

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

STUDIJNÍ PROGRAM: SPECIÁLNÍ CHEMICKO-BIOLOGICKÉ OBORY

STUDIJNÍ OBOR: MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE A BIOCHEMIE ORGANISMŮ



**Tereza Juříková**

Kmenové buňky v léčbě míšního poranění

Stem Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Pavla Jendelová, PhD.

Praha, 2016

## **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 dne 13.5.2016

Tereza Juříková

## Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. RNDr. Pavle Jendelové, Ph.D. zejména za její trpělivost a vstřícný přístup, dále za všechny rady, poskytnutí studijních materiálů a zorientování v dané problematice. Dále bych ráda poděkovala svým rodičům, prarodičům, Daliborovi, Kristýně, Martině a Tlapkovi za jejich lásku a podporu nejen při psaní této práce a za vše, co pro mě dělají. Poděkování patří i ostatním přátelům a známým.

## **Abstrakt**

Kmenové buňky jsou výjimečné díky schopnosti diferencovat do jakéhokoliv buněčného typu a sebeobnovy. Mohou být využity k opravě a náhradě funkcí různých tkání či orgánů. Těchto vlastností využívá regenerativní medicína, progresivní medicínský obor dávající naději pacientům se zatím neléčitelnými zdravotními komplikacemi. Mezi ty patří i traumatické poranění míchy, v jehož důsledku dochází k masivní demyelinizaci a poruchám neurologických funkcí. Mezenchymové kmenové buňky přispívají k obnově poškozené tkáně díky svým imunomodulačním schopnostem a produkcí řady růstových faktorů. Embryonální kmenové buňky mohou diferencovat do funkčních nervových buněk, nicméně jejich využití je spojeno s nebezpečím tumorigeneze a etickými problémy. Slibné výsledky přináší kombinovaná terapie využívající biomateriály jako nosiče pro buňky nebo růstové faktory. V budoucnosti bude využívána znalost genetické modifikace buněk. Cílem této práce je shrnout dosavadní poznatky v terapii míšního poranění s důrazem na tkáňově specifické kmenové buňky.

## **Klíčová slova**

kmenové buňky – míšní poranění – obnova tkání - biomateriály

## **Abstract**

Stem cells are unique thanks to their ability to differentiate into all cell types and self-renewal. They can be used for repairing and functional recovery of various tissues and organs. Regenerative medicine, which is a progressive medical field, uses these properties to give a chance to patients with yet incurable health complications. These include spinal cord injury, which results in huge demyelination and disorders in neurological function. Mesenchymal stem cells contribute to recovery of damaged tissue thanks to their immunomodulatory abilities and production of a number of growth factors. Embryonic stem cells can differentiate into the functional nerve cells, however its use is connected with the possibility of tumorigenesis and also ethical problems. A combinatorial treatment using biomaterials as scaffolds for cells or growth factors gives promising results. The knowledge of genetic modification of cells will be used in the future. The aim of this thesis is to summarise current knowledge of the spinal cord treatment with emphasis on tissue specific stem cells.

## **Keywords**

stem cells – spinal cord injury – tissue recovery - biomaterials

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Patofyziologie míšního poranění</b>	<b>3</b>
2.1	Primární poranění . . . . .	3
2.2	Sekundární poranění . . . . .	3
2.3	Chronické poranění . . . . .	5
<b>3</b>	<b>Strategie regenerace míšní tkáně</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>Kmenové buňky</b>	<b>8</b>
4.1	Embryonální kmenové buňky . . . . .	8
4.2	Indukované pluripotentní buňky . . . . .	9
4.3	Pluripotentní buňky v terapii SCI . . . . .	10
4.4	Dospělé kmenové buňky . . . . .	11
4.5	Hematopoetické kmenové buňky . . . . .	11
4.6	Neurální kmenové buňky . . . . .	11
4.7	Mezenchymální kmenové buňky . . . . .	12
<b>5</b>	<b>Biomateriály</b>	<b>16</b>
<b>6</b>	<b>Genová terapie</b>	<b>18</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b>	<b>20</b>

# 1 Úvod

I přes nesmírný pokrok v oblasti medicíny a intenzivní vědecký výzkum existují stále mnohá onemocnění, která nejsme schopni léčit. V rozvinutých zemích mezi taková onemocnění patří např. neurodegenerativní choroby (Parkinsonova a Alzheimerova choroba, amyotrofická laterální skleróza), autoimunitní onemocnění (roztroušená skleróza, Myasthenia Gravis, alergie), AIDS, některé druhy rakoviny a mnohá další. Pro některé z těchto chorob jsou známy léčebné přístupy, většinou však pouze mírní příznaky nemoci a zatím nejsou zcela vyléčitelné. Slibnou naději pro pacienty s těmito chorobami představuje genová terapie nebo regenerativní medicína.

Regenerativní medicína je intenzivně se rozvíjející interdisciplinární obor. Využívá kmenové buňky k opravám nebo náhradám poškozených tkání a orgánů. Kmenové buňky jsou unikátní nediferencované buňky, které se mohou přeměnit do jakéhokoliv buněčného typu a mají schopnost sebeobnovy. Jsou v malém množství přítomné ve všech orgánech, kde zajišťují přirozenou obnovu buněk. Z hlediska jejich diferenciačního potenciálu je můžeme rozdělit na buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. Totipotentní buňky vznikají splynutím vajíčka a spermie, mohou se bez omezení přeměnit na jakýkoliv typ buňky a vznikají z nich všechny embryonální a extraembryonální buňky. Jako pluripotentní buňky označujeme takové buňky, které dávají vzniknout buňkám všech tří zárodečných listů, vznikají z totipotentních buněk. Multipotentní buňky diferencují již jen do příbuzných buněčných linií, jsou mírně diferencovány. Unipotentní (progenitorové) buňky jsou již specifikované k produkci jediného typu buněk, zůstává jim však schopnost sebeobnovy.

Tento prakticky neomezený diferenciační potenciál kmenových buněk je již v klinické praxi využíván např. k léčbě diabetu typu 1, nemocí kostí a kloubů nebo jaterních onemocnění. Buněčná terapie je nadějí k zlepšení zdravotního stavu i pro pacienty s poraněním míchy (spinal cord injury, SCI). Jedná se o závažné poranění, které má doživotní fyzické i psychické následky, pacienti zůstávají po zbytek života odkázáni na pomoc druhých. V České republice ročně přibývá 200 – 300 pacientů s poškozením míchy [web 1]. Možnou strategií pro regeneraci poškozené tkáně je aplikace kmenových buněk v kombinaci s různými biomateriály. Do popředí se dostávají tkáňově specifické kmenové buňky, zejména mezenchymového

původu, jejichž léčivý účinek, který potvrdily mnohé studie, je založen na imunomodulačních schopnostech a produkci růstových faktorů.

V této práci si kladu za cíl seznámit se s patofyziologií míšního poranění, popsat jednotlivé typy kmenových buněk využitelné v terapii se zaměřením na tkáňově specifické kmenové buňky a jejich zdroje, biomateriály a nastíním další léčebné strategie.



## 2 Patofyziologie míšního poranění

Míšní poranění je závažnou zdravotní komplikací, vyžadující doživotní nákladnou péči. Nejčastěji vzniká následkem úrazů při dopravních nehodách, pádech, sportovních aktivitách nebo násilných činech. Velkou část postižených proto tvoří mladí lidé, které doprovází následky po zbytek života. Ročně přibývá na celém světě až 500 000 případů [web 2].

Po poranění dochází k částečným nebo úplným ztrátám neurologických funkcí. Vznikají tak sensorické, motorické a autonomní poruchy. Charakter zranění a jeho následky se odvíjí od místa poranění a jeho vážnosti, dalším faktorem je např. i věk zraněného (Furlan and Fehlings, 2009).

Pacientům hrozí také vyšší riziko kardiovaskulárních onemocnění, osteoporózy, hlubokých žilních trombóz, autonomní dysreflexie nebo neuropatické bolesti (Vawda and Fehlings, 2013).

Dosud neexistuje účinná terapie, která by vedla ke zlepšení neurologických funkcí. Obvyklým postupem je pouze stabilizace pacienta, podávání kortikosteroidů a dlouhodobá rehabilitace. Rozlišujeme primární, sekundární a chronické míšní poranění.

### 2.1 Primární poranění

Začíná okamžikem poranění a trvá několik hodin až dnů. Mechanickým působením na míchu dochází ke kompresi a deformaci nervové tkáně i okolních měkkých tkání a spouští se řada patofyziologických procesů. Nervové buňky reagují vlnou akčních potenciálů, nastávají v nich elektrolytické posuny vedoucí ke ztrátě funkcí (Hulsebosch, 2002). Poškozením buněčných membrán se uvolňuje množství glutamátu, který působí excitotoxicky a vede k poškození neuronů (Liu *et al.*, 1999). V místě poranění jsou porušeny cévy a mikrocirkulace. Nastává krvácení, edém, vasospasmus a ischemie. Buňky podléhají rozsáhlé nekróze.

### 2.2 Sekundární poranění

Následuje řada procesů, v jejichž důsledku dochází k apoptóze, poškození nervové tkáně a zvětšování léze. Jedná se zejména o zánět, vznik volných radikálů a peroxidaci lipidů, porušení iontových kanálů, demyelinizaci axonů, formování gliové jizvy a tvorbu cyst (Vawda and Fehlings, 2013).

Neurony jsou dále poškozovány působením glutamátu, pokračuje edém a ischemie. Následkem poškození cév dochází k porušení hematoencefalické bariéry a je aktivována zánětlivá imunitní odpověď (Figley *et al.*, 2014). Do místa poranění putují neutrofilny, makrofágy a aktivované mikroglie, které jsou schopné fagocytovat poškozenou tkáň, ale zároveň produkovat reaktivní sloučeniny kyslíku (reactive oxygen species, ROS) (Carlson *et al.*, 1998). Pokud nejsou odbourávány příslušnými enzymy, mohou v buňce poškodit nukleové kyseliny, proteiny i celé struktury. Během SCI dále vznikají ROS především v důsledku velkého množství glutamátu. Aktivace jeho receptorů, zejména NMDA-receptoru, vede ke zvyšování intracelulární koncentrace sodíku a selhání  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasy. Následně roste i intracelulární koncentrace vápníku ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  antiport). Překročí-li množství akumulovaného vápníku určitou mez, dojde k poškození mitochondrií, ztrátám jejich funkcí a inaktivaci např. enzymů dýchacího řetězce a ke vzniku ROS. Ty způsobují oxidativní stres a poškozují buňky peroxidací lipidů (Azbill *et al.*, 1997; Dumont RJ *et al.*, 2001).

Zánětlivá odpověď v místě poranění je složitá. Účastní se jí jak vrozené, tak adaptivní imunitní mechanismy (Trivedi *et al.*, 2006). Jednotlivé složky imunitního systému mohou přispívat k reparaci poškozené tkáně, ale zároveň i podporovat její poškození. Kromě již zmíněných ROS produkují zejména prozánětlivé cytokiny (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) nebo některé proteasy (neutrofilny) (Trivedi *et al.*, 2006). Makrofágy však produkují i faktory podporující růst, např. NGF, NT-3, thrombospondin (Fitch and Silver, 2008) a mohou uchovávat cholesterol z fagocytovaného myelinu, který může být znovu použit během remyelinizace. Aktivované mikroglie mohou snížit proliferaci astrocytů nebo podporovat růst neuritů. Aktuální odpověď buněk se odvíjí od načasování a vzájemných interakcí buněk mezi sebou i s okolní tkání (Trivedi *et al.*, 2006).

Zánětlivá odpověď může vyvrcholit tvorbou gliové jizvy, která ohraničuje poškozenou tkáň a brání rozvoji dalšího poškození. Bohužel tak zamezuje i regeneraci axonů (Silver *et Miller*, 2004). Tvoří ji reaktivní astrocyty, které jsou aktivovány makrofágy a mikroglie, a pojivové buňky. K jejímu formování vede proliferace astrocytů a přispívají některé cytokiny produkované buňkami imunitního systému i samotnými astrocyty, např. IL-1, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , FGF-2. Astrocyty vylučují také proteoglykany, např. chondroitinsulfát, který inhibuje

růst axonů (Silver *et Miler*, 2004). Oligodendrocyty jsou velmi zranitelné buňky a snadno podléhají apoptické i nekrotické smrti, jež vede k demyelinizaci axonů. Demyelinizace začíná již v akutní fázi porušením myelinové vrstvy a je jednou z hlavních příčin výsledné dysfunkce nervové tkáně. Apoptóza oligodendrocytů navíc neprobíhá pouze v původním místě poranění, ale dochází k ní i ve značné vzdálenosti podél míchy (Li *et al.*, 1999). Přirozeně nastává remyelinizace jako odpověď na zranění, může probíhat i několik let po úrazu, nicméně je pouze částečná a málo zdařilá (Totoiu and Keirstead, 2005). Sekundární poranění trvá až několik týdnů a přechází do chronického stavu.

## 2.3 Chronické poranění

Chronické poranění trvá léta a většině pacientů doživotně působí značné komplikace. Anterogradně i retrogradně pokračuje apoptóza, zasahuje i některé mozkové oblasti. Pokračuje demyelinizace, mnohé buňky jsou dlouhodobě hyperexcitabilní, což vede ve většině případů k chronické bolesti (Hulsebosch, 2002).

### 3 Strategie regenerace míšní tkáně

Díky pochopení patofyziologie poranění je možné cílit léčbu na konkrétní procesy probíhající v různých fázích poranění. Během sekundárního poranění je cílem neuroprotektce a zamezení šíření poškození, v chronické fázi regenerace poškozené tkáně a alespoň částečná obnova její funkce). Remyelinizace axonů, modulace zánětlivé odpovědi, inhibice gliové jizvy či apoptické smrti a další postupy přitahují značnou pozornost vědců, jelikož by mohly vést k významnému zlepšení stavu po SCI. Mezi možné způsoby, jak tohoto zlepšení dosáhnout, patří (shrnuto podle Syková *et al.*, 2006; Kabu *et al.*, 2015):

- podávání protizánětlivých kortikosteroidů,
- distribuce neurotrofilních a růstových faktorů,
- enzymatická léčba,
- anti-Nogo-A terapie,
- vyplnění kavic pomocí vhodných biomateriálů,
- implantace různých typů buněk,
- kombinovaná terapie,
- genová terapie.

Byla testována řada léčiv různé povahy, nicméně v klinické praxi je nejvíce využíván methylprednisolon (Syková *et al.*, 2006), přestože dlouhodobé užívání kortikosteroidů je diskutabilní. Neurotrofní, růstové, ale i angiogenní a antiapoptické faktory produkuje řada transplantovaných buněk (Rehman *et al.*, 2003; Crigler *et al.*, 2005; Zaminy *et al.*, 2013). Samotné faktory mohou být do tkáně také přímo aplikovány např. využitím hydrogelů, což se zdá být výhodnějším způsobem než standardní injekční či systémové podání díky dlouhodobému a řízenému uvolňování (Kabu *et al.*, 2015).

Vhodné biomateriály mohou přemostit vzniklé léze a také plnit funkci nosičů buněk, pro které je pak snazší osídlit danou tkáň. Takto kombinovaná terapie přináší slibné výsledky

díky větší pravděpodobnosti přežití transplantovaných buněk a tím i účinnější regeneraci (Syková *et al*, 2006).

Perspektivní je využití tkáňově specifických kmenových buněk, které jsou snadno dostupné, schopné diferencovat do mnoha buněčných typů a nenesou etické problémy. Mnoho studií prokázalo jejich pozitivní účinek na léčbu SCI, bude jim tedy v této práci věnována větší pozornost.

Genová terapie umožňuje zvýšit produkci různých faktorů v poškozené tkáni a tím rovněž přispět k její obnově (Pearse and Bunge, 2006).

## 4 Kmenové buňky

Jedna z prvních zmínek o kmenových buňkách zazněla na přednášce ruského vědce A. Maximova v Berlíně roku 1909. Popsal lymfocyty jako obecné kmenové buňky, ze kterých vznikají další krevní buňky během embryonálního i postnatálního vývoje. Postupně následovaly publikace, které popisovaly možnosti diferenciaci a význam kmenových buněk. První úspěšná transplantace kostní dřeně (Dr. Thomas, 60. léta 20. století) znamenala zároveň i první terapeutické využití kmenových buněk. 2. polovina 20. století přináší intenzivní výzkum kmenových buněk, přispívá k němu studium krvetvorby, *in vitro* fertilizace či teratomů. 21. století již představuje aplikaci poznatků o izolaci, kultivaci, mechanismech diferenciaci, působení růstových faktorů, genetické modifikaci kmenových buněk či immortalizaci buněčných linií do experimentálních odvětví medicíny. Začíná éra nahrazování tkání či orgánů využívající poznatky dalších oborů, zejména biotechnologie. [shrnutí podle web 3]

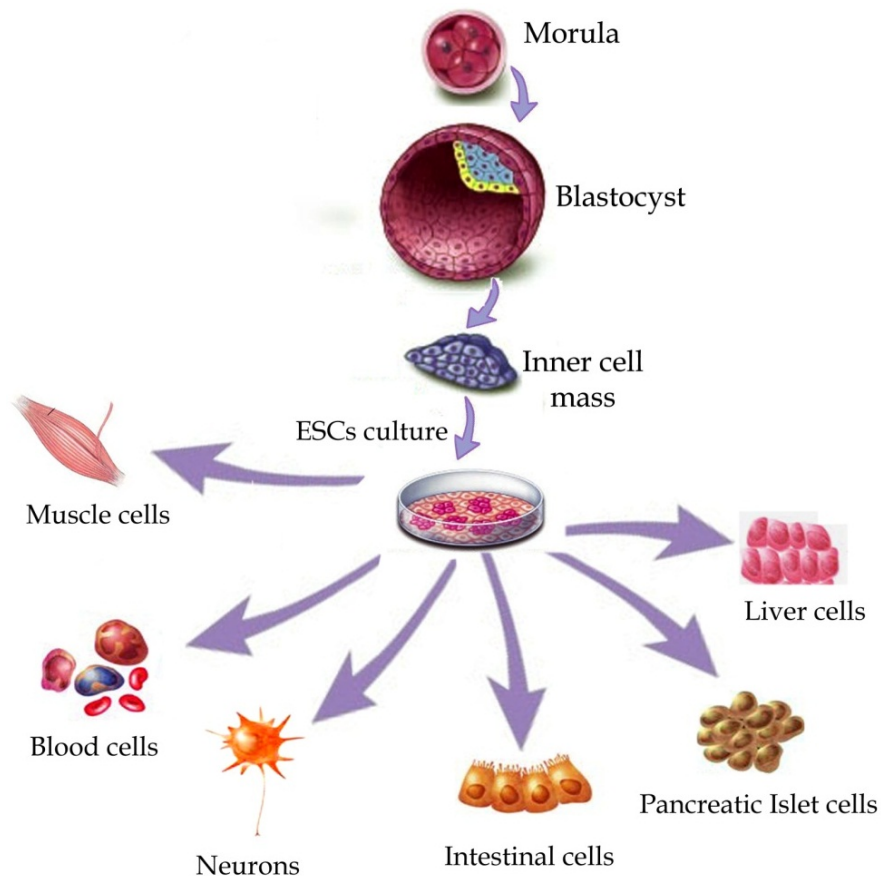
Kmenové buňky jsou nesespecializované buňky schopné přeměny ve kterýkoliv buněčný typ. Obecně se dělí asymetrickým způsobem, kdy z jedné dceřiné buňky vzniká dospělá diferencovaná buňka a druhá dceřiná buňka zůstává buňkou kmenovou, čímž je zajištěna neustálá obnova. Mezi transkripční faktory ovlivňující tento proces patří SOX-2, NOTCH, WNT, PTEN, p53, Myc, Musashi-1 i některé produkty HOX genů (Girlovanu *et al.*, 2015).

Podle zdroje můžeme kmenové buňky rozdělit na *embryonální*, *fetální*, *dospělé* a *indukované pluripotentní* kmenové buňky.

### 4.1 Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky (ESC) jsou pluripotentní a tedy schopné diferencovat do buněk všech tří zárodečných listů (Obr. 4.1) Jsou izolovány z vnitřní buněčné masy blastocysty. Nepodléhají senescenci a udržují si vysokou telomerázovou aktivitu (Coutts and Keirstead, 2008). Díky svému diferenciacnímu potenciálu jsou mezi vědci velmi populární. Využití ESC však přináší jistá úskalí, zejména vysoké riziko tumorigeneze a nutnost imunosuprese (Willert and Sakiyama-Elbert, 2008). Použití správných kultivačních technik by však mělo eliminovat riziko genomických, mitochondriálních i epigenetických změn vedoucích k transformacím (podle Coutts and Keirstead, 2008). Dále se s využitím (lidských) ESC pojí

etické a náboženské problémy, jelikož dochází k ničení embryí a tím možného lidského života. Se stejnými problémy se potýká i využití *fetálních kmenových buněk*, jejichž zdrojem jsou potraty.



Obrázek 4.1: Diferenční potenciál ESC, převzato z <http://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research/stem-cell-therapy-for-neuromuscular-diseases>

## 4.2 Indukované pluripotentní buňky

Indukované pluripotentní buňky (induced pluripotent stem cells, iPS) jsou pluripotentní buňky získané z adultních buněk. Způsob, jak již specializovanou buňku reprogramovat do pluripotentního stavu, popsali Takahashi a Yamanaka v roce 2006. Pomocí pouhých 4 transkripčních faktorů (Oct4, C-Myc, Klf4 a Sox2) indukovali z myších embryonálních či

dospělých fibroblastů pluripotentní kmenové buňky, jejichž vlastnosti byly obdobné ESC (Takahashi and Yamanaka, 2006). Překvapivé bylo, že nebyl potřeba Nanog, který je společně s Oct4 a Sox2 typickým faktorem pluripotence (Takahashi and Yamanaka, 2006). Tento objev se stal průlomovým, jelikož využití pluripotentních buněk, které nejsou embryonálního původu, přináší méně etických problémů a s tím potenciálně snadnější využití v klinické praxi. Výhodou je i možnost autologního odběru. Nicméně reprogramování buněk zatím ukrývá spoustu problémů. Kromě mutageneze spojené s využitím virů jde např. o epigenetickou paměť. Účinnost reprogramace buňky je ovlivněna původem tkáně, ze které byla odebrána. Ve srovnání s ESC tedy iPS diferencují méně efektivně. Tato tendence buněk se však dá změnit tím, že se buňky nejdříve diferencují do požadovaného buněčného typu, následně jsou reprogramovány do pluripotentního stavu, díky čemuž se zvýší pravděpodobnost přeměny na požadovanou buňku (Kim *et al.*, 2010).

### 4.3 Pluripotentní buňky v terapii SCI

Mnoho prací popisuje úspěšnou diferenciaci pluripotentních kmenových buněk do funkčních nervových buněk. Neurony či neurální prekuzory, které diferencovaly do neuronů, byly získány z lidských ESC (Carpenter *et al.*, 2001; Kozubenko *et al.*, 2009) a různými metodami včetně přímého reprogramování buněk i z lidských iPS (Kim *et al.*, 2011; Ambasudhan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Popsána byla i diferenciaci do funkčních specializovaných neuronů, např. dopaminergních neuronů (Switowski *et al.*, 2010) nebo motoneuronů (Dimos *et al.*, 2008). Transplantace takto získaných buněk do různých zvířecích modelů potvrdila značné zlepšení funkcí po SCI. K myelinizaci axonů a zlepšení lokomočních funkcí vedla transplantace prekuzorů oligodendrocytů, které byly získány jak z ESC (Keirstead *et al.*, 2005; Erceg *et al.*, 2010), tak z iPS, např. z myších fibroblastů pomocí pouhých 3 transkripčních faktorů (Sox10, Olig2 a Zfp536) (Yang *et al.*, 2013) i mnohými dalšími metodami (All *et al.*, 2015). Další práce ukázaly úspěšnou diferenciaci lidských iPS do všech typů nervových buněk, tzn. neuronů (včetně specializovaných), astrocytů i oligodendrocytů. Výsledkem byl pozitivní efekt na poraněnou tkáň díky podpoře axonálního růstu a angiogenezi, produkci neurotrofických faktorů nebo vytvoření funkčních synapsí. Modelovými zvířaty byly nejen hlodavci (Nori *et*



*al.*, 2011; Romanyuk *et al.*, 2015), ale i nehumánní primáti (Kobayashi *et al.*, 2012).

## 4.4 Dospělé kmenové buňky

Dospělé kmenové buňky (adult stem cells, ASC) jsou multipotentní buňky přítomné v malých množstvích ve všech orgánech. Zajišťují přirozenou obnovu buněk ve tkáních, např. v důsledku stárnutí nebo po úrazech. I když jsou pouze multipotentní a mají omezený diferenciální potenciál, jejich význam je především v produkci různých růstových faktorů a cytokinů, kterými mohou modulovat imunitní odpověď a facilitovat regeneraci poškozené tkáně. Vznikají z nich progenitorové buňky, které jsou již unipotentní a tvoří jen jeden buněčný typ. Označujeme je jako tkáňově specifické buňky a rozlišujeme hematopoetické, mezenchymové, nervové, jaterní, svalové, epitelové buňky a další. Mají vysoký potenciál pro aplikaci v nejrůznějších terapiích, jelikož se s nimi nepojí žádné významné etické problémy, nabízí se možnost autologního využití a poskytují slibné výsledky v klinických studiích.

## 4.5 Hematopoetické kmenové buňky

Hematopoetické kmenové buňky (hematopoetic stem cells, HSC) byly prvními a dlouho jedinými kmenovými buňkami využívanými v klinické praxi, a to k léčbě některých druhů leukémie. Nachází se v kostní dřeni a dávají vzniknout všem krevním buňkám. Mohou být získány i z periferní krve, jejich typickými povrchovými markery jsou CD34, CD90 a CD133 (shrnutí v Girlovanu *et al.*, 2015). Lidské HSC z pupečnickové krve, která může být dalším zdrojem těchto buněk, daly vzniknout indukovaným neuronům přímým buněčným reprogramováním díky Sendai virusu a koexpresi faktorů Sox2 a C-Myc (Castaño *et al.*, 2014). Pro své imunosupresivní účinky by mohly být použity k léčbě roztroušené sklerózy (Burt *et al.*, 2005).

## 4.6 Neurální kmenové buňky

Neurální kmenové buňky (neural stem cells, NSC) jsou multipotentní buňky diferencující do astrocytů, oligodendrocytů a neuronů a mohou být izolovány z embryonální, fetální i dospělé tkáně. Neurální progenitorové buňky (neural progenitor cells, NPC) dávají vznik-

nout pouze jednomu typu buněk, ale zachovávají si schopnost sebeobnovy. Lidské NPC mají, narozdíl od hlodavčích, velmi nízkou telomerázovou aktivitu (Ostenfeld *et al.*, 2000), produkují řadu růstových faktorů (NGF, BDNF, GDNF) a mají imunomodulační schopnosti (Amemori *et al.*, 2013).

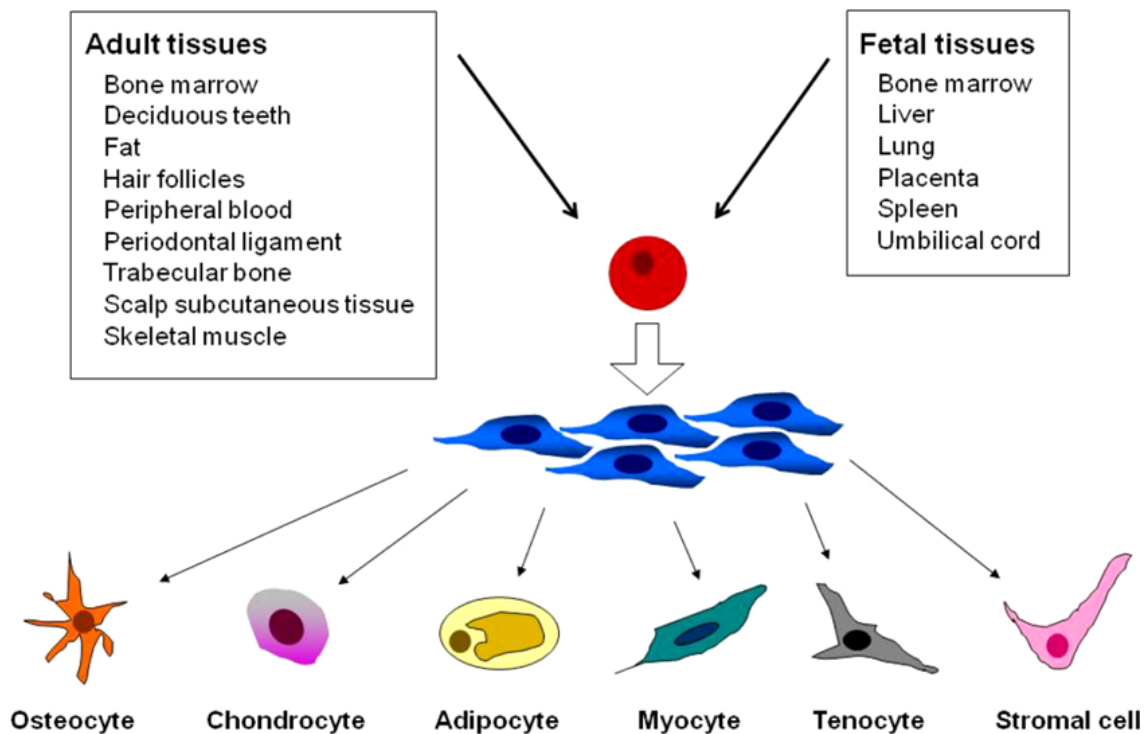
Po SCI jsou endogenní NSC aktivovány, proliferují a putují do místa poranění, avšak většina z nich diferencuje do astrocytů a tím přispívá k tvorbě gliové jizvy (Barnabe-Heider and Frisen, 2008). Řada studií prokazuje funkční zlepšení po SCI díky transplantaci NSC nebo NPC, jejich účinek je však zejména neuroprotektivní. Tomu nasvědčuje i fakt, že ke zlepšování stavu dochází brzy (2 – 3 týdny) po transplantaci buněk (Parr *et al.*, 2008). Většinou implantované buňky diferencují do gliových buněk, neurony vznikají jen výjimečně, významně však přispívají k myelinizaci axonů a zlepšení lokomoce (Parr *et al.*, 2008; Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2006). V přítomnosti růstových faktorů (EGF, bFGF, PDGF-AA) transplantované buňky více proliferují a snadněji přežívají (Karimi-Abdolrezaee *et al.*, 2006). Dalším navrženým způsobem terapie SCI je využití immortalizovaných neurálních linií získaných z lidské fetální tkáně. Takto získané buňky transplantované do SCI diferencovaly do motoneuronů (asi 25 % ze všech buněk), astrocytů i oligodendrocytů, díky čemuž rovněž došlo ke zlepšení lokomoce u potkanů (Amemori *et al.*, 2013).

## 4.7 Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSC) jsou multipotentní buňky, které mohou být izolovány z nejrůznějších tkání, dospělých i fetálních, např. z kostní dřeviny, tuků, periferní krve, pupečníku či dočasného chrupu (Obrázek 4.2). Je pro ně charakteristická přilnavost k plastickému povrchu a exprese markerů CD105, CD73, CD90, naopak neexprimují CD45, CD34, CD14, CD19 a další (Dominici *et al.*, 2006). Diferencují do osteocytů, chondrocytů, adipocytů, myocytů, tenocytů či stromálních buněk. Některé práce předpověděly větší plasticitu MSC a možnost diferenciaci i do buněk nemezenchymového původu, např. do jaterních nebo nervových (Brazelton *et al.*, 2000). Přestože takto získané buňky exprimovaly řadu neurálních genů nebo transkripčních faktorů (Blondheim *et al.*, 2006), nebyla prokázána diferenciaci do plně funkčních neuronů (Arboleda *et al.*, 2011). Po-

zitivní účinek MSC v léčbě SCI tedy není dán jejich diferenciačními schopnostmi, nýbrž je založen na produkci celé řady faktorů, a to růstových, imunosupresivních, angiogenních nebo antiapoptických (Schinköthe *et al.*, 2008). Díky inhibici prozánětlivých cytokinů ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{IL-2}$ ) mohou MSC potlačit maturaci dendritických buněk a tím aktivaci T-lymfocytů. Společně se zvýšením produkce protizánětlivých cytokinů ( $\text{IL-4}$ ,  $\text{IL-10}$ ) může být výsledkem změna prozánětlivé imunitní odpovědi v protizánětlivou. Dalším příspěvkem MSC je inhibice proliferace T-lymfocytů prostřednictvím dalších protizánětlivých cytokinů  $\text{TGF-}\beta$  a  $\text{IL-10}$  nebo potlačení cytotoxických T-lymfocytů. Na základě těchto schopností mohou být MSC využity kromě modulace zánětu k potlačení reakce štěpu proti hostiteli, jedné z hlavních komplikací doprovázející alogenní transplantace (Aggarwal and Pittenger, 2005). MSC vylučují řadu růstových faktorů, které jsou nezbytné pro růst a ochranu neuronů, např. NGF, BDNF, VEGF, HGF, nebo mohou k jejich vylučování stimulovat gliové buňky (NGF, BDNF) (Syková *et al.*, 2006). Zvýšením solubilních forem TRAIL-R3, TRAIL-R4 a FAS receptoru a zároveň díky potlačení proapoptických cytokinů ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{TNF-}\beta$ ) mohou MSC přispět k inhibici apoptózy. Dále přispívají k angiogenezi či neovaskularizaci produkcí angiogenních faktorů (bFGF, VEGF, angiopoetin-2) (Schinköthe *et al.*, 2008).

Díky těmto i mnohým dalším vlastnostem, např. snadné izolaci, kultivaci, rychlému dělení a možnosti autologního využití se MSC nabízí jako vhodný buněčný typ se širokou škálou využití.



Obrázek 4.2: Diferenciace MSC a jejich zdroje, převzato z <http://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering-cells-and-biomaterials/skeletal-regeneration-by-mesenchymal-stem-cells-what-else->.

*Mezenchymální buňky izolované z kostní dřeně* (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BMSC) tvoří vedle hematopoetických buněk heterogenní buněčnou populaci v kostní dřeni. Práce před 15-ti lety předpokládaly i jejich diferenciačních účinek, dnes se však vědecká komunita více přiklání zejména k parakrinnímu a imunomodulačnímu trofickému účinku. Za daných parametrů sice lidské i hlodavčí BMSC diferencují do nervového fenotypu a exprimují některé markery specifické pro neurony, nicméně diferenciační markery pro různé nervové buňky (GFAP, MAP-2, APC) nebyly zjištěny (Lu *et al.*, 2004). Transplantace BMSC do míšní léze tedy přispívá potlačením zánětlivé odpovědi a apoptózy k modulaci gliové jizvy a ke zlepšení lokomočních funkcí (Urdzíková *et al.*, 2014).

*Mezenchymální kmenové buňky získané z tukové tkáně* (adipose tissue-derived stem cells, ASC) se izolují z lipoaspirátu, díky čemuž se stávají velmi snadno dostupné ve velkém množství, navíc je tato izolace neinvazivní a bezpečná. Vlastnosti ASC jsou podmíněny ana-

tomickou oblastí, ze které pochází. Např. ASC získané z břišního tuku jsou více rezistentní k apoptóze než ASC získané z paže, dále se liší schopností proliferace, která se odvíjí i od věku (Schnipper *et al.*, 2008). Produkují tyto faktory: HGF, NGF, BDNF, GM-CSF, VEGF, bFGF, TNF- $\alpha$ , IL-6, 7, 8, 11 (Rehman *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2010).

*In vitro* experimenty ukázaly, že za určitých podmínek ASC diferencují do buněk neurálního typu, které po implantaci do SCI přežívají lépe než nediferencované ASC, nicméně neprokázaly větší zlepšení funkcí než nediferencované ASC (Zhang *et al.*, 2009, Arboleda *et al.*, 2011).

Dalším zdrojem MSC může být *Whartonův rosol*, nicméně jeho výtěžek je v porovnání s BMSC a zejména ASC velmi malý. Bylo však prokázáno, že tyto buňky po implantaci do míšní léze přežívají a migrují, rovněž produkují řadu růstových faktorů (např. BFGF, NT-3) a přispívají ke zlepšení lokomočních funkcí (Yang *et al.*, 2008).

## 5 Biomateriály

Přestože řada buněk přispívá k regeneraci míšní tkáně a obnově funkcí po jejím poranění, jejich samotná implantace do místa poranění není vzhledem k jeho charakteru dostatečná. Vzniklá kavita a gliová jizva v poškozeném místě tvoří fyzickou bariéru pro regeneraci axonů. Nabízí se využití biomateriálů, které v místě léze mohou poskytnout mechanickou podporu pro růst axonů a cév a přemostit vzniklé kavity, díky čemuž významně přispívají k regeneraci tkáně. Zároveň mohou být nosiči pro transplantované buňky nebo doručovat různá léčiva nebo biomolekuly. Základní požadavky na materiály implantovatelné do SCI jsou (shrnuto podle Kubinova and Sykova, 2011):

- nesmí splňovat
  - musí splňovat
- |                |                               |
|----------------|-------------------------------|
| toxicita,      | sterilizovatelnost,           |
| imunogenicita, | modifikovatelná struktura,    |
|                | vhodná velikost pórů,         |
|                | optimální mechanická pevnost, |
|                | dostupnost.                   |

Využívané biomateriály mohou být přírodního i syntetického původu. Přírodní materiály jsou biokompatibilní, ale mohou být variabilní a vyvolat imunitní reakci (Kubinova and Sykova, 2011). Chitosan je, jako většina přírodních materiálů, snadno biodegradovatelný polysacharid, který podporuje přichycení a proliferaci původních i kmenových buněk a hojení ran (Shi *et al.*, 2006). Kolagen může být použit k doručení růstových faktorů a potlačuje formování gliové jizvy (Houweling *et al.*, 1998). Dále se využívá např. agaróza, želatina nebo kyselina hyaluronová. Syntetické biomateriály mohou být zcela biodegradovatelné nebo ne-degradovatelné. Degradace obvykle probíhá enzymatickým nebo hydrolytickým štěpením, žádný degradační produkt ale nesmí být imunogenní. Využití syntetických biomateriálů může být výhodnější díky přesnému dohledu nad výrobou, která může probíhat ve velkém měřítku a jejich povrch může být upraven pro snadnější přichycení buněk (shrnuto v Kubinova and Sykova, 2011). Běžně využívané jsou hydrogely na bázi polyhydroxypropylmetakrylamidu (pHPMA) nebo polyhydroxyethylmetakrylátu (pHEMA) a další. Tyto hydrogely nachází uplatnění zejména v kombinované terapii (Hejcl *et al.*, 2008).

Využití biomateriálů v kombinaci s různými buněčnými typy se zatím zdá jako neúčinnější terapeutický přístup. Mnohé práce prokázaly, že využití tohoto spojení je efektivnější než pouhá implantace daného biomateriálu nebo samotných buněk (Hejcl *et al.*, 2010; Mahmood *et al.*, 2013). Navíc mohou být tyto biomateriály upravené k řízenému uvolňování růstových faktorů, díky čemuž lépe přežívají a diferencují transplantované buňky (Johnson *et al.*, 2010). Samotné buňky mohou rovněž být modifikovány k produkci růstových faktorů (Loh *et al.*, 2001) (viz genová terapie) nebo mohou být do poraněného místa kotransplantovány dva buněčné typy, například NSC a Schwannovy buňky (Chen *et al.*, 2010). I když tyto kombinace mají synergistický efekt na léčbu, nebyl zatím mnohokrát prokázán jejich dlouhodobý efekt (Růžička *et al.*, 2013). Bylo např. popsáno zajištění vhodného prostředí pro růst a diferenciaci implantovaných buněk *in vitro* i *in vivo* díky kombinaci pHEMA hydrogelu a NSC, nicméně 3 měsíce po transplantaci nebylo zřetelné významné zotavení (Růžička *et al.*, 2013). Kotransplantace různých buněčných typů také nemusí mít vždy synergistický efekt, přestože jednotlivé buňky přispívají k funkčnímu zlepšení (Amemori *et al.*, 2010).

## 6 Genová terapie

Genová terapie je dalším dynamicky se rozvíjejícím experimentálním odvětvím medicíny. Principem je vnesení funkčního genu do buňky s účelem potlačit mutantní geny nebo vnést chybějící gen. Terapie byla původně zamýšlená k léčbě dědičných onemocnění, jako je cystická fibróza, hemofilie či některé imunodeficience, nicméně po letech výzkumu dává naději i pacientům se získanými chorobami, např. s nádorovým nebo infekčním onemocněním.

V léčbě SCI cílí genová terapie na obranu před šířením poškození, posílení opravy tkáně a obnovení produkce či inhibice určitých genů (Pearce and Bunge, 2006). Do poškozené míchy se geny mohou vpravit mnohými způsoby. Rozlišujeme metody využívající virové a neviróvé nosiče (vektory). Obě metody skýtají řadu výhod i nevýhod.

Bez využití virů se nabízí možnost vnesení genů např. biolistickou metodou transformace, elektroporací či „gene-activated matrix“, což je doručovací systém tvořený biodegradovatelným polymerem, ve kterém je kopolymerován plazmid (shrnutí v Pearce and Bunge, 2006). Neviróvé vektory v porovnání s virovými jsou výhodné pro menší toxicitu a tumorigenicitu. Z virů jsou jako vektory využívány retroviry, adenoviry, adeno-asociované viry a lentiviry. Jejich předností je oproti neviróvým vektorům vysoká efektivita transdukce a stabilní transgenní exprese (shrnutí v Cui *et al.*, 2013).

Výše popsané způsoby terapie řadíme mezi *in vivo* techniky, kdy jsou funkční geny aplikovány přímo do buněk těla. Velký potenciál pro léčbu SCI představuje *ex vivo* terapie, kdy jsou do těla pacienta vpraveny geneticky modifikované buňky. Ty jsou v případě autologní transplantace nejdříve odebrány pacientovi, následně jsou do nich *in vitro* vpraveny funkční geny, poté se buňky kultivují a množí, aby mohly být později vráceny zpět pacientovi. Tato technika má řadu výhodných vlastností ve srovnání s přímou genovou terapií. Patří mezi ně např. specifita doručení genů do daných buněk, regulovatelné dávkování změnou počtu buněk, poměrně rychlá optimalizace infekce či transfekce, multigenový přenos (Pearce and Bunge, 2006).

Genetickou modifikací buněk můžeme zvýšit produkci růstových faktorů a jiných proteinů, pro jejichž aplikaci jsou jiné metody méně účinné nebo invazivní. Overexprese těchto faktorů významně přispívá k neuroprotekcí i regeneraci postižené tkáně. Jako vhodné buněčné typy



pro genovou manipulaci a transplantaci do SCI se ukázaly fibroblasty, Schwannovy buňky, gliální čichové buňky a nervové kmenové buňky (Hendriks *et al.*, 2004). Využití kmenových buněk pro dopravu různých genů může být výhodné díky jejich vyšší proliferační kapacitě. Mezenchymové kmenové buňky (MSC) mohou být modifikovány k produkci neurotrofních faktorů (NT-3, BDNF, GDNF, NGF) či jaterního růstového faktoru (HGF) (Cui *et al.*, 2013).

V budoucnu budou známy i další modifikace MSC přispívající k léčbě SCI. Je však nutné získat více poznatků o úrovni exprese transgenů a její stabilizaci, regulaci a bezpečnosti využití (Cui *et al.*, 2013). Modifikace MSC byla využita i k regeneraci dalších tkání, např. kostní tkáně (Gazit *et al.*, 1999) nebo ke zvýšení účinku léčby srdečního infarktu (Xue *et al.*, 2014).

## 7 Závěr

Míšní poranění zůstává stále neléčitelným zdravotním problémem, který významně ovlivňuje kvalitu života. Chronická fáze, ve které většina pacientů zůstává podstatnou část života, je charakterizována demyelinizací, chronickou bolestí a různou mírou neurologických dysfunkcí. Dosavadní terapie spočívá v dlouhodobé rehabilitaci a užívání kortikosteroidů bez výrazného zlepšení neurologických funkcí. Nadějně výsledky poskytuje aplikace kmenových buněk, které mohou přispět k obnově tkáně díky diferenciaci do nervových buněk nebo svými imunomodulačními schopnostmi a produkcí růstových faktorů.

Využití embryonálních a fetálních kmenových buněk je zatíženo etickými a náboženskými problémy, nicméně jejich aplikace do SCI přináší dobré výsledky. Řešení nabízí indukované pluripotentní buňky, které mají rovněž neomezený diferenciací potenciál, nicméně reprogramování buněk stále nese některé problémy a stejně jako embryonální kmenové buňky nesou riziko tumorogeneze. Adultní kmenové buňky, zejména mezenchymového původu, přispívají ke zlepšení funkcí po SCI zejména díky imunomodulačním schopnostem a produkcí řady růstových faktorů a cytokinů.

Nejefektivnější výsledky zatím přináší kombinovaná terapie, která využívá vhodné biomateriály k přemostění míšních lézí společně s buňkami či růstovými faktory, které jsou nezbytné pro obnovu buněk. Je tak zajištěno vhodnější prostředí pro růst axonů a redukci gliové jizvy, která je hlavní bariérou pro regeneraci tkáně. Buňky mohou být geneticky modifikovány ke zvýšení produkce daných faktorů, které mohou být samotné dopraveny do poškozené tkáně různými metodami genového inženýrství.

Proběhlé klinické studie prokazují alespoň částečnou obnovu funkcí díky výše jmenovaným strategiím, nicméně v budoucnu bude potřeba získat ještě mnoho poznatků o jejich bezpečné a účinné aplikaci do klinické praxe. Využití kmenových buněk nabízí naději i pro další nemoci, např. neurodegenerativní onemocnění, roztroušenou sklerózu nebo iktus.

## Reference

S. Aggarwal, M. F. Pittenger; Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses; *Blood*, číslo 4, 2005

A. H. All, Payam Gharibani, Siddharth Gupta, Faith A. Bazley, Nikta Pashai, Bin-Kuan Chou, Sandeep Shah, Linda M. Resar, Linzhao Cheng, John D. Gearhart, Candace L. Kerr; Early Intervention for Spinal Cord Injury with Human Induced Pluripotent Stem Cells Oligodendrocyte Progenitors; *Plos one*, 2015

R. Ambasudhan, Maria Talantova, Ronald Coleman, Xu Yuan, Saiyong Zhu, Stuart A. Lipton, Sheng Ding; Direct Reprogramming of Adult Human Fibroblasts to Functional Neurons under Defined Conditions; *Cell Stem Cell*, číslo 9, 2011

T. Amemori, Nataliya Romanyuk, Pavla Jendelova, Vit Herynek, Karolina Turnovcova, Pavel Prochazka, Miroslava Kapcalova, Graham Cocks, Jack Price, Eva Sykova; Human conditionally immortalized neural stem cells improve locomotor function after spinal cord injury in the rat; *Stem Cell Research & Therapy*, 2013

T. Amemori, P. Jendelová, K. Růžičková, D. Arboleda, E. Syková; Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat; *Cytotherapy*, 2010; 12: 212–225

R. D. Azbill, Xiaojun Mu, A. J. Bruce-Keller, M. P. Mattson., J. E. Springer; Impaired mitochondrial function, oxidative stress and altered antioxidant enzyme activities following traumatic spinal cord injury; *Brain Research* 765, 1997

F. Bamabé-Heider, J. Frisé; Stem Cells for Spinal Cord Repair; *Cell Stem Cell* 3, 2008

N. R. Blondheim, Y. S. Levy, T. Ben-Zur, A. Burshtein, T. Cherlow, I. Kan, R. Barzilai, M.

Bahat-Stromza,, Y. Barhum, S. Bulvik, E. Melamed, D. Offen; Human Mesenchymal Stem Cells Express Neural Genes, Suggesting a Neural Predisposition – Original Research Report; Stem Cells and Development, číslo 15, 2006

A. J. Braga Osorio Gomes Salgado, Rui L. Goncalves Reis, Nuno Jorge Carvalho Sousa, Jeffrey M. Gimble, Antonio J. Salgado, Rui L. Reis and Nuno Sousa; Adipose Tissue Derived Stem Cells Secretome: Soluble Factors and Their Roles in Regenerative Medicine; DOI: 10.2174/157488810791268564 Current Stem Cell Research & Therapy

T. R. Brazelton, Fabio M. V. Rossi, Gilmer I. Keshet, Helen M. Blau; From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice; Science, číslo 290, 2000

R. K. Burt, Bruce Cohen, John Rose, Finn Petersen, Yu Oyama, Dusan Stefoski, George Katsamakis, Ewa Carrier, Tomas Kozak, Paolo A. Muraro, Roland Martin, Roger Hintzen, Shimon Slavin, Dimitrios Karussis, Shalom Haggiag, Julio C. Voltarelli, George W. Ellison, Borko Jovanovic, Uday Popat, Joseph McGuirk, Laisvyde Statkute, Larissa Verda, Judith Haas, Renate Arnold; Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis; Neurological Review, číslo 6, 2005

S. L. Carlson, Mark E. Parrish, Joe E. Springer, Ketah Doty, Lee Dossett; Acute Inflammatory Response in Spinal Cord Following Impact Injury; Experimental Neurology, číslo 151, 1998

M. K. Carpenter, Margaret S. Inokuma, Jerrod Denham, Tahmina Mujtaba, Choy-Pik Chiu, Mahendra S. Rao; Enrichment of Neurons and Neural Precursors from Human Embryonic Stem Cells; Experimental Neurology, číslo 172 2001

J. Castaño, Pablo Menendez, Cristina Bruzos-Cidon, Marco Straccia, Amaia Sousa, Lorea Zabaleta, Nerea Vazquez, Amaia Zubiarrain, Kai-Christian Sonntag, Luisa Ugendo, Xonia Carvajal-Vergara, Josep Maria Canals, Maria Torrecilla, Rosario Sanchez-Pemaute, Alessan-

dra Giorgetti; Fast and Efficient Neural Conversion of Human Hematopoietic Cells; Stem Cell Reports, číslo 3, 2014

Chen Gang, Hu Yan-rong, Wan Hong, Xia Lei, Li Jun-hua, Yang Fei, Qu Xue, Wang Sheng-guo, Wang Zhong-cheng; Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold seeded with neural stem cells and Schwann cells; Chin Med J, číslo 17, 2010

M. Coutts, H. S. Keirstead; Stem cells for the treatment of spinal cord injury; 2007

J. T. Dimos, K. T. Rodolfa, K. K. Niakan, L. M. Weisenthal, H. Mitsumoto, W. Chung, G. F. Croft, G. Saphier, R. Leibel, R. Goland, H. Wichterle, Ch. E. Henderson, K. Eggan; Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons; Science, číslo 231, 2008

M Dominici, K Le Blanc , I Mueller, I Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop and EM Horwitz; Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells; The International Society for Cellular Therapy position statement; 4. svazek, 8. vydání, 2006

R. J. Dumont, D. O. Okonkwo, S. Verma, R. John Hurlbert, P. T. Boulos, D. B. Ellegala, A. S. Dumont; Pathophysiologic Mechanisms; Acute Spinal Cord Injury, Part I:

S. Erceg, M. Ronaghi, M. Oria, M. García Roselló, M. A. P. Aragón, M. G. Lopez, I. Radojevic, V. Moreno-Manzano, F.-J. Rodríguez-Jiménez, S. S. Bhattacharya, J. Cordoba, M. Stojkovic; Transplanted Oligodendrocytes and Motoneuron Progenitors Generated from Human Embryonic Stem Cells Promote Locomotor Recovery After Spinal Cord Transection; Stem Cells, číslo 28, 2010

S. A. Figley, R. Khosravi, J. M. Legasto, Yun-Fan Tseng, M. G. Fehlings; Characterization of Vascular Disruption and Blood-Spinal Cord Barrier Permeability following Traumatic Spinal Cord Injury; *Journal Of Neurotrauma*, 31, 2004

M. T. Fitch, J. Silver; CNS Injury, Glial Scars, and Inflammation; *Exp Neurol*, číslo 2, 2008

J. C. Furlan, M. G. Fehlings; The Impact of Age on Mortality, Impairment, and Disability among Adults with Acute Traumatic Spinal Cord Injury; *Journal Of Neurotrauma*, číslo 26, 2009

D. Gazit, Gadi Turgeman, Pamela Kelley, Elizabeth Wang, Mary Jalenak, Yoram Zilberman, Ioannis Moutsatsos; Engineered Pluripotent Mesenchymal Cells Integrate and Differentiate in Regenerating Bone: A Novel Cell-Mediated Gene Therapy; *The Journal Of Gene Medicine*, číslo 1, 1999

M. Girlovanu, S. Susman, O. Soritau, D. Rus-Ciuca, C. Melincovici, A.-M. Constantin, C. M. Miha; *Stem Cells – Biological Update and Cell Therapy Progress*; *Clujul Medical*, číslo 3, 2015

A. Hejčl, J. Sedý, M. Kapcalová, D.A. Toro, T. Amemori, P. Lesný, K. Likavcanová-Mašíňová, E. Krumbholcová, M. Prádný, J. Michálek, M. Burian, M. Hájek, P. Jendelová, E. Syková; HPMA-RGDhydrogels seeded with mesenchymal stem cells improve functional outcome in chronic spinal cord injury; *Stem Cells Dev.* 2010 Oct;19(10):1535-46. doi: 10.1089/scd.2009.0378

A. Hejčl, P. Lesný, M. Prádný, J. Michálek, P. Jendelová, J. Štulík, E. Syková; Biocompatible Hydrogels in Spinal Cord Injury Repair; *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 3): S121-S132, 2008

W. T.J. Hendriks, M. J. Ruitenber, B. Blits, G. J. Boer, Joost Verhaagen; Viral vector-mediated gene transfer of neurotrophins to promote regeneration of the injured spinal cord; *Progress in Brain Research*, číslo 146, 2004

D. A. Houweling, A. J. Lankhorst, W. H. Gispen, P. R. Baer, and E. A. J. Joosten; Collagen Containing Neurotrophin-3 (NT-3) Attracts Regrowing Injured Corticospinal Axons in the Adult Rat Spinal Cord and Promotes Partial Functional Recovery; *EXPERIMENTAL NEUROLOGY* 153, 49–59 (1998) EN986867

C. E. Hulsebosch; Recent Advances in Pathophysiology and Treatment of Spinal Cord Injury; *APS Refresher Course Report*, číslo 4, 2002

K. Janghwan, Jem A. Efe, Saiyong Zhu, Maria Talantova, Xu Yuan, Shufen Wang, Stuart A. Lipton, Kang Zhang, Sheng Ding; Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors; *PNAS*, číslo 19, 2011

P. J. Johnson, Alexander Tatara, Alicia Shiu, and Shelly E. Sakiyama-Elbert; Controlled release of neurotrophin-3 and platelet derived growth factor from fibrin scaffolds containing neural progenitor cells enhances survival and differentiation into neurons in a subacute model of SCI; *Cell Transplant.* 2010; 19(1): 89–101.

S. Karimi-Abdolrezaee, Eftekhari Eftekharpour, Jian Wang, Cindi M. Morshead, Michael G. Fehlings; Delayed Transplantation of Adult Neural Precursor Cells Promotes Remyelination and Functional Neurological Recovery after Spinal Cord Injury; *The Journal of Neuroscience*, 2006

H. S. Keirstead, Gabriel Nistor, Giovanna Bernal, Minodora Totoiu, Frank Cloutier, Kelly Sharp, Oswald Steward; Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury; *The Journal of Neuroscience*, číslo 19, 2005

K. Kim, A Doi, B Wen, K Ng, R Zhao, P Cahan, J Kim, MJ Aryee, H Ji, L Ehrlich, A Ya-

buuchi, A Takeuchi, KC Cunniff, H Hongguang, S Mckinney-Freeman, O Naveiras, TJ Yoon, RA Irizarry, N Jung, J Seita, J Hanna, P Murakami, R Jaenisch, R Weissleder, SH Orkin, IL Weissman, AP Feinber, GQ Daley; Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells; Nature, číslo 467, 2010

Y. Kobayashi, Y. Okada, G. Itakura, H. Iwai, S. Nishimura, A. Yasuda, S. Nori, K. Hikishima, T. Konomi, K. Fujiyoshi, O. Tsuji, Y. Toyama, S. Yamanaka, M. Nakamura, H. Okano; Pre-evaluated Safe Human iPSC-Derived Neural Stem Cells Promote Functional Recovery after Spinal Cord Injury in Common Marmoset without Tumorigenicity; Plos One, číslo 7, 2012

N. Kozubenko, Karolina Turnovcová, Miroslava Kapcalová, Olena Butenko, Miroslava Anderová, Vendula Rusnaková, Mikael Kubista, Aleš Hampl, Pavla Jendelová, Eva Syková; Analysis of In Vitro and In Vivo Characteristics of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursors; Cell Transplantation, číslo 19, 2010

Š. Kubinová, Eva Syková; Biomaterials combined with cell therapy for treatment of spinal cord injury; Regen. Med, číslo 7, 2012

C. Li, R. C. Robey , A. Asawachaicharn, D. Gaupp, D. G. Phinney; Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neuritogenesis; Exp Neurol. 2006 Mar;198(1):54-64. Epub 2005 Dec 5.

N. K. Loh, S. Woerly, S. M. Bunt, S. D. Wilton, and A. R. Harvey; The Regrowth of Axons within Tissue Defects in the CNS Is Promoted by Implanted Hydrogel Matrices That Contain BDNF and CNTF Producing Fibroblasts; Experimental Neurology 170, 72–84 (2001) doi:10.1006/exnr.2001.7692

D. Liu, G.-Y. Xu, E. Pan, D.J. McAdoo; Neurotoxicity of Glutamate at the Concentration Released Upon Spinal Cord Injury; Neuroscience, číslo 4, 1999



P. Lu, A. Blesch, and M. H. Tuszynski; Induction of Bone Marrow Stromal Cells to Neurons: Differentiation, Transdifferentiation, or Artifact?; *Journal of Neuroscience Research* 77:174–191 (2004)

L. Machová Urdzík, J. Ružička, M. LaBagnara, K. Kárová, Š. Kubinová, K. Jiráková, R. Murali, E. Syková, M. Jhanwar-Uniyal and P. Jendelová; Human Mesenchymal Stem Cells Modulate Inflammatory Cytokines after Spinal Cord Injury in Rat; *Int. J. Mol. Sci.* 2014, 15, 11275-11293; doi:10.3390/ijms150711275

A. Mahmood, Wu H., Qu C., Xiong Y., M. Chopp; Effects of treating traumatic brain injury with collagen scaffolds and human bone marrow stromal cells on sprouting of corticospinal tract axons into the denervated side of the spinal cord; *J Neurosurg.* 2013 Feb;118(2):381-9. doi: 10.3171/2012.11.JNS12753. Epub 2012 Nov 30.

Nan Yang, J. B. Zuchero, H. Ahlenius, S. Marro, Xi Han Ng, T. Vierbuchen, J. S. Hawkins, R. Geissler, B. A. Barres, M. Wernig; Generation of Oligodendroglial Cells by Direct Lineage Conversion; *Nat Biotechnol*, číslo 5, 2013

T. Ostefeld, M. A. Caldwell, K. R. Prowse, M. H. Linskens, E. Jauniaux, C. N. Svendsen; Human Neural Precursor Cells Express Low Levels of elomerase in Vitro and Show Diminishing Cell Proliferation with Extensive Axonal Outgrowth following Transplantation; *Experimental Neurology* 164, 2000

A. M. Parr, I. Kulbatski, T. Zahir, X. Wang, C. Yue, A. Keating, C. H. Tator; Transplanted Adult Spinal Cord-Derived Neural Stem/Progenitor Cells Promote Early Functional Recovery After Rat Spinal Cord Injury; *Neuroscience* 155, 2008

D. D. Pearse, M. B. Bunge; Designing Cell- and Gene-Based Regeneration Strategies To Repair the Injured Spinal Cord; *Journal Of Neurotrauma*, číslo 3/4, 2006

J. Rehman, D. Traktuev, Jingling Li, S. Merfeld-Clauss, C. J. Temm-Grove, J. E. Bovenberk, C. L. Pell, B. H. Johnstone, R. V. Considine, K. L. March; Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells; *Circulation* 2004

N. Romanyuk, T. Amemori, K. Turnovcova, P. Prochazka, B. Onteniente, E. Sykova, P. Jendelova; Beneficial Effect of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Precursors in Spinal Cord Injury Repair; *Cell Transplant* 2015;24(9):1781-97, Epub 2014 Aug 19

J. Růžička, N. Romanyuk, A. Hejčl, M. Vetrík, M. Hrubý, G. Cocks, J. Cihlář, M. Přádný, J. Price, E. Syková, P. Jendelová; Treating spinal cord injury in rats with a combination of human fetal neural stem cells and hydrogels modified with serotonin; *ACTA Neurobiologiae Experimentalis*, číslo 73, 2013

R. P. Salewski, R. A. Mitchell, C. Shen, M. G. Fehlings; Transplantation of Neural Stem Cells Clonally Derived from Embryonic Stem Cells Promotes Recovery After Murine Spinal Cord Injury; *Stem Cells and Development*, číslo 1, 2015

Satoshi Nori, Yohei Okada, Akimasa Yasuda, Osahiko Tsuji, Yuichiro Takahashi, Yoshiomi Kobayash, Kanehiro Fujiyoshi, Masato Koike, Yasuo Uchiyama, Eiji Ikeda, Yoshiaki Toyama, Shinya Yamanaka, Masya Nakamura, Hideyuki Okano; Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice; *PNAS*, číslo 40, 2011

Chunmeng Shi, Ying Zhu, Xinze Ran, Meng Wang, Yongping Su, and Tianmin Cheng; Therapeutic Potential of Chitosan and Its Derivatives in Regenerative Medicine; *Journal of Surgical Research* 133, 185–192 (2006) doi:10.1016/j.jss.2005.12.013

T. Schinköthe, W. Bloch, A. Schmidt; In Vitro Secreting Profile of Human Mesenchymal

Stem Cells; Stem Cells And Development, číslo 17, 2008

B. M. Schipper, K. G. Marra, Wei Zhang, A. D. Donnenberg, and J. P. Rubin; Regional Anatomic and Age Effects on Cell Function of Human Adipose-Derived Stem Cells; Ann Plast Surg. 2008 May; 60(5): 538–544

Shushi Kabu, Yue Gao, Brian K. Kwon, Vinod Labhasetwar; Drug delivery, cell-based therapies, and tissue engineering approaches for spinal cord injury; Journal of Controlled Release 219, 2015

J. Silver, J. H. Miller; Regeneration Beyond The Gliar Scar; Nature, volume 5, 2004

Sung-Su Park, Yu Jin Lee, Seung Hoon Lee, Donghae Lee, Kyuseok Choi, Wan-Hee Kim, Oh-Kyeong Kweon, Ho Jae Han; Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal Stem cells; Cytotherapy, číslo 14, 2012

A. Switowski, Jun Peng, Qiuyue Liu, Prashant Mali, Mahendra S. Rao, Linzhao Cheng, Xiaomin Zeng; Efficient Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Human Induced Pluripotent Stem Cells Under Defined Conditions; Stem Cells, číslo 28, 2010

E. Syková, Pavla Jendelová, Luca Urdzíková, Petr Lesný, Aleš Hejčl; Bone Marrow Stem Cells and Polymer Hydrogels—Two Strategies for Spinal Cord Injury Repair; Cellular and Molecular Neurobiology, číslo 26, 2006

K. Takahashi, S. Yamanaka; Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors; Cell 126, 2006

M. O. Totoiu, H. S. Keirstead; Spinal Cord Injury Is Accompanied by Chronic Progressive

Demyelination; The Journal Of Comparative Neurology, 2005

A. Trivedi, A. D. Olivas, L. J. Noble-Haeusslein,; Inflammation and Spinal Cord Injury: Infiltrating Leukocytes as Determinants of Injury and Repair Processes; Clin Neurosci Res., číslo 6, 2006

R. Vawda, M. G. Fehlings; Mesenchymal Cells in the Treatment of Spinal Cord Injury; Current & Future Perspectives, Current Stem Cell Research & Therapy, číslo 8, 2013

S. M. Willert, Shelly E. Sakiyama-Elbert; Cell Therapy for Spinal Cord Regeneration; Adv. Drug Deliv. Rev., číslo 60, 2008

Xiaodong Xue, Yu Liu, Jian Zhang, Tao Liu, Zhonglu Yang, Huishan Wang; Bcl-xL Genetic Modification Enhanced the Therapeutic Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in the Treatment of Heart Infarction; Stem Cells International, 2015

Xiaoyan Cui, Lei Chen, Yilong Ren, Yazhong Ji, Wei Liu, Jie Liu, Qiao Yan, Liming Cheng, Yi E. Sun; Genetic modification of mesenchymal stem cells in spinal cord injury repair strategies; BioScience Trends, číslo 7, 2013

A. Zaminy, M. Ali Shokrgozar, Y. Sadeghi, M. Norouzi, M. Hassan, H. Abbas Piryaei; Transplantation of Schwann Cells Differentiated from Adipose Stem Cells Improves Functional Recovery in Rat Spinal Cord Injury; Archives of Iranian Medicine, číslo 9, 2003

Yingsha Zhang, ChangHui Pak, Yan Han, H. Ahlenius, Zhenjie Zhang, S. Chanda, S. Marro, Ch. Patzke, C. Acuna, J. Covy, Wei Xu, Nan Yang, T. Danko, Lu Chen, M. Wernig, T. C. Sudhof; Rapid Single-Step Induction of Functional Neurons from Human Pluripotent Stem Cells; Neuron, číslo 5, 2013

## Internetové zdroje

1. Spinal Cord [online],

<http://www.spinalcord.cz/cz/statistiky/>

2. WHO [online],

<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/spinal-cord-injury-20131202/en/>

3. Buněčná terapie [online],

<http://www.bunecnaterapie.cz/bunecna-terapie/historie-vyzkumu-kmenovych-bunek/>