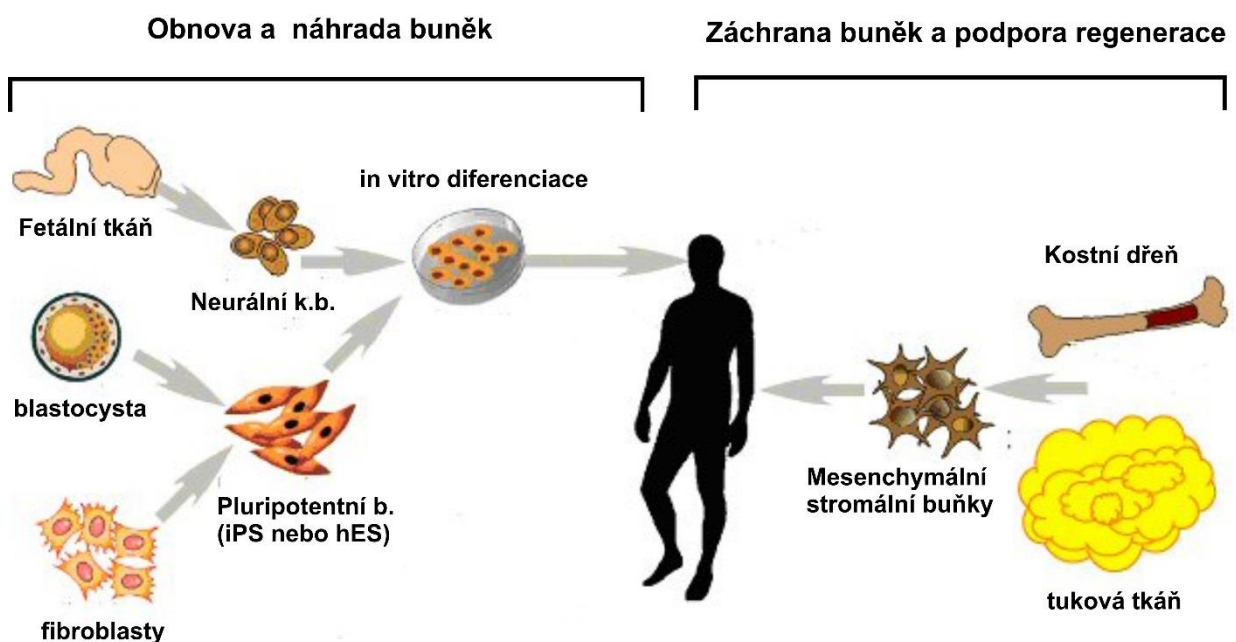


## ÚVOD

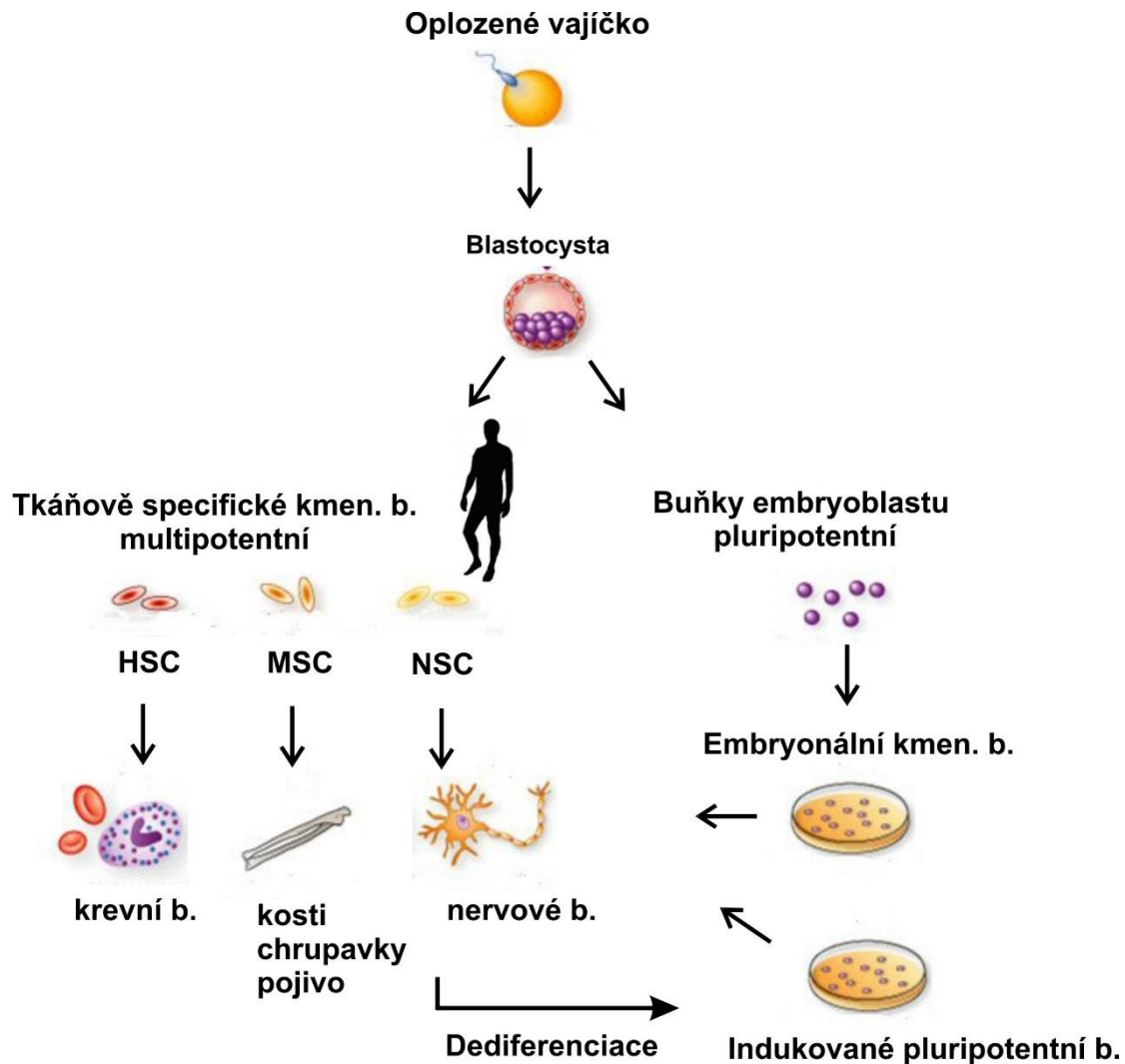
Regenerativní medicína je rychle se rozvíjející odvětví medicíny, které se snaží různými přístupy zrekonstruovat poškozené tkáně. I když různé tkáně a orgány v lidském těle mají rozdílnou schopnost obnovy, stále existuje řada úrazů a poškození, které neumíme léčit. Jedním z možných přístupů v regenerativní medicíně je využití kmenových buněk, které by mohly nahradit zničené nebo chybějící populace buněk v celé řadě závažných chorob. Oblast použití kmenových buněk je v podstatě neomezená. Pokud bychom chtěli vyjmenovat největší problémy současné medicíny, půjde o cukrovku, chronické srdeční ischemie a cévní choroby, selhání jater, iktus, poranění míchy, neurodegenerativní onemocnění a mnoho dalších. Bohužel v současné době nemáme k dispozici žádnou univerzální kmenové buňky, které bychom mohli aplikovat na všechny typy neléčitelných onemocnění. Ve výzkumu buněčné terapie se proto formují dva směry. Jeden směr využívá buňky schopné generovat prekursorů diferencujících se do zralých somatických buněk (tj embryonální kmenové buňky, indukované pluripotentní buňky nebo somatické kmenové buňky diferencující v rámci “svého” zárodečného listu), které podporují funkci „obnovy“, zatímco druhý směr se snaží podpořit regeneraci pomocí tkáňově specifických kmenových buněk, jako jsou třeba buňky kostní dřeně, které mohou zachránit poškozené buňky v rozvíjející se lézi tím, že produkují růstové faktory, cytokiny, indukují proliferaci endogenních kmenových buněk, podporují revaskularizaci a redukuje jizvu, tj mají funkci „záchrany“ poškozené tkáně (obr.1).



**Obrázek 1:** Schéma zdrojů a účinků kmenových buněk v regenerativní medicíně.

## 1. Kmenové buňky

Kmenové buňky mohou být podle zdroje svého původu během vývoje klasifikovány jako embryonální kmenové buňky, fetální kmenové buňky a somatické kmenové buňky izolované z dospělých jedinců (obr. 2). Celá řada vědeckých skupin upřednostňuje **embryonální kmenové buňky (ES)**, protože je můžeme neomezeně expandovat a mají ohromný, téměř neomezený diferenciační potenciál. Lidské ES jsou derivované z vnitřní buněčné masy preimplantační blastocysty a jsou schopné sebeobnovy, diferenciaci do všech buněčných fenotypů a hlavně jejich expanze neprobíhá na úkor diferenciačního potenciálu. Nicméně, allogenní původ ES bude vždy vyžadovat podávání imunopresiv s cílem zabránit odhojení transplantovaných buněk. Navíc využití nadbytečných embryí z in vitro fertilizačních klinik je často kritizováno z etického hlediska, jelikož vytvoření nové ES linie je vždy na úkor zničeného embrya.

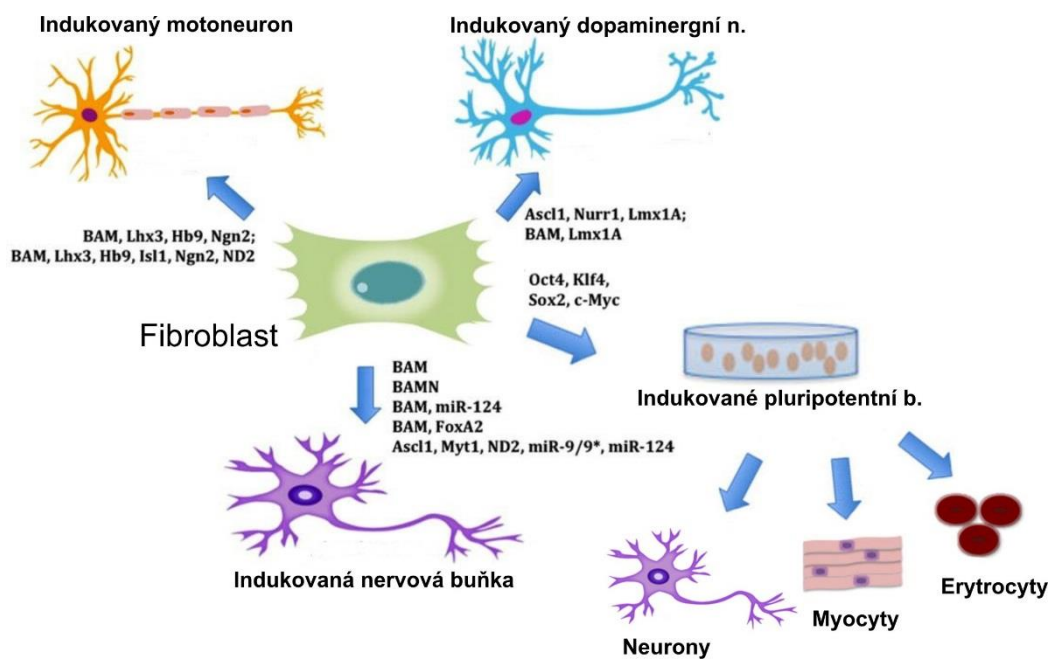


**Obrázek 2:** Schéma znázorňující jednotlivé typy kmenových buněk a jejich diferenciační potenciál. HSC – hematopoetické kmenové buňky, MSC – mesenchymové kmenové buňky, NSC – neurální kmenové buňky.

Nedávno objevené **indukované pluripotentní kmenové buňky (iPS)** se proto ukázaly být novým nadějným zdrojem pluripotentních kmenových buněk pro širokou škálu onemocnění. V roce 2006 Takahashi a Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006) z Japonska popsali nový přístup, jak dediferencovat zralou buňku zpátky do pluripotentního stavu pomocí 4 transkripčních faktorů (Oct4, C-Myc, Klf4 a Sox2). Tento postup má nyní mnoho modifikací, které zde není třeba popisovat. O jeho významu svědčí i fakt, že v roce 2012 získal prof Yamanaka za svůj objev Nobelovu cenu. Další experimenty prokázaly, že iPS buňky je možné diferencovat do všech tří zádodečných listů do nejrůznějších specializovaných buněk, jako jsou neurony, kardiomyocyty nebo třeba inzulin produkující beta buňky pankreatu (Tateishi et al., 2008; Hu and Zhang, 2009; Zhang et al., 2009). Nediferencované iPS buňky jsou svými vlastnostmi natolik podobné ES buňkám, že jednu dobu převládla představa, že výzkum na ES buňkách už nebude potřeba. Další experimenty vyjevily, že mechanismy reprogramování buněk nejsou tak jednoduché a tak výzkum na ES zůstává dále zlatým standardem vývojové a buněčné biologie v oblasti pluripotence a pokračuje souběžně s výzkumem iPS s cílem získat co nejvíce nových poznatků v oblasti bezpečné dediferenciace a následné diferenciaci do požadovaných buněčných typů. I přes všechny výše uvedené problémy je neodiskutovatelné, že ES a iPS mohou diferencovat do širokého okruhu buněk a probíhá řada studií na experimentálních modelech zvířat prokazujících potenciální možnost („proof of concept“) léčby onemocnění jako jsou diabetes (Kroon et al., 2008), infarkt myokardu (Pal, 2009), Parkinsonova choroba (Lindvall and Kokaia, 2009), iktus (Seminatore et al., 2010) a poranění míchy (Aznar and Sanchez, 2011). Mezinárodní společnost pro výzkum kmenových buněk (ISSCR) vydala zásady pro preklinické a translační studie, aby světová vědecká komunita pracující v regenerativní medicíně měla definovaná kritéria vědeckých i etických principů při zavádění pluripotentních kmenových buněk do klinických studií (Hyun et al., 2008). První klinickou studií, povolenou v USA regulačním úřadem Food and Drug Administration, byla studie firmy Geron, která využívala produkt získaný z lidských ES buněk – prekursorů oligodendrocytů – k léčbě míšního poranění (Couzin, 2009). Bohužel, v listopadu byla tato studie zastavena z finančních důvodů. Z původně plánovaných 10-ti pacientů se podařilo transplantovat pouze 5, kteří však budou sledováni po dobu 15ti let. V Japonsku byla v červnu 2013 schválená klinická studie využívající iPS buňky k tvorbě pigmentového epitelu sítnice a jeho následnou transplantaci pacientům s degenerací makuly. Z paže odebrané kůže budou vytvořeny iPS buňky a ty budou diferencovány do epitelu a následně transplantovány pacientům. První transplantace se očekávají v roce 2014. Předpokládá se, že brzy další firmy požádají o schválení klinických studií využívajících ES nebo iPS produkty, jako například biotechnologická firma

Novocell (Irvine, Kalifornie), která vyvíjí beta buňky Langerhansových ostrůvků k léčbě diabetu.

Existují i jiné způsoby, jak ze somatických buněk, například fibroblastů, získat nervové buňky, a to pomocí přímého reprogramování buněk vynecháním pluripotentního stádia dediferenciace (přehled viz (Abdullah et al., 2012), (obr. 3)). Pomocí speciálních koktejlů transkripčních faktorů (například Brn2/Pou3f2, Ascl1/MASH1 a Myt11) byly připraveny **indukované neurony** (iN) (Vierbuchen et al., 2010; Ambasudhan et al., 2011; Pang et al., 2011; Pfisterer et al., 2011; Son et al., 2011; Yoo et al., 2011) a přidáním dalších faktorů lze přímo získat i specializované neurony, jako například dopaminergní neurony (Lmx1 a FoxA2) (Vierbuchen et al., 2010) nebo motoneurony (Lhx3, Hb9, Isl1, Ngn2, a NeuroD1) (Son et al., 2011) či neurální kmenové buňky (Pang et al., 2011).



**Obrázek 3:** Schéma faktorů indukujících různé typy neuronů a iPS. (Upraveno podle (Abdullah et al., 2012)).

Takto vytvořené neurony mají všechny znaky funkčních neuronů, účinnost reprogramování je 2-10% a transdiferenciace trvá 6-8 dní oproti klasické diferenciaci z kmenových buněk, která trvá řádově týdny. Dosud však není zcela jednoznačné, zda-li se jedná o skutečné neurony, neboť i když iN exprimují zásadní neuronální faktory a signální molekuly, synaptické proteiny, proteiny a receptory nutné pro syntézu neurotransmitterů a molekuly nezbytné pro navádění axonů, byla u nich detekována i nízká exprese genů specifických pro zralé fibroblasty (Caiazzo et al., 2011; Jin et al., 2011). Rovněž není jasné

jejich dlouhodobé chování v poraněné tkáni. Slibným směrem budoucnosti je i reprogramování buněk pomocí syntetické messenger RNA (Warren et al., 2010).

Hlavní výhodou dalšího zdroje kmenových buněk, **fetální tkáně**, je, že buňky jsou již více definované a předurčené ve svém dalším vývoji (Lepore et al., 2006), a tudíž nenesou tak velké riziko nekontrolovaného dělení. Hlavní překážkou ve využití těchto buněk je nedostatek tkáně, neboť zdrojem jsou převážně potraty. Navíc i s použitím potrácené tkáně je spojena řada etických otázek. Řešením může být vytvoření imortalizovaných buněčných linií, ve kterých je imortalizující gen downregulovaný po transplantaci do tkáně příjemce. Buněčná linie CTX0E03 byla vytvořena technologií (c mycERTAM) ve které je vytvořený fúzovaný protein, sestávající z genu podporujícího proliferaci c-myc a hormonálního receptoru, který je regulován syntetickou látkou 4-hydroxy-tamoxifenem (4-OHT) (Littlewood et al., 1995). Tato linie je nyní využívána ve Velké Británii v klinické studii u pacientů s iktem (Pollock et al., 2006).

**Somatické kmenové buňky** z dospělých jedinců lze získat z celé řady orgánů, včetně kostní dřeně, tukové tkáně nebo periferní krve. Hlavní výhodou posledně jmenovaných zdrojů je možnost autologního využití bez potřeby celoživotního podávání imunosupresivních látek. V autologních studiích jsou nejčastěji získávány od pacientů jejich vlastní hematopoetické, endoteliální nebo mesenchymové kmenové buňky, většinou odběrem kostní dřeně, mobilizací kostní dřeně pomocí růstových faktorů nebo z liposukce z tukové tkáně. Takovéto autologní buněčné terapie jsou využívány v různých klinických studiích s popsáním různým účinkem na pacienty. Například několik srovnávacích studií popsalo pozitivní účinek CD34<sup>+</sup> populace buněk na revaskularizaci a regeneraci srdečního svalu u pacientů (Sekiguchi et al., 2009). Kromě využití autologních terapií, kde hlavním zdrojem bývá kostní dřeň a v poslední době i tuková tkáň, se pozornost zaměřila na alogenní buněčné terapie využívající **mesenchymové kmenové** nebo **stromální buňky** (MSC) a to zejména pro jejich imunosupresivní účinky. Bylo prokázáno, že MSC z kostní dřeně mohou diferencovat do různých buněčných typů, jako jsou chondrocyty, osteoblasty a adipocyty. Navíc bylo provedeno mnoho pokusů transdiferencovat MSC do epiteliálních buněk, kardiomyocytů, neuronů nebo beta buněk pankreatu, avšak transdiferenciace MSC napříč zárodečnými listy patří stále k velkým vědeckým výzvám. V mnoha experimentálních modelech poškozených orgánů laboratorních zvířat (jako například infarkt myokardu, selhání ledvin, iktus, míšní poranění, kožní rány (Boyle et al., 2010; Urdzikova et al., 2006; Herdrich et al., 2008; Dharmasaroja, 2009; Choi et al., 2010) bylo prokázáno, že MSC migrují do místa poranění, kde zůstávají a přispívají k hojivým procesům. Jejich léčivý efekt je dán zejména růstovými faktory, které vylučují, či jejich

imunomodulačními schopnostmi. Ty byly demonstrovány v řadě in vitro a in vivo modelů. Bylo ukázáno, že MSC inhibují proliferaci lymfocytů, produkci cytokinů nebo tvorbu cytotoxických T lymfocytů. In vivo MSC mohou potlačovat zánětlivá onemocnění, jak bylo prokázáno u zánětu myokardu, revmatoidní artritidy a dalších experimentálních autoimunitních onemocnění. Jelikož podání alograftu v kombinaci s MS prodlužuje přežití transplantátu, je naděje, že MSC mají velký terapeutický potenciál v potlačování škodlivé imunitní reakce. V současné době probíhá řada klinických studií využívajících imunosupresivní účinky alogenních MSC v potlačení reakce štěpu proti hostiteli či osteoartritidy, roztroušené sklerózy nebo systémového lupus erythematosus ([www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)). Terapeutický potenciál MSC izolovaných z kostní dřevě je srovnatelný s ostatními typy MSC, které byly v poslední době získány z různých zdrojů, včetně tkání trabekulární kosti (Song et al., 2005), periostu (Choi et al., 2008), synoviální membrány (De Bari et al., 2001), z kosterních svalů (Dodson et al., 2010), kůže (Belicchi et al., 2004), pericytů (Feng et al., 2010), periferní krve (Shi et al., 2009), dočasných zubů (Miura et al., 2003), periodontia (Seo et al., 2004) a pupeční šňůry (Musina et al., 2005; Baksh et al., 2007). I když populace kmenových buněk, získaných z těchto zdrojů mají podobné vlastnosti, jako MSC izolované z kostní dřevě, hlavním problémem těchto omezeně dostupných tkání, je malé množství sklizených buněk. Proto v podstatě všechny somatické kmenové buňky vyžadují do určité míry ex vivo kultivaci nebo manipulaci. Z těchto důvodů patří **mesenchymové stromální buňky** derivované z **tukové tkáně** (AMSC) k jedné z nejslibnějších populací dosud identifikovaných kmenových buněk, neboť lidská tuková tkáň je všudypřítomná a lze ji snadno získat ve velkém množství s nízkým diskomfortem odběru od dárce nebo pacienta. Průměrná četnost AMSC izolovaných z lipoaspirátu tvoří asi 2% jaderných buněk, a výnos je 5000 CFU-F na gram tukové tkáně, což je ve srovnání s kostní dřeví 5 až 50x více (Strem et al., 2005). AMSC již v raných pasážích produkují hepatocytární růstový faktor (HGF), cévní endoteliální růstový faktor (VEGF), transformující růstový faktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), inzulinu podobný růstový faktor (IGF) -1, základní růstový faktor fibroblastů (bFGF), kolonie granulocytů-makrofágů stimulující faktor GM-CSF, tumor nekrotizující faktor (TNF- $\alpha$ ), interleukiny (IL-6, IL7, IL8, a IL11), adiponektin, angiotenzin, katepsin D, pentraxin, retinol-vážíci protein, a CXCL12 (Rehman et al., 2004; Kilroy et al., 2007; Salgado et al., 2010). AMSC sdílejí mnoho povrchových markerů s MSC z kostní dřevě, včetně CD13, CD29, CD44, CD58, CD166. Navíc, Puissant et al. (Puissant et al., 2005) ve své studii poukázal na imunosupresivní vlastnosti lidských AMSC. Na základě těchto zjištění Fang et al. zveřejnil předběžné výsledky, ve kterých ukazuje, že silná akutní reakce štěpu proti hostiteli (GVHD), neodpovídající na léčbu steroidy, může být léčena lidskými AMSC od HLA-nesourodých dárců

(Fang et al., 2007). Práci poukazujících na lepší imunosupresivní vlastnosti tukových AMSC v poslední době přibývá (Melief et al., 2013).

Pokud jde o diferenciaci do buněk mezodermální linie a regenerace tkání mezodermálního původu, AMSC mohou diferencovat do adipogenních (Cherubino and Marra, 2009; Brayfield et al., 2010), osteogenních (Dragoo et al., 2003), chondrogenních (Dragoo et al., 2003; Estes and Guilak, 2011), myogenních (Mizuno et al., 2002), kardiomyogenních (Lee et al., 2009), antiangiogenních (Rehman et al., 2004; Cherubino et al., 2011), tenogenních (Uysal and Mizuno, 2010), a periodontogenních linií (Tobita and Mizuno, 2010). Byly popsány i úspěšné transdiferenciace AMSC do buněk ektodermálního i endodermálního původu (neurony (Safford et al., 2004) a hepatocyty (Aurich et al., 2009; Banas et al., 2009)), obecně ale jejich využití v regenerativní medicíně, podobně jako tomu je u MSC z kostní dřeně, bude spíše založeno na parakrinním efektu díky antiapoptotickým, protizánětlivým a antifibrotickým faktorům, které vylučují. V současné době běží 26 klinických studií, většinou fáze I nebo II, ověřující bezpečnost podání AMSC v léčbě nejrůznějších onemocnění ([www.clinicaltrial.gov](http://www.clinicaltrial.gov)).

## **2. Poranění míchy**

Jedním z odvětví regenerativní medicíny, která ještě neumíme léčit, je poranění mozku a míchy.

Poranění míchy je významný zdravotní i společenský problém převážně v ekonomicky rozvinutých zemích světa. Současná studie, provedená ve Spojených Státech pod záštitou nadace Christofera Reeva (Christopher & Dana Reeve Foundation, Short Hills, NJ) ukázala, že jen v USA žije s poraněním míchy 1,275 mil. osob, což je 0.4% populace. Ročně tam přibývá asi 11 000 nových úrazů míchy (40/1mil. obyvatel). Náklady na péči jednoho 25 letého paraplegického pacienta se v roce 2007 odhadovaly na 3 mil dolarů (Priebe et al. 2007). V České republice je situace podobná. Ročně přibývá kolem 200–250 nových poškození míchy (20-25/1mil. obyvatel). Ve většině případů je etiologie úrazová – pády, dopravní nehody, sportovní úrazy. Statistika, která by vyčíslila náklady na jednoho pacienta v ČR, neexistuje.

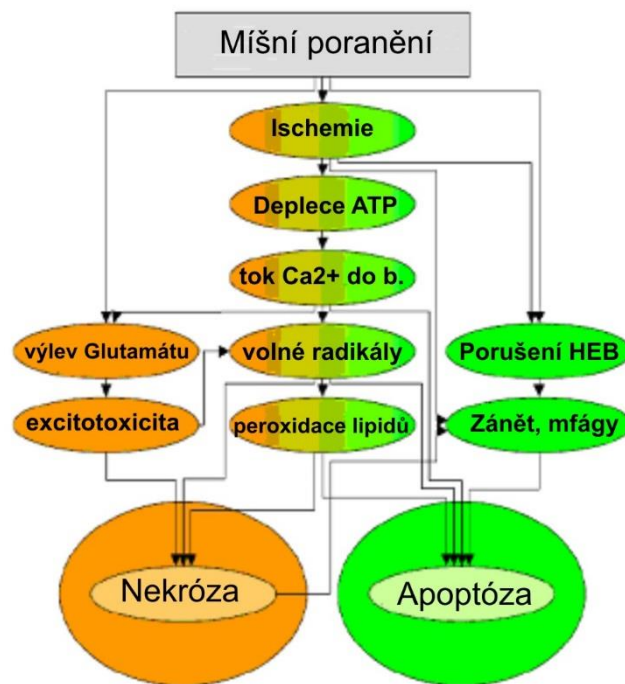
### **2.1. Patologie míšního poranění**

Pro terapii míšních poranění (MP) nemáme v současnosti žádnou účinnou léčbu. Standardem je, kromě stabilizace, konzervativní terapie vysokými dávkami methylprednisolonu (Hugenholtz et al., 2002), proběhly i klinické studie s naloxonem (Bracken et al., 1990), tirilazadem (Bracken et al., 1998), GM-1 gangliosidem (Geisler et al., 2001) a nimodipinem (Pointillart et al., 2000). Dlouhodobá léčba pacientů po míšním poranění se soustřeďuje na rehabilitaci, odstraňování bolesti, spasticity a prevenci komplikací. Do popředí se dostávají podpůrné techniky, například funkční elektrická stimulace, replantace šlach a neuroprotektika. Jelikož se míšní poranění vyskytuje často u mladých lidí, je důležité, abychom porozuměli jeho mechanismům a vyvinuli terapie, které nejen zmenší následky sekundárního poranění, ale povedou i k zlepšení neurologických deficitů, vyvolaných poraněním. Obecně platí, že úrazy míchy jsou velmi různorodá a terapeutický přístup se liší v závislosti na umístění, rozsahu, stupni poškození a době uplynulé od úrazu. Traumatické míšní poranění může být rozděleno do tří etap: akutní, subakutní a chronické. **Akutní fáze** začíná po poranění míchy, kdy mechanická deformace míchy a působící síla vede k porušení neuronálních buněčných membrán s následným uvolněním jejich intracelulárního obsahu a glutamátu z intracelulárních zásob, což vede k excitotoxicitě, vazospazmu, lokalizovanému edému, porušení hematoencefalické bariéry a kaskádě biochemických a buněčných procesů vedoucích k masivní nekrotické buněčné smrti a posunu metabolismu směrem k anaerobní glykolýze (Kato et al., 1996; Emery et al., 1998). Dochází rovněž ke zvýšení hladin cytokinů (jako je C-reaktivní protein, IL-6, endothelin-1, a sVCAM-1 (Wang et al., 2007)). Akutní fáze trvá několik hodin až dnů a přechází do subakutní fáze (obr. 4).

**Subakutní fáze** je charakterizována procesy, které po počátečním traumatickém šoku vedou k dalšímu poškození nervové tkáně. Tyto procesy spouští řetěz událostí, které jsou doprovázeny zánětlivou reakcí, aktivací mikroglíí a oligodendroglíí, probíhá demyelinizace, cévní poruchy související s hypoxií, deplece ATP, produkce volných radikálů s následnou peroxidací lipidů (Farooqui et al., 2004), lokální zánět (Carlson et al., 1998). Následná buněčná smrt v centru místa poranění a apoptotická buněčná smrt v okolních oblastech dosahuje nejvyšší úrovně asi 1 týden po úrazu (Dusart and Schwab, 1994; Crowe et al., 1997; Popovich et al., 1997; Taoka et al., 1997; Beattie et al., 2000; Klussmann and Martin-Villalba, 2005). Probíhající demyelinizace (Waxman, 1989; Bunge et al., 1993) a degenerace nervových drah vede k neuronální smrti nejen v bezprostřední blízkosti léze, ale i ve vzdálených místech, jako je motorická kůra mozku (Lee et al., 2004; Seif et al., 2007). V této fázi zanikne mnoho oligodendrocytů a astrocytů v centru léze (Crowe et al., 1997), zatímco na jejím okraji dochází



k aktivaci astrocytů, které tvoří dlouhé výběžky s cílem zabránit šíření agresivního prostředí v obou směrech (Nathaniel and Nathaniel, 1977; Eddleston and Mucke, 1993). Aktivované astrocyty však následně blokují regeneraci tkáně, neboť vytváří bariéru pro růst axonů (Fawcett, 2006). Dalšími inhibičními faktory jsou glykoproteidy související s myelinem a glykoproteiny oligodendrocytů a myelinu, které slouží jako inhibiční molekuly pro růst axonů (Schwab and Caroni, 1988; Domeniconi et al., 2002; Oertle et al., 2003).



**Obrázek 4:** Schéma patologie akutní fáze míšního poranění

**Chronická fáze** MP může trvat několik let a je charakterizována pokračující demyelinizací (Bunge et al., 1993; Schwab and Bartholdi, 1996; Totoiu and Keirstead, 2005), lokálním zánětem a apoptózou (Fleming et al., 2006), snížením počtu aktivovaných makrofágů, a tvorbou gliové jizvy a pseudocyst (Windle and Chambers, 1950; Fawcett and Asher, 1999; Nielsen et al., 1999; Perrouin-Verbe et al., 1999). Tato fáze MP je velkou výzvou pro lékaře a vědce a přitahuje největší zájem výzkumných pracovišť, protože většina pacientů s míšním poraněním zůstává v této fázi ve větší či menší míře po celý zbytek svého života.

Regenerace dospělého CNS je omezena v důsledku nízké plasticity neuronů, termínu, který zahrnuje řadu kompenzačních procesů (spontánní regeneraci postižených axonů, remodelaci dendritů, změny v nervových okruzích a synaptických zakončeních). Tyto procesy

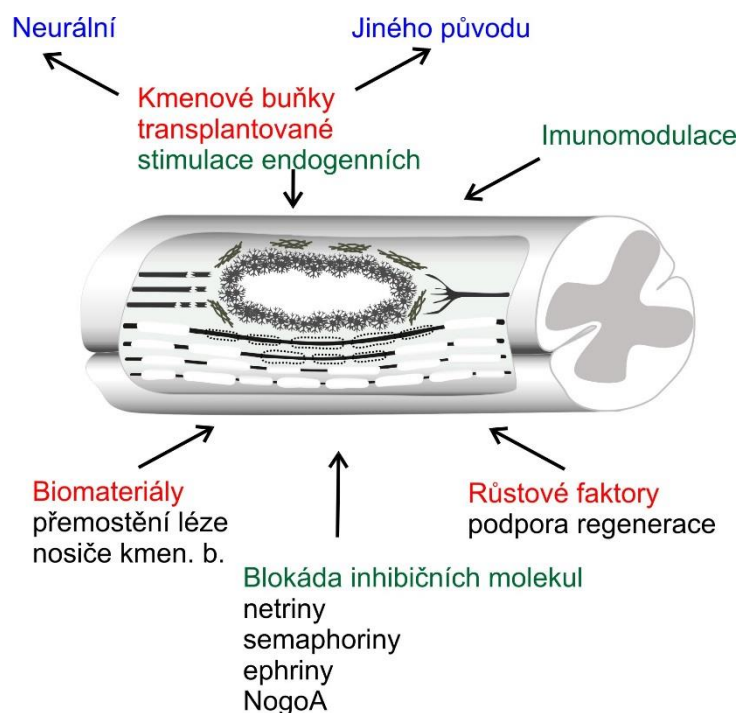
probíhají v míše po úraze s cílem překonat růstové inhibiční molekuly, gliovou jizvu a obnovit ztracené struktury a funkce (Carulli et al., 2010; Zorner and Schwab, 2010). Z tohoto důvodu je třeba přijít s novými léčebnými strategiemi, které vytvoří neuroprotektivní prostředí, pomohou regenerujícím axonům překonat inhibiční molekuly a gliovou jizvu a budou vykazovat protizánětlivý účinek tak, aby poskytovaly účinnou léčbu a zlepšení kvality života pacienta.

## **2.2.Strategie regenerace míšní tkáně**

Nové neuroregenerativní strategie jsou zaměřeny na neuroprotekcii, nahrazování poškozených neuronů a gliových buněk použitím různých typů kmenových buněk nebo jejich progenitorů (Hofstetter et al., 2005), nicméně bez vhodného permissivního prostředí se neuronální regenerace nikdy nepodaří. V budoucnu bude proto léčba míšního poranění zaměřena nejen na zlepšení axonální regenerace (tzv rewiring), ale i na inhibici astroglialní jizvy, blokování syntézy inhibičních proteoglykanů, netrinů, semaforinů a efrinů (Rhodes and Fawcett, 2004; Silver and Miller, 2004; Garcia-Alias et al., 2009; Bavelier et al., 2010), modulaci zánětlivé a imunitní odpovědi (Lu et al., 2013); stimulaci endogenních kmenových buněk (Arnett et al., 2001; Martens et al., 2002), blokování glykoproteinů souvisejících s myelinem a anti-Nogo A-terapií (Schwab, 2004) a to dohromady s výplní kavit a pseudocyst biomateriály sloužícími jako přemostění a nosiče transplantovaných buněk (Hejcl et al., 2010; Kubinova et al., 2013). Z výše jmenovaných přístupů jsem se ve své vědecké kariéře zabývala zejména použitím kmenových buněk a biomateriálů, proto jsou v následujících kapitolách tyto metody rozebrány podrobněji (obr. 5).

## **2.3.Kmenové buňky v léčbě míšního poranění**

Kmenové a progenitorové buňky jsou užitečným nástrojem v regeneraci CNS, zejména pro svoji schopnost ovlivnit prostředí léze. Obecně lze říci, že zvyšují hladiny neurotrofinů, které jsou důležité pro neuroprotekcii i neuroregeneraci. Výsledkem je pak prodlužování axonů, jejich kolaterální pučení (sprouting), formování nových synapsí, remyelinizace a snížení retrogradní degenerace axonů (Ruff et al., 2012).



**Obrázek 5:** Schéma současných strategií regenerace míšního poranění. Strategie podrobněji popsané v této práci jsou označeny červeně.

Slibným zdrojem diferencovaných oligodendrocytů a motoneuronů mohou být **embryonální kmenové buňky** (Nistor et al., 2005; Lee et al., 2007), které tak mohou být použity k léčbě neurologických poruch a traumat, včetně MP. Bylo prokázáno, že oligodendrocyty jsou vysoce citlivé na faktory existující v zanícené tkáni a podléhají buněčné smrti. Transplantace oligodendrocytárních prekurzorů, derivovaných z lidských ES může obnovit ztrátu neurologických funkcí, vyvolanou ztrátou myelinizujících buněk (Nistor et al., 2005). Nicméně pro využití ES v klinických aplikacích je důležité vytvořit in vitro čisté a definované populace nervových buněk. Řada studií se zaměřuje na vylepšení diferenciačních protokolů do neurálních prekurzorů vhodných pro transplantaci do MP, například vitronektin v kombinaci s kyselinou retinovou, Sonic hedgehog, Noggin nebo SB431542 (inhibitor SMAD signální dráhy) podporuje diferenciaci oligodendrocytů z ES (Gil et al., 2009), přičemž v kombinaci s inzulínem brání apoptóze prekurzorů derivovaných z kmenových buněk (Zhao et al., 2007). Jiným vhodným způsobem diferenciace je využití stadia rozet, což jsou neuroektodermové struktury diferencující do nervových buněk, které jsou schopné si udržet široký diferenciační potenciál i po dlouhodobém růstu in vitro (Elkabetz et al., 2008; Koch et al., 2009). Kromě toho existují protokoly derivující z ES přímo neurální prekurzory, které mohou dát vzniknout specifickým typům neuronů podle daných oblastí mozku. Tato schopnost specifické diferenciace podle různých CNS regionů je výborná vlastnost, kterou naopak nedisponují neurální kmenové buňky izolované z nervové tkáně (NSC). Transplantace NSC do

míšní léze nevede přímo k myelinizaci, ale má neuroprotektivní efekt vyvolaný imunomodulačním (Pluchino et al., 2005), nebo supresivním účinkem na T-buňky (Einstein et al., 2007; Aharonowiz et al., 2008).

Mobilizace endogenních **neurálních kmenových buněk** nebo jejich transplantace může být alternativní strategií pro léčbu MP. Nervové kmenové buňky jsou multipotentní buňky s potenciálem diferencovat do neuronů, astrocytů a oligodendrocytů, a mohou být účinně expandovány in vitro (Cattaneo and McKay, 1990; Hsu et al., 2007). Tyto buňky mohou být získané z míchy, ale jejich charakteristické znaky jsou odlišné od NSC získaných z mozku (Barnabe-Heider and Frisen, 2008). V dospělém CNS je tkáň sousedící s laterálními komorami a ependymální buňky přímo lemující laterální komory bohatým zdrojem multipotentních NSC (Johansson et al., 1999). Podobně proliferací buněk v centrálním ependymálním kanálu míchy vznikají nové progenitorové buňky, které jsou schopny diferencovat v neurální fenotyp (Thuret et al., 2006). Po poranění míchy se ependymální kmenové buňky aktivují a prolifерují; v místě poranění během 1 měsíce po poranění vznikne téměř 2 miliony nových prekurzorových buněk (Moreno-Manzano et al., 2009) přehled viz (Bambakidis et al., 2008). Nicméně tato aktivace není dostatečná, aby sama o sobě vedla k obnově funkcí, jelikož většina progenitorových buněk migruje do léze a přispívá k tvorbě gliové jizvy (Barnabe-Heider and Frisen, 2008). Tyto buňky jsou GFAP negativní a Sox9 a vimentin pozitivní, s morfologií podobnou astrocytům (Meletis et al., 2008). Menší část buněčné populace vykazuje Olig2, což je marker nezralých oligodendrocytů. Hlavní nevýhodou NSC je jejich omezená možnost expanze v in vitro podmínkách. Dlouhou kultivací klesá diferenciační potenciál NSC (Wright et al., 2006), navíc diferencovat NSC v čistou populaci neuronů se dosud nepodařilo (Coutts and Keirstead, 2008). V transplantačních studiích nejčastěji NSC diferencují do astrocytů, výjimečně do oligodendrocytů. Jednou z možností, jak tento problém překonat je genetická manipulace NSC tak, aby buňky více exprimovaly geny řídící a ovlivňující diferenciaci do motoneuronů, jako jsou NGN2, Nkx6.1 nebo HB9. Druhou možností, jak získat větší počet NSC, jsou immortalizované linie derivované z lidské fetální nervové tkáně (Pollock et al., 2006; Cocks et al., 2013).

Stále více přibývá experimentálních, preklinických i klinických studií využívajících v regeneraci míšni i mozkové tkáně kmenové buňky, které nemají neurální původ. Nejčastěji se jedná o **buňky kostní dřeně, pupečnickové krve** nebo **mezenchymové kmenové buňky** izolované **z kostní dřeně** nebo **tukové tkáně**. Studie publikované na konci minulého století optimisticky poukazovaly na možnost transdiferenciace těchto multipotentních buněk do

neurálního fenotypu (Sanchez-Ramos et al., 2000), tyto práce byly většinou založeny na expresi neurálních markerů, jako NeuN,  $\beta$ -III tubulin, ale chyběly v nich elektrofyziologické experimenty prokazující schopnost těchto buněk generovat akční potenciál, průkaz iontových kanálů reagujících na neurotransmittery a jejich blokátory atd. V dnešní době se nepředpokládá, že by hlavní efekt těchto buněk byl v jejich diferenciačním potenciálu, přesto u experimentálních zvířat dochází k výraznému zlepšení neurologického deficitu způsobeného míšni lézí. Tento efekt je dán zejména parakrinním působením transplantovaných buněk, které samy vylučují celou řadu látek nebo ovlivňují produkci růstových faktorů endogenních buněk. Například MSC vylučují hned několik růstových faktorů jako je z mozku derivovaný nervový faktor (BDNF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), nervový růstový faktor (NGF), z glií derivovaný nervový faktor (GDNF) a inzulinu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), které hrají klíčovou roli při ochraně neuronů (Li et al., 2002; Zhang et al., 2004; Rice and Scolding, 2008; Lattanzi et al., 2011; Zhou et al., 2013). Po transplantaci jsou MSC schopné zprostředkovat přímou neuroprotekcí snížením neuronální citlivosti k ligandům glutamátových receptorů a změnou exprese genů, což naznačuje souvislost mezi terapeutickým účinkem MSC a aktivací buněčné plasticity v poškozeném CNS (Vercelli et al., 2008). Že se jedná o solubilní faktory naznačily in vitro a in vivo experimenty s kondiciovaným médiem z MSC kultur, které ukázaly, že sekrety z MSC podporují růst axonů a mají neuroprotektivní efekt (Uccelli et al., 2011; Muto et al., 2012). S aplikací MSC je spojen i protizánětlivý účinek, způsobený upregulací protizánětlivého faktoru TGF- $\beta$ 1, který pak může převládnout nad zvýšenými prozánětlivými chemokiny/cytokiny, jako jsou IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$  (Neuhuber et al., 2005; Kim and Im, 2009; Silva et al., 2013). Migrační schopnost transplantovaných MSC a jejich následný záchyt (homing) do poraněných tkání závisí také na stavu lokálního i systémového zánětu a je kontrolován širokou škálou receptorů, tyrosin kinázou, růstovými faktory a chemokiny (Gnecchi et al., 2006). Řada studií prokázala schopnost MSC snížit oxidační stres a dokonce vylučovat superoxididismutázu (Wright et al., 2011; Hawryluk et al., 2012; Chang et al., 2013). Transplantace MSC 3 dny po indukci míšni léze změnila zánětlivé prostředí přeměnou makrofágů z fenotypu M1 (prozánětlivé) na M2 (protizánětlivé), což vedlo k zachování více axonů i myelinu (Zhukareva et al., 2010).

Jiným, nedávno popsáním mechanismem působení MSC v buněčných terapiích je tvorba mikrováček (MV), které vzniknou v buňce a jsou pak uvolněny do extracelulárního prostoru. MV obsahují velké množství biologicky aktivních molekul, lipidů, proteinů, receptorů pro růstové faktory, messenger a mikro RNA atd. (Kemp et al., 2010; Chen et al., 2011; Whone

et al., 2012). Bylo prokázáno, že terapeutický efekt léčby mozkové příhody pomocí MSC je zprostředkován miRNA vylučovanou z MSC do MV, které jsou přeneseny do okolních nervových buněk (neuronů a astrocytů), což u nich vede k změně genové exprese s následnou remodelací neuritů, změně plasticity mozku a tím i ke zlepšení neurologických funkcí (Nakajima et al., 2012).

MSC navíc vykazují imunopresivní účinky snížením proliferace a diferenciace B lymfocytů, zvyšují expresi anti-apoptických proteinů a inhibují proliferaci cytotoxických T-buněk a NK buněk (Le Blanc, 2003; Aggarwal and Pittenger, 2005; Wang et al., 2012). Maggini et al. ukázali, že MSC produkují prostaglandin E2 v takovém množství, že mohou inhibovat produkci TNF $\alpha$  a IL6 aktivovanými makrofágy a ovlivnit schopnost makrofágů aktivovat antigen specifické T CD4<sup>+</sup> lymfocyty (Maggini et al., 2010). MSC rovněž produkují indolamin 2,3-dioxygenázu a prostaglandin E2 navozující inhibici NK buněk.

**Schwannovy buňky (SC)** jsou důležité pro regeneraci periferních nervů. Produkují růstové faktory, které podporují axonální růst (Bandtlow et al., 1987; Acheson et al., 1991; Rende et al., 1992; Oudega and Xu, 2006), podílejí se na ostraňování zbytků myelinu a axonálního debris v místě poškození (Stoll et al., 1989; Fernandez-Valle et al., 1995), navádí regenerující axony a následně je remyelinizují. Všechny tyto vlastnosti vedly k představě, že Schwannovy buňky budou vhodným kandidátem i v regeneraci CNS. Buhužel se ukázalo, že astrocyty v kontaktu se Schwannovými buňkami hypertrofují a izolují je do lokálních ostrůvků. Navíc SC produkují heparansulfát proteoglykany, které zvyšují expresi inhibičních proteoglykan sulfátů v astrocytech, což negativně ovlivňuje regeneraci neurální tkáně. Proto se v současné době studuje možnost geneticky manipulovat SC tak, aby se zabránila produkce heparan proteoglykan sulfátů. Dosud bylo provedeno relativně velmi málo pokusů s lidskými SC, rovněž není jasné, jak je třeba regenerující axony stimulovat k výstupu z prostředí materiálu překlenujícího lézi a obsahujícího SC zpět do míchy příjemce.

**Buňky olfaktorické glie (OEG)** jsou přítomny v nosní sliznici a v olfaktorickém bulbu a za fyziologických podmínek vytváří snopce, kterými axony čichových neuronů prorůstají z periferního nervového systému do CNS (Doucette, 1991). Jsou i jimi myelinizovány. Průměrná doba života čichového neuronu je 6-8 týdnů a pak je nahrazen nově vznikajícími a diferencujícími se neuroblasty, migrujícími z oblasti subventrikulární zóny. OEG spolupůsobí při neurogenезi čichových neuronů svým snopcovým uspořádáním a produkcí růstových faktorů. Navíc jsou schopné fagocytovat bakterie a axonální debris. Proto se o OEG uvažuje

jako o významných kandidátech pro regeneraci míšní tkáně (King-Robson, 2011). OEG, podobně jako SC, vylučují řadu růstových faktorů (BDNF, GDNF, Neurotrophin3,4,5, a NGF), ale mnohem lépe se prolínají s astrocyty a nestimulují jejich aktivaci a hypertrofii (Lakatos et al., 2000; Santos-Silva et al., 2007); navíc je lze použít v autologních transplantacích. (Mackay-Sim et al., 2008). Hlavními mechanismy regenerace axonů pomocí OEG je produkce růstových faktorů a jejich schopnost obalovat rostoucí axony, což vede k jejich izolaci od nepermissivního prostředí aktivovaných astrocytů.

## 2.4. Biomateriály v léčbě míšního poranění

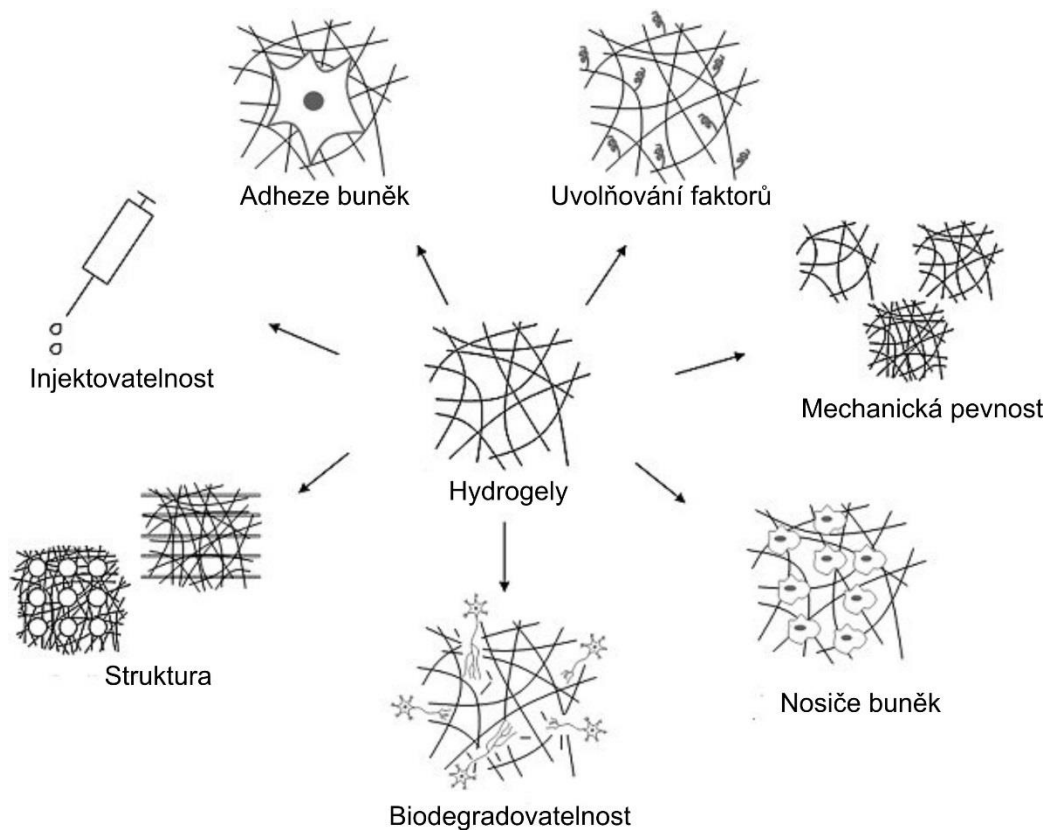
Samotné buňky na tak komplexní děj, jako je míšní poranění nebo iktus nestačí. Proto je třeba zkombinovat jejich působení s novými biomateriály, které se dají použít jako materiály k výplni kavit nebo nosiče kmenových buněk, a mohou se tak podílet na rekonstrukci poškozených tkání. Celé vědecké skupiny se snaží optimalizovat mechanické vlastnosti, adhezivitu buněk, biodegradabilitu, a topografii syntetických i přírodních materiálů a vyvinout nové přístupy jak pomocí těchto matric doručit buňky a biomateriály do místa léze (obr. 6). Implantáty pro nervovou tkáň musí být velmi měkké s nízkými hodnotami Youngova modulu. Vhodná **mechanická pevnost** (tuhost) materiálu je rozhodující pro úspěšnou integraci implantátu do okolní tkáně, a ovlivňuje i buněčné funkce. V případě materiálů, které jsou příliš tuhé, kontakt s měkkou tkání míchy může způsobit kompresi regenerujících axonů, a tvorbu cyst mezi implantátem a okolní tkání míchy, neboť příliš tuhý implantát se nemůže správně přizpůsobit tvaru léze (Chen et al., 2011; Kubinova et al., 2011). Závislost chování buněk na tuhosti podkladu bylo prokázáno v několika in vitro studiích (Engler et al., 2006; Leach et al., 2007), ale optimální mechanické vlastnosti materiálu, které by byly nastaveny podle výsledků získaných z in vivo transplantací biomateriálů do míchy, dosud nebyly definovány. Bakshi et al. uvádí, že poly (2-hydroxyetyl-methakrylát) (HEMA) matrice s modulem komprese 3-4 kPa odpovídá míšní tkáni (Bakshi et al., 2004). Chen et al. srovnává regenerační schopnosti čtyř biologicky odbouratelných vícekanálových matric s různými mechanickými vlastnostmi, které byly oseté Schwannovými buňkami a implantované do přetřáté míchy (Chen et al., 2011). Ve srovnání s poly e-kaprolakton fumarátovým materiálem, který měl výrazně vyšší hodnoty kompresního modulu, vykazaly tyto matrice tvorbu výrazně menších kavit. Implantované HEMA hydrogely s modulem pružnosti mezi 10 a 19 kPa se dobře integrovaly do okolní míšní tkáně a podporovaly vaskularizaci materiálu a infiltraci Schwannovými buňkami (Kubinova et al., 2011).

Implantovaný materiál musí být biokompatibilní, aby nedocházelo k indukci reakce proti cizímu tělesu. **Biokompatibilita** je jev závislý na vlastnostech povrchu materiálu a jeho interakcemi s buňkami nebo proteiny (Fournier et al., 2003). Nespecifická zánětlivá reakce příjemce je reakcí tkáně k cizorodému materiálu a její rozsah určuje míru biokompatibility implantátu. Chronická zánětlivá reakce, která je charakterizována vznikem fibrózní jizvy a reakcí proti cizímu tělesu, je samozřejmě nežádoucí, neboť blokuje regeneraci tkáně (Jones, 2008). Na druhé straně, akutní odpověď imunitního systému, která je zprostředkována makrofágy nebo dendritickými buňkami, může být neuroprotektivní a může podporovat regeneraci CNS. Modulace zánětlivé reakce podle typu povrchu biomateriálu tedy může být pomocným nástrojem pro reparační mechanismy tkáně (Gal et al., 2009).

**Fyzikální vlastnosti** biomateriálů by se měly co nejvíce blížit extracelulárnímu prostředí centrálního nervového systému a umožnit tak difúzi neurotrofních faktorů. Interakce mezi povrchem polymeru a živou tkání jsou obvykle zprostředkovány vrstvou proteinů, proto dnešní moderní biomateriály mají povrchy optimalizované bioaktivními molekulami nebo oligopeptidickými sekvencemi (Kubinova et al., 2010) tak, aby podporovala adhezi pouze určitých typů buněk (například axonů). Často jsou diskutovány výhody a nevýhody přírodních a syntetických materiálů, degradovatelných i nedegradovatelných materiálů, v současné době jsou intenzivně zkoumány všechny skupiny materiálů.

**Biodegradovatelné materiály** jsou o něco preferovanějšími před nedegradovatelnými, neboť zde není riziko opožděného odhojení nebo chronického utlačování nervové tkáně. Nejčastěji využívanými degradačními mechanismy jsou hydrolýza a enzymatické štěpení. Rychlost degradace lze regulovat různými faktory, jako například molekulární vahou a strukturou polymérů, síťováním, využitím ko-polymérů (Gopferich, 1996). Samozřejmě, že degradační produkty nesní vykazovat žádnou imunitní reakci a rychlost rozpadu materiálu musí být přiměřená tvorbě nové tkáně. Materiály vhodné pro reparaci nervové tkáně degradují většinou týdny až měsíce, podle toho jak rychle vrůstají do matrice axony a cévy, což je proces, který začíná týden po poranění, ale může trvat až měsíce. Degradace může probíhat postupným štěpením (erozí) povrchu materiálu při zachování struktury materiálu, nebo postupným zborcením struktur materiálu. První způsob je výhodnější, neboť při kolapsu materiálu může dojít k zastavení vrůstání tkáňových elementů a zastavení procesu regenerace.





**Obrázek 6:** Schéma vlastností hydrogelu vhodného pro regeneraci míšního poranění. (Upraveno podle (Straley et al., 2010))

**Nedegradovatelné materiály** nesmí být imunogenní a musí mít stabilní fyzikální i chemické vlastnosti. V současné době je zajímavým směrem výzkumu elektricky aktivní vodivý materiál, schopný generovat elektrické pulsy a stimulovat tak nervovou aktivitu (Nomura et al., 2006; Straley et al., 2010).

Mezi **přírodní materiály** patří například kolagen, alginátový hydrogel, metylcelulóza nebo materiály na bázi kyseliny hyaluronové. Většina z nich je biodegradovatelná (Madigan et al., 2009). Nevýhodou bývá jejich přirozená variabilita a riziko imunogenicity. Implantace mrazem sušeného alginátu do posttransekční kavity novorozenců či mladých laboratorních potkanů stimulovalo nejen vrůstání velkého počtu nemyelinizovaných a myelinizovaných vláken do hydrogelu (Suzuki et al., 1999; Kataoka et al., 2001), ale i tvorbu funkčních spojení přes kavitu, tj. synaptické spoje s neurony byly nalezeny i distálně od kavity (Suzuki et al., 2002).

Výhoda **syntetických biomateriálů** je v možnosti důsledné kontroly procesu výroby a přesného nastavení jejich vlastností, tak jako jejich produkce ve velkém množství. Nejčastěji používané syntetické biomateriály jsou na bázi polyetylenglykolu (PEG), metakrylátu (polyhydroxyethylmetakrylátu (HEMA)), (Tsai et al., 2004; Hejcl et al., 2008; Kubinova et al.,

2011), polyhydroxypropylmetakrylamidu (HPMA), (Hejcl et al., 2008; Woerly et al., 2008) anebo kopolyméru polyakrylonitrilu a polyvinylchloridu (PAN/PVC) (Xu et al., 1995). Syntetické materiály bývají pro buňky nonadhezivní a proto se připravují hybridní materiály s biologicky aktivními látkami (Tsai et al., 2006; Silva et al., 2010), aby se zvýšila atraktivita těchto materiálů pro vrůstání buněk příjemce.

Důležitá je **velikost pórů**, která ovlivňuje mechanické vlastnosti, stabilitu, revaskularizaci implantátu, difúzi nutričních látek, adhezi buněk i regeneraci axonů. Zvláštní pozornost je soustředěná na přípravu matic s orientovanými póry, které mají simulovat strukturu míšních drah a navádět axony přes místo poranění. Byla vytvořena i polymerní matrice z PLGA, která měla uvnitř neorientované póry, ale zvenku byly póry orientované tak, aby se implantát co nejvíce podobal struktuře bílé a šedé hmoty v míše (Teng et al., 2002). Nejčastěji bývají polymerní matrice s orientovanými póry oseté Schwannovými buňkami, které jsou často zalité do fibrinu nebo matrigelu, neboť velké póry nejsou pro osazení buňkami příliš vhodné. Při srovnávacích studiích se ukázalo, že matrice s průměrem kanálů 450  $\mu\text{m}$  jsou více prorostlé axony než matrice o velikosti kanálů 660  $\mu\text{m}$  (Krych et al., 2009), které vykazovaly velký fibrózní lem.

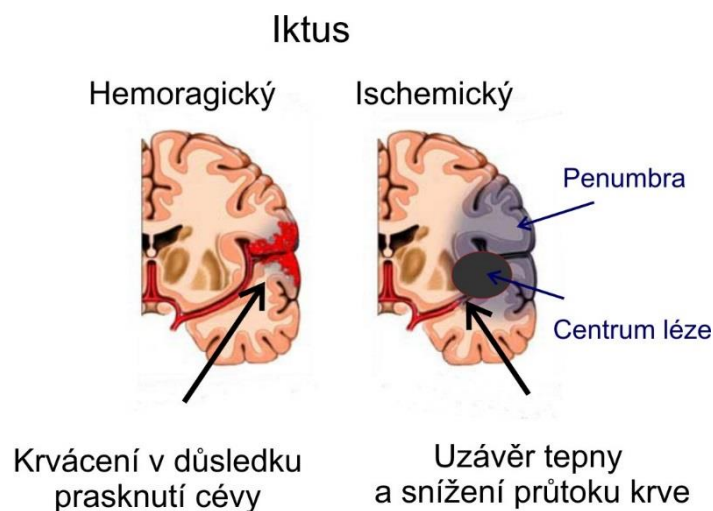
**Adheze buněk** na polymér je klíčová vlastnost pro úspěšný vznik polymerního konstruktu i pro začlenění implantátu do tkáně (Tysseling-Mattiace et al., 2008). Adheze buněk je založena na vazbě transmembránového integrinového receptoru na určitou část molekuly extracelulární matrix, jako je laminin, kolagen nebo fibronectin. Faktory, které buněčnou adhezi ovlivňují, závisí na chemickém složení, povrchovém náboji, drsnosti povrchu a jeho topografii, nebo například rovnováze mezi hydrofilními a hydrofóbními mikrodomény (Kubinova et al., 2009). Jelikož syntetické biomateriály nemají přirozená vazebná místa, je třeba jejich povrch modifikovat bioaktivními látkami. Nejčastěji se používá imobilizace peptidů (RGD-odvozených od fibronectinu, nebo YIGRS či IKVAV odvozených od lamininu (Gunn et al., 2005), představujících aktivní vazebná místa molekul extracelulární matrix na povrch polymeru.

I když samotné biomateriály mohou ovlivnit regeneraci nervové tkáně potlačením tvorby gliové jizvy, či vytvořením prostoru pro růst buněk přes lézi, stále více je jasné, že **kombinovaná terapie** má synergický efekt a přináší lepší výsledky. Nejčastěji jsou biomateriály kombinovány s různými typy buněk, nebo s enzymy štěpícími proteoglykany v gliové jizvě, jako je třeba ABC chondroitináza. Nejčastěji používanými buňkami jsou mesenchymové kmenové buňky, Schwannovy buňky, neurální kmenové nebo progenitorové buňky, které mohou exprimovat noggin, podporující neurogenezi a potlačující gliogenezi

(Enzmann et al., 2005). Byly provedeny i experimenty využívající neurální progenitorové buňky připravené z lidských ES v kombinaci s kolagenovou maticí (Hatami et al., 2009). Biomateriály mohou rovněž sloužit k uvolňování biologicky aktivní látky, která pak může vytvořit gradient, podporující růst buněk do implantátu. Těmito biologicky aktivními látkami mohou být růstové faktory, cytokiny, neurotrofiny (NT3, NGF, BDNF, GDNF), neurotransmittery a protilátky proti inhibitorům růstu axonů (Musoke-Zawedde and Shiocher, 2006; Dodla and Bellamkonda, 2008; Nisbet et al., 2008; Wei et al., 2010). Biomateriály byly rovněž oseté geneticky modifikovanými NSC uvolňujícími NT3 a to ještě v kombinaci s ABC chondroitinázou. Tato kombinovaná terapie vedla ke zvýšené remyelinizaci hemisektované míchy, lepšímu přežívání buněk a větší diferenciaci NSC do neuronů a oligodendrocytů než v případě nemodifikovaných NSC. Výsledkem těchto změn byla obnova motorických evokovaných potenciálů v ipsilaterální končetině a zmírnění funkčního deficitu vyvolaného míšní hemisekcí (Hwang et al., 2011). Rekonstrukce míšní tkáně po delším časovém odstupu (chronická léze) však zůstává stále výzvou, neboť to je hlavní cílová skupina pacientů s míšním poraněním. Bohužel výsledky zatím nejsou příliš přesvědčivé. Částečného zlepšení neurologických funkcí bylo dosaženo v modelu „clip contusion“ spolupůsobením několika faktorů, jako například rozrušením gliové jizvy chondroitinázou a následnou transplantací NSC v kombinaci s infúzí růstových faktorů (Karimi-Abdolrezaee et al., 2010).

### **3. Cévní mozková příhoda**

**Cévní mozková příhoda (CMP), iktus**, je náhle se rozvíjející postižení určitého okrsku mozkové tkáně vzniklé poruchou jejího prokrvení. K této poruše může dojít buď na podkladě uzávěru mozkové tepny (tzv. ischemická CMP), nebo na podkladě krvácení z mozkové cévy (tzv. hemoragická CMP; obr. 7). Během ischémie dochází k omezení nebo zastavení přívodu krve a tudíž i kyslíku v určité oblasti mozku, zatímco hemoragické příhody jsou následkem krvácení do mozku, většinou v důsledku vysokého krevního tlaku nebo nějaké cévní abnormality v mozku. Krvácení do mozku představuje jen asi 12% cévních mozkových příhod a lze jej rozdělit na intracerebrální (9%) a subarachnoidální (3%).



**Obrázek 7:** Schématické znázornění iktu. Cílem buněčné terapie je zachránit co největší oblast penumbry.

### 3.1. Ischemická příhoda

Ischemické příhody lze obecně rozdělit na trombotické a embolické. **Trombózy** velkých tepen bývají způsobeny aterosklerózou velkých cév, včetně vnitřní karotidy, vertebrální tepny, bazilární tepny, a dalších významných větví Willisova okruhu. K trombózám malých cév dochází zejména v důsledku chronických onemocnění, jako je cukrovka, hypertenze, hyperlipidémie a kouření, které vedou k zúžení a okluzi profilu menších cév. Nejčastější příčinou **embolických mozkových příhod** jsou emboly uvolněné při fibrilaci síní, ale mohou vzniknout kdekoli v těle a oběhovým systémem se dostat do mozku. Dále mohou být příčinou iktu dědičná onemocnění, metabolické poruchy, a koagulopatie. Existují však i mozkové příhody, které nemají žádnou z výše uvedených příčin.

### 3.2. Patofyziologie ischemické příhody

V centru cévní mozkové příhody je průtok krve tak drasticky snížený, že buňky obvykle nelze zachránit a dochází u nich k buněčné smrti. Tkáň v oblasti sousedící s jádrem infarktu, tzv. penumbra, jsou postiženy méně. Tato oblast je charakterizovaná sníženým průtokem krve, ale zůstává metabolicky aktivní. Buňky v této oblasti jsou ohroženy, ale ještě nejsou nevratně poškozeny. Po několika hodinách nebo dnech mohou podstoupit apoptózu, ale pokud je průtok krve a přísun kyslíku obnoven krátce po začátku CMP, je možné tuto oblast zachránit (obr. 7).

V centru léze jsou nervové buňky bez dostatečného prokrvení a tím i nedostatku kyslíku a ztrácejí schopnost produkovat energii - zejména adenosintrifosfát (ATP). Buňky v zasažené

oblasti přecházejí na anaerobní metabolismus, což vede k menší produkci ATP, ale i k produkci kyseliny mléčné, která poškozuje buňky narušením normální acidobazické rovnováhy v mozku. Iontové pumpy závisující na ATP, například  $\text{Na}^+\text{K}^+$  ATPáza, udržující membránový gradient selhávají a do buněk proudí  $\text{Na}^+$  a uniká  $\text{K}^+$ , dochází k depolarizaci membrány a přílivu  $\text{Ca}^{2+}$  do buněk. Vysoká intracelulární koncentrace vápníku vede k uvolňování excitačního neurotransmiteru glutamátu. Glutamát stimuluje AMPA receptory a pro  $\text{Ca}^{2+}$  propustné NMDA receptory, což vede k ještě většímu přísunu vápníku do buňky. Nadbytek vápníku v buňce má za následek aktivaci proteáz, lipáz, a vznik volných radikálů v procesu zvaném excitotoxicita. Jelikož je buněčná membrána poškozená fosfolipázami, stává se propustnější a více iontů a škodlivých látek může vstoupit do buňky. Dochází k poškození mitochondrií a k uvolnění dalších toxinů a apoptotických faktorů do buňky, která podstupuje apoptózu. Pokud buňka nekrotizuje, uvolní glutamát a toxické chemické látky do svého okolí. Zvýšené hladiny glutamátu působí excitotoxicky na okolní buňky a poškození se šíří. Ztráta integrity cévní struktury má za následek porušení ochranné hematoencefalické bariéry, a přispívá k otoku mozku, který může způsobit sekundární progresi poranění mozku.

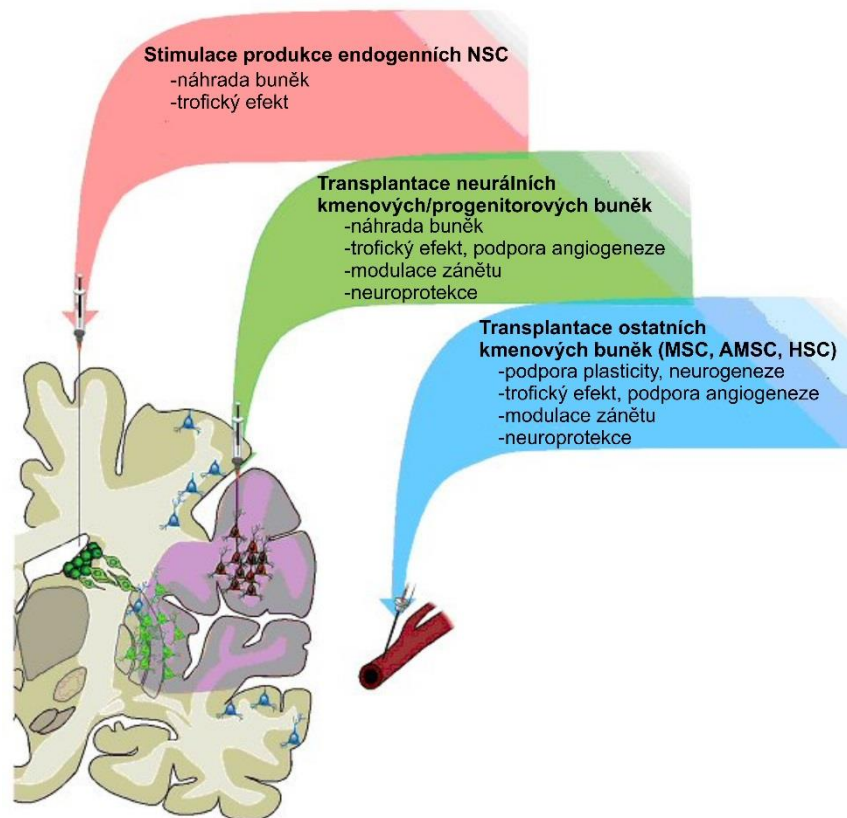
### **3.3. Patofyziologie hemoragické příhody**

Hemoragické ikty vedou v důsledku prasknutí cévy ke stlačení mozkové tkáně z rozšiřujícího se hematomu. To může narušit a poškodit tkáň. Navíc, tlak může vést ke ztrátě dodávky krve do postižené tkáně, což vede k infarktu, a krev unikající do mozku má pravděpodobně přímý toxický účinek na mozkové tkáně a cévní řečiště. Mozkové krvácení vzniká v důsledku prasknutí cévy a hromadění krve v mozku. To nastane obvykle důsledkem poškození cév díky chronické hypertenzi, cévních malformací, nebo použitím léků spojených s možným rizikem zvýšeného krvácení, jako jsou antikoagulanty, trombololytika a inhibitory agregace trombocytů. Subarachnoidální krvácení je postupné hromadění krve v subarachnoidálním prostoru pod durou, obvykle způsobené traumatem hlavy nebo prasknutím mozkového aneurysmatu.

### **3.4. Buněčná terapie v léčbě ikty**

Podobně jako v případě poranění míchy existuje celá řada studií zabývajících se transplantací kmenových buněk do oblasti penumbry. Jakými mechanismy se mohou kmenové buňky podílet na regeneraci nervové tkáně? Existují důkazy, že neurony, diferencované z transplantovaných neurálních kmenových buněk, se mohou částečně integrovat do poškozené

tkáň a přispívat tak k zlepšení jednoduchých senzomotorických funkcí (Hicks et al., 2009). K náhradě chybějících populací buněk lze využít nerální progenitorové buňky derivované z ES, z iPS a neurálních kmenových buněk. Pluripotentní buňky však představují riziko tumorů, což lze snížit genetickou modifikací buněk se zavedením tzv. sebevražedného genu (Schuldiner et al., 2003; Kiuru et al., 2009). Existují však i jiné mechanismy (obr. 8), kterými mohou kmenové buňky přispívat k regeneraci nervové tkáň.



**Obrázek 8:** Možnosti uplatnění buněčné terapie v léčbě iktu (upraveno podle (Lindvall and Kokaia, 2011))

Iktus u hlodavců vede ke zvýšené proliferaci NSC v subventrikulární zóně (SVZ) a tvorbě neuroblastů, které migrují do oblasti poškozeného striata po dobu několika měsíců, diferencují do zralých neuronů (Arvidsson et al., 2002; Parent et al., 2002; Thored et al., 2006), z části se integrují (Yamashita et al., 2006) a jsou pravděpodobně i funkční (Hou et al., 2008). Tato neurogeneze probíhá i ve starším věku (Darsalia et al., 2005). Neurogeneze navozená iktem byla popsána i u lidí (Jin et al., 2006; Macas et al., 2006; Marti-Fabregas et al., 2010). Dosud však není zcela jasné, jak tato zvýšená neurogeneze přispívá ke zlepšení neurologických funkcí. Předpokládá se, že zde bude hrát roli i trofický efekt, neboť ke zlepšení dochází dříve než k začlenění nových neuroblast do stávajících struktur. Aby neurogeneze byla

z terapeutického hlediska hodnotná, je potřeba zvýšit přežití nově vznikajících neuronů (Arvidsson et al., 2002). Toho lze dosáhnout modulací zánětlivé reakce, která může stimulovat neurogenezi (Ekdahl et al., 2009) nebo podáním růstových faktorů GDNF (Kobayashi et al., 2006) nebo G-CSF (Schneider et al., 2005). Migraci nových neuroblastů lze rovněž podpořit lokálním zvýšením aktivních molekul, které řídí migraci. Také transplantace NSC zvyšuje endogenní neurogenezi v mozku příjemce (Jin et al., 2011). Existuje tudíž stále více důkazů, že NSC vyvolávají funkční zlepšení i jinými mechanismy, než je náhrada neuronů (obr. 8), (Ramos-Cabrer et al., 2010) Intravenózní injekce lidských NSC vyvolala zlepšení po hemoragickém iktu u potkanů pravděpodobně svými protizánětlivými účinky (Lee et al., 2008). Zvýšená exprese VEGF a antiapoptického faktoru Akt1 lidskými NSC podpořila angiogenezi a zvýšila míru přežití buněk, doprovázenou zlepšením neurologických funkcí myši s modelem iktu (Lee et al., 2007; Lee et al., 2009). Fetální NSC implantované do korové léze 1 týden po CMP u potkanů zlepšily motoriku předních tlapek již po 1 týdnu (Horie et al., 2011). Mechanismem účinku byla pravděpodobně rovněž sekrece VEGF neurálními kmenovými buňkami, která potlačila zánět a podpořila neovaskularizaci v oblasti penumbry. Konečně, myši NSCs podané intravenózně 3 dny po iktu potlačily zánět a tvorbu gliové jizvy, vykazovaly neuroprotektivní účinek a zlepšení funkčního deficitu nastalo 18 dní po indukci léze (Bacigaluppi et al., 2009). (Zhang and Chopp, 2009; Kernie and Parent, 2010).

Obnova funkčního deficitu po iktu byla popsána i po použití různých typů kmenových buněk, které nemají neurální původ, jako jsou **buňky pupečnickové krve, hematopoetické kmenové buňky z kostní dřeně a mesenchymální stromální buňky**. Nebylo prokázáno, že by tyto buňky diferencovaly do neuronů a mohly tak nahradit poškozené neurony. Intravenózně podané MSC zmírnily funkční deficit potkanů s iktem zejména díky navození angiogeneze a zlepšení krevního průtoku (Onda et al., 2008). Neuroprotektce a zlepšení neurologických funkcí bylo ještě výraznější, pokud MSC exprimovaly angiopoetin nebo VEGF. Intravenózní podání lidských MSC rovněž zvyšuje proliferaci neurálních progenitorů v SVZ a podporuje neurogenezi GDNF (Nomura et al., 2005; Horita et al., 2006; Liu et al., 2006; Onda et al., 2008; Toyama et al., 2009). Kromě toho dochází ke zvýšení hladiny protizánětlivého cytokinu IL10 (Li et al., 2010), and neurotrofických faktorů (Wakabayashi et al., 2010; Bao et al., 2011). Podobný efekt má podání mesenchymálních stromálních buněk kostní dřeně (rew (Li and Chopp, 2009). MSC z kostní dřeně migrují do poraněného mozku na základě chemotaxe SDF1-CXCR4 (Shen et al., 2007). Tyto buňky rovněž podporují endogenní regeneraci zvýšením angiogeneze (Chen et al., 2003; Zacharek et al., 2007), proliferace v SVZ, (Chen et al., 2003;

Shen et al., 2007), přeskupením axonů v oblasti parietálního cortexu (Li et al., 2005) a zvýšením plasticity nervové tkáně v ipsilaterální i kontralaterální hemisféře a v podkorových oblastech (Andrews et al., 2008; Liu et al., 2010). Zajímavé je, že MSC mají pozitivní efekt na zlepšení neurologických funkcí, i když jsou podány 1 měsíc po indukci léze (Shen et al., 2007; Yasuhara et al., 2009) a efekt může přetrvat až jeden rok (Shen et al., 2007).

#### 4. Neinvazivní sledování transplantovaných buněk

Pokroky v buněčné terapii, vedoucí k rozvoji klinických studií, vyžadují zásadní použití neinvazivní techniky pro monitorování účinnosti buněčné terapie a přežití štěpu v hostitelském organismu, s cílem odhalit nebezpečné vedlejší účinky, jako například hyperproliferační nebo migraci do nežádoucích struktur. V případě experimentálních zvířecích modelů je vždy po skončení experimentu provedena histologická analýza transplantované tkáně a navíc experimentální zvířata nepřežívají roky, ale týdny nebo maximálně měsíce. Proto se v posledních letech rozvinuly různé zobrazovací metody, jako například **pozitronová tomografie** (PET), optické zobrazování nebo magnetická rezonance (Modo, 2008). Pro klinickou praxi se nejlépe hodí posledně jmenovaná, neboť PET má horší prostorové rozlišení (Luker and Piwnica-Worms, 2001) a pracuje s radioaktivními sondami, které mají relativně krátký poločas rozpadu, zatímco **optické zobrazování** je velmi citlivou metodou ve studiích využívajících malá laboratorní zvířata, ale díky omezené penetraci vlnových délek emitovaných fluorochromy do tkáně je použitelné pouze v povrchových vrstvách (Mahmood and Weissleder, 2003). **Magnetická rezonance (MR)** má několik výhod: výborné rozlišení (až na 300  $\mu\text{m}$ ), není limitována velikostí pacienta a nepotřebuje radioaktivní sondy. Kontrastní látky v mikromolárních koncentracích mění relaxační časy sousedních protonů vody a zvyšují tak kontrast. Mohou měnit jak kontrast T1 nebo T2 vážených obrazů. Paramagnetické látky mění hlavně T1 obrazy, zatímco superparamagnetické látky ovlivňují zejména T2 vážené obrazy.

##### 4.1. Značení buněk nanočásticemi

Nejčastěji používané superparamagnetické kontrastní látky jsou na bázi **oxidů železa (SPIO)**. Seznam komerčních kontrastních látek zahrnuje ferumoxydy obalené dextranem (Endorem<sup>®</sup>, Feridex), ferucarbotran (Resovist), ferumoxan (Sinerem, Combidex), ferumoxsil (Lumirem, Gastromark). Všechny tyto kontrastní látky byly vyvinuty k zobrazování orgánů, ale



začaly se používat i ke značení buněk (Corot et al., 2006). Liší se hlavně svoji velikostí a povrchem, což ovlivňuje zejména jejich vychytávání do buněk. Podle velikosti jejich obalu, můžeme SPIO nanočástice rozlišit jako standardní SPIO s průměrem mezi 50 až 150 nm, USPIO nanočástice s průměrem méně než ~ 50 nm, nebo mikronové velikosti (MPIO) částic. Většina komerčních látek nemá ideální vlastnosti z hlediska značení buněk, většinou se jedná o malou účinnost značení, případně jejich přítomnost v buňce má negativní efekt na růst nebo diferenciaci buněk. Navíc, kontrastní látky na bázi železa jsou v klinické medicíně nahrazovány látkami na bázi gadolinia a proto pro farmaceutické firmy přestává být ziskové tyto klasické kontrastní látky dodávat na trh. Proto se řada vědeckých skupin pokouší vyvinout nanočástice určené ke značení buněk. Obecně platí, že značení buněk vyžaduje vychytávání nanočástic buňkami. Jiný přístup kombinuje komerční kontrastní látky s transfekčními činidly (Arbab et al., 2003), čímž zvyšuje účinnost značení a zkracuje dobu nezbytnou pro příjem nanočástic do buněk. Nedostatečný příjem nanočástic do buněk může být usnadněn rovněž použitím elektroporace (Gilad et al., 2008), specifickým cílením a endocytózou nanočástic přes receptory transferinu (Bulte et al., 1999) magnetodendrimery (Bulte et al., 2002), nebo transdukčními činidly, jako je TAT protein odvozený od HIV (Kircher et al., 2003). Pro klinické aplikace by ale bylo výhodné použít kontrastní látky, které neobsahují jakékoliv další přísady k usnadnění vychytávání buňkami.

Důležitým faktorem, který ovlivňuje vychytávání částic a tím i účinnost značení je povrchový obal nanočástic (Horák et al., 2009). Ve většině případů je náboj nanočástic (elektrostatické interakce s negativně nabitou buněčnou membránou) hnací silou ovlivňující vstup nanočástic do buňky. Náboj nanočástice také přispívá k adsorpci specifických proteinů z kultivačního média, které mohou zlepšit nebo snížit internalizaci nanočástic do buněk. Internalizace těchto nanomateriálů může probíhat jednou z následujících cest: (i) receptory zprostředkovanou endocytózou (Lewin et al., 2000), (ii) nespecifickou endocytózou (Lu et al., 2007) a (iii) internalizací za podmínek inhibujících endocytózu (Kostarelos et al., 2007). Nanočástice internalizované v endozómech jsou pak přenášeny do kyselého nebo oxidačního prostředí lyzozomů a peroxisomů. V této fázi mají tři možné osudy: (i) degradaci enzymy nebo kyselým pH, (ii) exocytózu, (iii) únik z prostoru endo-lysosomů a přesun do jiných intracelulárních kompartmentů, včetně buněčného jádra. Přes řadu informací získaných v posledních letech, je internalizace a konečný osud intracelulárního umístění nanočástic v kmenových buňkách proces, který stále není plně objasněný. Proto je další důležitou otázkou, kterou je třeba vyhodnotit, účinek internalizovaných nanočástic v biologii kmenových buněk.

Rozhodujícím aspektem je skutečnost, že částice SPIO nesmí být toxické, a nemají nepříznivý vliv na fyziologii buněk, diferenciaci nebo migrační schopnosti buněk in situ.

Ačkoliv je metoda značení buněk pomocí SPIO nanočásticemi široce používána v preklinických studiích využívajících buněčnou terapii, existují některé vedlejší faktory, které mohou vést k nesprávné interpretaci MR signálu a proto vyžadují další analýzu. V mnoha případech může mít hypointenzní signál fyziologický původ, (železo uvolněné z hemoglobinu) nebo patologický původ, (krvácení nebo následek experimentálního traumatického postupu (např. injekce). Dalším možným omezením této techniky je přítomnost fagocytárních buněk, např. makrofágů, v lézi, ve kterých se mohou hromadit nanočástice železa a vést k falešnému MR signálu (Amsalem et al., 2007). Proto musí být v interpretaci signálu MR podíl z transplantovaných magneticky značených buněk jasně definovaný a popsán. Na druhé stranu může být ztráta signálu MRI způsobena biodegradací nanočástic nebo jejich zředěním v důsledku proliferace buněk. Yano et al. ukázal, že 3 měsíce po transplantaci GFP-MSC značenými SPIO nanočásticemi do striata s fokální ischemií, pouze 2,7% GFP-pozitivních buněk zůstalo označeno SPIO nanočásticemi (Yano et al., 2005). Jeden přístup k překonání zředění magnetické značky v důsledku dělení buněk je použití MR reportérových genů, které jsou založeny na enzymatické nebo metabolické produkci kontrastní látky nebo expresi povrchových receptorů zobrazitelných MR (Gilad et al., 2007). Dalším aspektem značení buněk kontrastními látkami je jejich vliv na regenerační potenciál kmenových buněk po transplantaci. Ve studii Guzman et al. značení lidských neurálních kmenových buněk magnetickými nanočásticemi neovlivnilo jejich přežití, migraci nebo dělení a ani neměnilo elektrofyzilogické vlastnosti neuronů (Guzman et al., 2007). Naproti tomu nedávná studie Modo et al. ukázala, že neurální kmenové buňky značené komplexem gadolinium-rhodamin-dextran transplantované po iktu do kontralaterální hemisféry nemigrovaly do oblasti penumbry a ani nijak významně nezlepšily deficit chování ve srovnání s buňkami značenými pouze fluorescenčním barvivem. Naopak, 1 rok po transplantaci došlo k mírnému nárůstu velikosti léze. Tato práce zdůrazňuje nezbytnost dlouhodobých studií, protože většina používaných kontrastních látek nebyla původně určená pro zobrazování buněk (Modo et al., 2009).

Alternativou ke značení buněk ex vivo je systémová SPIO injekce umožňující sledování specifických buněk in situ. SPIO nanočástice jsou preferenčně fagocytózovány monocyty a makrofágy, což je využíváno k vizualizaci zánětlivé reakce po iktu nebo jiných onemocnění centrálního nervového systému (Stoll and Bendszus, 2009). Alternativně, intraventrikulární injekce MPIO částic umožnila sledování migrace endogenních kmenových/progenitorových buněk ze subventrikulární zóny do vyvíjejícího se mozku pomocí MR, a to jak ve zdravé tkáni,

tak ve tkáni poškozené hypoxií (Yang et al., 2009). Kromě in vivo sledování označených buněk, lze SPIO nanočástice využít samostatně nebo konjugované s cílově specifickými ligandy, jako jsou proteiny nebo protilátky, pro selektivní in vivo zobrazování i léčbu nádorů (Islam and Josephson, 2009), nebo pro cílenou genovou terapii (Rad et al., 2009).