tomto zákroku dochází ke kompletnímu přetěti míchy nebo v případě hemisekce (viz obrázek 5) k vyjmutí určitého segmentu míšní tkáně (Centenaro *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2013). Zákrok vyvolá symptomy zahrnující paraplegii, kvadruplegii, poruchy močení a ztrátu některých sensorických funkcí v závislosti na jeho lokalizaci. V laboratorní praxi se upřednostňuje hemisekční model (Xia *et al.* 2013), jelikož má menší dopad na lokomoci zvířete, které je proto možné využít k behaviorálním testům ihned po aplikaci biomateriálů či kmenových buněk bez předchozí náročné péče.



Obr. 5 – Míšní hemisekce (převzato z Jendelová, 2014)

6.2. Transgenní modely ALS

Geny zodpovědné za vznik neurodegenerativního onemocnění ALS, byly již zmíněny v podkapitole 5.1. Pro menší rekapitulaci připomínám, že jich bylo prozatím objeveno 33 (Coatti *et al.*, 2015). Výzkumy ALS se zaměřují především na formu FALS, konkrétně na typ **mutace genu SOD1 G93A** u potkanů a myši (Gourney *et al.*, 1994). Mutací, při které je vneseno několik kopií lidského SOD1 genu, je dosaženo potenciálního patologického fenotypu, napodobujícího progresi nemoci u lidí. V určitém věku zvířete se manifestují symptomatické příznaky ALS v podobě degenerace neuronů a s tím spojená svalová slabost v zadních končetinách, třes a následná paralýza, jež vede k úhynu. Typ mutace G93A značí, kolik kopií genu SOD1 transgenní model má a jaká bude rychlost progresse onemocnění, která v tomto případě činí čtyři až pět měsíců. Ostatní mutace stejného genu (G37R, G85R, D90A, G86R) se liší jen minimálně (Van Den Bosh, 2011). Zajímavostí je, že již před viditelnou manifestací patrnou z behaviorálních testů jsou již zaznamatelné změny na elektromyografu, jež by v budoucnu mohly sloužit ke zkoumání patofyziologických procesů v raném stadiu ALS (Doble & Kennel, 2000). Obdobným způsobem by mohly přispět i buněčné modely *in vitro*. Prozatím však FALS-SOD1 zůstává nejvěrohodnějším transgenním modelem ALS.

S ALS dále souvisí **mutace genu TARDBP**, jíž je docíleno zvýšenou expresí genu TDP-43 řízenou promotorem Thy-1 (Wegorzewska *et al.*, 2009; Stallings *et al.*, 2010; Wils *et al.*, 2010).

Ostatní transgenní modely vykazují značné fenotypové rozdíly s variabilní patofyziologií, které tolik neodpovídají manifestaci příznaků u pacientů. Pro příklad uvádím produkt genu VAPB (Tudor *et al.*, 2010), dynaktinu (Lai *et al.*, 2007), alsinu (Yamanaka *et al.*, 2006) a mutace různých cytoskeletálních proteinů (NL-H, NF-L, peripherin) (Doble & Kennel, 2000).

Používání transgenních modelů je nejlepší možnou cestou, jak zkoumat samotné příčiny neurodegenerativních nemocí, používání léčiv a terapií. Je ovšem nutné mít na paměti, že u hlodavců se zkoumá zejména FALS typu, zatímco u lidí je často vícero genů zodpovědných za propuknutí nemoci. Samozřejmostí jsou také anatomické, fyziologické a genetické rozdíly mezi hlodavci a lidmi, které brání přesným způsobem simulovat danou nemoc, čímž komplikují přechod získaných poznatků do klinických studií.

7. TRANSPLANTACE BUNĚK

Kmenové buňky mohou být implantovány několika způsoby, a to systémově, lokálně nebo kombinovaně. Při lokálním podání se používají cesty intracerebrální, intraventrikulární, intraspinální, intramuskulární a intrathekální („cisterna magna“, lumbální cisterna). Při systémovém jde o podání intraarteriální, intravenózní a intraperitoneální. Záleží na typu a ložiscích poškození, které rozhodne, kam a jak aplikovat kmenové buňky, aby jejich působení bylo co nejúčinnější. Proximita hraje významnou roli v migraci buněk – čím jsou vzdálenější od ložiska poškození, tím je jejich působení slabší. Při léčbě jsou relevantní a často používané lumbální punkce a intrathekální podání buněk, proto jsou vhodné i pro buněčnou terapii díky relativně neinvazivnímu podání, spojenému s nízkým rizikem dodatečného poškození tkáně příjemce (Forostyak *et al.*, 2014).

Transplantace musí splňovat kritéria bezpečnosti, musí být minimálně invazivní a proveditelná i opakovaně. Dalším hojně diskutovaným problémem je časové okno pro podání buněk. U MP se pohybuje zmiňovaný časový úsek mezi pátým až devátým dnem od poškození (Jendelová, 2014). U degenerativních onemocnění, s ohledem na neuroprotektivní vlastnosti implantovaných buněk, které mohou zpomalit celkový průběh poškození, je nutné je aplikovat co nejdříve. Problematické je ale stanovení včasné a správné diagnózy a tím určení vhodné terapie.

Cílem terapie je taková dávka buněk, která bude mít ještě léčebný účinek, nebude vyvolávat toxicitu, bude schopná imunomodulace, případně buněčné náhrady, neuroprotektce a neuroregenerace (Titomanlio *et al.*, 2011). Velké množství implantovaných buněk by totiž porušilo permeabilitu prostředí a negativně ovlivnilo vlastnosti transplantátu. Také tvořící se gliová jizva přispívá ke snížené permeabilitě a komplikuje jak migraci buněk, tak prorůstání novým axonům.

Dobré výsledky vykazuje Amemoriho studie se spinálními neuronálními prekurzory na potkanech. Při vpichu s počtem buněk $5 \times 10^5 / 5 \mu\text{l}$ jich z celkového objemu přežilo 17% (Amemori *et al.*, 2015). Je nutné vzít v úvahu, že se při výzkumech provádí zejména transplantace lidských iPSCs linií na potkanech a myších. Kvůli vlastnostem xenotransplantátu je proto nutná imunosuprese, je ale nutná i kvůli zánětlivé povaze léze, vedoucí k aktivaci mikroglie a makrofágů, která by jinak snižovala růst implantovaných iPSCs-NPs.

Upřednostňují se proto kombinace kmenových buněk s biomateriály či hydrogely různého charakteru, aby napomohly buňkám k lepšímu růstu, migraci i přežívání v nehostinném prostředí poškozené míchy (Jendelová, 2014).

8. EVALUACE ÚČINKU PREKURZORŮ iPSCs

8.1. Behaviorální testy (Sledování neurologických funkcí)

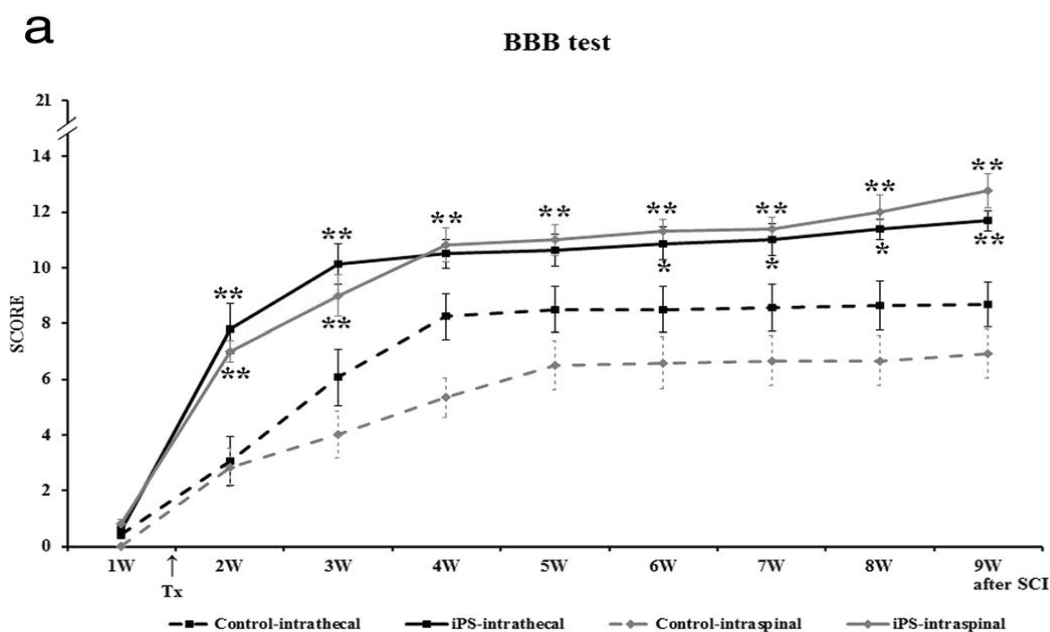
Konvenčními testy, kterými se zkoumají senzoricokolokomoční změny u MP a ALS, jsou behaviorální testy. U MP se standardně používá **BBB test** neboli „Open Field Test“, který může být rozšířen o jeden až dva doplňkové testy pro komplexnost dat a následné vyhodnocování statistiky. V případě ALS jsou hlavními sledovanými parametry doba přežití, úbytek váhy zvířete, neurologické skóre (Weydt *et al.*, 2003) a opět pro komplexnost mohou být doplněny například o „grip strenght“, rotarod a BBB test.

8.1.1. Basso-Beattie-Bresnehan test („BBB“, „Open Field“)

Tento test slouží k vyhodnocování motorických funkcí (viz obrázek 6). Testovaný potkan se položí do otevřené arény a sleduje se jeho pohyb. Následně se hodnotí stabilita trupu, pohyb tlapek, poloha ocasu, pohybu kloubů a předozadní koordinace pohybů. Do skórovací tabulky se poté vynáší hodnoty od 0–21, kdy 0 značí pro žádný pohyb a 21 pro plně funkční motoriku. Hodnotí se pouze zadní končetiny, každá zvlášť (Basso *et al.*, 1995). Zvíře je takto testováno jednou týdně.

8.1.2. Chůze po kladině („Beam Walk“)

Jedná se o další ze skupiny motorických testů u modelu MP hodnotící koordinaci pohybů předních a zadních končetin s důrazem na přenášení váhy. Potkan musí přejít kladinu o šířce 3 cm a délce 140 cm a dostat se do klece během šedesáti sekund. Sleduje se čas a počty pádů z kladiny. Testované zvíře je ohodnocováno škálou bodů 0–5, kde nejvyšší číslo znamená, že potkan přešel bez problémů po kladině až do klece (Goldstein, 1997). Test je opět prováděn jednou týdně.



Obr. 6 – Funkční regenerace míšňí léze po podání iPSCs-NPs intrathekální a intraspinální cestou zobrazená na BBB testu (převzato a upraveno z Amemori *et al.*, 2015)

8.1.3. Plantární test („Plantar Test“)

V rámci tohoto senzorkého testu se pozoruje reakční doba testovaného na bolestivý stimul. Zvíře je umístěno do akrylového boxu a na zadní tlapku je mu namířen infračervený zářič s pohybovým senzorem. Ten se automaticky vypne, pokud potkan zareaguje na stimul a pohne končetinou, tím se získá časový interval reakce na podnět. Měření je prováděno pětkrát s každou tlapkou s časovými rozestupy. Potkani s MP a s ním spojenou patologií mívají často projevy hyperalgie (přecitlivělost na bolestivý stimul), kdy se jejich reakční doba na stimul zkracuje. Projevy se testují jedenkrát za týden.

8.1.4. Rotarod

Tento lokomoční test je prováděn na rotujícím válci, na kterém se potkan musí udržet po určitou časovou periodu. Důraz je tu kladen na vytrvalou svalovou aktivitu. Rychlost rotace je obvykle stanovena na 5–10 rpm a potkan má tři pokusy o maximální délce 180 sekund. Test se provádí několikrát do týdne v průběhu dvou týdnů.

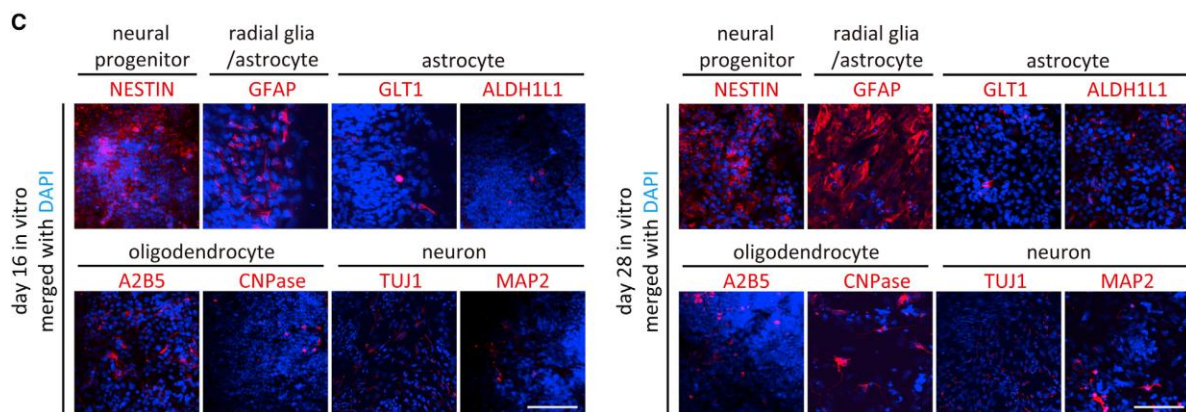
8.1.5. „Grip strenght“ test

„Grip strength“ test slouží k měření síly úchopu předních a zadních končetin, sleduje se tím odumírání motoneuronů, které je typické pro progresi ALS. Potkan je přiložen na platformu a po úchopu je energickým pohybem sňat z platformy pod určitým úhlem, měření se provádí třikrát.

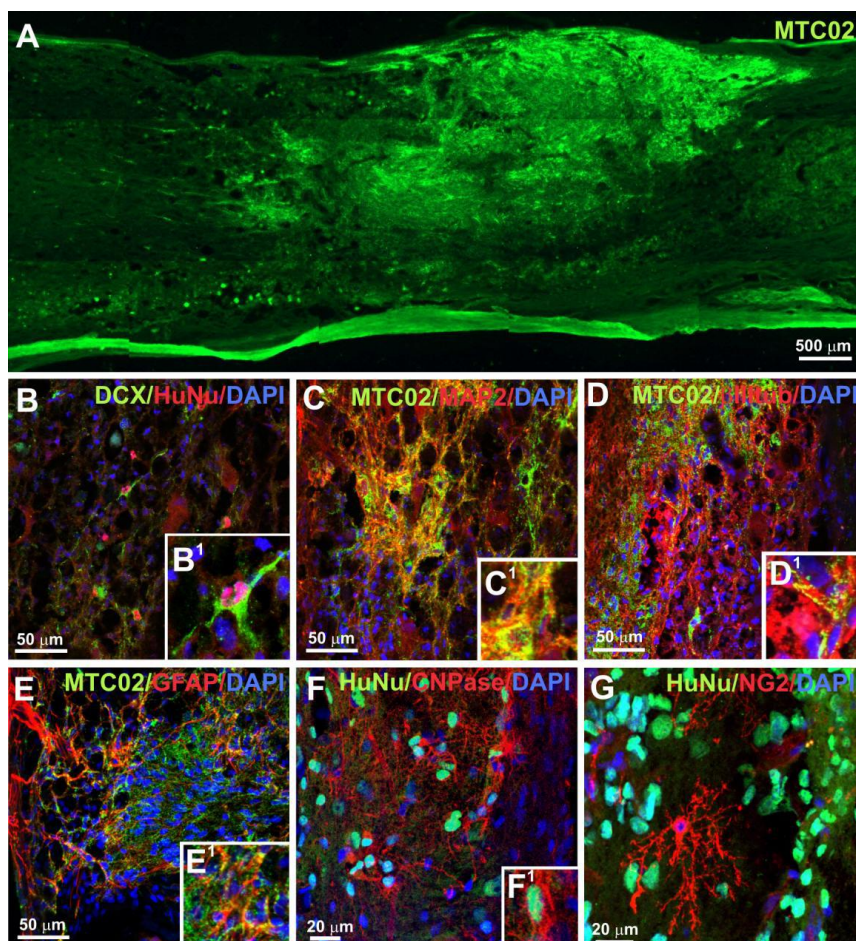
8.2. Přežívání a diferenciacie buněk a jejich imunohistochemická analýza

Zvíře je na konci experimentování humánně usmrcováno, aby se mohla provést histopatologická analýza nervové tkáně. Ke sledování transplantovaných kmenových buněk *in vivo* se využívá různých fluorescenčních protilátek (GFP, protilátky proti lidskému jadernému HuNu a mitochondriálnímu MTC02). Následně se pozorují změny související s diferenciací do příslušných buněčných typů, k čemuž se používají další fluorescenčně značené protilátky (Nestin, GFAP, GLN1/ALDH1, A2B5/CNPáza, Tuj1/MAP2, β 3-Tubulin, ChAT, Tau, OLIG2, DCX a mnohé jiné), které ukazují na to, zda se jedná o neuronální či astrogliální prekurzor, zralý astrocyt, oligodendrocyt, interneuron, dopaminergní neuron nebo motoneuron (Kondo *et al.*, 2014; Romanyuk *et al.*, 2015).

Důležité je sledovat migraci buněk, jejich úspěšnou integraci do tkání, protizánětlivý efekt daný snížením hladiny cytokinů, neuroprotektivní charakter a jejich dlouhodobé přežívání. K další evaluaci může posloužit i histologická analýza, která odhalí poměr změn v zachované ploše šedé ku bílé hmotě, získaný z příčných a podélných řezů míšní tkáně z oblasti léze (Romanyuk *et al.*, 2015). Expresí neutrofních faktorů je umožněna qPCR, (Bdnf, Vegf, Ngf, Nt3, Fgf8, Gdnf a další), které zprostředkovávají endogenní neuroregeneraci.



Obr. 7 – iPSCs-NPs projevující imunoreaktivitu na NP marker (Nestin), astrogliální marker (GFAP), astrocytální marker (GLT1/ALDH1), oligodendrocytální marker (A2B5/CNPáza) a marker neurální linie (TUJ1/MAP2) (převzato a upraveno z Kondo *et al.*, 2014)



Obr. 8 – Pohled na řez míchou po 8 týdenní transplantaci iPSCs-NPs, buňky jsou inkorporované ve tkáni příjemce a vycestovávají ze štěpu (A), DCX⁺ buňky (B), MAP2⁺ (C), βIII-tubulin⁺ (D), GFAP⁺ (E), CNPase⁺ (F), štěp by infiltrován mikroglie, která ale nebyly původem z iPSCs-NPs, protože byly HuNu⁻ (G) (převzato z Romanyuk *et al.*, 2015).

8.3. Srovnání výsledků vybraných preklinických studií

Značné množství typů kmenů iPSCs používaných ve světě komplikuje vyvozování jednotných závěrů. Například ve studii od Kondo *et al.* (2014) transplantovali neurální progenitory bohaté na glie, které efektivně zpomalily degeneraci neuronů u myši s mutací SOD1 přes aktivaci AKT signalizace. I pro MP existuje mnoho odvozených bezpečných iPSCs linií, které mají různý terapeutický efekt (Tsuji *et al.*, 2010) a které mohou být zdrojem iNPs, jež se dobře pohybují ve štetu a umí se integrovat do tkáně, čímž působí neuroprotektivně (Sareen *et al.*, 2014). Příkladem tohoto působení je zajištění remyelinizace axonů a tím zlepšení motorických funkcí s použitím iPSCs derivovaného oligodendrocytálního prekursoru a iPSCs-NPs (Kawabata *et al.*, 2016; Salewski *et al.*, 2015).

Z mnou vybraných prostudovaných prací by se šlo usoudit, že iPSCs mají alespoň do nějaké míry určitý léčebný účinek. Studie, které dříve upozorňovaly na adverzní účinky jako je hyperproliferace či tumorogeneze (Semintore *et al.*, 2010), již nebudí tolik zájem, jelikož je tento problém v zásadě překonán. Funkce iPSCs-NPs ovlivňují jak zlepšení lokomoční, tak sensorická (Xu *et al.*, 2011). Jejich imunomodulační vlastnosti snižují hladiny některých zánětlivých cytokinů a zároveň působí proti manifestaci gliové jizvy. Díky tomu dochází ke zlepšení prorůstání axonálních vláken, čímž zvyšují svoji početnost (Amemori *et al.*, 2015). Produkce neurotrofinů chrání stávající motoneurony před excitotoxicitou a podporuje tak endogenní růst axonů. Studie se velmi často shodují na opožděném nástupu symptomů a prodlužování progresu nemocí či poruch. Neurologická skóre se na přechodnou dobu rapidně zlepšují a ke konci se vrací na takovou míru, že se kryjí s kontrolními skupinami.

Rozdíly jsou patrné i mezi samci a samicemi. Podíl na tom budou mít i mimo jiné steroidní hormony, pohlavní cyklus a rozdílné hmotnosti (Alves *et al.*, 2011). Schopnosti diferenciačního potenciálu varírují podle buněčného kmenu. Kondo a kolektiv zaznamenali největší podíl diferencovaných astrocytů (Kondo *et al.*, 2014) a například skupina Ústavu experimentální medicíny Akademie věd ČR (ÚEM AVČR) měla víceméně rovnoměrnou diferenciaci do všech tří neuronálních fenotypů (Romanyuk *et al.*, 2014). Výsledky morfometrických analýz zachované šedé a bílé hmoty se také různí, což pouze dokládá, jak málo se ví o etiologii těchto poruch a stejně tak málo o všech probíhajících patofyziologických příznacích.

9. DISKUZE A ZÁVĚR

Traumatické poranění míchy a neurodegenerativní onemocnění ALS patří mezi velmi závažná onemocnění nesoucí kokrétní míšní patofyziologii, která může vést k doživotní paralýze (v případě MP) až k úmrtí (u ALS). Bohužel medicína dodnes nezná vhodnou léčbu, navíc komplikovaná a nedostatečně popsaná etiologie věci nijak nepřispívá. Proto cílem této práce bylo zjistit, jsou-li iPSCs vhodným kandidátem v léčbě míchy a neurodegenerativního onemocnění v regenerativní medicíně, zda preklinické studie dosahují očekávaných výsledků a bezpečnosti a zda jsou současně dostupné metody spojené s transplantacemi iPSCs dostačující pro budoucí klinické studie.

Buněčná terapie má smysl z hlediska modulací zahrnujících neuroprotekcii, neuroregeneraci, částečné buněčné náhrady, snižováním hladiny cytokinů s mnohými dalšími podpůrnými faktory. Pluripotentní kmenové buňky nabízejí neomezený diferenciacní potenciál, jenže technické nedostatky diferenciacních protokolů, komplikace s nízkou výtěžností a jejich dlouhá kultivace představují jedny z hlavní problémů přechodu do klinické praxe. Do budoucna bude potřeba vytvořit dobře reprodukovatelné studie, které budou splňovat přísná kritéria, díky nimž nebudou riziková pro podání pacientům. Další bariérou jsou modelové organismy, na kterých se provádí výzkumy. Jsou to především hlodavci, kteří díky anatomickým, fyziologickým a genetickým rozdílům nemohou nikdy věrně kopírovat studované lidské patologie CNS. Preklinické studie přináší rozporuplné výsledky kvůli heterogenně využívaných kmenech iPSCs. I přes tyto bariéry má podávání buněk terapeutické účinky. Jen je potřeba lépe porozumět obecně mechanismům účinku terapeutického efektu a i patologickým mechanismům daných nemocí.

Vhodným přístupem je například vytváření derivovaných neuronů s ALS patologií pro zkoumání v *in vitro* podmínkách (Dimos *et al.*, 2008). Díky takovým modelům lze přispět k subklinickému zkoumání patologie a díky tomu i k určení včasné diagnózy. Stejně tak jsou vhodné i pro testování léků bez nutnosti použití zvířecích modelů. S lepším porozuměním patofyziologií pak bude možné navrhnout efektivní multimodální léčbu, jejíž nedílnou součástí bude i buněčná terapie.

Ve své budoucí diplomové práci bych se chtěl i nadále věnovat buněčné terapii, jen pomocí jiného typu kmenových buněk, který v klinické praxi byl již vyzkoušen, a to mesenchymálních kmenových buněk (MSCs), které v současnosti převyšují používání iPSCs v mnoha ohledech.

10. PŘEHLED CITOVANÉ LITERATURY

- Abdullah, A. I., Pollock, A., Sun, T. (2012). The path from skin to brain: generation of functional neurons from fibroblasts. *Molecular Neurobiology*. 45 (3), 586–595.
- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K. G., Choo, A. B. H., Churchill, G. H., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J. S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R. A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P. J., Hamilton, R. S., Hampl, A., Healy, L. E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M. P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J. L., Jones, M., Kee, K., King, B. L., Knowles, B. B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B. S., Manning, D., Mayshar, Y., Mckay, R. D. G., Michalska, A. E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S. L., Moore, H. D., Mummery, C. L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C. M., Oh, S. K. W., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K.-Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M. H., Piekarczyk, M. S., Pera, R. A. R., Reubinoff, B. E., Robins, A. J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T. C., Semb, H., Sherrer, E. S., Siemen, H., Stacey, G. N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., van den Brink, S., Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T. A., Young, L. A., Zhang, W. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotechnology*. 25 (7), 80–816.
- Amemori, T., Ruzicka, J., Romanyuk, N., Jhanwar-Uniyal, M., Sykova, E., & Jendelova, P. (2015). Comparison of intraspinal and intrathecal implantation of induced pluripotent stem cell-derived neural precursors for the treatment of spinal cord injury in rats. *Stem Cell Research & Therapy*. 6 (1), 1–11.
- Andrews, P. W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G. S., Carlin, C., Dracopoli, N. C., Føgh, J. (1984). Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Journal of Technical Methods and Pathology*. 50 (2), 147–162.
- Allen, A. R. (1911). Surgery of experimental lesion of spinal cord equivalent to crush injury of fracture dislocation of spinal column: a preliminary report. *Journal of the American Medical Association*. 57 (11), 878–880.

- Alves, C. J., de Santana, L. P., dos Santos, A. J. D., de Oliveira, G. P., Duobles, T., Scorisa, J. M., Scorisa, J. M., Martins, R. S., Maximino, J. R., Chadi, G. (2011). Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Research*, 1394, 90–104.
- Aznar, J., Sánchez, J. L. (2011). Embryonic stem cells: are useful in clinic treatments? *Journal of Physiology and Biochemistry*. 67 (1), 141–144.
- Basso, D. M., Beattie, M. S., & Bresnahan, J. C. (1995). A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of Neurotrauma*, 12 (1), 1–21.
- Bracken, M. B., Shepard, M. J., Collins, W. F., Holford, T. R., Young, W., Baskin, D. S., Eisenberg, H. W., Flamm, E., Leo-Summers, L., Maroon, J., Marshall, L. F., Perot, P. L., Piepmeier, J., Sonntag, V. K. H., Wagner, F. C., Wilberger, J. E., Winn, H. R. (1990). A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury: results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study. *New England Journal of Medicine*. 322 (20), 1405–1411.
- Brooks, B. R., Miller, R. G., Swash, M., Munsat, T. L. (2000). El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*. 1 (5), 293–299.
- Centenaro, L. A., da Cunha Jaeger, M., Ilha, J., de Souza, M. A., Balbinot, L. F., do Nascimento, P. S., Marcuzzo, S., Achaval, M. (2013). Implications of olfactory lamina propria transplantation on hyperreflexia and myelinated fiber regeneration in rats with complete spinal cord transection. *Neurochemical research*. 38 (2), 371–381.
- Coatti, G. C., Beccari, M. S., Olávio, T. R., Mitne-Neto, M., Okamoto, O. K., Zatz, M. (2015). Stem cells for amyotrophic lateral sclerosis modeling and therapy: Myth or fact?. *Cytometry Part A*. 87 (3), 197–211.
- Davis, R. L., Weintraub, H., Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*. 51 (6), 987–1000.
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golan, R., Wichterle, H., Henderson, C. E., Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*. 321 (5893), 1218–1221.

- Doble, A., Kennel, P. (2000). Animal models of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*. 1 (5), 301–312.
- Dumont, R. J., Okonkwo, D. O., Verma, S., Hurlbert, R. J., Boulos, P. T., Ellegala, D. B., Dumont, A. S. (2001). Acute spinal cord injury, part I: pathophysiologic mechanisms. *Clinical Neuropharmacology*. 24 (5), 254–264.
- Devlin, A. C., Burr, K., Borooah, S., Foster, J. D., Cleary, E. M., Geti, I., Vallier, L., Shaw, C. E., Chandran, S., Miles, G. B. (2015). Human iPSC-derived motoneurons harbouring TARDBP or C9ORF72 ALS mutations are dysfunctional despite maintaining viability. *Nature Communications*, 6.
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*. 457 (7227), 277–280.
- Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., Aoi, T., Watanabe, A., Yamada, Y., Morizane, A., Takahashi, J., Ayaki, T., Ito, H., Yoshikawa, K., Yamawaki, S., Suzuki, S., Watanabe, D., Hioki, H., Kaneko, T., Makioka, K., Okamoto, K., Takuma, H., Tamaoka, A., Hasegawa, K., Nonaka, T., Hasegawa, M., Kawata, A., Yoshida, M., Nakahata, T., Takahashi, R., Marchetto, M. C. N., Gage, F. H., Yamanaka, S., Inoue, H. (2012). Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Science Translational Medicine*. 4 (145), 145ra104–145ra104.
- El Tecle, N. E., Dahdaleh, N. S., Hitchon, P. W. (2016). Timing of Surgery in Spinal Cord Injury. *Spine*.
- Esteban, M. A., Wang, T., Qin, B., Yang, J., Qin, D., Cai, J., Li, W., Weng, Z., Chen, J., Ni, S., Chen, K., Li, Y., Liu, X., Xu, J., Zhang, S., Li, F., He, W., Labuda, K., Song, Y., Peterbauer, A., Wolbank, S., Rendl, H., Zhong, M., Cai, D., Zeng, L., Pei, D. (2010). Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 6 (1), 71–79.
- Evans, M. J., Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292, 154–156.

- Farooqui, A. A. (2010). Neurochemical aspects of neurotraumatic and neurodegenerative diseases. *Springer Science & Business Media*.
- Friedrich, T. D., Regenass, U., Stevens, L. C. (1983). Mouse genital ridges in organ culture: the effects of temperature on maturation and experimental induction of teratocarcinogenesis. *Differentiation*. 24, 60–64.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 85 (8), 348–362.
- Forostyak, S., Homola, A., Turnovcova, K., Svitil, P., Jendelova, P., Sykova, E. (2014). Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS. *Stem Cells*. 32 (12), 3163–3172.
- Gage, F. H., Coates, P. W., Palmer, T. D., Kuhn, H. G., Fisher, L. J., Suhonen, J. O., Peterson, D. A., Suhr, S.T., Ray, J. (1995). Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 92, 11879–11883.
- Goldstein, L. B. (1997). Effects of bilateral and unilateral locus coeruleus lesions on beam-walking recovery after subsequent unilateral sensorimotor cortex suction-ablation in the rat. *Restorative Neurology and Neuroscience*. 11 (1,2), 55–63.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A., Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*. 302 (5644), 415–419.

- Henkel, J. S., Beers, D. R., Wen, S., Rivera, A. L., Toennis, K. M., Appel, J. E., Zhao, W., Moore, D. H., Powell, S. Z., Appel, S. H. (2013). Regulatory T-lymphocytes mediate amyotrophic lateral sclerosis progression and survival. *EMBO Molecular Medicine*. 5 (1), 64–79.
- Hu, B. Y., Weick, J. P., Yu, J., Ma, L. X., Zhang, X. Q., Thomson, J. A., Zhang, S. C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (9), 4335–4340.
- Huang, W. L., George, K. J., Ibba, V., Liu, M. C., Averill, S., Quartu, M., Hamlyn, P. J., Priestley, J. V. (2007). The characteristics of neuronal injury in a static compression model of spinal cord injury in adult rats. *European Journal of Neuroscience*. 25 (2), 362–372.
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology*. 26 (11), 1269–1275.
- Hugon, J. (1995). Riluzole and ALS therapy. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)*. 146 (9-10), 185–187.
- Choi, K. D., Yu, J., Smuga-Otto, K., Salvaggio, G., Rehrauer, W., Vodyanik, M., Thomson, J., Slukvin, I. (2009). Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 27 (3), 559–567.
- Chambers, S. M., Fasano, C. A., Papapetrou, E. P., Tomishima, M., Sadelain, M., Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology*. 27 (3), 275–280.
- Chung, W.-H., Lee, J.-H., Chung, D.-J., Yang, W.-J., Lee, A.-J., Choi, C.-B., Chang, H.-S., Kim, D.-H., Chung, H. J., Suh, H. J., Hwang, S.-H., Han, H., Do, S. H., Kim, H.-Y. (2013). Improved rat spinal cord injury model using spinal cord compression by percutaneous method. *Journal of Veterinary Science*. 14 (3), 329–335.
- Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., Srivastava, D. (2010). Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 142 (3), 375–386.

- Jendelová, P. *Kmenové buňky a biotechnologie v léčbě poranění míchy a mozku*. [zapůjčeno] Praha, 2014. Habilitační práce. Univerzita Karlova v Praze, 2. lékařská fakulta.
- Kawabata, S., Takano, M., Numasawa-Kuroiwa, Y., Itakura, G., Kobayashi, Y., Nishiyama, Y., Sugai, K., Nishimura, S., Iwai, H., Isoda, M., Shibata, S., Kohyama, J., Iwanami, A., Toyama, Y., Matsumoto, M., Nakamura, M., Okano, H. (2016). Grafted Human iPSC Cell-Derived Oligodendrocyte Precursor Cells Contribute to Robust Remyelination of Demyelinated Axons after Spinal Cord Injury. *Stem cell reports*. 6(1), 1-8.
- Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., Kim, K.S. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 4, 472–476.
- Kleinsmith, L. J., Pierce Jr, G. B. (1964). Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Research*. 24, 1544–1551.
- Kondo, T., Funayama, M., Tsukita, K., Hotta, A., Yasuda, A., Nori, S., Kaneko, S., Nakamura, M., Takahashi, R., Okano, H., Yamanaka, S., Inoue, H. (2014). Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice. *Stem Cell Reports*. 3 (2), 242–249.
- Kroon, E., Martinson, L. A., Kadoya, K., Bang, A. G., Kelly, O. G., Eliazer, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N. G., Cunningham, J., Agulnick, A. D., D'Amour, K. A., Carpenter, M. K., Baetge, E. E. (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature Biotechnology*. 26 (4), 443–452.
- Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H. S., Hao, E., Hayek, A., Ding, S. (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nature Methods*. 6 (11), 805–808.
- Lindvall, O., Kokaia, Z. (2009). Prospects of stem cell therapy for replacing dopamine neurons in Parkinson's disease. *Trends in Pharmacological Sciences*. 30, 260–267.
- Lunn, J. S., Sakowski, S. A., & Feldman, E. L. (2014). Concise review: Stem cell therapies for amyotrophic lateral sclerosis: recent advances and prospects for the future. *Stem Cells*. 32 (5), 1099–1109.

- Mann, C. M., Lee, J. H., Hillyer, J., Stammers, A. M., Tetzlaff, W., Kwon, B. K. (2010). Lack of robust neurologic benefits with simvastatin or atorvastatin treatment after acute thoracic spinal cord contusion injury. *Experimental Neurology*, 221 (2), 285–295.
- Martin, G. R. (1980). Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science*. 209, 768–776.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 78, 7634–7638.
- Maynard, F. M., Bracken, M. B., Creasey, G. J. F. D., Ditunno, J. F., Donovan, W. H., Ducker, T. B., Garber, S. L., Marino, R. J., Stover, S. L., Tator, C. H, Waters, R. L., Wilberger, J. E. (1997). International standards for neurological and functional classification of spinal cord injury. *Spinal Cord*. 35 (5), 266–274.
- Mead, B., Berry, M., Logan, A., Scott, R. A., Leadbeater, W., Scheven, B. A. (2015). Stem cell treatment of degenerative eye disease. *Stem Cell Research*. 14 (3), 243–257.
- Miller, R. G., Mitchell, J. D., Lyon, M., Moore, D. H. (2009). Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Amyotrophic Lateral Sclerosis and Other Motor Neuron Disorders*. 4 (3), 1–17.
- Moura, M. C., Novaes, M. R. C. G., Zago, Y. S., Eduardo, E. J., Casulari, L. A. (2016). Efficacy of Stem Cell Therapy in Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Clinical Medicine Research*. 8 (4), 317.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 322 (5903), 949–953.
- Pal, R. (2009). Embryonic stem (ES) cell-derived cardiomyocytes: a good candidate for cell therapy applications. *Cell Biology International*. 33, 325–336.
- Palmer, T. D., Takahashi, J., Gage, F. H. (1997). The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 8, 389–404.

- Park, I. H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G. Q. (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*. 134 (5), 877–886.
- Pfannkuche, K., Hannes, T., Khalil, M., Noghabi, M. S., Morshedi, A., Hescheler, J., Dröge, P. (2010). Induced pluripotent stem cells: a new approach for physiological research. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 26 (2), 105–124.
- Reynolds, B. A., Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 255, 1707.
- Ramalho-Santos, M., & Willenbring, H. (2007). On the origin of the term “stem cell”. *Cell Stem Cell*. 1 (1), 35–38.
- Richards, L. J., Kilpatrick, T. J., Bartlett, P. F. (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. 92 (89), 8591–8595.
- Ringholz, G. M., Appel, S. H., Bradshaw, M., Cooke, N. A., Mosnik, D. M., Schulz, P. E. (2005). Prevalence and patterns of cognitive impairment in sporadic ALS. *Neurology*. 65 (4), 586–590.
- Rivlin, A. S., Tator, C. H. (1978). Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surgical Neurology*. 10 (1), 38–43.
- Ritz, M. F., Graumann, U., Gutierrez, B., Hausmann, O. (2010). Traumatic spinal cord injury alters angiogenic factors and TGF-beta1 that may affect vascular recovery. *Current Neurovascular Research*. 7 (4), 301–310.
- Romanyuk, N., Amemori, T., Turnovcova, K., Prochazka, P., Onteniente, B., Sykova, E., Jendelova, P. (2015). Beneficial effect of human induced pluripotent stem cell-derived neural precursors in spinal cord injury repair. *Cell Transplantation*. 24 (9), 1781–1797.
- Salewski, R. P., Mitchell, R. A., Li, L., Shen, C., Milekovskaia, M., Nagy, A., Fehlings, M. G. (2015). Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells mediate functional recovery following thoracic spinal cord injury through remyelination of axons. *Stem cells translational medicine*. 4(7), 743-754.

- Sareen, D., Gowing, G., Sahabian, A., Staggenborg, K., Paradis, R., Avalos, P., Latter, J., Ornelas, L., Garcia, L., Svendsen, C. N. (2014). Human induced pluripotent stem cells are a novel source of neural progenitor cells (iNPCs) that migrate and integrate in the rodent spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*. 522(12), 2707-2728.
- Seminatore, C., Polentes, J., Ellman, D., Kozubenko, N., Itier, V., Tine, S., Tritschler, L., Brenot, M., Guidou, E., Bloundeau, J., Lhuillier, M., Bugi, A., Aubry, L., Jendelova, P., Sykova, E., Perrier, A. L., Finsen, B., Onteniente, B. (2010). The postischemic environment differentially impacts teratoma or tumor formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Stroke*. 41 (1), 153–159.
- Shu, J., Wu, C., Wu, Y., Li, Z., Shao, S., Zhao, W., Tang, X., Yang, H., Shen, L., Zuo, X., Yang, W., Shi, Y., Chi, X., Zhang, H., Gao, G., Shu, Y., Yuan, K., He, W., Tang, C., Zhao, Y., Deng, H. (2013). Induction of pluripotency in mouse somatic cells with lineage specifiers. *Cell*. 153 (5), 963–975.
- Son, E. Y., Ichida, J. K., Wainger, B. J., Toma, J. S., Rafuse, V. F., Woolf, C. J., Eggan, K. (2011). Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons. *Cell Stem Cell*. 9 (3), 205–218.
- Streijger, F., Beernink, T. M., Lee, J. H., Bhatnagar, T., Park, S., Kwon, B. K., Tetzlaff, W. (2013). Characterization of a cervical spinal cord hemicontusion injury in mice using the infinite horizon impactor. *Journal of Neurotrauma*. 30 (10), 869–883.
- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126 (4), 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131 (5), 861–872.
- Taura, D., Sone, M., Homma, K., Oyamada, N., Takahashi, K., Tamura, N., Nakao, K. (2009). Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 29 (7), 1100–1103.
- Tavernier, G., Mlody, B., Demeester, J., Adjaye, J., De Smedt, S. C. (2013). Current methods for inducing pluripotency in somatic cells. *Advanced Materials*. 25 (20), 2765–2771.

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282 (5391), 1145–1147.
- Thompson, S., Stern, P. L., Webb, M., Walsh, F.S., Engstrom, W., Evans, E. P., Shi, W. K., Hopkins, B., Graham, C. F. (1984). Cloned human teratoma cells differentiate into neuron-like cells and other cell types in retinoic acid. *Journal of Cell Science*. 72, 37–64.
- Thuret, S., Moon, L. D., Gage, F. H. (2006). Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 7 (8), 628–643.
- Trounson, A. O., Gardner, D .K., Baker, G., Barnes, F. L., Bongso, A., Bourne, H., Calderon, I., Cohen, J., Dawson, K., Eldar-Geve, T., Gardner, D. K., Graves, G., Healy, D., Lane, M., Leese, H. J., Leeton, J., Levron, J., Liu, D. Y., MacLachlan, V., Munné, S., Oranratnachai, A., Rogers, P., Rombauts, L., Sakkas, D., Sathananthan, A.H., Schimmel, T., Shaw, J., Trounson, A. O., Van Steirteghem, A., Willadsen, S., Wood, C. (2000). *Handbook of in vitro fertilization*, (Boca Raton, London, New York, Washington, D.C.: CRC Press).
- Titomanlio, L., Kavelaars, A., Dalous, J., Mani, S., El Ghouzzi, V., Heijnen, C., Oliver, B., Gressens, P. (2011). Stem cell therapy for neonatal brain injury: perspectives and challenges. *Annals of Neurology*. 70 (5), 698–712.
- Tsuji, O., Miura, K., Okada, Y., Fujiyoshi, K., Mukaino, M., Nagoshi, N., Kitamura, K., Kumagai, G., Nishino, M., Tomisato, S., Higashi, H., Nagai, T., Katoh, H., Kohda, K., Matsuzaki, Y., Yuzaki, M., Ikeda, E., Toyama, Y., Nakamura, M., Yamanaka, S., Okano, H. (2010). Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (28), 12704–12709.
- Urdzikova, L.M., Ruzicka, J., LaBagnara, M., Karova, K., Kubinova, S., Jirakova, K., Murali, R., Sykova, E., Jhanwar-Uniyal, M., and Jendelova, P. (2014). Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat. *International Journal of Molecular Sciences*. 15, 11275–11293.

- Varma, A. K., Das, A., Wallace IV, G., Barry, J., Vertegel, A. A., Ray, S. K., Banik, N. L. (2013). Spinal cord injury: a review of current therapy, future treatments, and basic science frontiers. *Neurochemical Research*. 38 (5), 895–905.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Sudhof, T. C., Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*. 463, 1035–1041.
- Vanický, I., Urdzík, L., Saganová, K., Cízková, D., Gálik, J. (2001). A simple and reproducible model of spinal cord injury induced by epidural balloon inflation in the rat. *Journal of Neurotrauma*. 18 (12), 1399–1407.
- Walker, M. J., Walker, C. L., Zhang, Y. P., Shields, L. B., Shields, C. B., Xu, X. M. (2015). A Novel Vertebral Stabilization Method for Producing Contusive Spinal Cord Injury. *Journal of visualized experiments: JoVE* (95).
- Wang, Y., Mah, N., Prigione, A., Wolfrum, K., Andrade-Navarro, M. A., Adjaye, J. (2010). A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. 6 (2), 282–296.
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A., Daley, G. Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schläger, T. M., Rossi, D. J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 7 (5), 618–630.
- Weydt, P., Hong, S. Y., Klot, M., Möller, T. (2003). Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. *Neuroreport*. 14 (7), 1051–1054.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 385, 810–813.
- Winter, B., Pattani, H. (2011). Spinal cord injury. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 12 (9), 403–405.
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., Kaji, K., Sung, H., Nagy, A. (2009).

- piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 458 (7239), 766–770.
- Xia, G. N., Zou, Y., Wang, Y. C., Xia, Q. J., Lu, B. T., Wang, T. H., & Qi, J. G. (2013). Neural stem cells grafts decrease neural apoptosis associated with caspase-7 downregulation and BDNF upregulation in rats following spinal cord hemisection. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 33 (7), 1013–1022.
- Xu, L., Shen, P., Hazel, T., Johe, K., Koliatsos, V. E. (2011). Dual transplantation of human neural stem cells into cervical and lumbar cord ameliorates motor neuron disease in SOD1 transgenic rats. *Neuroscience letters*. 494 (3), 222–226.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*. 10 (6), 678–684.
- Yerbury, J. J. (2016). Protein aggregates stimulate macropinocytosis facilitating their propagation. *Prion*. (právě přijato), 00-00.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., Thomson, J. A. (2007). Induced Pluripotent Stem Cells Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 318 (5858), 1917–1920.
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., Shi, Y., Deng, H. (2009a). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Research*. 19 (4), 429–438.
- Zhang, J., Wilson, G. F., Soerens, A. G., Koonce, C. H., Yu, J., Palecek, S. P., Thomson, J. A., Kamp, T. J. (2009b). Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circulation Research*. 104 (4), e30–e41.
- Zhang, Y. K., Liu, J. T., Peng, Z. W., Fan, H., Yao, A. H., Cheng, P., Liu, L., Ju, G., Kuang, F. (2013). Different TLR4 expression and microglia/macrophage activation induced by hemorrhage in the rat spinal cord after compressive injury. *Journal of Neuroinflammation*. 10, 112.

Zhao, Y., Yin, X., Qin, H., Zhu, F., Liu, H., Yang, W., Zhang, Q., Xiang, C., Hou, P., Song, Z., Liu, Y., Yong, J., Zhang, P., Cai, J., Liu, M., Li, H., Li, Y., Qu, X., Cui, K., Zhang, W., Xiang, T., Wu, Y., Zhao, Y., Liu, C., Yu, C., Yuan, K., Lou, J., Ding, M., Deng, H. (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*. 3 (5), 475–479.