

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Biologie

Študijný obor: Biologie



Jana Dubišová

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek
Mesenchymal stem cells for treatment of spinal cord injury

Bakalárska práca

Školiteľka: PharmDr. Šárka Kubinová, Ph.D.

Praha, 2013

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

Prohlášení:

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

V Praze, 13.5. 2013

Jana Dubišová

Abstrakt

Pacienti s vážnym poraním miechy (SCI - spinal cord injury) majú malú šancu na plnohodnotný návrat do ich pôvodného života. Tento druh zranení necháva doživotné následky ako na samotnom pacientovi, tak aj na jeho najbližšom okolí, rodine a celosvetovo sú vydávané nemalé finančné prostriedky pre znovuzачlenenie týchto pacientov do spoločnosti. Táto práca sa zameriava na popis poranenia miechy, jeho komplikovanosť a možnosť liečby pomocou novej terapeutickéj metódy mezenchymálnymi bunkami. Prvá časť pojednáva o závažnosti poranenia miechy a jeho patofyziológii s predstavením následných klinických fáz. Druhá časť je venovaná novým liečebným metódam a prístupom s dôrazom na bunkovú terapiu. Tretia časť predstaví liečebnú metódu pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek (MSCs - mesenchymal stem cells), ktorých imunomodulačné a protizápalové vlastnosti, tak ako ich schopnosť migrácie do miesta poranenia a možnosť ich genetickej modifikácie z nich urobili skvelých kandidátov na liečbu tohto závažného poranenia.

Kľúčové slová:

Poranenie miechy, kmeňové bunky, mezenchymálne kmeňové bunky, bunková terapia, regeneratívna medicína

Abstract

Patients with serious spinal cord injury (SCI) have a little chance of a full return to their original life. This kind of injuries leaves lifelong consequences as on the patients themselves, as well as their surroundings and family. Considerable financial resources are, worldwide, granted for reintegration of these patients into society. This work focuses on the description of spinal cord injury, its complexity and the possibility of treatment by new therapeutic methods of mesenchymal cells. The first section discusses the severity of spinal cord injury and its pathophysiology with the performance of subsequent clinical phases. The second part is dedicated to new treatment methods and approaches, with an emphasis on cell therapy. The third part presents treatment method using mesenchymal stem cells (MSCs), which immunomodulatory and anti-inflammatory properties, such as their ability to migration to the injured area and the possibility of genetic modification, made them a great candidates for the treatment of serious injuries.

Keywords

Spinal cord injury, stem cells, mesenchymal stem cells, cell therapy, regenerative medicine

Pod'akovanie

Rada by som poďakovala vedúcej mojej bakalárskej práce,
PharmDr. Šárke Kubinovej, Ph.D. za ochotu, trpezlivosť a
cenné rady, ktorými mi pri vypracovaní tejto práce pomohla.

Obsah

1. Zoznam použitých skratiek	2
2. Úvod	4
3. Patofyziológia poranenia miechy	6
3.1 Primárne poranenie.....	6
3.2 Sekundárne poranenie.....	6
3.2.1 Akútna fáza	7
3.2.2 Subakútna fáza.....	8
3.2.3 Chronická fáza.....	9
3.2.4 Gliová jazva.....	10
4. Nové liečebné postupy.....	11
5. Bunková terapia	12
5.1 Embryonálne kmeňové bunky.....	12
5.2 Neurálne kmeňové bunky	12
6. Terapia mezenchymálnymi kmeňovými bunkami	15
6.1 Aplikácia nemodifikovaných MSCs do miesta s SCI.....	16
6.2 Neurálna diferenciacia MSCs.....	18
6.3 Genetická modifikácia MSCs.....	19
6.4 MSCs a ich imunomodulačné vlastnosti.....	21
6.5 Bezpečnosť transplantácií MSCs.....	23
7. Záver	25
8. Zoznam literatúry	26
8.1 Literárne zdroje	26
8.2 Internetové zdroje.....	31

1. Zoznam použitých skratiek

BDNF – mozgový neutrofný faktor (brain-derived neurotrophic factor)

BBB – hematoencefalická bariéra (blood–brain barrier)

BMSCs – bunky kostnej drene (bone marrow stromal cells)

cAMP – cyklický adenosínmonofostát (cyclic adenosine monophosphate)

CNS – centrálna nervová sústava (central nervous system)

DMSO – dimetylsulfoxid

EGF – epidermálny rastový faktor (epidermal growth factor)

ESC – embryonálne kmeňové bunky (embryonic stem cells)

FGF2 – rastový faktor fibroblastov (fibroblast growth factor-2)

FLIP – inhibičných proteínov podobných FLICE (FLICE like inhibitory proteins)

GFAP – gliálny fibrilárny kyslý proteín (glial fibrillary acidic protein)

GFP – zelený fluorescenčný proteín (green fluorescent protein)

GM-CSF – faktor stimulujúci rast kolónií granulocytov a makrofágov (granulocyte-monocyte colony-stimulating factor)

GvHD – reakcia štep proti hostiteľovi (Graft-versus-Host disease)

HGF – rastový faktor hepatocytov (hepatocyte growth factor)

HLA – ľudský leukocytárny antigén (human leukocyte antigens)

HSCs – hematopoetické kmeňové bunky (hematopoetic stem cells)

hUCB – ľudská pupočníková krv (human umbilical cord blood)

IGF – inzulínu podobný rastový faktor (insuline-like growth factor)

IL-1 – interleukín-1

IL-4 - interleukín-4

IL-10 - interleukín-10

IL-1RN – antagonist receptoru pre IL-1

MMP-2 – metaloproteináza-2 (metalloproteinase-2)

MSCs – mezenchymálne kmeňové bunky (mesenchymal stem cells)

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

NeuN – neurálne jadro (neuronal nuclei)

NGF – nervový rastový faktor (nerve growth factor)

NK bunky – prirodzene cytotoxické bunky (natural killers)

NO – oxid dusný

NOD mice - neobézna diabetická myš (nonobese diabetic mice)

Nogo – inhibítor rastu neuritov (Neurite outgrowth inhibitor)

NPC – neurálne progenitorové bunky a prekursory (neural precursor cells)

NSCs – neurálne kmeňové bunky (neural stem cells)

NSE – neurón-špecifická enoláza (neuron specific enolase)

NT-3 – neutrofin-3 (neurotrophin-3)

OEG – olfaktorické gliové bunky (olfactory ensheathing glia)

PLGA – Poly-D,L-lactide-co-glykolid

PLO – Poly-L-Ornithin (Poly-L-Ornithine)

SCI – poranenie miechy (spinal cord injury)

TGF β – transformačný rastový faktor β (transforming growth factor-beta)

TNF- α – faktor nádorovej nekrózy (tumor necrosis factor α)

TrkB – tyrozín-kinázové receptory triedy B (TrkB tyrosine kinase)

VEGF – vaskulárny endoteliálny rastový faktor (vascular endothelial growth factor)

XIAP – proteín inhibujúci apoptózu nachádzajúci sa na X chromozóme (X-linked inhibitor of apoptosis protein)

2. Úvod

Poranenia miechy (SCI - spinal cord injuries) predstavujú vážny socioekonomický problém ako pre samotných postihnutých, tak i pre ich okolie. SCI sa týka prevažne vyspelých krajín sveta a súvisí s rozvojom automobilovej dopravy, úrazmi pri práci, voľnočasových aktivitách a násilnými trestnými činmi. Približne 2,5 milióna ľudí na svete žije a bojuje s týmto zranením a každoročne pribúda asi 130 000 nových prípadov. Incidencia týchto prípadov je vo vyspelých krajinách asi 5 na 100 000 obyvateľov, v USA to činí ročne asi 12 000. Veľký problém SCI je taktiež ich ekonomická záťaž, či už samého jednotlivca a jeho rodiny, tak aj štátu. Len v USA je vynaložených 7,6 mld. \$ ročne na riešenie problémov spojených s týmto druhom zranenia¹. V ČR je incidencia asi 200-300 prípadov ročne².

Klinický obraz lézie miechy je anatomicky určený rozsahom a výškovou lokalizáciou patologického procesu. Podľa lokalizácie poranenia sa v súvislosti s motorikou rozlišuje:

- Pentaplégia - poškodenie miechy v oblasti segmentov C1-C4. Vyskytuje sa ochrnutie všetkých končatín, bránice, ochrnutie brušného a trupového svalstva
- Kvadriplégia (tetraplégia) - poškodenie miechy v rozsahu segmentov C5-Th1, kedy sa vyskytuje čiastočná strata pohyblivosti horných končatín a úplná strata pohyblivosti dolných končatín a trupu.
- Paraplégia - vzniká pri lézií hrudnej miechy segmentov Th1-Th12. Podľa výšky poranenia sú postihnuté trup, brušné orgány, orgány panvy a dolné končatiny.
- Paraparéza - vzniká pri lézií v bedrovej oblasti (L1-S2) s manifestáciou na dolných končatinách.

V súčasnej dobe nie sú známe liečebné metódy, ktoré by úplne zregenerovali poškodené tkanivo a tým obnovili stratené motorické a senzorické funkcie. Dnešné štandardizované liečebné metódy zahrňujú chirurgickú stabilizáciu, fixáciu chrbtice, aplikáciu kortikosteroidov a následnú rehabilitáciu. Hoci moderné liečebné postupy skutočne znížili mortalitu týchto zranení, morbidita pacientov s poranením miechy je stále naozaj vysoká. Zložitosť patológie

Prevzaté z:

¹<http://www.campaignforcure.org/index.php/general-information>

²http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&termId=1376&tname=Poran%C4%9Bn%C3%AD+m%C3%ADchy+-+rehabilitace

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

tohto druhu poranenia vyžaduje vývoj a aplikáciu nových postupov, ktoré budú pozitívne pôsobiť proti inhibičnému prostrediu v mieste poranenia a pomôžu regenerovať poškodené nervové tkanivo. Súčasná možnosti liečby sú stále málo efektívne a ich mierne funkčné zlepšenia sú dosahované skorou dekompresiou a následnou rehabilitáciou.

Cieľom mojej bakalárskej práce je zhrnúť základné poznatky o mechanizmoch regenerácie poškodenej centrálny nervovej sústavy (CNS - central nervous system) pri SCI za pomoci použitia mezenchymálnych kmeňových buniek. V prvej časti mojej práce je popísaná štruktúra miechy a mechanizmus jej poškodenia spoločne s popisom rôznych štádií SCI. Druhá časť je venovaná novým liečebným metódam pri tomto druhu zranení a zameriava sa najmä na bunkovú terapiu. Tretia časť popisuje rôzne formy aplikácie MSCs pri SCI a ich dopady na modelových jedincov.

3. Patofyziológia poranenia miechy

Poranenie miechy je veľmi heterogénne a pohybuje sa v rozmedzí od makroskopicky normálne vyzerajúcej miechy, kde je histologický nález (napríklad demyelinizácia), až po úplnú transekciju, ku ktorej dochádza veľmi zriedka. SCI spôsobuje odumieranie buniek, vrátane neurónov, astrocytov, oligodendrocytov a buniek prekursorov (Horky et al. 2006) a zapríčiňuje vznik rôznych druhov cýst a dutín, ktoré narúšajú vzostupné a zostupné dráhy axónov aj napriek tomu, že biela hmota po obvode nemusí javiť známky poškodenia. Z patofyziologického pohľadu môžeme poranenia miechy rozdeliť na primárne a sekundárne.

3.1 Primárne poranenie

Primárnym poranením je označovaný samostatný mechanický proces poškodenia miechy v dôsledku traumy (Taoka and Okajima 1998). V dôsledku primárneho úrazu dochádza k mechanickému poškodeniu neurálnych a ďalších mäkkých tkanív, vrátane cievneho endotelu, čo často vedie ku krvácaniu, intravaskulárnemu trombu a opuchu (Tator and Koyanagi 1997). Porucha funkcie neurónov prispieva k rozvoju miechového šoku (Ditunno et al. 2004) a vedie k strate funkcie v úrovni a pod úrovňou SCI. Následkom oxidatívneho stresu a mechanického poškodenia membrán začína rozvrat extracelulárneho prostredia a iontová nerovnováha. Porucha nervového vedenia a kumulácia niektorých neurotransmiterov (napr. glutamát) poškodzuje neuróny v okolí narušenej miechy mechanizmom excitotoxicity (Wrathall et al. 1996). Dôsledkom primárneho poranenia je poranenie sekundárne.

3.2 Sekundárne poranenie

Sekundárne poranenie zahŕňa procesy rozdelené do troch fáz: akútne, subakútne a chronické. Predpokladá sa, že väčšina patologických zmien je spôsobená práve následkom sekundárnych procesov (edém, ischemia, krvácanie, zápal, bunčná trauma súvisiaca s kalcium, radikálmi, NO, glutamátom).

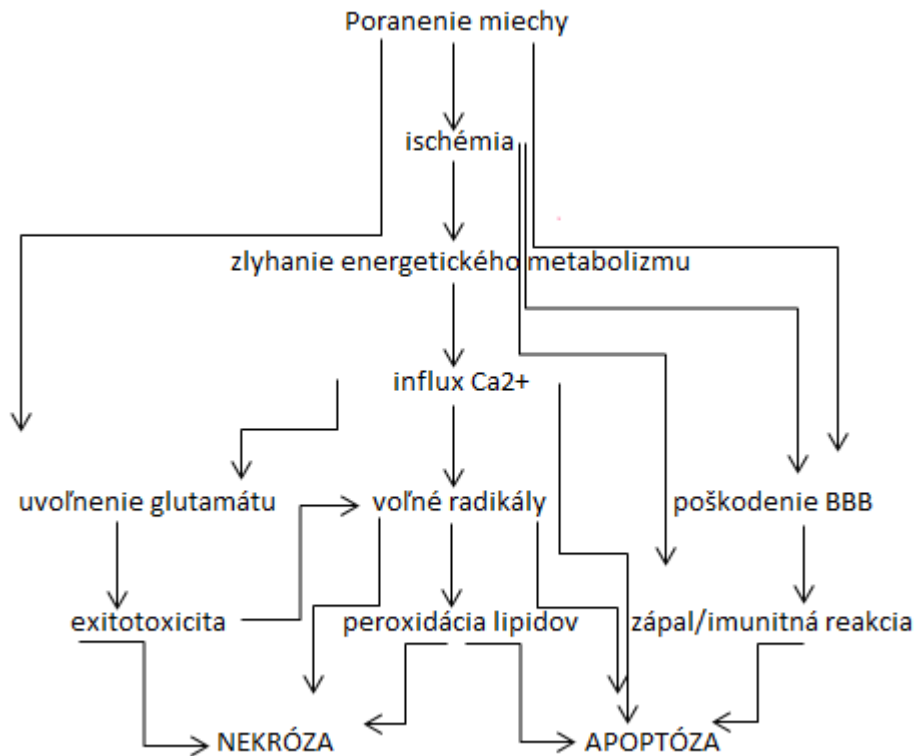
3.2.1 Akútna fáza

Časový rozsah je 2-48 hodín po samotnom úraze. V priebehu tejto fázy sa rozširuje oblasť poranenia. Charakteristickým znakom je zvýšená tvorba voľných radikálov, rozvoj zápalu, edému a krvácania. Jedná sa o kombináciu vazogénneho edému, charakterizovaného poruchou integrity hematoencefalickej bariéry (BBB - blood-brain barrier) s následným únikom plazmy do extracelulárneho prostredia. Toto spôsobuje zníženie krvného tlaku a rozvoj ischémie vďaka tlakovým zmenám. K prvotnému edému sa pridružuje edém cytotoxický, ktorý je intracelulárny a postihuje hlavne astrocyty a môže mať devastujúce následky pre miechu.

Neuróny odumierajú buď okamžite po poranení alebo s odstupom niekoľkých hodín. Zatiaľ čo v okamžitej fáze poranenia je bunková smrť spôsobená mechanickým úrazom, tak v sekundárnej fáze je následkom ischémie tkanív podloženej zníženou perfúziou, krvácaním a opuchom (Tator and Fehlings 1991). Pri tom prichádza k porušeniu veľmi krehkej iontovej rovnováhy na bunkových membránach. Pre život bunky je potom obzvlášť dôležité udržať nízku koncentráciu intracelulárneho vápniku Ca^{2+} . Hlavnú rolu v tom zohrávajú membránové receptory excitocitárnych neurotransmiterov - glutamátu a asparátu, ktoré sa nachádzajú vo vysokých koncentráciách v posttraumatickom období a spôsobujú ďalšiu stimuláciu neurónov. Táto hyperstimulácia môže viesť až k ich smrti (Olney 1969). Poškodenie BBB umožní vstup toxických látok a infiltráciu buniek parenchýmu krvnými bunkami, kde sa podieľajú na zápalovej reakcii. Neuroimunitná odpoveď na vaskulárne reakcie a proteíny sekretované aktivovanými astrocytmi a mikrogliami môžu ešte viac zvýšiť priepustnosť BBB, uľahčiť migráciu leukocytov do poškodeného tkaniva, a tým urýchliť rozvoj zápalu (Weber et al. 2007). V prípade SCI má zápalová reakcia ako pozitívne, tak i negatívne účinky. Faktor nádorovej nekrózy α (TNF - α - tumor necrosis factor α) je hlavný zápalový mediátor, ktorý je po poškodení miechy vo zvýšenej miere exprimovaný v neurónoch, gliách a endoteliálnych bunkách (Yan et al. 2001). Inhibícia jeho signálnej kaskády viedla k funkčnému zlepšeniu po SCI (Bethea et al. 1999). V inom výskume bol však preukázaný aj jeho neuroprotektívny účinok ako *in vitro*, tak *in vivo*, kde TNF- α deficientné potkany vykazovali vyšší počet apoptotických buniek, väčšiu léziu a zhoršené funkcie v porovnaní s kontrolnými jedincami (Kim et al. 2001). Vhodná modulácia imunitnej odpovedi na poranenie miechy je veľmi dôležitým krokom pri komplexnej liečbe SCI.

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

V priebehu akútnej fázy SCI dochádza k bunkovej smrti ako nekrozou, tak apoptózou. Nekróza neurónov je dôsledkom vyššie spomenutého mechanického poškodenia, rozrušenia bunkových membrán a excitotoxicity, apoptóza bola pozorovaná skôr ojedinele. Naproti tomu u myelinizujúcich buniek oligodendrocytov bola spozorovaná apoptóza ako v akútnej, tak v ďalších fázach SCI (Sahni et al. 2010). Blokáda apoptózy je tak jedným z terapeutických cieľov v liečbe SCI (Obr.1).



Obr. 1 Schéma pato-fyziologickej kaskády po akútnom SCI podľa Klussmann and Martin-Villalba (2005)

3.2.2 Subakútna fáza

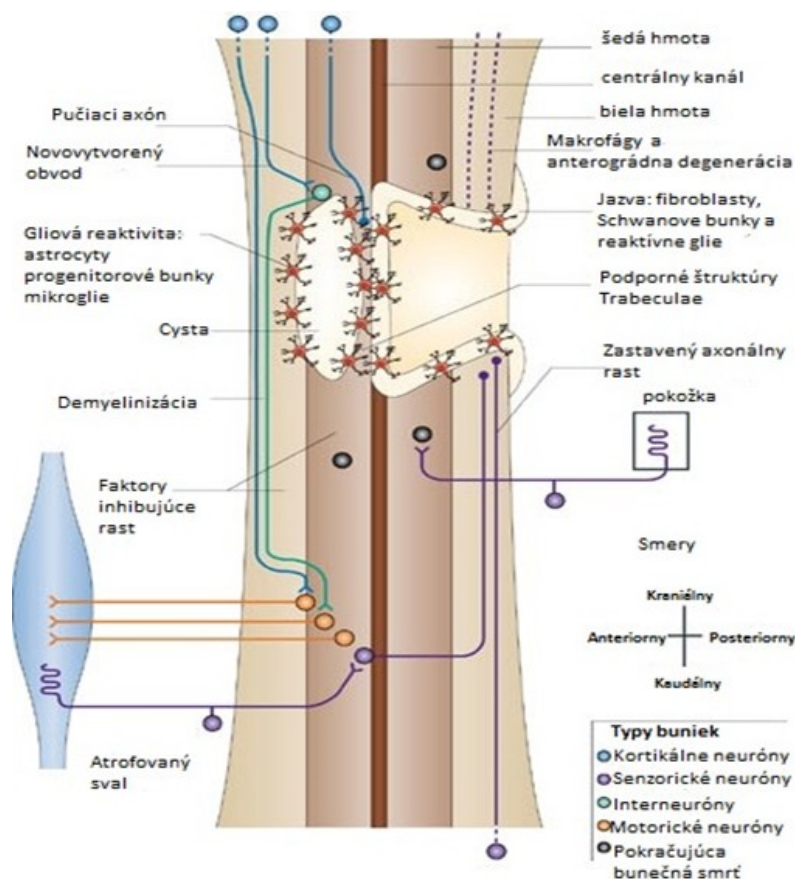
Subakútna fáza poranenia miechy sa popisuje v rozmedzí cca od 2 dní do 2 týždňov po poranení (Rowland et al. 2008). Je charakterizovaná veľkou aktivitou mikroglií a ich participáciou na zápalových procesoch. Fagocytóza nekrotického bunkového detritu a odstraňovanie zvyškov myelínu, môže prispieť k podpore axonálnej regenerácie. V tomto časovom období po poranení dochádza taktiež k hypertrofii astrocytov na okrajoch lézie a ich aktivácii. V centre poranenia naopak pokračuje ich odumieranie a nekróza. Aktivované astrocyty majú zvýšenú metabolickú aktivitu, proliferujú a oddeľujú agresívne prostredie lézie

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

od zvyškov tkaniva. Dochádza k tvorbe astrocytárnej (gliálnej) jazvy, ktorá je bariérou pre regeneráciu neurónov (Eddleston et al. 1993).

3.2.3 Chronická fáza

Chronická fáza poranenia, ktorá nastupuje v priebehu týždňov po poranení a trvá niekoľko rokov pokračuje apoptózou, jazvením, demyelinizáciou, stabilizáciou gliovej jazvy a tvorbou cýst (Obr.2). Zánik oligodendrocytov vytvárajúcich myelínove pošvy spôsobuje ďalšiu demyelinizáciu nervových vlákien (Fawcett and Asher 1999). V dôsledku formácie cysty a jej zväčšovania môže dôjsť k rozvoji syringomyélie. Je možné pozorovať známky regenerácie a axonálneho pučania, čo môže viesť k čiastočnej reinervácii, ale aj k chronickej bolesti (Christensen and Hulsebosch 1997). V tejto fáze poranenia sa terapeutické prístupy zameriavajú na redukciiu inhibujúcej gliovej jazvy a premostenie kavity.



Obr. 2 Schematické znázornenie miechy po zranení. Sagitálny pohľad na cervikálny región po SCI, vykresľujúci kombináciu znakov z rôznych typov poranení. Veľké množstvo buniek odumiera okamžite po poranení, rovnako tak bunky odumierajú aj postupne po SCI. Cysty sa zvyčajne formujú po kontúzii miechy. Po penetračných poraneniach bunky z PNS vnikajú do poraneneho miesta, kde spolu s astrocytmi,

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

progenitorovými bunkami a mikrogliami formujú gliovú jazvu. Veľké množstvo zostupných a vzostupných dráh je prerušených a neschopných regenerácie. Niektoré axóny vytvoria nové spojenia s motorickými dráhami pomocou interneurónov. Na strane cysty môžu axóny pučať do premostenia (tzv. trabeculae), ktoré je formované ependymálnymi bunkami. Rozdelené myelinizované segmenty axónov sú fagocytované makrofágmi. Boli pozorované spontánne remyelinizácie určitých segmentov, prevažne pomocou Schwannových buniek v PNS, zatiaľ čo denervované svaly atrofovali. (Prevzaté z Thuret et al. (2006)

3.2.4 Gliová jazva

Gliová jazva vzniká následkom rôznych poranení CNS a je tvorená najmä astrocytmi, mikrogliami a oligodendrocytmi. Po poranení dochádza k migrácii makrofágov z krvného riečiska a mikroglíí z okolitých tkanív do miesta poranenia (Kreutzberg 1996). Neskôr dochádza taktiež k aktivácii prekursorov oligodendrocytov a eventuálne meningeálnych buniek v okolitom tkanive. Astrocyty hypertrofujú, predlžuje sa dĺžka a štruktúra ich výbežkov, ktoré sa preplietajú a sú spojené tesnými spojmi (angl. tight junctions). Astrocytárna reakcia je sprevádzaná zvýšením expresie gliálneho fibrilárneho kyslého proteínu (GFAP - glial fibrillary acidic protein), vimentinu a markrov neurálnych prekursorových buniek (Nestin) (Abnet et al. 1991).

Sama štruktúra gliovej jazvy s jej tesnými spojmi je prekážkou pre axonálny rast. Reaktívne astrocyty taktiež produkujú proteíny extracelulárnej matrix (napr. chondroitin sulfátové proteoglykany), ktoré sú pre samotný rast axónov inhibičné (Eddleston, Delatorre, Oldstone, Loskutoff, Edgington and Mackman 1993). Oligodendrocyty významne prispievajú k inhibičnej povahe jazvy napríklad produkciou inhibičných molekúl ako inhibítora rastu neuritov (Nogo - neurite outgrowth inhibitor) a rôznych iných proteoglykanov (Schnell and Schwab 1990). Rovnako aj meningeálne bunky migrujúce do oblasti lézie tvoria významnú bariéru pre rast axónov. Gliová jazva je hlavným dôvodom inhibície ako regenerácie axónov, tak aj remyelinizácie (Fawcett and Asher 1999).

4. Nové liečebné postupy

Z vyššie uvedených problémov vyplýva, že liečba SCI musí byť komplexná. Musí pôsobiť proti inhibičnému prostrediu, ktoré sa v mieste zranenia nachádza, a tým poskytnie možnosť regenerácie axónov. Ako účinná liečba poranenia miechy je v súčasnej dobe navrhovaná kombinácia rôznych terapeutických prístupov, ako sú bunková transplantácia, premostenie lézie pomocou biomateriálov, blokácia inhibičných faktorov, narušenie gliálnej jazvy, podanie neurotrofných, neuroprotektívnych látok a rastových faktorov ako mozgový neurotrofný faktor (BDNF - brain-derived neurotrophic faktor), nervový rastový faktor (NGF - nerve growth factor), neurotrofin-3 (NT-3 - neurotrophin-3), či malých molekúl typu cyklický adenzínmonofosfát (cAMP - cyclic adenosine monophosphate), ktoré regulujú rast a podporujú prežitie neurónov alebo génová terapia (Kubinova and Sykova 2012).

Pokroky vo výskume kmeňových buniek a výsledky preklinických a klinických štúdií preukázali, že forma bunkovej terapie aplikovaná na liečbu SCI vyzerá do budúca veľmi sľubne (Sykova et al. 2006b).

5. Bunková terapia

Kmeňové bunky sú nediferencované živočíšne bunky, majúce schopnosť proliferácie a diferenciácie na iný bunkový typ. Delia sa na totipotentné, ktoré môžu diferencovať na akýkoľvek bunkový typ, pluripotentné, vznikajúce z bunky totipotentnej, produkujúce akýkoľvek iný bunkový typ okrem totipotentnej bunky, bunky multipotentné, produkujúce iba bunky príbuzné danému bunkovému typu a progenitorové bunky, ktoré môžu produkovať iba jediný bunkový typ, ale sú schopné sa samé plne obnoviť - toto je vlastnosť deliaca ich od buniek, ktoré nie sú kmeňové.

Bunková terapia predstavuje sľubný potenciál v liečbe SCI a ďalších chorôb CNS. V experimentálnej liečbe poškodenia miechy bola overovaná celá rada bunkových typov: embryonálne kmeňové bunky (ESCs - embryonic stem cells), neurálne progenitorové bunky a prekursor (NPCs - neural precursor cells), olfaktorické gliové bunky (OEG - olfactory ensheathing glia), MSCs, Schwannove bunky, indukované pluripotentné bunky alebo aj kmeňové bunky izolované z kože (Schultz 2005).

5.1 Embryonálne kmeňové bunky

Embryonálne kmeňové bunky sú pluripotentné bunky odvodené z vnútornej bunkovej masy raného štádia blastocysty. Transplantácia ESCs pri SCI bola prvýkrát použitá McDonaldom a jeho tímom v roku 1999 (McDonald et al. 1999). Táto štúdia demonštrovala príslušnú diferenciáciu, ktorá asociovala s funkčnou regeneráciou. Avšak tieto výskumy ukázali, že kmeňové bunky, a najmä tie najprimitívnejšie, diferencovali do nežiaducich bunkových typov, ktorých výsledkom boli tumory. Riešením, ako sa vyhnúť tvorbe teratómov z ESCs, je vytvorenie špecifických línii progenitorových buniek, ktoré diferencujú výhradne do určitého bunkového typu, napr. do oligodendrocytov, astrocytov či neurálnych buniek.

5.2 Neurálne kmeňové bunky

Neurálne kmeňové bunky (NSCs - neural stem cells) môžu byť odvodené z ESCs alebo fetálneho tkaniva. Štúdie, zahrňujúce transplantáciu NSCs sa ukazovali ako veľmi sľubné.

Po vystavení rastovým faktorom sú NSCs *in vitro* schopné rásť, udržiavajú si schopnosť regenerácie aj po niekoľkých cykloch rozmrazenia a ich opätovného zamrazenia a produkujú

diferencované bunky, ktoré môžu funkčne interagovať (Caldwell et al. 2001) a regenerovať miesto poranenia (Cummings et al. 2006). Taktiež chránia proti excitotoxicite a sekretujú neurotrofné rastové faktory (Llado et al. 2004).

Cummings a kol. demonštrovali, že ľudské NSCs rástli ako neurosféra, migrovali a bola pozorovaná expresia markrov neuronálnej a oligodendrocytickej diferenciácie ešte dlhú dobu po ich transplantácií do miesta s SCI (2006). Mimo to, implantované NSCs asociovali so zlepšením lokomotorických funkcií a so zníženou astrocytickou diferenciáciou. U oboch modelových myelín-deficientných jedincov s SCI bola taktiež pozorovaná remyelinizácia a snímky z elektrónového mikroskopu doložili formovanie synapsií medzi NSCs a neurónmi.

Ďalší výskum ukázal, že po transplantácií NSCs do miesta s poraním miechy diferencovali najmä na astrocyty (Cao et al. 2001) a vykazovali expresiu oligodendritických markerov (Pfeifer et al. 2004), zatiaľ čo neuronálna diferenciácia sa vyskytovala vzácné. Prežitie transplantovaných NSCs v hostiteľskom tkanive sa ukázalo ako problematické (Dihne et al. 2006). Transplantované bunky totiž neboli plne prijaté hostiteľským prostredím v zranenej CNS a umierali, čím umocnili endogénnu bunkovú smrť, ktorá vyvoláva ďalšie zápalové procesy, a tým rozširuje veľkosť lézie. Aj životnosť NPCs sa ukázala ako veľmi nízka, obzvlášť pri ich aplikácií v chronickom štádiu SCI, kde implantácia NPCs prebiehala spoločne s použitím rastových faktorov (Karimi-Abdolrezaee et al. 2006). Mimo to, NPCs môžu vyvolať nekontrolované pučanie a vytvoriť tak cestu zvýšenej senzitivite bolesti sprevádzajúcu SCI. Stupeň allodynne taktiež koreloval aj s mierou diferenciácie astrocytov (Hofstetter et al. 2005). Tendencia diferenciácie NSCs na gliové bunky (Cao et al., 2005, Vroemen et al., 2003), prerastajúce poranenú CNS, ďalej prispieva k astroglióze a zväčšovaniu gliovej jazvy (Vroemen et al. 2003).

Pri ďalšej štúdií boli modifikované ľudské NSCs implantované do Poly-D,L-lactide-co-glycolide (PLGA - poly(lactic-co-glycolic acid)) konštrukcie a aplikované do psej miechy po hemisekcií. PLGA premostili defekt a interagovali so reziduálnym tkanivom psej miechy a taktiež NSCs prežili implantáciu a vykazovali schopnosť migrácie do reziduálneho tkaniva. Rovnako bola pozorovaná ektopická expresia NT-3 a u pokusných jedincov a zvýšená pohyblivosť postihnutých končatín (Kim et al. 2010).

Z vyššie popísaných výsledkov vyplýva, že transplantácia NCSs má ako rad výhod, tak aj svoju limitáciu, avšak ich použitie sa už testuje v klinických štúdiách ako napríklad

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

Neuralstem štúdia, prebiehajúca v USA, kde klinická štúdia prvej fázy pre chronických pacientov s SCI začala v roku 2013 a Severnej Kórei, kde táto fáza taktiež začala v roku 2013 avšak pre pacientov, v akútnej fáze SCI³.

Súčasne sa vo výskumoch začali používať dospelé kmeňové bunky s možnosťou autológnych transplantácií. V porovnaní s ESCs tieto transplantácie neporušovali etický kódex a autológne transplantáty neboli odhojované.

Prevzaté z:

³ <http://www.neuralstem.com/cell-therapy-for-sci>

6. Terapia mezenchymálnymi kmeňovými bunkami

Dospelá kostná dreň je zložená z rôznych bunkových typov, vrátane hematopoetických kmeňových buniek (HSCs - hematopoietic stem cells) a buniek kostnej drene (BMSCs - bone marrow stromal cells), tiež známych ako mezenchymálne kmeňové bunky. MSCs boli po prvýkrát izolované a rozpoznané Alexandrom Friedensteinom v kostnej dreni vďaka ich schopnosti tvoriť fibroblastické kolónie a diferencovať na osteoblasty, chondroblasty a adipocyty (Friedens.Aj et al. 1968). Jedna z výhod MSCs je ich pomerne jednoduchá izolovateľnosť v rámci rôznych štruktúr, ktorými sú napríklad pupočníková krv, kostná dreň, tukové tkanivo alebo koža. Avšak v tejto dobe nie je jasné, či majú tieto bunky, izolované z rôznych tkanív, podobné terapeutické možnosti, a ktoré tkanivá sú najvhodnejšie pre izoláciu týchto buniek pre ich najoptimálnejšie vlastnosti.

Transplantované MSCs sú schopné sekretovať faktory, podporujúce prežívanie neurónov, ako sú inzulínu podobný rastový faktor (IGF - insuline-like growth factor), BDNF, vaskulárny endoteliálny rastový faktor (VEGF - vascular endothelial growth factor), faktor stimulujúci rast kolónií makrofágov (GM-CSF - granulocyte-macrophage colony stimulating), rastový faktor fibroblastov (FGF2 - fibroblast growth factor-2) a transformačný rastový faktor β (TGF- β - transforming growth factor-beta) (Nakagami et al. 2005, Wei et al. 2009, Sadat et al. 2007). Tieto bunky je taktiež možné geneticky upraviť, aby vylučovali peptidy alebo celé proteíny, ktoré by mohli pôsobiť či už autokrinne, zaisťujúc svoje vlastné prežitie (Cao et al., 2005), rovnako ako zaisťujúc prežitie a regeneráciu neurónov (Liu et al., 2002).

Jedna z vlastností, pre ktorú sú MSCs využívané, je ich migračná schopnosť, ktorou sú tieto bunky, podané zdravému jedincovi, smerované do kostnej drene (Bensidhoum et al. 2004, Devine et al. 2001, Wynn et al. 2004), zatiaľ čo intravenózne podané MSCs pri jedincoch s akútnym zápalom migrovali najmä do postihnutých miest (Chapel et al. 2003, Ortiz et al. 2003).

Naproti tomu pokusy na potkaních modeloch s poraním mozgu (TBI - traumatic brain injury) ukázali, že jednorazovo intravenózne podané MSCs boli až z 96 % vychytané v pľúcach a nedostali sa do arteriálneho obehu (Harting et al. 2009). Iné pokusy nám ukázali, že MSCs, ktoré boli podané potkanom s TBI dvojfázovo, vykazovali úspešnú migráciu do miesta poranenia a ich viditeľnú lokalizáciu v jeho okolí. Taktiež bola pozorovaná exprimácia niektorých neuronálnych a astrogliálnych markrov (Mahmood et al. 2003).

Vďaka svojej schopnosti diferencovať na rôzne typy buniek majú MSCs široké klinické využitie. Ich terapeutický účinok je využívaný v regeneratívnej medicíne v odvetviach, ako napríklad liečba Crohnovej choroby, reakcia štetu proti hostiteľovi či liečba mŕtvice (Hanley et al. 2013). Bola taktiež pozorovaná in vitro diferenciácia MSCs na kardiomyocyty a mezenchymálne kmeňové bunky sa používajú aj pri regenerácii myokardu po srdečnom infarkte (Heng et al. 2004).

6.1 Aplikácia nemodifikovaných MSCs do miesta s SCI

Vzhľadom na vyššie popísané vlastnosti sa MSCs začali aplikovať okrem iného aj pri liečbe SCI a na pokusných modeloch sa testujú rôzne formy podania mezenchymálnych buniek.

Pri jednom z pokusov na myších modeloch boli bunky stróma izolované z myší, ktoré exprimovali zelený fluorescenčný proteín (GFP - green fluorescent protein). Tieto bunky boli kultivované ako adherentné bunky s typicky pretiahnutým tvarom. Transplantácia týchto MSCs pomocou mikroinjekcie do miesta demyelinizovanej miechy imunosupresívneho potkana preukázala remyelinizáciu postihnutého miesta a bolo pozorované zrýchlenie prenosu nervového vzruchu. GFP-pozitívne MSCs boli objavené v miestach myelinizácie spolu s bázickým proteínom myelínu (MBP - myelin basic protein). Tieto pozorovania naznačovali, že MSCs sú schopné produkovať funkčný myelín po ich transplantácii do demyelinizovanej miechy (Akiyama et al. 2002).

Vo výskume na potkaních modeloch boli jedincom s SCI injikované do cerebrospinálnej tekutiny MSCs. Výsledky preukázali zlepšenie behaviorálnych vlastností modelových jedincov, zmenšenie kavity a produkciu trofických faktorov (Ohta et al. 2004).

V ďalšej štúdií boli modelovým jedincom po balónikovej lézii aplikované ľudské MSCs. Potkanom, ktorým neboli podané imunosupresíva, boli intravenózne podané MSCs 7 dní po SCI. Výsledky preukázateľne dokázali zlepšenie motorických funkcií. Rovnako aj imunohistochemická analýza preukázala migráciu a prežitie MSCs do miesta lézie. Bola preukázana diferenciácia MSCs na oligodendrocyty, avšak sekrécia neurálnych markerov nebola preukázaná (Cizkova et al. 2006) .

Vo ďalšom výskume boli ľudské MSCs, pochádzajúce od rôznych donorov, aplikované priamo do miesta neúplného SCI potkaních modelov ihneď po transekcii.

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

Imunohistochemická analýza preukázala rast axónov a zlepšenie pohybových funkcií, avšak veľkosť zlepšenia bola závislá na donorovi (Neuhuber et al. 2005).

Vaquero a kol. vo svojej štúdií injikoval potkaním modelom s chronickým SCI MSCs intravenózne alebo priamo do miesta lézie (2006). Jeho výsledky preukázali, že intravenózne podané MSC vykazovali určité motorické zlepšenie v porovnaní s kontrolami, avšak MSCs, aplikované priamo do miesta lézie vykazovali jasnú a progresívnu funkčnú regeneráciu poškodenej miechy.

V jednom z výskumov, pri ktorom boli dospelým potkanom podané imunopresíva, transplantovali MSCs izolované z ľudskej pupočníkovej krvi (hUCB - human umbilical cord blood) do miesta s akútnym SCI. Bola pozorovaná sekrécia rastového faktoru hepatocytov (HGF - hepatocyte growth factor), jeho orientovaná migrácia a akumulácia v mieste lézie, redukcia jej veľkosti, väčšia rýchlosť axonálneho rastu a signifikantné zlepšenie motorických funkcií u pozorovaných jedincov. Taktiež nebola pozorovaná žiadna neurálna diferenciácia ani dlhotrvajúca perzistencia voči transplantátu. Produkcia pleiotrofinu *in vitro* ďalej naznačuje parakrinnú funkciu MSCs pri ich aplikácii do SCI (Schira et al. 2012).

Na základe pozitívnych výsledkov z preklinických výskumov sa MSCs začali overovať v celom rade klinických testov. Klinická štúdia, ktorá prebehla v Severnej Kórei aplikovala MSCs pacientom s kompletným SCI priamo do miesta lézie, spolu so subkutánnym podaním GM-CSF. Táto štúdia preukázala zlepšenie motorických schopností u pacientov v rôznom časovom odstupe a bezpečnosť tejto formy liečby (Park et al., 2005).

Ďalšia klinická štúdia, ktorá prebehla v Českej republike, zahrňovala 20 pacientov s tranzverzálnym SCI. Táto štúdia porovnávala intra-arteriálny a intra-venózne spôsoby aplikácie autológnych MSCs a skupinu pacientov s akútnym SCI a chronickým SCI. Výsledky preukázali, že transplantácia MSCs je asociovaná s funkčným zlepšením u pacientov v akútnej fáze SCI a dokázali bezpečnosť tejto metódy (Sykova et al. 2006a).

Jedna z novších klinických štúdií popisuje u 10 pacientov s SCI aplikáciu MSCs priamo do miesta poškodenia. Mezenchymálne bunky boli izolované z ilia, kultivované 4 týždne a autológne transplantované do miechy a intradurálneho priestoru. Po 4-8 týždňoch boli MSCs injikované pomocou lumbálnej punkcie. Výsledky ukázali, že u 9 pacientov sa zlepšili motorické funkcie po aplikácii MSCs a rovnako bolo vidieť na obrázkoch z magnetickej rezonancie zmenšenie veľkosti kavity (Park et al. 2012).

6.2 Neurálna diferenciácia MSCs

Za normálnych podmienok diferencujú MSCs do buniek mezodermálneho pôvodu teda kosti, chrupavky a tukového alebo svalového tkaniva. Výskumy však ukazujú, že pri vystavení MSCs epidermálnemu rastovému faktoru (EGF - epidermal growth factor) alebo BDNF, začne časť z nich diferencovať na neurálne bunky a exprimovať faktory ako Nestin, GFAP a neurálne jadro (NeuN - neuronal nuclei) (Sanchez-Ramos et al. 2000). Iné výskumy použili 2 % dimetylsulfoxid (DMSO), ktorý vyvolal exprimáciu neuronálnych indikátorov ako NeuN a neurón-špecifická enoláza (NSE - neuron specific enolase)(Woodbury et al. 2000). Z najnovších výskumov vyplýva, že pri MSCs, ktoré diferencovali do neurálnych buniek, je potlačovaná génová expresia chondrogenických, osteogenických, adipogenických a myogenických génov a naopak, je vo zvýšenej miere aktivovaná expresia v neurálnych génoch (Tondreau et al. 2008). Keď túto diferenciáciu testovali *in vivo* na potkaních modeloch pre Parkinsonovu chorobu, aplikovali MSCs exprimujúce GFP a skúmali ich bunkový fenotyp počas 12-tich mesiacov. Výsledky odhalili, že hoci sledované bunky migrovali do miesta poranenia, ostali hematopoetickými a nediferencovali na neurálne bunky (Vallieres and Sawchenko 2003). Iný výskum preukázal, že po podaní ľudských MSCs do miesta postihnutého léziou, MSCs sekretovali neutrotrófné faktory, cytokíny a látky pre axonálny rast aj niekoľko mesiacov po podaní. Aj napriek tomu, že ich množstvo sa rapidne zmenšilo, terapeutický účinok stále pretrvával (Himes et al. 2006).

Hofstetter a kol. diferencoval bunky *in vitro* na bunky podobné neurónom a aplikoval ich potkaním modelom (2002). Jednej skupine modelových jedincov boli injikované MSCs ihneď po zranení, zatiaľ čo druhej skupine boli mezenchymálne bunky podané týždeň po SCI. Tieto pokusy preukázali vyššie prežívanie jedincov, ktorým boli aplikované MSCs s oneskorením oproti jedincom, ktorým boli podané ihneď po zranení. Rovnako neskoršia liečba asociovala so signifikantným zlepšením motorických funkcií. Avšak aj napriek úspešnému zlepšujúcemu sa stavu modelových jedincov, elektrofyzologické a imunohistochemické analýzy týchto diferencovaných MSCs preukázali, že transplantované bunky neboli zrelé a nemali funkčné sodné a draselné kanály.

Výrazne vyšší neurogénny diferenciačný potenciál majú MSCs získane z pupočníkovej krvi. Zaujímavý výsledok poskytla štúdia, kde boli kmeňové bunky izolované z hUCB implantované do potkanej miechy po SCI. Už po jednom týždni bolo vidieť diferenciáciu

týchto buniek do nervových buniek, ktoré vykazovali morfológický a imunohistochemický profil neurónov, oligodendrocytov a astrocytov napomáhajúci v remyelinizácii obnažených axónov (Dasari et al. 2007b). Napriek tomu, že nie je jasné, ktorý molekulárny faktor určuje diferenciáciu MSCs po transplantácii, bolo pozorované, že transplantácia hUCB buniek môže utlmovať dráhu fas/kaspázy-3 v neurónoch aj oligodendrocytoch a zvyšuje množstvo anti-apoptotických proteínov, inhibičných proteínov podobných FLICE (FLIP - FLICE like inhibitory proteins) a proteín inhibujúci apoptózu nachádzajúci sa na X chromozóme (XIAP - X-linked inhibitor of apoptosis protein)(Dasari et al. 2008). Ďalšie experimenty na potkaních modeloch ukázali, že spomínanú schopnosť regulácie majú aj MSCs, aplikované v mieste poranenia miechy (Dasari et al. 2007a). Tieto štúdie ukázali, že je možné zabrániť sekundárnej demyelinizácii a apoptóze oligodendrocytov moduláciou anti-apoptotických dráh, a tým prispieť k zlepšeniu pohybových schopností použitých myších modelov (Azari et al. 2006).

Na týchto výsledkoch môžeme vidieť, že neurálna alebo neuronálna diferenciácia MSCs je zatiaľ veľmi kontroverzná a mala by byť v budúcnosti oveľa viac preskúmaná.

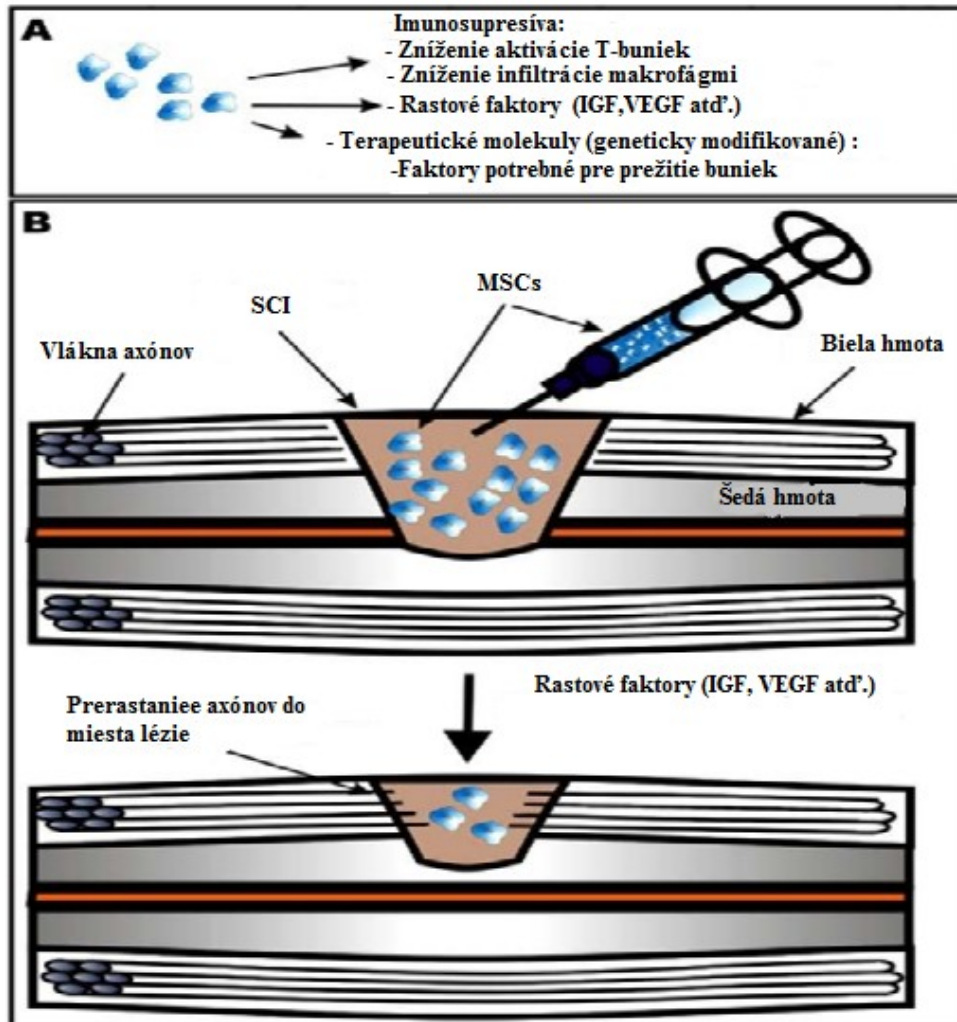
6.3 Genetická modifikácia MSCs

Zranená dospelá miecha je prostredie, kde sú veľmi nevhodné podmienky pre prežitie buniek, ich diferenciáciu a maturáciu, preto vedci hľadali spôsoby, ako by reparačné, diferenciačné a maturačné schopnosti kmeňových buniek zvýšili (Hofstetter, Holmstrom, Lilja, Schweinhardt, Hao, Spenger, Wiesenfeld-Hallin, Kurpad, Frisen and Olson 2005). Jedna zo stratégií, ako zvýšiť produktivitu MSCs je ich genetická modifikácia. MSCs sú po genetickej modifikácii schopné tvoriť veľké spektrum látok, vrátane neurotrofných faktorov ako NT-3, BDNF a NGF, ktoré sú schopné podporovať regeneráciu poškodeného tkaniva po ich transplantácii do miesta lézie. MSCs, ktoré boli modifikované na expresiu NT-3, podporovali axonálny rast po SCI v kortikospinálnom trakte (Grill et al. 1997). Po podaní MSCs modifikovaných na sekréciu BDNF bolo taktiež preukázané veľké zvýšenie axonálneho rastu v rubro-spinálnom, vestibulo-spinálnom a retikulo-spinálnom trakte, a to aj v prípade podania MSCs v štádiu chronického zápalu poranenia až po 4 týždňoch od prevedenej hemisekcie (Jin et al. 2002).

Pri transplantácii týchto MSCs do miesta poranenia v rubrospinálnej oblasti (Liu et al. 2002) alebo laterálnej lézie vláken (Murray et al. 2002) u dospelých potkanov bola

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

preukázaná nielen schopnosť MSCs redukovať odumieranie neurónov, ale aj podpora axonálneho rastu s čiastočným návratom pohybových schopností skúmaných jedincov (Obr.3).



Obr. 3 Terapeutický účinok MSCs pri SCI. **A)** MSCs majú viaceré účinky, ktoré môžu byť použité v regeneratívnej medicíne, ako napríklad ich schopnosť utlmenia imunitného systému, sekrecie rastových faktorov a možnosť ich použitia ako bunkových vektorov pre prepravu terapeutických molekúl. **B)** Transplantácia MSCs, obzvlášť geneticky modifikovaných na sekreciu neurotrofných faktorov ako BDNF, môže výsledne regenerovať poškodené axóny a podporiť ich prerastanie do lézie (Azari et al. 2010).

Ďalší výskum ukázal, že MSCs, ktoré sekretovali ako BDNF, tak aj NT-3 nielenže prispeli k zlepšeniu pohybových schopností zadných končatín na potkaních modeloch, ale aj k čiastočnému zlepšeniu funkcie močového mechúra, ktorý bol po poškodení hrudnej časti miechy areflexný (Mitsui et al. 2005).

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

Terapeutické vlastnosti MSCs sú závislé aj na špecifickosti neurotrofinu, ktorý exprimujú. Tento poznatok bol objasnený v štúdií, kde boli do poškodenej miechy dospelých potkaních modelov implantované MSCs exprimujúce NT-3 alebo NGF. Bunky exprimujúce NT-3 boli schopné zabrániť odumieraniu neurónov v Clarkovej oblasti, zatiaľ čo MSCs, ktoré exprimovali NGF zabraňovali odumieraniu iba čiastočne (Himes et al. 2001). Nakaharov tím vo svojej štúdií preukázal, že nepoškodené motorické axóny naštepené modifikovanými MSCs, exprimujúcimi NGF, NT-3 a FGF2, nerástli, zatiaľ čo senzorické neurity s týmito štepami rast vykazovali. Pri poškodení miechy rástli senzorické axóny iba v prítomnosti BDNF faktoru (Nakahara et al. 1996). Mimo to, zdá sa, že preťaté axóny, lokalizované v zostupnej dráhe, vyžadujú špecifické neurotrofiny a iný metodický postup. Regenerácia rubro-spinálnych vlákien je závislá na BDNF z dôvodu výskytu tyrozín-kinázových receptorov triedy B (TrkB - TrkB tyrosine kinase) (King et al. 1999, Kobayashi et al. 1997) a vlákna kortiko-spinálnej dráhy vyžadujú kombináciu BDNF, NT-3 a GDNF pomocou implantácie periférneho nervu pre optimálnu regeneráciu a rast tkaniva (Ferguson et al. 2001).

Aj sekrécia solubilných molekúl, vytváraných MSCs, môže byť regulovaná trofickými faktormi priamo z miesta poranenia. Napríklad MSCs, kultivované s extraktmi ischemického mozgu, zvyšovali expresiu BDNF, NGF, VEGF a HGF (Chen et al. 2002). Na druhú stranu faktory, nachádzajúce sa v miestach zranenej miechy, môžu znižovať produkciu BDNF v geneticky modifikovaných MSCs (Tobias et al. 2001).

Tieto štúdie nám poukázali na fakt, že liečba SCI si vyžaduje veľmi komplexný a špecifický prístup pre rôzne bunkové typy. Nové liečebné stratégie musia používať kombinácie neurotrofických faktorov a rôzne dopravné možnosti do miest, kde má prebiehať neuronálna regenerácia.

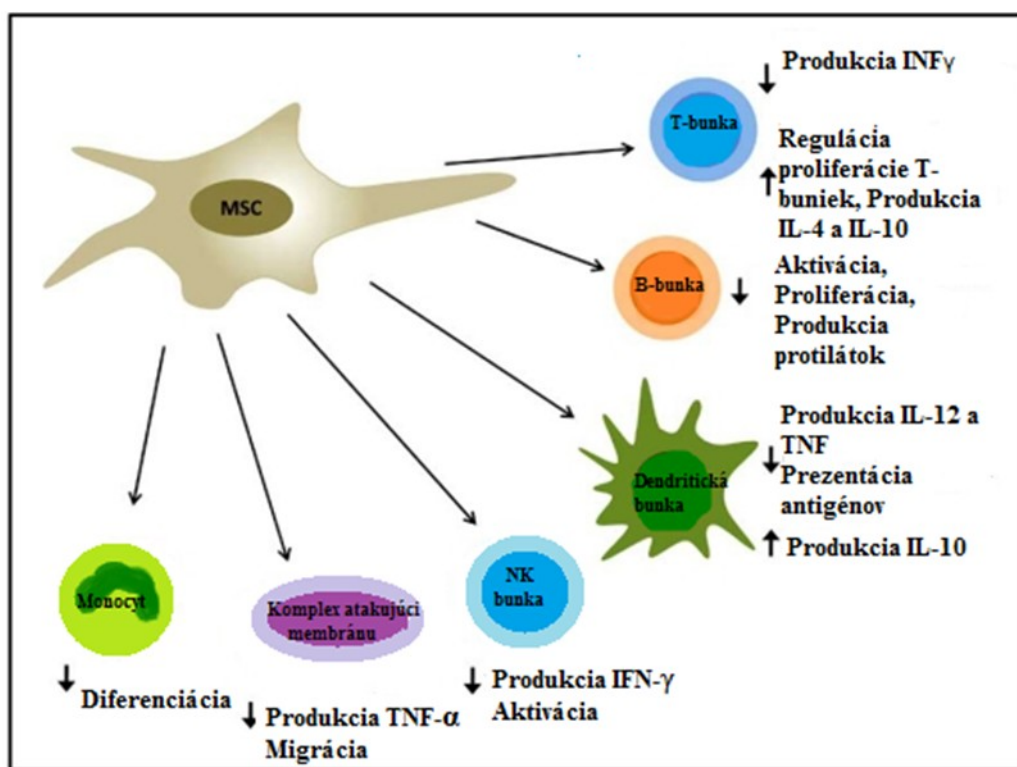
6.4 MSCs a ich imunomodulačné vlastnosti

V posledných rokoch bolo preukázané, že MSCs majú imunosupresívne účinky a sú schopné prejsť hiskompatibilnou (HLA - human leukocyte antigens) bariérou. Okrem toho, tieto alogénické štepy sú *in vitro* prijímané bez problémov a nevytvárajú žiadnu reakciu, dokonca nie sú príliš odhrojované imunitným systémom hostiteľa pri pokusoch *in vivo* (Chidgey et al. 2008). Vzhľadom na to, že imunitný systém nie je schopný rozoznať HLA I. triedy, exprimované na povrchu MSCs, je možné zredukovať podpornú liečbu imunosupresívami po ich transplantácii. Navyše tieto bunky sú schopné sekretovať

imunomodulačné molekuly, ktoré sú schopné zastaviť vývoj T-lymfocytov v G0 fázy ich bunkového cyklu, čo je jedna z možností, prečo nie sú rozpoznávané hosťateľským imunitným systémom.

Ďalšia ich vlastnosť je, že dokážu inhibovať zápalové cytokíny, interleukíny-1 (IL-1) vďaka svojej schopnosti sekretovať antagonistu receptora IL-1 (IL-1RN), a rovnako znižujú produkciu ďalšieho zápalového mediátora TNF α , ktorý je produkovaný aktivovanými makrofágmi (Ortiz et al. 2007).

Pri výskume MSCs bolo preukázané, že tieto bunky sú schopné ovplyvňovať veľké množstvo buniek imunitného systému (Obr. 4).



Obr. 4 MSCs majú schopnosť modulovať reakciu imunitného systému redukciou zápalových funkcií imunitných buniek a obmedzením produkcie zápalových cytokínov, pričom popri tom podporujú proliferáciu T-buniek a sekréciu interleukínu-4 (IL-4) a interleukínu-10 (IL-10) (Azari, Mathias, Ozturk, Cram, Boyd and Petratos 2010).

Protizápalové účinky MSCs boli dostatočne preukázané pri potlačení reakcie štetu proti hosťateľovi (GvHD - Graft-versus-Host disease) u pacientov s transplantáciou kostnej drene, kde bola rovnako preukázaná schopnosť týchto buniek podporovať hematopézu (Le Blanc et al. 2007).

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

V pokusoch na potkaních modeloch bolo úspešne preukázané, že po transplantácii MSCs do miesta lézie, prichádza zlepšenie pohybových schopností a regenerácia poškodeného tkaniva, a to aj napriek tomu, že už 11 týždňov po zranení je počet živých mezenchymálnych buniek v mieche veľmi nízky (Himes, Neuhuber, Coleman, Kushner, Swanger, Kopen, Wagner, Shumsky and Fischer 2006). Tieto skutočnosti nám môžu pomôcť objasniť rolu imunitného systému pri odhojovaní transplantovaných MSCs počas absencie sprievodnej liečby imunosupresívami.

Dôvod odhojovania transplantovaných buniek prinútil hľadať cestu, kde by sa MSCs absolútne skryli pred imunitným systémom hostiteľa. Preto Tobias a tím spolupracovníkov vymysleli stratégiu, kde MSCs uzavreli do kapsule z Poly-L-Ornithinu (PLO - Poly-L-Ornithine), ktorá až po dobu jedného mesiaca ochránila bunky pred imunitným systémom a nebolo nutné použitie imunosupresív (Tobias, Dhoot, Wheatley, Tessler, Murray and Fischer 2001).

6.5 Bezpečnosť transplantácií MSCs

Bezpečnosť použitia MSCs bola preukázaná v celom rade už dokončených klinických štúdií zameraných na liečbu CNS (Park et al. 2005; Sykova, Homola, Mazanec, Lachmann, Konradova, Kobylka, Padr, Neuwirth, Komrska, Vavra, Stulik and Bojar 2006a). Z definície vyplýva, že sú schopné diferencovať na bunky mezenchymálneho pôvodu. Diferenciácia intravenózne transplantovaných MSCs na osteoblasty bola zistená pri analýze pľúcnych tumorov (Wang et al. 2009). Hoci u mezenchymálnych buniek transplantovaných priamo do miesta zranenej miechy, nebol pozorovaný vývoj inej ako neurálnej diferenciácie, možnosť ich nežiaducej diferenciácie nemôžeme úplne vylúčiť.

Tieto multipotentné bunky sú schopné ektopickej diferenciácie po ich transplantácií. Jedna zo štúdií potvrdila túto diferenciáciu po implantácii MSCs potkanom s glomerulonefritídou. Tieto bunky v renálnom tubule diferencovali na adipocyty, ktoré bránili normálnej funkcii obličky a spôsobili chronické ochorenie obličiek (Kunter et al. 2007).

Pri výskume diabetes mellitus I. typu bolo pozorované na modeloch neobéznych diabetických (NOD - nonobese diabetic) myší formovanie tkanív a viscerálnych tumorov

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

v tele modelových jedincov po aplikácií MSCs (Fiorina et al. 2009). Táto štúdia môže objasniť riziko transplantácie MSCs pri pacientoch s imunosupresívami.

Rovnako existuje riziko, spájajúce sa so schopnosťou MSCs posobiť ako imunosupresívum. Ich aplikácia pri liečbe GvHD podnietila u pacientov nákazu vírusovou infekciou a preukázala, že liečba MSCs znižuje schopnosť imunitného systému pri boji s vírusmi (Sundin et al. 2006).

Ďalšie z možných rizík pri transplantácii MSCs je, že majú potenciál prispievať k formovaniu gliovej jazvy. Rovnako ani táto možnosť nemôže byť úplne vylúčená, avšak Veerevalli a kol. najnovšie preukázali, že transplantácia hUCB buniek sa podieľa na redukcii gliovej jazvy (2009). Taktiež tieto bunky podporujú expresiu metaloproteinázy-2 (MMP-2 - metalloproteinase-2) v extracelulárnej matrix, kde je táto gelatináza schopná degradovať gliovú jazvu (Veeravalli et al. 2009). Ale ani po tejto štúdií nie je jasné, v akom rozsahu boli zodpovedné priamo mezenchymálne bunky za tieto výsledky.

Ďalším potenciálnym rizikom pri terapiách, ktoré ovplyvňujú axonálny rast a regeneráciu, vrátane transplantácie fibroblastov, sekretujúcich rastové faktory, je možnosť nekontrolovaného pučania a rastu axónov, a tým spôsobená alebo umocnená neuropatická bolesť (Deumens et al. 2008). Motorické a senzorické axóny majú veľmi podobný molekulárny mechanizmus, ktorý riadi ich rast. Z tohto dôvodu nie je v súčasnosti známa metóda indukujúca iba rast a regeneráciu motorických axónov bez podpory rastu axónov senzorických.

7. Záver

Liečba SCI je veľmi komplikovaný proces. Jej výsledok závisí od veľkého počtu faktorov, ktoré v optimálnom pomere môžu priniesť v terapii pozitívne výsledky. Tieto pomery sa taktiež navzájom veľmi líšia, vzhľadom na veľkú heterogenitu poranenia miechy a účinky liečby pri jej aplikácii v rôznych časových rozmedziach. Jednou z možností liečby SCI, ktorá má veľký potenciál, sa ukázali mezenchymálne kmeňové bunky. Na rozdiel od buniek derivovaných z ESCs netvorí tumory, je možné ich izolovať z rôznych tkanív pacienta a následne ich autológne transplantovať. Hlavný efekt MSCs v mieste poranenia spočíva v sekrécii najrôznejších faktorov, ktoré podporujú prežitie buniek a endogénnu regeneráciu ako napríklad podpora rastu axónových vlákien, modulácia imunitných reakcií potláčaním zápalových funkcií imunitných buniek, zníženie tvorby zápalových cytokínov. MSCs sú vhodní kandidáti na genetické modifikácie a je možné ich použitie ako bunkových vektorov pre transfer terapeutických molekúl z dôvodu ich schopnosti migrácie do miesta poranenia. Dokonca po transplantácii mezenchymálnych kmeňových buniek je možné redukovať liečbu imunosupresívami vďaka ich schopnosti prejsť HLA-bariérou organizmu, ktorý nevie rozoznať MHC I. triedy na povrchu týchto buniek. MSCs sa preto v súčasnej dobe javia ako ideálni kandidáti pre ďalšie skúmanie a vývoj v bunkovej terapii pre klinické aplikácie.

8. Zoznam literatúry

8.1 Literárne zdroje

ABNET, K., J. W. FAWCETT AND S. B. DUNNETT Interactions between meningeal cells and astrocytes *in vivo* and *in vitro*. *Developmental Brain Research*, Apr 1991, 59(2), 187-196.

AKIYAMA, Y., C. RADTKE AND J. D. KOCSIS Remyelination of the rat spinal cord by transplantation of identified bone marrow stromal cells. *Journal of Neuroscience*, Aug 2002, 22(15), 6623-6630.

AZARI, M. F., L. MATHIAS, E. OZTURK, D. S. CRAM, et al. Mesenchymal Stem Cells for Treatment of CNS Injury. *Current Neuropharmacology*, Dec 2010, 8(4), 316-323.

AZARI, M. F., C. PROFYRIS, T. KARNEZIS, C. C. BERNARD, et al. Leukemia inhibitory factor arrests oligodendrocyte death and demyelination in spinal cord injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, Sep 2006, 65(9), 914-929.

BENSIDHOUM, M., A. CHAPEL, S. FRANCOIS, C. DEMARQUAY, et al. Homing of *in vitro* expanded Stro-1(-) or Stro-1(+) human mesenchymal stem cells into the NOD/SCID mouse and their role in supporting human CD34 cell engraftment. *Blood*, May 2004, 103(9), 3313-3319.

BETHEA, J. R., H. NAGASHIMA, M. C. ACOSTA, C. BRICENO, et al. Systemically administered interleukin-10 reduces tumor necrosis factor- α production and significantly improves functional recovery following traumatic spinal cord injury in rats. *Journal of Neurotrauma*, Oct 1999, 16(10), 851-863.

CALDWELL, M. A., X. L. HE, N. WILKIE, S. POLLACK, et al. Growth factors regulate the survival and fate of cells derived from human neurospheres. *Nature Biotechnology*, May 2001, 19(5), 475-479.

CAO, Q. L., Y. P. ZHANG, R. M. HOWARD, W. M. WALTERS, et al. Pluripotent stem cells engrafted into the normal or lesioned adult rat spinal cord are restricted to a glial lineage. *Experimental Neurology*, Jan 2001, 167(1), 48-58.

CHAPEL, A., J. M. BERTHO, M. BENSIDHOUM, L. FOUILLARD, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *Journal of Gene Medicine*, Dec 2003, 5(12), 1028-1038.

CHEN, X. G., Y. LI, L. WANG, M. KATAKOWSKI, et al. Ischemic rat brain extracts induce human marrow stromal cell growth factor production. *Neuropathology*, Dec 2002, 22(4), 275-279.

CHIDGEY, A. P., D. LAYTON, A. TROUNSON AND R. L. BOYD Tolerance strategies for stem-cell-based therapies. *Nature*, May 2008, 453(7193), 330-337.

CHRISTENSEN, M. D. AND C. E. HULSEBOSCH Chronic central pain after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, Aug 1997, 14(8), 517-537.

CIZKOVA, D., J. ROSOCHA, I. VANICKY, S. JERGOVA, et al. Transplants of human mesenchymal stem cells improve functional recovery after spinal cord injury in the rat. *Cellular and Molecular Neurobiology*, Nov 2006, 26(7-8), 1167-1180.

CUMMINGS, B. J., N. UCHIDA, S. J. TAMAKI AND A. J. ANDERSON Human neural stem cell differentiation following transplantation into spinal cord injured mice: association with recovery of locomotor function. *Neurological Research*, Jul 2006, 28(5), 474-481.

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

DASARI, V. R., D. G. SPOMAR, C. CADY, M. GUJRATI, et al. Mesenchymal stem cells from rat bone marrow downregulate caspase-3-mediated apoptotic pathway after spinal cord injury in rats. *Neurochemical Research*, Dec 2007a, 32(12), 2080-2093.

DASARI, V. R., D. G. SPOMAR, C. S. GONDI, C. A. SLOFFER, et al. Axonal remyelination by cord blood stem cells after spinal cord injury. *Journal of Neurotrauma*, Feb 2007b, 24(2), 391-410.

DASARI, V. R., D. G. SPOMAR, L. LI, M. GUJRATI, et al. Umbilical cord blood stem cell mediated downregulation of Fas improves functional recovery of rats after spinal cord injury. *Neurochemical Research*, Jan 2008, 33(1), 134-149.

DEUMENS, R., E. A. J. JOOSTEN, S. G. WAXMAN AND B. C. HAINS Locomotor dysfunction and pain: The scylla and charybdis of fiber sprouting after spinal cord injury. *Molecular Neurobiology*, Feb 2008, 37(1), 52-63.

DEVINE, S. M., A. M. BARTHOLOMEW, N. MAHMUD, M. NELSON, et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Experimental Hematology*, Feb 2001, 29(2), 244-255.

DIHNE, M., C. BERNREUTHER, C. HAGEL, K. O. WESCHE, et al. Embryonic stem cell-derived neuronally committed precursor cells with reduced teratoma formation after transplantation into the lesioned adult mouse brain. *Stem Cells*, Jun 2006, 24(6), 1458-1466.

DITUNNO, J. F., J. W. LITTLE, A. TESSLER AND A. S. BURNS Spinal shock revisited: a four-phase model. *Spinal Cord*, Jul 2004, 42(7), 383-395.

EDDLESTON, M., J. C. DELATORRE, M. B. A. OLDSTONE, D. J. LOSKUTOFF, et al. Astrocytes are the primary source of tissue factor in the murine central-nervous-system - a role for astrocytes in cerebral hemostasis. *Journal of Clinical Investigation*, Jul 1993, 92(1), 349-358.

FAWCETT, J. W. AND R. A. ASHER The glial scar and central nervous system repair. *Brain Research Bulletin*, Aug 1999, 49(6), 377-391.

FERGUSON, I. A., T. KOIDE AND R. A. RUSH Stimulation of corticospinal tract regeneration in the chronically injured spinal cord. *European Journal of Neuroscience*, Mar 2001, 13(5), 1059-1064.

FIORINA, P., M. JUREWICZ, A. AUGELLO, A. VERGANI, et al. Immunomodulatory Function of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Experimental Autoimmune Type 1 Diabetes. *Journal of Immunology*, Jul 2009, 183(2), 993-1004.

FRIEDENS.AJ, PETRAKOV.KV, KUROLESO.AI AND G. P. FROLOVA Heterotopic transplants of bone marrow - analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 1968, 6(2), 230-&.

GRILL, R., K. MURAI, A. BLESCH, F. H. GAGE, et al. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, Jul 1997, 17(14), 5560-5572.

HANLEY, P. J., Z. Y. MEI, M. D. CABREIRA-HANSEN, M. KLIS, et al. Manufacturing mesenchymal stromal cells for phase I clinical trials. *Cytherapy*, Apr 2013, 15(4), 416-422.

HARTING, M. T., F. JIMENEZ, H. XUE, U. M. FISCHER, et al. Intravenous mesenchymal stem cell therapy for traumatic brain injury Laboratory investigation. *Journal of Neurosurgery*, Jun 2009, 110(6), 1189-1197.

HENG, B. C., H. K. HAIDER, E. K. W. SIM, T. CAO, et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovascular Research*, Apr 2004, 62(1), 34-42.

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

HIMES, B. T., Y. LIU, J. M. SOLOWSKA, E. Y. SNYDER, et al. Transplants of cells genetically modified to express neurotrophin-3 rescue axotomized Clarke's nucleus neurons after spinal cord hemisection in adult rats. *Journal of Neuroscience Research*, Sep 2001, 65(6), 549-564.

HIMES, B. T., B. NEUHUBER, C. COLEMAN, R. KUSHNER, et al. Recovery of function following grafting of human bone marrow-derived stromal cells into the injured spinal cord. *Neurorehabilitation and Neural Repair*, Jun 2006, 20(2), 278-296.

HOFSTETTER, C. P., N. A. V. HOLMSTROM, J. A. LILJA, P. SCHWEINHARDT, et al. Allodynia limits the usefulness of intraspinal neural stem cell grafts; directed differentiation improves outcome. *Nature Neuroscience*, Mar 2005, 8(3), 346-353.

HORKY, L. L., F. GALIMI, F. H. GAGE AND P. J. HORNER Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *Journal of Comparative Neurology*, Oct 2006, 498(4), 525-538.

JIN, Y., I. FISCHER, A. TESSLER AND J. D. HOULE Transplants of fibroblasts genetically modified to express BDNF promote axonal regeneration from supraspinal neurons following chronic spinal cord injury. *Experimental Neurology*, Sep 2002, 177(1), 265-275.

KARIMI-ABDOLREZAEE, S., E. EFTEKHARPOUR, J. WANG, C. M. MORSHEAD, et al. Delayed transplantation of adult neural precursor cells promotes remyelination and functional neurological recovery after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, Mar 2006, 26(13), 3377-3389.

KIM, B. G., Y. M. KANG, J. H. PHI, Y. H. KIM, et al. Implantation of polymer scaffolds seeded with neural stem cells in a canine spinal cord injury model. *Cytotherapy*, Oct 2010, 12(6), 841-845.

KIM, G. M., J. XU, J. M. XU, S. K. SONG, et al. Tumor necrosis factor receptor deletion reduces nuclear factor-kappa B activation, cellular inhibitor of apoptosis protein 2 expression, and functional recovery after traumatic spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*, Sep 2001, 21(17), 6617-6625.

KING, V. R., G. J. MICHAEL, R. K. JOSHI AND J. V. PRIESTLEY TrkA, trkB, and trkC messenger RNA expression by bulbospinal cells of the rat. *Neuroscience*, 1999, 92(3), 935-944.

KLUSSMANN, S. AND A. MARTIN-VILLALBA Molecular targets in spinal cord injury. *Journal of Molecular Medicine-Jmm*, Sep 2005, 83(9), 657-671.

KOBAYASHI, N. R., D. P. FAN, K. M. GIEHL, A. M. BEDARD, et al. BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and T alpha 1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *Journal of Neuroscience*, Dec 1997, 17(24), 9583-9595.

KREUTZBERG, G. W. Microglia: A sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences*, Aug 1996, 19(8), 312-318.

KUBINOVA, S. AND E. SYKOVA Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury. *Regenerative Medicine*, Mar 2012, 7(2), 207-224.

KUNTER, U., S. RONG, P. BOOR, F. EITNER, et al. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *Journal of the American Society of Nephrology*, Jun 2007, 18(6), 1754-1764.

LE BLANC, K., H. SAMUELSSON, B. GUSTAFSSON, M. REMBERGER, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia*, Aug 2007, 21(8), 1733-1738.

LIU, Y., B. T. HIMES, M. MURRAY, A. TESSLER, et al. Grafts of BDNF-producing fibroblasts rescue axotomized rubrospinal neurons and prevent their atrophy. *Experimental Neurology*, Dec 2002, 178(2), 150-164.

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

LLADO, J., C. HAENGGELI, N. J. MARAGAKIS, E. Y. SNYDER, et al. Neural stem cells protect against glutamate-induced excitotoxicity and promote survival of injured motor neurons through the secretion of neurotrophic factors. *Molecular and Cellular Neuroscience*, Nov 2004, 27(3), 322-331.

MAHMOOD, A., D. Y. LU, M. LU AND M. CHOPP Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery*, Sep 2003, 53(3), 697-702.

MCDONALD, J. W., X. Z. LIU, Y. QU, S. LIU, et al. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Medicine*, Dec 1999, 5(12), 1410-1412.

MITSUI, T., I. FISCHER, J. S. SHURNSKY AND M. MURRAY Transplants of fibroblasts expressing BDNF and NT-3 promote recovery of bladder and hindlimb function following spinal contusion injury in rats. *Experimental Neurology*, Aug 2005, 194(2), 410-431.

MURRAY, M., D. KIM, Y. LIU, C. TOBIAS, et al. Transplantation of genetically modified cells contributes to repair and recovery from spinal injury. *Brain Research Reviews*, Oct 2002, 40(1-3), 292-300.

NAKAGAMI, H., K. MAEDA, R. MORISHITA, S. IGUCHI, et al. Novel autologous cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissue-derived stromal cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, Dec 2005, 25(12), 2542-2547.

NAKAHARA, Y., F. H. GAGE AND M. H. TUSZYNSKI Grafts of fibroblasts genetically modified to secrete NGF, BDNF, NT-3, or basic FGF elicit differential responses in the adult spinal cord. *Cell Transplantation*, Mar-Apr 1996, 5(2), 191-204.

NEUHUBER, B., B. T. HIMES, J. S. SHUMSKY, G. GALLO, et al. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Research*, Feb 2005, 1035(1), 73-85.

OHTA, M., Y. SUZUKI, T. NODA, Y. EJIRI, et al. Bone marrow stromal cells infused into the cerebrospinal fluid promote functional recovery of the injured rat spinal cord with reduced cavity formation. *Experimental Neurology*, Jun 2004, 187(2), 266-278.

OLNEY, J. W. Brain lesions obesity and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 1969, 164(3880), 719-&.

ORTIZ, L. A., M. DUTREIL, C. FATTMAN, A. C. PANDEY, et al. Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jun 2007, 104(26), 11002-11007.

ORTIZ, L. A., F. GAMBELLI, C. MCBRIDE, D. GAUPP, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jul 2003, 100(14), 8407-8411.

PARK, H. C., Y. S. SHIM, Y. HA, S. H. YOON, et al. Treatment of complete spinal cord injury patients by autologous bone marrow cell transplantation and administration of granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Tissue Engineering*, May 2005, 11(5-6), 913-922.

PARK, J. H., D. Y. KIM, I. Y. SUNG, G. H. CHOI, et al. Long-term Results of Spinal Cord Injury Therapy Using Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow in Humans. *Neurosurgery*, May 2012, 70(5), 1238-1247.

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

PFEIFER, K., M. VROEMEN, A. BLESCH AND N. WEIDNER Adult neural progenitor cells provide a permissive guiding substrate for corticospinal axon growth following spinal cord injury. *European Journal of Neuroscience*, Oct 2004, 20(7), 1695-1704.

ROWLAND, J. W., G. W. J. HAWRYLUK, B. KWON AND M. G. FEHLINGS Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical Focus*, Nov 2008, 25(5).

SADAT, S., S. GEHMERT, Y. H. SONG, Y. S. YEN, et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-1 and VEGF. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Nov 2007, 363(3), 674-679.

SAHNI, V., A. MUKHOPADHYAY, V. TYSELING, A. HEBERT, et al. BMPR1a and BMPR1b Signaling Exert Opposing Effects on Gliosis after Spinal Cord Injury. *Journal of Neuroscience*, Feb 2010, 30(5), 1839-1855.

SANCHEZ-RAMOS, J., S. SONG, F. CARDOZO-PELAEZ, C. HAZZI, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Experimental Neurology*, Aug 2000, 164(2), 247-256.

SCHIRA, J., M. GASIS, V. ESTRADA, M. HENDRICKS, et al. Significant clinical, neuropathological and behavioural recovery from acute spinal cord trauma by transplantation of a well-defined somatic stem cell from human umbilical cord blood. *Brain*, Feb 2012, 135, 431-446.

SCHNELL, L. AND M. E. SCHWAB Axonal regeneration in the rat spinal-cord produced by an antibody against myelin-associated neurite growth-inhibitors. *Nature*, Jan 1990, 343(6255), 269-272.

SCHULTZ, S. S. Adult stem cell application in spinal cord injury. *Current Drug Targets*, Feb 2005, 6(1), 63-73.

SUNDIN, M., C. ORVELL, I. RASMUSSEN, B. SUNDBERG, et al. Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplantation*, Jun 2006, 37(11), 1051-1059.

SYKOVA, E., A. HOMOLA, R. MAZANEC, H. LACHMANN, et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with subacute and chronic spinal cord injury. *Cell Transplantation*, 2006a, 15(8-9), 675-687.

SYKOVA, E., P. JENDELOVA, L. URDZIKOVA, P. LESNY, et al. Bone marrow stem cells and polymer hydrogels-two strategies for spinal cord injury repair. *Cellular and Molecular Neurobiology*, Nov 2006b, 26(7-8), 1113-1129.

TAOKA, Y. AND K. OKAJIMA Spinal cord injury in the rat. *Progress in Neurobiology*, Oct 1998, 56(3), 341-358.

TATOR, C. H. AND M. G. FEHLINGS Review of the secondary injury theory of acute spinal-cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of Neurosurgery*, Jul 1991, 75(1), 15-26.

TATOR, C. H. AND I. KOYANAGI Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery*, Mar 1997, 86(3), 483-492.

THURET, S., L. D. F. MOON AND F. H. GAGE Therapeutic interventions after spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*, Aug 2006, 7(8), 628-643.

TOBIAS, C. A., N. O. DHOOT, M. A. WHEATLEY, A. TESSLER, et al. Grafting of encapsulated BDNF-producing fibroblasts into the injured spinal cord without immune suppression in adult rats. *Journal of Neurotrauma*, Mar 2001, 18(3), 287-301.

TONDREAU, T., M. DEJENEFFE, N. MEULEMAN, B. STAMATOPOULOS, et al. Gene expression pattern of functional neuronal cells derived from human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Bmc Genomics*, Apr 2008, 9.

VALLIERES, L. AND P. E. SAWCHENKO Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity. *Journal of Neuroscience*, Jun 2003, 23(12), 5197-5207.

VAQUERO, J., M. ZURITA, S. OYA AND M. SANTOS Cell therapy using bone marrow stromal cells in chronic paraplegic rats: Systemic or local administration? *Neuroscience Letters*, May 2006, 398(1-2), 129-134.

VEERAVALLI, K. K., V. R. DASARI, A. J. TSUNG, D. H. DINH, et al. Human umbilical cord blood stem cells upregulate matrix metalloproteinase-2 in rats after spinal cord injury. *Neurobiology of Disease*, Oct 2009, 36(1), 200-212.

VROEMEN, M., L. AIGNER, J. WINKLER AND N. WEIDNER Adult neural progenitor cell grafts survive after acute spinal cord injury and integrate along axonal pathways. *European Journal of Neuroscience*, Aug 2003, 18(4), 743-751.

WANG, H., F. CAO, A. DE, Y. CAO, et al. Trafficking Mesenchymal Stem Cell Engraftment and Differentiation in Tumor-Bearing Mice by Bioluminescence Imaging. *Stem Cells*, 2009, 27(7), 1548-1558.

WEBER, C., L. FRAEMOHS AND E. DEJANA The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nature Reviews Immunology*, Jun 2007, 7(6), 467-477.

WEI, X., Z. DU, L. M. ZHAO, D. N. FENG, et al. IFATS Collection: The Conditioned Media of Adipose Stromal Cells Protect Against Hypoxia-Ischemia-Induced Brain Damage in Neonatal Rats. *Stem Cells*, 2009, 27(2), 478-488.

WOODBURY, D., E. J. SCHWARZ, D. J. PROCKOP AND I. B. BLACK Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, Aug 2000, 61(4), 364-370.

WRATHALL, J. R., Y. D. TENG AND D. CHOINIÈRE Amelioration of functional deficits from spinal cord trauma with systemically administered NBQX, an antagonist of non-N-methyl-D-aspartate receptors. *Experimental Neurology*, Jan 1996, 137(1), 119-126.

WYNN, R. F., C. A. HART, C. CORRADI-PERINI, L. O'NEILL, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, Nov 2004, 104(9), 2643-2645.

YAN, P., Q. LI, G. M. KIM, J. XU, et al. Cellular localization of tumor necrosis factor-alpha following acute spinal cord injury in adult rats. *Journal of Neurotrauma*, May 2001, 18(5), 563-568.

8.2 Internetové zdroje

Campaignforcure. *International Campaign for Cures of Spinal Cord Injury Paralysis* [online]. 2013 [cit. 2013-05-06]. Dostupné z:

<http://www.campaignforcure.org/index.php/general-information>

Poranenie miechy a jeho terapia pomocou mezenchymálnych kmeňových buniek

Medicabaze. *Medicabáze* [online].2007[cit.2013-05-06]. Dostupné z:

http://www.medicabaze.cz/index.php?sec=term_detail&termId=1376&tname=Poran%C4%9Bn%C3%AD+m%C3%ADchy+-+rehabilitace

Neuralstem. *Neuralstem* [online]. 2013 [cit. 2013-05-06]. Dostupné z:

<http://www.neuralstem.com/cell-therapy-for-sci>