

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Peter Hámor**

Cílená diferenciacie mezenchymálních kmenových buněk a jejich využití  
v klinické praxi

Targeted differentiation of mesenchymal stem cells and their clinical  
application

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce: PharmDr. Šárka Kubinová, Ph.D.

Praha, 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 17.5.2013

Podpis

**Podakovanie:**

Na tomto mieste by som chcel podakovať predovšetkým svojej vedúcej PharmDr. Šárke Kubinovej, Ph.D. za trpezlivosť a všetku poskytnutú pomoc a možnosti. Taktiež hlavne svojim rodičom a starým rodičom za veľkú podporu vo všetkých smeroch a Pavlovi Tallovi a priateľom za dôveru aj pomoc nielen pri písaní tejto práce.

## **ABSTRAKT**

Cieľom tejto práce je úvod do možností neurálnej diferenciácie mezenchymálnych kmeňových buniek a ich využítí v klinickej praxi zameranej na opravu a regeneráciu tkanív centrálnej nervovej sústavy. Keďže táto sústava predstavuje riadiace centrum funkčných vlastností celého tela a liečba zranení a degenerácií často prináša mnoho problémov a prekážok, je možnosť využitia vlastných buniek ako transplantátu alebo podpory prirodzených regeneračných vlastností tkanív hodná hlbšieho skúmania.

Práca sa postupne zameriava na všeobecné vlastnosti a charakteristiku kmeňových buniek a ich diferenciačného potenciálu, následne sú podrobnejšie charakterizované mezenchymálne kmeňové bunky spolu s možnosťami ich izolácie a kultivácie. Hlavnú časť textu tvorí rešerš štúdií a metód zameraných na cielenú diferenciáciu mezenchymálnych kmeňových buniek so snahou o ich transdiferenciáciu do buniek neurálnej bunkovej línie, spoločne so súčasným a predpokladaným využitím týchto buniek v terapiách centrálnej nervovej sústavy.

## **KLÚČOVÉ SLOVÁ**

Kmeňové bunky, mezenchymálne kmeňové bunky, diferenciácia, transdiferenciácia, bunková terapia, neurodegenerácia.

## **ABSTRACT**

The goal of this work is to point out possibilities of neuronal differentiation of mesenchymal stem cells and their application for clinical purposes, primary for repairing and regeneration of central nervous system tissues. Because this system works as a control center for functional features of the whole body, and treating this injuries and degenerations often bring many problems and obstacles, the possibility of using autologous cells for a transplantation or inducer of the natural regenerative properties of tissues is worth deeper research.

This work progressively focuses on basic characteristics of stem cells and their differentiation potential, characterizing further mesenchymal stem cells together with possibilities of their isolation and cultivation. The main part of the text is formed by studies and methods used for targeted differentiation of mesenchymal stem cells and attempts of their transdifferentiation into neural cell line, together with present and possible future application of these cells in central nervous system therapies.

## **KEYWORDS**

Stem cells, mesenchymal stem cells, differentiation, transdifferentiation, cell therapy, neurodegeneration.

# OBSAH

<b>ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK.....</b>	<b>2</b>
<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>4</b>
<b>1. KMEŇOVÉ BUNKY .....</b>	<b>5</b>
1.1. Charakteristika.....	5
1.2. Delenie podľa diferenciačného potenciálu .....	5
1.3. Delenie podľa pôvodu .....	6
<b>2. MEZENCHYMÁLNE KMEŇOVÉ BUNKY.....</b>	<b>10</b>
2.1. Charakteristika.....	10
2.2. Morfológia .....	10
2.3. Izolácia a kultivácia .....	11
2.4. Funkcie.....	12
<b>3. CIELENÁ DIFERENCIÁCIA MEZENCHYMÁLNYCH KMEŇOVÝCH BUNIEK.....</b>	<b>13</b>
3.1. Diferenciácia do neurónov .....	14
3.1.1. Nediferencované MSC.....	14
3.1.2. Neurosteroidy.....	16
3.1.3. Rastové faktory, cytokiníny a CSF.....	16
3.1.4. Spoločná kultivácia s neurónmi .....	17
3.1.5. Diferenciačné povrchy a média .....	19
3.1.6. Cytotoxický efekt.....	21
3.1.7. Záver .....	22
<b>4. TERAPEUTICKÉ VYUŽITIE MEZENCHYMÁLNYCH KMEŇOVÝCH BUNIEK.....</b>	<b>23</b>
4.1. Cerebrovaskulárne ochorenia .....	23
4.2. Traumatické poranenia mozgu a miechy .....	24
4.3. Parkinsonova choroba .....	25
4.4. Huntingtonova choroba.....	25
4.5. Alzheimerova choroba.....	26
4.6. Roztrúsená skleróza.....	27
4.7. Amyotrofická laterálna skleróza .....	28
<b>5. ZÁVER.....</b>	<b>29</b>
<b>6. POUŽITÁ LITERATÚRA .....</b>	<b>30</b>

## ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

<b>ALS</b>	amyotrophic lateral sclerosis	amyotrofická laterálna skleróza
<b>ASC</b>	adult stem cell	dospelá kmeňová bunka
<b>ATtau</b>	truncated misfolded tau protein	skrátенý a nesprávne zložený tau proteín
<b>A<math>\beta</math></b>	amyloid $\beta$ -peptide	amyloid $\beta$ -peptid
<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor	základný fibroblastový rastový faktor
<b>BHA</b>	butylated hydroxyanisole	butylovaný hydroxyanisol
<b>BME</b>	$\beta$ -mercaptoethanol	$\beta$ -mercaptoetanol
<b>BM-</b>	bone marrow-derived	mezenchymálna kmeňová bunka derivovaná
<b>MSC</b>	mesenchymal stem cell	z kostnej drene
<b>BM-</b>	bone marrow-derived stromal	stromálna kmeňová bunka derivovaná
<b>SSC</b>	stem cell	z kostnej drene
<b>CNS</b>	central nervous system	centrálna nervová sústava
<b>CSF</b>	cerebrospinal fluid	mozgomiešny mok
<b>Dcx</b>	doublecortin	proteín doublecortin
<b>DEX</b>	dexamethasone	dexametazón
<b>DMSO</b>	dimethyl sulfoxide	dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
<b>E<sub>2</sub></b>	estradiol	estradiol
<b>EAE</b>	experimental autoimmune encephalomyelitis	experimentálna autoimunitná encefalomyelitída
<b>ECM</b>	extracellular matrix	extracelulárny matrix
<b>EGF</b>	epidermal growth factor	epidermálny rastový faktor
<b>ESC</b>	embryonic stem cell	embryonálna kmeňová bunka
<b>FSC</b>	foetal stem cell	fetálna kmeňová bunka
<b>GABA</b>	gamma-aminobutyric acid	kyselina gama-aminomaslová
<b>GFAP</b>	glial fibrillary acidic protein	gliálny fibrilárny kyslý proteín
<b>hESC</b>	human embryonic stem cell	ľudská embryonálna kmeňová bunka
<b>HD</b>	Huntington's disease	Huntingtonova choroba
<b>hMSC</b>	human mesenchymal stem cell	ľudská mezenchymálna kmeňová bunka
<b>HSC</b>	hematopoietic stem cell	hematopoietická kmeňová bunka
<b>IFN</b>	interferon	interferón

<b>IL</b>	interleukin	interleukín
<b>iPSC</b>	induced pluripotent stem cell	indukovaná pluripotentná kmeňová bunka
<b>MDN</b>	mesenchymal stem cell-derived neuron-like cell	neurónu podobná bunka derivovaná z mezenchymálnej kmeňovej bunky
<b>MS</b>	multiple sclerosis	roztrúsená skleróza
<b>MSC</b>	mesenchymal stem cell	mezenchymálna kmeňová bunka
<b>NF</b>	neurofilament	neurofilament
<b>NSE</b>	neuron specific enolase	neurónová špecifická enoláza
<b>NSC</b>	neural stem cell	neurálna kmeňová bunka
<b>NTF</b>	neurotrophic factor	neurotrofný faktor
<b>PC12</b>	rat pheochromocytoma-derived cell line	bunková línia odvodená od potkanieho feochromocytómu
<b>PLGA</b>	poly(lactic-co-glycolic acid) polymer	poly-D-L-lactide-co-glycolide polymér
<b>QA</b>	quinolinic acid	chinolinová kyselina
<b>RA</b>	retinoic acid	retinolová kyselina
<b>rMSC</b>	rat mesenchymal stem cell	potkania mezenchymálna kmeňová bunka
<b>SC</b>	stem cell	kmeňová bunka
<b>SSC</b>	skeletal stem cell	skeletálna kmeňová bunka
<b>TBI</b>	traumatic brain injury	traumatické mozgové poranenie
<b>TEA</b>	tetraethylammonium	tetraethylammonium
<b>TNF</b>	tumor necrosis factor	faktor nádorovej nekrózy
<b>TNF-R</b>	tumor necrosis factor receptor	receptor faktoru nádorovej nekrózy



# 1. ÚVOD

Využitie kmeňových buniek (SC) sa v lekárstve javí ako veľmi sľubná terapeutická možnosť liečby. Vlastnosti charakteristické pre tieto bunky, akými sú schopnosť samoobnovy alebo možnosť špecializácie do ktoréhokoľvek typu buniek v ľudskom tele, sú už niekoľko rokov skúmané ako riešenie veľkého množstva chorôb a degenerácií, ktoré boli ešte donedávna striktne neliečiteľné. Najširšie využitie ponúkajú kmeňové bunky získavané z ranných vývojových štádií embrya, pretože sú to práve tieto bunky, z ktorých sa postupne v prenatálnom vývoji buduje celý organizmus. Vzhľadom k etickým problémom, ktoré súvisia s využívaním ľudských zárodkov na vedecké účely, sa hľadajú iné možnosti využitia unikátnych vlastností týchto buniek. Keďže je možné dospelé somatické bunky preprogramovať na bunky svojimi charakteristikami podobné embryonálnym kmeňovým bunkám, je to jedno z možných a pravdepodobných riešení nedostatku takto získavaných buniek.

Jednou z ďalších možností sú kmeňové bunky mezenchymálneho pôvodu (MSC), ktorých získavanie je možné počas celého života človeka, a ponúka sa tak možnosť autológnych bunkových transplantácií. Tieto bunky majú menšie rozpätie možností diferenciácie, sú teda multipotentné. Terapeutické využitie MSC v klinickej praxi však nie je postavené len na ich diferenciačných vlastnostiach. Medzi mnohé prednosti týchto kmeňových buniek patrí hlavne relatívne jednoduché získavanie (kostná dreň, tukové tkanivo, pupočníková krv atď.) a jednoduchá expanzia umožňujúca získanie veľkého počtu týchto buniek pre autológne transplantácie. Boli opísané taktiež trofické efekty MSC vyvolané produkciou rôznych rastových faktorov a cytokínov, ktoré takto vytvoria lokálne imunosupresívne prostredie (Wong 2011). Okrem základného terapeutického využitia diferenciácie MSC do osteoblastov, adipocytov a chondrocytov, sa mimo iné aktívne skúma možnosť transdiferenciácie týchto buniek do neurálnych buniek. Použitie neurálnych buniek odvodených z autológnych MSC pre transplantácie a terapie nahradenia neurónov by mohli zamedziť odmietnutiu buniek alebo tkanív imunitnými reakciami (Ma et al. 2011), poskytujúc tak možnosť liečby neurodegeneratívnych porúch, akými sú poškodenie miechy, mozgová príhoda, Parkinsonova, Huntingtonova, Alzheimerova choroba, roztrúsená a amyotrofická laterálna skleróza.

# 1. KMEŇOVÉ BUNKY

## 1.1. Charakteristika

Kmeňové bunky sa bežne definujú ako bunky so schopnosťou kontinuálnej regenerácie a s pluripotentnými alebo multipotentnými vlastnosťami diferenciácie do rôznych bunkových typov. Tieto bunky sa najčastejšie kategorizujú podľa pôvodu alebo podľa úrovne potencie, s ktorou sú schopné diferencovať. Existuje však niekoľko primárnych princípov, podľa ktorých by mali byť kmeňové bunky: samoobnovujúce, prípadne schopné vyprodukovať aspoň jednu dcérsku bunku s podobnými charakteristikami ako materská bunka; schopné diferenciácie do viacerých zárodočných tkanív; a *in vivo* funkčne rekonštituovať predložené tkanivo (Verfaillie 2002). Radia sa do troch základných skupín podľa pôvodu: embryonálne kmeňové bunky (ESC), indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSC) a somatické kmeňové bunky (Wislet-Gendebien 2012), tiež nazývané aj dospelé (ASC). Často sa vyčleňuje ďalšia skupina, a to fetálne (plodové) kmeňové bunky (FSC). Podľa potencie delíme SC na základe diferenciačného potenciálu na totipotentné, pluripotentné, multipotentné, oligopotentné a unipotentné.

## 1.2. Delenie podľa diferenciačného potenciálu

Diferenciačný potenciál určuje schopnosť menej špecifickej SC diferencovať do špecifickejšieho bunkového typu. Mení sa tak veľkosť bunky, rovnako ako aj jej tvar, membránový potenciál, metabolická aktivita, vnímavosť signálov a hlavne expresia génov bez zmeny sekvencie DNA. Kmeňové bunky sa delia na základe tohto potenciálu, ktorý ukazuje do ktorých, prípadne koľkých rôznych bunkových línií a typov sa môže daná bunka diferencovať.

### *Totipotentné kmeňové bunky*

Tento typ bunky vzniká po oplodnení vajíčka spermiou a je prítomný aj vo vývojovom štádiu moruly. Z týchto buniek vznikajú všetky nasledujúce embryonálne a extraembryonálne bunky.

### *Pluripotentné kmeňové bunky*

Sú prítomné v blastocyste a vznikajú z totipotentných SC. Vznikajú z nich bunky všetkých troch zárodočných vrstiev.

### *Multipotentné kmeňové bunky*

Mierne diferencované a špecifikované bunky, ktoré sú schopné ďalšej diferenciácie len v rámci blízko príbuzných bunkových typov. V prípade diferenciácie do buniek inej bunkovej línie ide o transdiferenciáciu.

### *Unipotentné kmeňové bunky*

Tento typ buniek je plne diferencovaný a nie je schopný produkcie iného ako vlastného bunkového typu. Status kmeňových buniek im ostáva na základe schopnosti samoobnovy.

## **1.3. Delenie podľa pôvodu**

Pôvodom SC sa rozumie miesto prirodzeného výskytu týchto buniek, odkiaľ putujú do rôznych častí tela v priebehu vývoja plodu (v prípade ESC), alebo kde sa v priebehu života nachádzajú, kde proliferujú a diferencujú za hlavným účelom vývoja (fetálne kmeňové bunky) a regenerácie tkanív a udrzaním dostatočného množstva funkčných buniek (dospelé kmeňové bunky sú takmer vo všetkých orgánoch a tkanivách).

### *Embryonálne kmeňové bunky (ESC)*

ESC sú derivované z izolovaných vnútorných buniek (ICM) prvotného embryonálneho štádia blastocysty, v ktorom sa nachádzajú vo vnútri zárodka 4 až 5 dní po oplodnení vajíčka a vzniku zygoty. Pri procese extrakcie vnútorných buniek zárodok zaniká. Po kultivácii týchto buniek na vrstve embryonálnych fibroblastov sa vyvinie línia ESC. Aby mohli byť bunky kategorizované do bunkovej línie ESC, musia spĺňať nasledujúce kritéria: nesmrteľnosť a expresia proteínu telomerázového génu, pluripotencia a formovanie teratómov, udržiavanie stabilného karyotypu aj po niekoľkonásobnom pasážovaní *in vitro*, klonalita, expresia Oct4 a ďalších markerov pluripotencie a schopnosť podieľať sa na formovaní chimér skrz blastocystovú injekciu. Ľudské ESC (hESC) spĺňajú všetky podmienky okrem podieľania sa na vzniku chimér

(Bongso et al. 2004). Tieto bunky majú schopnosť diferencovať do buniek všetkých 3 zárodočných vrstiev, preto sú kategorizované ako pluripotentné. Je to práve táto vlastnosť, ktorá z nich robí bunky s hypoteticky najširším využitím v terapeuticknej praxi, pretože pluripotentné vlastnosti si zachovávajú aj *in vitro*. Pluripotencia je zároveň zodpovedná za jeden z hlavných problémov v rámci využitia ESC v praxi, a tým je vznik teratómov.

#### *Fetálne kmeňové bunky (FSC)*

FSC sa získavajú z potrateného plodu, najčastejšie v prvom trimestri vývoja. Odňaté bunky sú už nasmerované k vývoju určitého orgánu. Odobraním tkanív končatín, obličiek a pečene plodu sa dá získať homogénna kultúra fibroblastom podobných MSC. Tieto bunky migrujú z mechanicky rozrušených tkanív a prisadajú na kultivačný plastik (Lai et al. 2010).

MSC bunky derivované z pečeneých FSC zdieľajú fenotyp a diferenciačnú multipotenciu s dospelými MSC. Vo vhodných kultivačných podmienkach je možné indukovať fetálne MSC k *in vitro* diferenciacii do adipocytov, chondrocytov a osteocytov. Po šiestich pasážiach sa znížila schopnosť diferenciacie do adipogénnej bunkovej línie, ale schopnosť diferenciacie do chondrocytov a osteocytov nebola počtom pasáží ovplyvnená (Götherström et al. 2003). Vďaka vysokej proliferačnej schopnosti a kardioprotektívnej sekrécii sa o FSC uvažuje ako o vhodnej alternatíve ESC (Lai et al. 2010) a tiež ako o vhodných bunkách v *in utero* transplantáciách, pretože tieto bunky sa prispôbujú fetálnemu prostrediu lepšie ako ASC (Götherström et al. 2004).

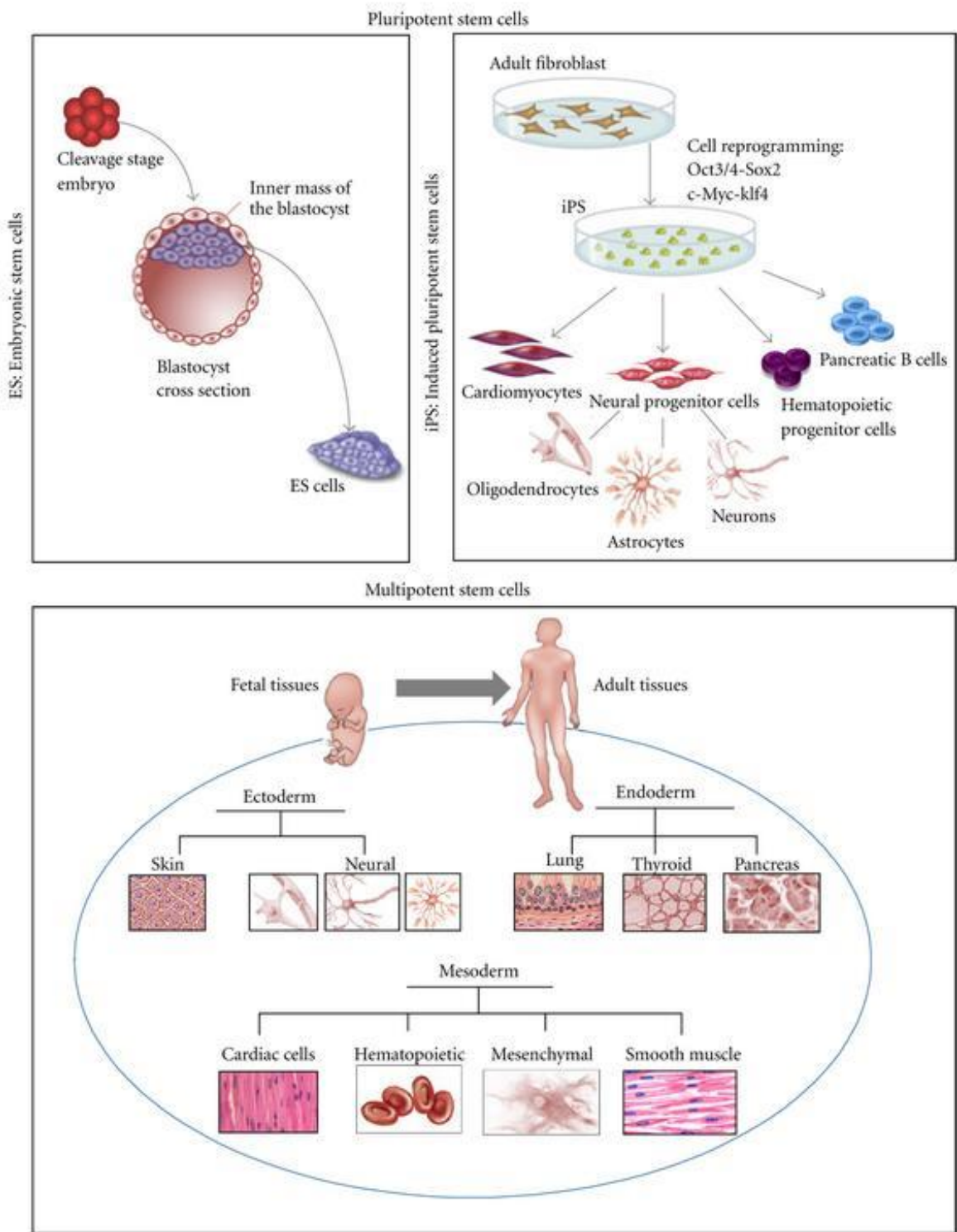
#### *Dospelé kmeňové bunky (ASC)*

Tiež nazývané somatické SC, sa nachádzajú vo väčšine, ak nie vo všetkých už vyvinutých orgánoch a tkanivách. Patria medzi ne endoteliálne SC (nachádzajúce sa v kostnej dreni), testikulárne SC (derivované zo spermatogoniálnych progenitorových buniek semenníkov), SC neurálnej lišty (nájdene v gastrointestinálnom trakte, sedacom nerve, spinálnych a sympatetických gangliách), čuchové SC, mezenchymálne SC (v placente, tukovom tkanive, kostnej dreni, pupočníkovej krvi, zubných zárodkoch), neurálne SC (v rôznych častiach mozgu), kmeňové bunky v koži (epidermálne SC), oku (limbálne SC) a črevách (SC črevných krýpt). K tomuto typu buniek patria aj MSC a jedny z najpreštudovanejších kmeňových buniek –

hematopoietické SC (HSC) (Bongso at al. 2004). Kým HSC sú základom úspešnosti transplantácie kostnej drene, MSC sa v súčasnosti najčastejšie využívajú na terapie a produkciu osteoblastov, adipocytov a chondrocytov, a taktiež v regeneratívnych terapiách vyžadujúcich obnovu alebo produkciu nových tkanív. Diferenčné schopnosti ASC sú obmedzené na vývoj do buniek určitej bunkovej línie, čo ich radí medzi bunky s multipotentnými vlastnosťami.

#### *Indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSC)*

V roku 2006 dokázal tím Shinya Yamanaka, že aj nepluripotentné bunky, akými sú napríklad potencie slabšie (multipotentné SC) alebo somatické bunky, medzi ktoré patria aj kožné fibroblasty (Wislet-Gendebien et al. 2012), môžu byť transformované na bunky pluripotentné. Dosiahlo sa tak vnesením 4 hlavných transkripčných faktorov zodpovedných za pluripotenciu (Oct4, Sox2, onkogény Klf4 a c-Myc) pomocou retrovírusových vektorov do somatickej bunky a tým nastalo jej preprogramovanie. Keďže použitie týchto faktorov a retrovírusov spôsobuje inkorporáciu vírusovej DNA do bunky a častú tumorigenézu, nastáva obdobie aktívneho hľadania vhodnejších a bezpečnejších indukčných prostriedkov (Ferreira a Mostajo-Radji 2013, Takahashi a Yamanaka 2006). Tieto bunky majú pluripotentné vlastnosti podobné ESC a vďaka možnosti autologného získavania sa dôkladne skúma možnosť využitia v regeneratívnej medicíne, pretože na rozdiel od ESC, takto získavané bunky nepredstavujú etické problémy.



*Obrázok 1: Typy kmeňových buniek a ich pôvod. Okrem zárodočných kmeňových buniek môžeme určiť ďalšie tri skupiny, na základe ich diferenciačných schopností: (a) pluripotentné embryonálne kmeňové bunky (ESC), (b) indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSC) a (c) multipotentné fetálne alebo dospelé somatické kmeňové bunky (Wislet-Gendebien et al. 2012).*

## **2. MEZENCHYMÁLNE KMEŇOVÉ BUNKY**

Množstvo publikácií za posledné roky vytvorilo niekoľko rozdielností v terminológii a hodnotení MSC. Medzi mnohé pomenovania patria dreňové stromálne bunky, multipotentné stromálne bunky, mezenchymálne stromálne bunky, kolónie-formujúce jednotkové fibroblasty (CFU-F), stromálne kmeňové bunky kostnej drene (BM-SSC), stromálne prekursorové bunky (SPC), skeletálne kmeňové bunky (SSC) a multipotentné dospelé progenitorové bunky (MAPC). Žiaden z týchto názvov však presne nevystihuje vývojový pôvod a diferenciačnú kapacitu týchto buniek. V súčasnosti sa najčastejšie používa termín mezenchymálne kmeňové bunky (Chen et al. 2008).

### **2.1. Charakteristika**

MSC sú dospelé kmeňové bunky s mezodermálnym pôvodom, schopné diferenciácie do adipocytov, chondrocytov, osteocytov a endoteliálnych buniek alebo myocytov, pričom ich schopnosť diferenciácie je značne plastická v porovnaní s inými populáciami ASC (Ferroni et al. 2013). Napriek tomu, že po niekoľko desaťročí panovala predstava o jednosmernosti segregácie bunkových prekursorov do predurčených zárodočných vrstiev počas embryogenézy súčasne s nezvratnosťou bunkovej diferenciácie, ukazuje sa schopnosť prekursorov v určitých podmienkach (často sú tieto podmienky patofyziologické) dospievať do dospelých buniek, ktoré nenájdeme v tkanivách alebo orgánoch, odkiaľ tieto bunky pochádzajú. Tento fenomén sa označuje ako fenotypová plasticita (Wislet-Gendebien et al. 2005). Skúma sa napríklad možnosť diferenciácie MSC nad rámec ich multipotencie, konkrétne transdiferenciácie do neurálnych buniek a neurónov.

### **2.2. Morfológia**

Morfológia MSC je značne heterogénna. Ich vzhľad je často opisovaný ako fibroblastoidný, v tvare malých okrúhlych buniek, vretenovitého a splošteného tvaru, alebo podobajúc sa na veľké tukové bunky. Ich vzhľad sa často mení vzhľadom ku konfluencii s akou sa nachádzajú v kultúre, ale podstatu vzťahu medzi ich morfológiou a funkčnosťou sa zatiaľ nepodarilo objasniť (Wong 2011).

### 2.3. Izolácia a kultivácia

MSC je možné izolovať z rôznych tkanív, ako sú napríklad kostná dreň, tukové tkanivo, z plodovej vody a krvi pupočnej šnúry (Wislet-Gendebien 2012), ako aj z dentálnych tkanív, synoviálnej tekutiny, krčných mandlí, prištítnych teliesok a vajcovodov (Wong 2011), kože a kostrových svalov (Ferroni et al. 2013). Najčastejšie sa však izolujú z kostnej drene (bone marrow mesenchymal stem cells – BM-MSC), kde tvoria okolo 0,001% celkovej drene (Wong 2011), alebo z tukového tkaniva. Kostná dreň sa v súčasnosti považuje za zlatý štandard na porovnanie obnovovacích a multipotentných vlastností novoobjavených zdrojov MSC (Ferroni et al. 2013).

MSC derivované z tukového tkaniva majú podobné vlastnosti ako BM-MSC, ale sú ľahšie získateľné z tkanív (Wong 2011). Izolujú sa z prvotnej zmesi tukového tkaniva, ktoré obsahuje stromálne a cievne bunky ako preadipocyty, fibroblasty, hladké svalové bunky ciev, endoteliálne bunky, monocyty, makrofágy, lymfocyty a vlastné kmeňové bunky. Z tejto zmesi, nazývanej stromálno-cievna frakcia (stromal-vascular fraction – SVF), sa získavajú vďaka schopnosti adhézie na kultivačný plastik (Ferroni et al. 2013).

Medzi hlavné metódy izolácie MSC patrí izolácia koncentračným gradientom, kultivácia vo vhodných fyziologických podmienkach s následným prisadnutím a resuspendovaním buniek, použitie magnetických guľôčok pokrytých anti-CD45 a anti-glycophorinom A a následná separácia v magnetickom stĺpci a negatívna bunková selekcia pomocou RosetteSep metódy, aplikovaná na čerstvé vzorky kostnej drene. Obsahuje v sebe koktejl tetramerických protilátok, namierených proti povrchovým antigénom ľudských hematopoietických buniek (Tondreau et al. 2004).

#### *Detekcia*

MSC nemajú žiadne špecifické fenotypové markery. Medzinárodná spoločnosť pre bunkovú terapiu (International Society for Cellular Therapy) určila tri základné kritériá, minimálne ktoré musí kultúra MSC v štandardných kultivačných podmienkach spĺňať: príľnavosť k plastovým materiálom, schopnosť diferenciácie do osteoblastov, adipocytov a chondrocytov, pozitívna expresia povrchových bunkových markerov CD73, CD 90, CD 105 a negatívna expresia markerov CD45, CD 34, CD14, CD11b, CD79, CD19 a HLA-DR. Tento zoznam ale nie je definitívny a je potrebné brať do úvahy, že expresia



povrchových markerov *in vitro* nemusí korelovať s expresiou *in vivo*. Preto sa akceptujú aj markery CD44, CD71, Stro-1, adhezívne povrchové molekuly CD106, CD166 a CD29 (Wong 2011), v niektorých prípadoch aj CD144, CD115, CD29, HLA-ABC a Sca-1 (Chen et al. 2008).

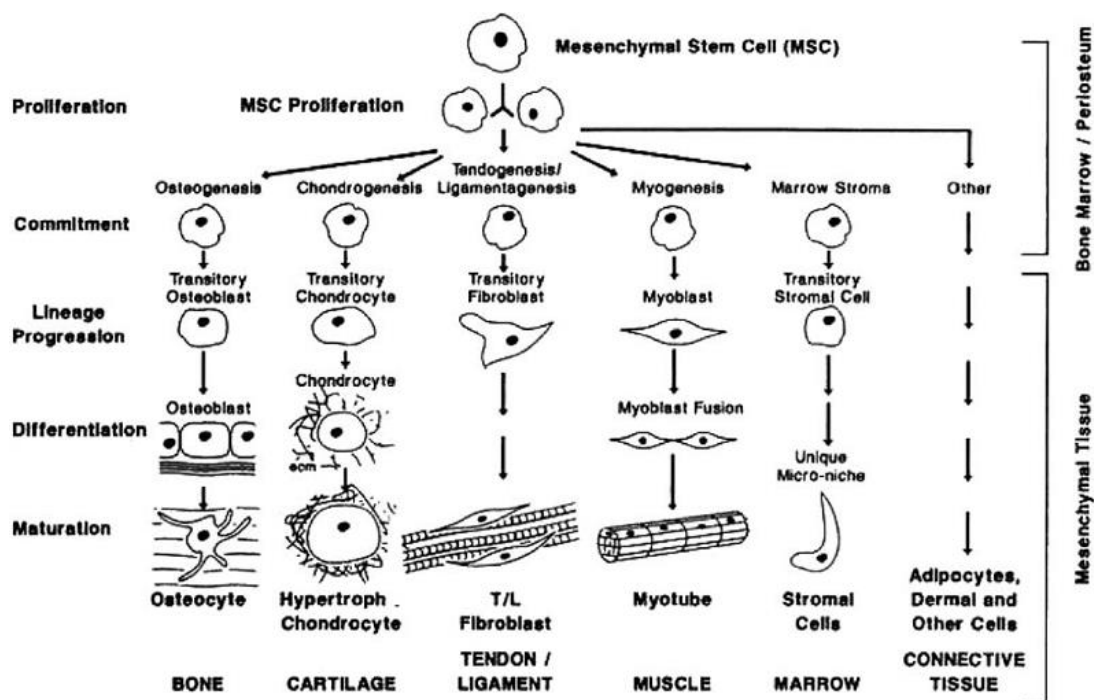
## 2.4. Funkcie

Prirodzenosť MSC smeruje bunky k diferenciácii do buniek mezodermálneho pôvodu (tukové tkanivo, kosť, chrupavka, svalstvo, šlachy a väzy). V kostnej dreni prispievajú k formovaniu ník HSC poskytovaním vhodného hematopoietického mikroprostredia, ako aj pozitívnou a negatívnou reguláciou samoobnovovania, proliferácie a diferenciácie hematopoietických kmeňových či progenitorových buniek. Zvažuje sa schopnosť týchto buniek *in vivo* transdiferenciácie, aj keď špecifické mechanizmy zodpovedné za fenomén diferenciácie, transdiferenciácie, bunkovej fúzie a kombinácie týchto mechanizmov ešte nie sú známe (Chen et al. 2008). Predpokladá sa ich schopnosť vylučovať rozpustné faktory, ktoré menia mikroprostredie v bunkách a tkanivách, čo funkčne prevažuje nad schopnosťou transdiferenciácie v rámci regenerácie tkanív. Medzi tieto faktory patria napríklad rastový faktor hepatocytov, transformujúci rastový faktor-1, interleukín-1(IL-1), IL-1 $\beta$ , IL-3, IL-6, IL-7, IL-11, faktor kmeňových buniek a Fms-like tyrozín kináza 3 ligand. Je možné, že tieto faktory zlepšujú regeneračnú schopnosť tkanív, stimulujú proliferáciu a diferenciáciu endogénnych, kmeňovým bunkám podobných progenitorov, tlmia zápal a imunitné reakcie (Baddoo et al. 2003).

### 3. CIELENÁ DIFERENCIÁCIA MEZENCHYMÁLNYCH KMEŇOVÝCH BUNIEK

Bunková diferenciácia je proces, pri ktorom sa z menej špecializovaných buniek stávajú bunky špecializované. Z jedinej bunky - zygoty - sa postupom času vyvinie komplexný systém tkanív so všetkými bunkovými typmi (totipotentná bunka). Diferenciácia pokračuje aj v dospelosti, kedy sa kmeňové bunky podieľajú na tvorbe nových a náhradných buniek a tkanív (kmeňové bunky pluripotentné a multipotentné).

Okrem základného terapeutického využitia diferenciácie MSC do osteoblastov, adipocytov a chondrocytov sa aktívne skúma možnosť diferenciácie týchto buniek do neurálnych buniek (a teda možnosť transdiferenciácie). Je to práve schopnosť proliferácie a diferenciácie do neuron-like buniek, ktorá indikovala možnosť BM-MSK pre aplikáciu v rámci bunkovej terapie v širokej oblasti neurodegeneratívnych porúch (Bae et al. 2011). Napriek tomu, že sa dospelé kmeňové bunky pokladajú za obmedzené v rozmedzí svojej bunkovej línie, niekoľko štúdií poukazuje, že hMSC môžu diferencovať alebo transdiferencovať do širokého spektra bunkových typov, ktoré nie sú príbuzné ich pôvodnému fenotypovému embryonickému pôvodu (Ma et al. 2012).



Obrázok 2: Schématické znázornenie vzniku mezodermálneho tkaniva ako je kosť, šľacha, sval, tuk, väz, koža či spojivové tkanivo z MSC (Caplan 1994).

### 3.1. Diferenciácia do neurónov

Indukcia hMSC k produkcii neuron-like buniek z rôznych bunkových kultúr sa najčastejšie vyvoláva rastovými faktormi, chemickými látkami alebo ich kombináciou (Ma et al. 2011). Okrem pôvodného využívania  $\beta$ -mercaptoethanolu, dimethylsulfoxidu (DMSO), butylovaného hydroxyanisolu (BHA), epidermálneho rastového faktoru spoločne s retinovou kyselinou (RA), derivátov vitamínu A či RA v kombinácii s mozgovým neurotrofným faktorom, sa začala využívať široká paleta induktorov spôsobujúcich neurálnu transdiferenciáciu MSC. Patria medzi ne cytokiníny, rastové faktory, neurotrofiny, antioxidanty, demetylujúce látky a zlúčeniny zvyšujúce hladiny intracelulárneho cyklického adenosínmonofosfátu - AMP (Mammadov et al. 2011). Niektoré experimenty potvrdzujú, že hMSC v rôznych kultivačných médiách menia svoju morfológiu a exprimujú niekoľko neurálnych markerov na imunochemickej aj fyziologickej úrovni (Wong 2011). Transformácia dospelých MSC buniek do neurónov však vyvoláva dve dôležité uváženia. Po prvé, aj keď sú MSC schopné expresie niektorých neurálnych markerov v rôznych podmienkach, väčšina štúdií spolieha zásadne na morfologické alebo imunologické dôkazy o neurálnej fenotypovej plasticite MSC. Neurálne bunky však musia spĺňať niekoľko kritérií, aby bolo možné definovať ich ako neuróny. Mali by byť post-mitotické, polarizované jediným axónom a početnými dendritmi, schopné vyvolávať akčné potenciály a komunikovať s ostatnými neurónmi cez synapsie, ktoré vyžadujú ako uvoľňovanie neurotransmitérov, tak aj k nim príslušné receptory (Reh 2002). Po druhé, priame prostredie MSC pravdepodobne hrá dôležitú úlohu v ich možnosti diferenciácie do neurálnych buniek alebo priaznivo vplýva na regeneráciu neurálneho tkaniva. Toto pozorovanie vyvoláva niekoľko otázok: ktorý faktor alebo faktory prostredia sú zodpovedné za túto neurálnu plasticitu? Je každá MSC schopná reagovať na tieto faktory? Existuje nejaká regulácia odpovedí MSC na tieto faktory? (Wislet-Gendebien et al. 2005)

#### 3.1.1. Nediferencované MSC

Foudah et al. v rozsiahlej štúdií potvrdili, že rMSC kultivované bez akýchkoľvek diferenciačných činidiel spontánne exprimujú neurálne markery. Množstvo rMSC exprimujúcich neurálne markery záviselo na počte pasáží kultúry (staršie pasáže so senescentnými bunkami, ktoré nadobudli MSC imunofenotyp, mali zníženú alebo

chýbajúcu expresiu týchto markerov v porovnaní so skoršími pasážami; na druhú stranu bola spontánna expresia mezenchymálnych markerov vo všetkých pasážiach rMSC nízka alebo úplne chýba). Schopnosť nediferencovaných rMSC exprimovať neurálne proteíny potvrdzuje, že sú to bunky multipotentné. Zároveň si zachovávajú mezenchymálnu morfológiu bez pozorovateľných prejavov neurálneho fenotypu. Na základe tohto zistenia je možné vylúčiť možnosť, že expresia neurálnych markerov môže byť následkom spontánnej neurálnej diferenciácie. Za expresiu neurálnych markerov môže byť zodpovedný biologický pôvod MSC nediferencovaných rMSC. Tieto bunky sú počas embryonálneho vývoja produkované neurálnou lištou a môžu prežiť až do dospelosti kostnej drene. Iná hypotéza tvrdí, že za expresiu neurálnych markerov v MSC je zodpovedný NRSF (neuron-restrictive silencer factor), ktorý sa účastní represie génov špecifických pre neuróny. To by síce vysvetľovalo spontánnu expresiu neurálnych markerov rMSC, ale nie expresiu nestínu a gliových markerov (Foudah et al. 2012).

Foudah et al. vyhodnotil v rôznych časoch a pasážach kultivovaných rMSC, ktoré neboli diferencované ani ovplyvnené diferenciačnými činidlami, pomocou imunofluorescenčného farbenia nasledujúce diferenciačné markery: nestín – neuroprogenitorový marker;  $\beta$ III tubulín – skorý neurálny marker; NeuN, NF (neurofilament) – neskoré neurálne markery; GFAP, S100– gliový marker; PPAR $\gamma$ 2 – adipogénny marker; OPN – osteogénny marker. V kontrolných kultúrach boli na  $\beta$ III tubulín a NeuN pozitívne iba neuróny a na GFAP len gliové bunky.

marker	pasáž							
	P0	P1	P2	P4	P8	P16	P24	P40
nestín	55 ± 21,2	52,5 ± 24,8	26,25 ± 1,8	56 ± 5,5	61,3 ± 11,1	68,3 ± 10,4	28,8 ± 1,8	3,5 ± 0,7
$\beta$ III tubulín	36,5 ± 2,1	72,5 ± 3,5	64,2 ± 3,8	56,7 ± 7,6	30 ± 8,2	11,7 ± 3,8	12,5 ± 3,5	0,9 ± 0,14
NeuN	36 ± 1,4	18,8 ± 1,8	47,5 ± 17,7	50 ± 8,7	20 ± 7	7 ± 4,2	0,9 ± 0,14	-
NF	-	-	0,9 ± 0,11	0,8 ± 0,14	0,85 ± 0,10	0,88 ± 0,16	0,85 ± 0,21	-
GFAP	55 ± 7,1	19 ± 7,1	11 ± 2,8	7,2 ± 3	11 ± 4,2	5,8 ± 2,5	3 ± 1,4	-
S100	10,3 ± 0,4	3,8 ± 1,8	0,95 ± 0,07	0,93 ± 0,1	0,98 ± 0,04	0,9 ± 0,04	0,93 ± 0,04	-
PPAR $\gamma$ 2	3,9 ± 0,14	4,25 ± 0,35	2,45 ± 0,07	0,78 ± 0,04	0,68 ± 0,11	0,8 ± 0,14	0,85 ± 0,21	0,83 ± 0,11
OPN	12,2 ± 0,4	11 ± 5,7	25 ± 14,1	10 ± 2,8	9,75 ± 3,9	5,25 ± 3,2	0,9 ± 0,1	0,83 ± 0,2

*Tabuľka 1:* Expresia diferenciačných markerov nediferencovaných rMSC v rôznych pasážach (kultivácia pasáže 14 dní). Počet pozitívnych buniek pre každý marker je vyjadrený v % ± SD (smerodajná odchylka), žiadne pozitívne bunky sú značené „-“. (Foudah et al. 2012).

### 3.1.2. Neurosteroidy

Je známe, že rastové faktory sú mitogenické polypeptidy, hrajúce dôležitú úlohu počas astrogliálnej a neurálnej bunkovej proliferácie a diferenciácie bunkových kultúr. Dexamethazón (Dex) a estradiol ( $E_2$ ) sú neurosteroidy aktívne v neurálnych bunkových líniách, hlavne v astrogliálnej oblasti. Steroidné hormóny sa aktívne účastnia metabolizmu kostí a mnohostranne regulujú rôzne typy buniek, vrátane BM-MSK. Aplikácia Dex na kultúru potkaních MSC spôsobila u týchto buniek zvýšenie expresie neurálnych markerov (nestín, NF,  $\beta$ III tubulín) a MAP kinázy. Použitie  $E_2$  vyvolalo zvýšenie množstvo MAP kinázy a  $\beta$ III tubulínu, zároveň sa však znížila expresia nestínu a NF. Na základe imunocytochemickej analýzy sa predpokladá, že použitie Dex zvyšuje expresiu neurálnych proteínov a má tak pravdepodobne vplyv na diferenciáciu BM-MSK do neurónov. Je možné, že interaguje s niektorými rastovými a trofickými faktormi a spúšťa tak kaskádu signálnych dráh, ktoré môžu viesť k expresii neurálnych markerov (Bronzi et al. 2010).

### 3.1.3. Rastové faktory, cytokiníny a CSF

Rastové faktory sa často používajú ako indukčné činidlá a na živote neurónov sa podieľajú v rámci ich výživy. Sú schopné odstraňovať voľné radikály, znižovať neúmerne zvýšené množstvá vápnika alebo potlačiť expresiu syntázy oxidu dusnatého. Patria medzi ne aj EGF (epidermal growth factor) a bFGF (basic fibroblast growth factor), ktoré podporujú rast bunky a proliferáciu neurálnych kmeňových buniek, rovnako ako ich diferenciáciu do neurocytov. Mozgomiešny mok (CSF) obsahuje okrem množstva elektrolytov, proteínov, cukrov a iných faktorov práve aj bFGF, ktorý podporuje proliferáciu a diferenciáciu neurálnych kmeňových buniek väzbou na jemu príslušný receptor na povrchu bunky, alebo mozgový neurotrofný faktor (BDNF), ktorý má úlohu vo výžive MSC a do určitej miery podporuje ich proliferáciu a diferenciáciu. Je pravdepodobné, že CSF obsahuje dostatok látok a živín na indukciu diferenciácie BM-MSK a poskytuje tak lepšie prostredie pre diferenciáciu do nervových buniek, preto sa uvažuje nad jeho použitím ako stimulantu diferenciácie MSC do neurónov (Ye et al. 2011).

Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) je pleiotropný cytokinín, ktorý má dôležité, hoci často protichodné úlohy v mnohých fyziologických a patologických procesoch

vrátane imunity a zápalov. Následkom zranenia sa jeho expresia a vylučovanie zaháji do niekoľkých minút až hodín a niekoľko dní je prítomný v poškodených tkanivách. Nachádza sa v zvýšených hodnotách pri rôznych neurodegeneratívnych poruchách a chorobách, kde funguje ako zápalový faktor. Na druhú stranu je pravdepodobné, že má neuroprotektívnu úlohu a napomáha oprave tkanív po mozgovej mŕtvi. V mozgu ovplyvňuje rast, prežitie a neurálnu diferenciáciu neurálnych kmeňových a progenitorových buniek, čo je sprostredkované signalizáciou cez bunkový receptor TNF-R1 (tumor necrosis factor receptor). Dlhodobá kultivácia hMSC v prítomnosti TNF- $\alpha$  dramaticky mení ich bunkovú morfológiu, ktorá pripomína hviezdovitý vzhľad astrocytov prítomných v mozgu a mieche. Tento typ gliových buniek dokáže syntetizovať GFAP, súčasne so znížením expresie nestínu a vimentínu. Takéto znaky vykazovali aj hMSC kultivované s TNF- $\alpha$ , čím sa potvrdzuje ich astroglialna povaha. Pokles nestínu v hMSC je pravdepodobne spôsobený neurálnou diferenciáciou spôsobenou TNF- $\alpha$ , zatiaľ čo transkripčný faktor bežne prítomný v embryonálnych a neurálnych kmeňových bunkách, zodpovedný za progenitorové vlastnosti, bol v týchto bunkách vo zvýšených koncentráciách. Markerové proteíny typicky exprimované dospelými oligodendrocytmi a neurónmi (Gal-C a  $\beta$ III tubulín) neboli v týchto hMSC syntetizované pred ani po kultivácii s TNF- $\alpha$ , čím sa vylučuje neuronálny fenotyp v týchto bunkách. Tieto výsledky dokazujú, že hMSC kultivované spolu s TNF- $\alpha$  spúšťajú expresiu neurálnych génov a funkcií, ktoré by mohli dopomôcť k vylepšeniu použitia hMSC buniek v terapiách neurologických porúch a chorôb (Egea et al. 2010).

#### **3.1.4. Spoločná kultivácia s neurónmi**

Wislet-Gendebien et al. ukázali, že dospelé potkanie MSC bunky sú schopné diferenciácie do excitabilných neuron-like buniek ak sú kultivované spoločne s myšími mozgovými granulórnymi neurónmi. Tieto bunky exprimovali neurálne markery (NeuN a  $\beta$ III-tubulín), axonálny marker (neurofilamentárny proteín rozpoznávaný monoklonálnou protilátkou SMI31) a dendritický marker (MAP2ab). Elektrofyziológické merania týchto neuron-like buniek odvodených z MSC pozitívnych na nestín (MDN) ukázali tri fázy vývoja (*tabuľka 1*). Po 4 až 6 dňoch spoločnej kultivácie vykazovali MDN odpovede na neurotransmitery (GABA, glycín, serotonín a glutamát) a napätím ovládané K<sup>+</sup> kanály inhibované TEA (tetraethylammonium). V tomto štádiu MDN neexprimovali funkčné, napätím ovládané sodné kanály a mali nízke hodnoty akčných potenciálov.

Počas druhého týždňa začínali MDN vykazovať Na<sup>+</sup> prúd vratne inhibovateľný TTX (tetrodotoxínom) a boli schopné vytvoriť jeden depolarizačný kmit akčného potenciálu. V dlhšie kultivovaných kultúrach dosahoval pokojový membránový potenciál negatívnejšie hodnoty, ktoré sa blížili hodnotám nameraným v neurónoch (Wislet-gendebien et al. 2005).

	5 dní <i>in vitro</i>	8 dní <i>in vitro</i>	12 dní <i>in vitro</i>
Citlivosť na neurotransmitery	GABA, glycín, glutamát	GABA, glycín, glutamát	GABA, glycín, glutamát
Napätím ovládané K <sup>+</sup> kanály	+	+	+
Napätím ovládané Na <sup>+</sup> kanály	-	+	+
Akčný potenciál	-	+	+
Rady akčných potenciálov	-	-	-
Synaptická aktivita	-	-	-
Membránový potenciál (mV)	-37 ± 3	-50,3 ± 2	-57,7 ± 2,3

*Tabuľka 2:* Fázy dospievania MSC-derivovaných neuron-like buniek (Wislet-Gendebien et al. 2005).

Takáto elektrofyziologická analýza názorne ukazuje, že MDN sú schopné prijať niektoré funkčné charakteristiky neurónov. Na základe Rehových kritérií však ešte nemôžeme tieto bunky nazývať neurónmi. Napriek tomu, že sú schopné elektrickej odpovede po aplikácii niekoľkých neurotransmitérov a tieto odpovede sú inhibovateľné klasickými blokátormi ionotropných receptorov, nebolo dokázané, že sú medzi sebou schopné komunikovať synaptickými spojmi. Rovnako zatiaľ neboli zaznamenané opakujúce sa akčné potenciály (Wislet-Gendebien et al. 2005).

Ma et al. kultivovali hMSC spoločne s neurálnymi kmeňovými bunkami (NSC), čím sa dosiahla ich diferenciácia do NSC-like buniek, ktoré proliferovali v neurosféram podobných štruktúrach a exprimovali ranné NSC markery. Boli tiež schopné diferenciácie do buniek, ktoré exprimovali markery neurónov, astrocytov a oligodendrocytov. Po troch týždňoch spoločnej kultivácie sa začali tvoriť agregáty hMSC buniek. Po ďalších 3-7 dňoch sa tieto agregáty naďalej zväčšovali a začali tvoriť štruktúry morfológicky podobné hNSC tvoreným neurosféram. Proliferačné markery kmeňových buniek Oct4 a Pax6 boli exprimované týmito hMSC agregátmi (ich koexpresia môže poukazovať na získané schopnosti špecifickej neurálnej diferenciácie, zároveň je však ešte stále do istej miery prítomný potenciál diferenciácie do iných bunkových typov), vo valnej väčšine z nich tiež nestín. Boli pozorovateľné aj Sox1 a Bf1

imunoreaktívne bunky. Nestín imunoreaktívne bunky boli proliferujúce, pravdepodobne zotrúvajúce v nediferencovanom stave v prítomnosti média s hNSC. Počas neurálneho vývoja hMSC sa expresia Oct4 a Pax6 postupne znižovala spolu so zvýšením expresie ranných NSC markerov. Nakoniec stratili morfológiu podobnú fibroblastom a expresiu fibronektínu. Po pridaní neurobazálneho média obsahujúceho B27 alebo N2 začali po

5-10 dňoch NSC-like bunky migrovať z neurosféram podobných štruktúr a tvoriť neuritom podobné útvary. Následná imunochemická analýza odhalila pokles expresie markerov neurálnych progenitorových buniek, ako je nestín. Na druhú stranu začali exprimovať markery astrocytov (GFAP, 60% z celkového počtu buniek) a neurónové markery ( $\beta$ III tubulín, 40% z celkového počtu buniek). Po 7 dňoch odhalili neurálne prtilátky expresiu NF-200, GABA, MAP2 a glutamátu, objavili sa aj NG2 a GalC imunoreaktívne podskupiny buniek (markery oligodendrocytov). Prekrývajúca sa expresia  $\beta$ III tubulínu a DCX alebo MAP2, čiže markery nezrelých a dospelých neurónov, značí, že prítomné bunky boli v rôznych vývojových štádiách. Časom sa zvyšovalo množstvo buniek exprimujúcich MAP2, čo naznačuje postupné dospievanie neurálnych buniek. Elektrofyziologické merania ukazovali pokojový potenciál od -25 do -58 mV s priemernou hodnotou  $-37,6 \pm 1,3$  mV ( $n=60$ ). Prevažná väčšina týchto buniek po podrobení pulzom prúdu prejavila aktívne membránové vlastnosti. Napriek niekoľkým kľúčovým markerom, ktoré vo výsledku tieto bunky produkovali, sú tieto markery produkovateľné aj inými bunkovými populáciami, a teda to nie je jednoznačný dôkaz transdiferenciácie do neurálnej bunkovej línie (Ma et al. 2011).

### 3.1.5. Diferenciačné povrchy a média

Na vytvorenie presných modelov *in vitro*, dokazujúcich zložité interakcie pozorované medzi bunkami *in vivo*, a ktoré vierohodnejšie kopírujú prostredie, v ktorom sa nachádzajú bunky *in situ* sa vyvíja veľké úsilie. V tkanivách sú bunky navzájom v kontakte cez extracelulárny matrix (ECM), ktorý má dôležitú úlohu v kontrole správania bunky. Tieto interakcie sa dajú vytvoriť *in vitro* pomocou pokrývania rôznych povrchov ECM molekulami. Často sa efekty vyvolané ECM proteínmi dajú dosiahnuť použitím krátkych peptidových sekvencií alebo motívov. Pripevnením týchto molekúl kurčitému povrchu sa dá imitovať správanie podobné celej molekule. Prezenciou špecifických ECM peptidov (postupne alebo ich kombináciou) môžeme identifikovať



domény dôležité v neurálnej diferenciacii kultivovaných buniek. Na príklade neurálnej diferenciacie buniek PC12 (bunková línia odvodená od buniek tumoru potkaních buniek drene nadobličiek) bol ukázaný vplyv motívov kolagénu I a fibronektínu PHSRN, ktoré výrazne zvýšili expresiu  $\beta$ III tubulínu, kým peptidový motív laminínu a fibronektínu RGD tiež vyvolali prospešné efekty na rast kultúry. Tak je možné sledovať vplyv peptidických motívov biomimetických povrchov na reguláciu rastu neuritov PC12 buniek (Cooke et al. 2009).

V oblasti tkanivového inžinierstva je vývoj podporných nosičov s postupným uvoľňovaním látok a bioaktívnych faktorov, potrebných pre bunkovú diferenciaciu dôležitý, pretože tieto faktory jednoducho degradujú vďaka svojmu krátkemu polčasu života v kultivačnom médiu. Takéto podporné nosiče (scaffoldy) musia mať vhodné fyzikálno-chemické vlastnosti, musia byť biokompatibilné a prístupné biologickým látkam. Kontrolované uvoľňovanie bioaktívnych látok zo scaffoldu je rovnako dôležitým faktorom pre použitie týchto materiálov na biologické účely, pretože môžu regulovať pochody ako sú génová expresia, produkcia peptidov alebo rastových faktorov. Vhodným materiálom pre klinické použitie syntetických polymérov v ľudskej medicíne sa ukazuje byť napríklad PLGA film. Khang et al. skúmal použitie PLGA/BME polymérneho filmu, ktorý postupne uvoľňoval BME do prilnutých buniek, a ich následnú diferenciaciu do neurálnych buniek. Kultivácia BM-MSC s BME spúšťala expresiu neural-like markerov (napr. NF a NSE). Napriek tomu vysoká koncentrácia BME v médiu znižovala produkciu NF a zároveň aj hustotu bunkovej kultúry. Výsledky ukazujú, že určité (zatiaľ presne neznáme) množstvo BME v médiu je dôležité na správnu diferenciaciu BM-MSC do neuron-like buniek bez znižovania veľkosti buniek a apoptózy (Khang et al. 2012).

Výsledky Mareschi et al. dokazujú expresiu špecifických neurálnych markerov (nestín a MAP2) u MSC kultivovaných v neural progenitor maintenance médiu (NPMM). Imunocytochemická analýza na rozdiel od real-time PCR ukázala slabú génovú expresiu MAP2, nestínu, NF-M a GFAP. Elektrofyziológické pokusy odhalili, že  $K^+$  kanál detekovateľný v nediferencovaných hMSC je pomaly aktivovaný pri extrémne nefyziologických podmienkach (hodnota napätia, kedy je pravdepodobnosť otvorenia kanálu 50 % -  $V_{1/2}$ , je 168 mV) a zablokovateľný vysokými dávkami TEA. Taktiež sa nepodarilo v rámci diferenciacie hMSC do neuron-like buniek exprimovať dostatočnú

hustotu Na<sup>+</sup> kanálov, ktoré by boli schopné indukcie akčných potenciálov. Mareschi predpokladá, že proces diferenciácie do neurónov bude obsahovať ešte ďalšie kroky. Jeho experimenty však potvrdili predošlé štúdie poukazujúce na skutočnosť, že hMSC dokážu v závislosti na rôznych kultivačných médiách meniť svoju morfológiu a hodnotu expresie niekoľkých neurálnych markerov na imunochemickej aj fyziologickej úrovni. Dôkaz expresie neurálnych markerov spoločne so zmenou typu K<sup>+</sup> kanálov v hMSC kultivovaných s NPMM médiom (neural progenitor maintenance medium; Cambrex) podporujú koncept hMSC ako potenciálny zdroja neurónov a gliových buniek (Mareschi et al. 2006).

### **3.1.6. Cytotoxický efekt**

Súčasný výskum sa zameriava na hľadanie najefektívnejšej metódy neurálnej diferenciácie mezenchymálnych kmeňových buniek. V minulosti sa chemikálie využívali na indukciu MSC. Predpoklad, že konverzia MSC do neurónov chemikáliami je možná, sa stala kontroverzným názorom. Tvrdí sa, že tieto chemikálie indukujú cytotoxické zmeny v bunkovej morfológii, ktoré sú následne nesprávne interpretované ako nadobudnutie neurálnej morfológie. Keď boli konečne diferencované bunky ako fibroblasty, keratinocyty, alebo MSC vystavené stresujúcim faktorom, akými sú napríklad  $\beta$ -ME, BHA, DMSO súčasne s extrémnymi hodnotami pH, chloridu sodného alebo detergentov, viedlo to k zmenšeniu buniek a morfológickým zmenám vedúcim k získaniu vzhľadu neurónov v priebehu niekoľkých hodín. Skutočná neurálna diferenciácia však vyžaduje rozsiahle preprogramovanie signálnych kaskád, ktoré nie je možné navodiť inhibíciou syntézy proteínov. Mammadov et al. získal po kultivácii hMSC s kyselinou retinovou (RA) bunky s neuron-like morfológiu spoločne s expresiou neurálnych markerov ( $\beta$ III tubulín a NF). Tieto zmeny nastali postupne a boli stabilné a v porovnaní s kontrolou bola proliferácia týchto buniek znížená. Zmeny nastali pomaly a boli teda s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobené zmenou syntézy proteínov a nie cytotoxickým efektom. Pri indukcii RA spoločne s DMSO, KCl<sup>-</sup> a neuroblasty podmieňujúcim médiom sa telá buniek zmenšili a vytvorili sa na nich výbežky podobné tým neurónovým. Postupne tieto zmeny vymizli, a po deviatich dňoch bunky odumreli podobným spôsobom ako následkom senescencie. Nestabilita, morfológické zmeny a bunková smrť následkom chemikálií v neskorších fázach naznačujú, že tieto zmeny

nevznikajú následkom neurálnej diferenciácie, ale cytotoxicitou spôsobenou chemickými zlúčeninami (Mammadov et al. 2011).

K podobným záverom týkajúcich sa transdiferenciácie MSC do neurónov pomocou chemickej indukcie došli aj Lu et al. Na experimenty použil kultivačné médium, do ktorého bolo pridané DMSO/BHA alebo BME. Bunky po kultivácii v tomto médiu nadobudli tvar neurónov a exprimovali niekoľko neurálnych markerov (NSE, NeuN, nestín), pričom mnohé iné neurónové, astrocytárne a oligodendrocytárne markery neboli detekovateľné (MAP-2,  $\beta$ III tubulín, NF-H, GFAP, APC). Výsledky týchto pokusov ukazujú, že neurálna indukcia pomocou chemických činidiel spôsobuje bunkový stres, ktorý má za následok zmenšenie buniek do tvaru a morfológie neurónov a zároveň nevyvoláva expresiu neurálnych markerov. Podobnú morfológiu nadobúdajú aj iné bunky a vyvolávajú ju aj iné chemikálie, ktoré spôsobujú bunkový stres alebo bunky poškodzujú (na ďalšiu sériu pokusov použili Tween 20, Triton X-100 a polybren), ale tiež aj suprafyziologické koncentrácie solí či zmeny v pH. Výsledky naznačujú, že neurálna indukcia MSC jednoduchými chemickými postupmi často vyvoláva bunkové reakcie na stres, namiesto transdiferenčného procesu (Lu et al. 2004).

### **3.1.7. Záver**

Je veľká snaha o identifikáciu podmienok, ktoré vedú k indukcii neurálnej diferenciácie MSC *in vitro*, aby sa prišlo na princípy ich plasticity *in vivo*. Ukazuje sa, že *in vitro* štúdie pracujúce s metódami diferenciácie do neurónov a následne posudzovanie ich biológie sú často nedokončené alebo v rozpore. Pripisovanie neurálneho osudu MSC bunkám je nedostatočné na základe chýbajúcej špecifity prítomných neurálnych markerov, heterogenitou skúmaných MSC populácií a artefaktmi spôsobenými metódami bunkovej kultivácie *in vitro* (Phinney a Prockop 2007). Množstvo rozsiahlych protokolov a výsledkov ukazuje na rôzne typy indukovaných nervových buniek. Morfológická rôznorodosť týchto buniek a rozdielna expresia neurálnych proteínov je s najväčšou pravdepodobnosťou spôsobená faktormi, akými sú rozdielnosť protokolov, množstvo bunkových pasáží, hustoty buniek, vek darcov, doba kultivácie atď. (Lambert et al. 2009).

## **4. TERAPEUTICKÉ VYUŽITIE MEZENCHYMÁLNYCH KMEŇOVÝCH BUNIEK**

MSC majú dobré proliferačné schopnosti, ktoré môžu vynahradiť limitáciu množstva dospelých nervových kmeňových buniek. Potvrďuje sa, že MSC sú schopné diferenciácie do buniek s podobnými vlastnosťami aké majú neurálne bunky, a teda je možné ich použitie k náhrade poškodených alebo nefunkčných neurónov. Transplantácia diferencovaných neuron-like buniek v klinických terapeutických metódach môže ponúkať menej limitácií. Tieto bunky je možné použiť autológne, nespôsobujú teda niekoľko vážnych problémov, akými sú napríklad odmietnutie imunitným systémom a nutnosť použiť imunosupresiu. Vzhľadom k tomu, že z malého množstva kostnej drene je možné vyprodukovať veľké množstvo neuron-like buniek, ich využitie a aplikácia v klinickej terapii bude veľmi osožné (Bae et al. 2011).

Ľudské neurologické poruchy sú často spôsobené stratou alebo degeneráciou neurónov a gliových buniek v mozgu alebo mieche. Endogénne neurálne progenitory majú limitovanú proliferačnú kapacitu a novo vytvorené neuróny majú tendenciu k rovnakým degeneráciám ako tie predchádzajúce. Kvôli týmto dôvodom opravy porúch endogénnymi neurónmi nedokážu napraviť prvotné príčiny týchto degenerácií. Bunkové terapie sa javia ako inovatívny prístup k liečbe takýchto porúch. MSC sa v súčasnosti testujú na použitie v týchto terapiách, vďaka vlastnostiam ako plasticita, imunerugaltívne funkcie, imunosupresívne schopnosti, migrácia na postihnuté miesto a vylučovanie množstva trofických signálov ktoré ovplyvňujú okolité tkanivá (Ferroni et al. 2013).

### **4.1. Cerebrovaskulárne ochorenia**

Mozgové disfunkcie súvisiace s cievnyim systémom zásobujúcim mozog krvou, akými sú napríklad vysoký krvný tlak, môžu poškodiť bunky ciev, endotélium, odhaľujú tak vrstvy kolagénu, kde sa následne hromadia krvné doštičky a zvyšuje sa riziko tvorby trombu. Trvalo zvýšený krvný tlak permanentne mení stavbu ciev, ktoré bývajú následne náchylnejšie k deformáciám, nepravidelnostiam v ich stavbe a výkyvom krvného tlaku v mozgu. Následne sa zvyšuje riziku poškodenia cievnej sústavy, ktoré často ústi k cievnej mozgovej príhode, mŕtvici alebo hemoragickej mŕtvici.

Transplantácie BM-MSC v akútnej fáze cievnej mozgovej poruchy u myší viedla k zmenšeniu rozsahu poškodenia a ústrednej mozgovej ischémie. Tento efekt je s väčšou pravdepodobnosťou vysvetliteľný sekréciou humorálnych faktorov MSC bunkami, skôr než ich vlastnou diferenciáciou do buniek neurálnej alebo vaskulárnej línie. Okrem množstva trofických a antiapoptotických faktorov produkovaných MSC sú dôležité regeneratívne faktory ako cievny endoteliálny rastový faktor (VEGF), hepatocytový rastový faktor (HGF) a angiopoietin-1, ktoré vykazujú neuroprotektívne vlastnosti (Ikegame et al. 2011). Úlohu v regenerácii bunkovou terapiou po mozgovej mŕtvici hrajú aj faktory, medzi ktoré patrí vek, typ mŕtvice, umiestnenie a veľkosť lézie alebo načasovanie liečby (Dharmasaroja 2009).

#### **4.2. Traumatické poranenia mozgu a miechy**

Traumatické poranenia vznikajú ako dôsledok vonkajších mechanických síl, ktorých následkom vzniká poranenie trvalo alebo krátkodobo poškodzujúce mozog alebo miechu. Vážnosť zranenia závisí hlavne na sile a spôsobe, akým k zraneniu došlo. Poškodenie môže byť spôsobené ako zranením samotným, tak aj dôsledkom sekundárnych efektov, ktoré sa môžu dostaviť po hodinách až dňoch po zranení, a patria medzi ne zmeny krvného obehu v mozgu alebo zmena vnútrolebečného tlaku.

Bunková terapia a transplantácia neurónov diferencovaných z MSC ponúka vhodný typ liečby traumatickým mozgovým poranením (TBI) alebo poranením miechy. Skúmajú sa možnosti priamej aplikácie a intravenózneho podania MSC, ktorých potenciálne terapeutické využitie spočíva v schopnosti migrácie do poškodených oblastí, následnej diferenciácie do špecifických buniek a vylučovaní rastových a trofických faktorov, ktoré podporujú synaptogenézu, angiogenézu a endogénnu neurogenézu (Zhang et al. 2008). Taktiež je dôležité miesto aplikácie týchto buniek, keďže zápal a hypoxia spôsobená zranením pôsobia nepriaznivo na prežitie aplikovaných MSC. Na druhú stranu, aplikácia buniek vo vzdialenejších miestach od zranenia im dáva možnosť usadiť sa a proliferovať skôr, než by mali možnosť prejaviť svoje terapeutické schopnosti. Pre liečbu mozgu sa skúma možnosť miestnej implantácie vstupu s MSC, čím by sa dopomohlo nahradeniu zranených neurónov, resp. priamym vylučovaním protizápalných, neurotrofných a imunomodulárnych cytokinínov podporiť neuroregeneráciu (Lam et al. 2013).

### 4.3. Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je chronická, progresívna, neurodegeneratívna porucha, prejavujúca sa postupným a selektívnym odumieraním dopaminergných neurónov v *substantia nigra pars compacta* so sekundárnou redukciou uvoľňovania dopamínu v striate. Táto strata nigrálnych dopaminergných neurónov vedie ku klinickej diagnóze prevažne kvôli sprievodným motorickým symptómom, akými sú strnulosť, trasenie a spomalenie pohybov – bradykinézia (Wislet-Gendebien et al. 2012).

Po experimentálnej transplantácii hMSC do potkanieho modelu s Parkinsonovou chorobou sa výrazne znížila strata dopaminergných neurónov. Je pravdepodobné, že existujú recipročné interakcie medzi vštepenými hMSC a okolím oblastí lézií potkaních mozgov, ktoré vedú k záchrane neurónov a neuroprotektívnym efektom, rovnako ako aj špecifickému vývoju nešpecializovaných buniek smerom k dopaminergným neurónom. Postupným fenotypovým dospievaním buniek a tvorbou neurónov, spoločne s presunom neuronálnych prekursorov zo subependymálnej do vnútornej striatálnej vrstvy bola dokázaná prítomnosť Dcx imunoreaktívnych neuroblastov v danej oblasti. Po transplantácii hMSC do zvierat s léziami sa zvýšila Dcx expresia a migrácia rozvetvených neuroblastov smerom kléziovému striatu. Denzitometrické merania indikovali výrazné zvýšenie proliferácie v ependymálnej oblasti. Vštep hMSC buniek môže teda uchovať dopaminergné neuróny a podporiť neurogenézu v potkaniom modeli (Cova et al. 2010). Niektoré štúdie však podporujú myšlienku, že efekt MSC buniek v zvieracích modeloch nemá na svedomí nahradenie neurónov, ale parakrinné mechanizmy, vylučovanie neurotrofných, protizápalových, imunomodulárnych, anti-apoptotických a angiogenických faktorov, ktoré podporujú obnovu mozgového tkaniva (Glavaski-Joksimovic a Bohn 2013).

### 4.4. Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (HD) je neurodegeneratívna porucha ovplyvňujúca koordináciu svalov, ktorá vedie ku kognitívnym a psychickým poruchám. Je spôsobená dominantnou autosomálnou mutáciou, a to rozpínaním polyglutamínu kódovaného CAG repetíciami v Exóne 1 génu *IT15*, ktorý kóduje proteín Huntingtin. Medzi následky patrí nekoordinovaný pohyb tela, demencia, problémy s dýchaním a srdčné poruchy.

V rámci štúdií orientovaných na bunkovú terapiu HD sa skúma vplyv neurotrofných faktorov na patogenézu. U modelov HD vyvolaných excitotoxickou kyselinou chinolinovou (QA) boli transplantované geneticky modifikované MSC vylučujúce neurotrofné faktory (NTF<sup>+</sup> bunky). Niekoľko týždňov po transplantácii nadobudli MSC fenotyp buniek sekretujúcich NTF, a značne sa znížili striatálne zmeny objemu spojené s léziami vyvolanými QA. Potkany vykazovali zlepšenie správania v porovnaní s kontrolnými potkanmi s aplikovaným fosfátovým pufrom (PBS). Prejavujú sa tak neuroprotektívne vlastnosti MSC, ochraňujúce bunky pred *in vivo* excitotoxickým poškodením (Sadan et al. 2012). Do mozgu transplantované, geneticky upravené MSC, slúžiace ako dopravné prostriedky pre vírusové vektory nesúce epidermálny rastový faktor (EGFR) pravdepodobne podporujú funkčnú obnovu cez produkciu trofických faktorov indukujúcich prežitie a regeneráciu neurónov. Napriek sľubným predpokladom genetického inžinierstva zasiahnutých buniek a následnej podpore ich opravy a obnovy sa pri použití vírusových vektorov zvyšuje riziko vzniku mozgových nádorov (Huang et al. 2012).

#### **4.5. Alzheimerova choroba**

Táto choroba je najčastejšou formou demencie, ktorá sa prejavuje postupným zväčšovaním deficitu pamäti, zhoršením kognitívnych schopností a charakterovými zmenami. Kľúčovú patogenickú úlohu zastáva pravdepodobne amyloid  $\beta$ -peptid ( $A\beta$ ) (Wislet-Gendebien et al. 2012), aj keď v prevyšujúcej väčšine prípadov ostáva príčina choroby neznáma.

V prípade  $A\beta$ , ktorý sa v prípadoch Alzheimerovej choroby (AD) nachádzal vo forme amyloidných plakov v mozgovom parenchýme, sa skúma možnosť jeho redukcie v mozgu a predpokladá sa tak možnosť prevencie a liečby AD. V experimentoch s myšami AD indukovanými modelmi sa pri použití BM-MSC zvýšila mikrogliálna aktivácia a následne sa znížili zásoby  $A\beta$ . Morfológia takto aktivovaných mikroglií bola rozdielna od tých v kontrolnej skupine a po bližšom preskúmaní sa ukázalo, že transplantácia BM-MSC pravdepodobne normalizuje mikrogliálnu odpoveď a zlepšuje mikrogliálnu morfológickú zmenu v patologickom prostredí (Lee et al. 2009).

Iné štúdie ukazujú na súvislosť medzi AD a nesprávne zloženým a skráteným proteínom tau (AT tau), ktorý je zodpovedný aj za ďalšie neurodegeneratívne poruchy.

Pri spoločnej kultivácii s MSC sa výrazne zvýšila proliferácia AT tau buniek, aj keď nebola priamo ovplyvnená expresia tau proteínu. Predpokladá sa tak potenciál MSC neutralizovať bunkovú smrť spôsobenú tau proteínom bez ovplyvnenia jeho degradácie. Podporuje sa tak myšlienka využitia MSC v rámci neuroprotektívnych terapií, skôr než v nahradzovaní buniek, ako vhodná metóda liečby AD s podobných tauopatií (Zilka et al. 2011).

#### **4.6. Roztrúsená skleróza**

Tiež nazývaná skleróza multiplex (MS), je chronické zápalové demyelinizujúce ochorenie centrálnej nervovej sústavy (CNS), ktoré postihuje prevažne mladých, dospelých ľudí. Presná patogenéza je síce ešte nejasná, a podieľa sa na nej pravdepodobne viaceré faktorov (genetických, environmentálnych a infekčných), v súčasnosti sa prijíma, že konečná patologická dráha je vyústením autoimunitného útoku proti myelínovým zložkám. V rámci bunkových terapií sa skúmajú mechanizmy SC, akými sú neuroregenerácia a remyelinizácia cez aktiváciu prirodzene sa vyskytujúcich SC, alebo produkcia nových progenitorov CNS bunkovej línie spoločne s miestnymi a systémovými imunomodulačnými efektmi (Karussis a Kassis 2008).

Jednou zo sledovaných možností použitia MSC bunkovej terapie na liečbu MS je inhibícia proliferácie mitogén/myelín stimulovaných T buniek, ktoré sú zodpovedné za autoimunitné reakcie. Prítomnosť MSC znížila po šiestich dňoch počet proliferujúcich mitogénom aktivovaných CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T lymfocytov *in vitro*, rovnako ako sa inhibovala proliferácia myelínom aktivovaných CD3<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> T buniek. Schopnosť MSC potlačiť následky myelínom indukovaných efektorových buniek bola v nepriamej úmere s vážnosťou ochorenia, čo môže spôsobovať prevaha neurodegeneratívneho procesu nad autoimunitnými reakciami. Limitácia T lymfocytov MSC bunkami v rámci MS sa odohráva s najväčšou pravdepodobnosťou skrz IFN- $\gamma$ -IDO mediovaný mechanizmus (Zafranskaya et al. 2013). Pri experimentoch na modeloch s experimentálnou autoimunitnou encefalomyelitídou (EAE), ktorá slúži ako zvierací model pre štúdium MS, sa ukázali byť BM-MSK efektívne v rámci potlačenia EAE v myšiach. Indukovala sa neuroprotektia spoločne so zachovaním väčšiny axónov CNS. Histopatologické štúdie odhalili úspešnú migráciu MSC podaných intravenózne aj intraventrikulárne do poškodeného tkaniva CNS a následnú diferenciáciu do buniek exprimujúcich markery



buniek neurálnej a gliovej línie. Použitie MSC môže slúžiť ako praktická metóda *in situ* imunomodulácie, neuroprotektie a pravdepodobne aj remyelinizácie alebo regenerácie v rámci MS (Karussis et al. 2008).

#### **4.7. Amyotrofická laterálna skleróza**

Amyotrofická laterálna skleróza (ALS) je fatálna neurodegeneratívna porucha, klinicky charakterizovaná svalovou slabosťou a paralýzou, často vyžadujúcu podporu dýchania. ALS sa prejavuje postupnou stratou vyšších aj nižších motorických neurónov v cerebrálnom kortexe, mozgovom kmeni a mieche. Príčina vzniku ALS je nejasná a zatiaľ neexistuje žiadna forma liečby (Morita et al. 2008).

Na zvieracích modeloch ALS kombinovaná dávka neovplyvnených MSC zlepšila funkčné motorické schopnosti, predĺžila dobu života a množstvo motorických neurónov v potkanoch. Bunky aplikované priamo do miechy prežili až do konečného štádia choroby a migrovali bielou hmotou miechy oboma smermi. Kombinovaná aplikácia BM-MSK by mohla byť vhodnou metódou liečby ALS, aj keď efekt MSC bol silne závislý na veľkosti dávky (Forostyak et al. 2011). Ústav experimentálnej medicíny Akadémie vied ČR v spolupráci s Bionovou vykonáva vo Fakultnej nemocnici v Motole I. a II. klinické štúdie terapie ALS pomocou expandovaných autológnych MSC.

## 5. ZÁVER

Do výskumu bunkových terapií za použitia SC sa vkladá veľa energie a zdrojov. Po objavení totipotných vlastností ES sa otvorili možnosti autológnej transplantácie tkanív, čím sa zamedzujú vedľajšie efekty spôsobené samotnou transplantáciou. Kvôli problémom etiky je však potrebné nájsť čo najefektívnejšiu náhradu týchto buniek, ktorá by mala čo najpodobnejšie spektrum a šírku diferenciačných možností.

iPSC sú jednou z hlavných možností, u ktorých sa predpokladá možnosť totipotencie, vyvstáva však problém indukcie a jej kompletného zvládnutia. Aby sa obišiel tento zložitý krok, hľadajú sa v ľudskom tele SC, ktoré by mali širokú potenciú bez nutnosti vážneho genetického reprogramovania. Jedny z najľahšie získateľných SC bez etických otázok sú práve MSC, preto je dôležité odhaliť všetky ich diferenciačné a transdiferenciačné vlastnosti. Ak by sa podarilo dokázať ich transdiferenciačné schopnosti, regeneratívna medicína by dostala do rúk silnú metódu liečby ďalších degenerácií a porúch, ktoré zasahujú aj CNS. Keďže oprava a obnova neurónov a nervových tkanív je náročná a pomalá, možnosti MSC pri ich liečbe by boli nespočetné. Zatiaľ sa však ukazujú byť tieto bunky použiteľné pri liečbe z hľadiska podpory vlastnej regenerácie tkanív, a napomáhajú tak ich oprave pravdepodobne bez vlastnej diferenciácie a inkorporácie, a to nepriamo cez vytváranie vhodného prostredia či podporovaním vylučovaným sekretómom. Aj to môže byť dôležitá pomoc pri terapii, ale je dôležité identifikovať celý potenciál týchto buniek, aby sa mohlo naplno začať pracovať na využití ich terapeutických možností.

## 6. POUŽITÁ LITERATÚRA

- Baddoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G. C., a iní. (2003). Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89, s. 1235-1249.
- Bae, K. S., Park, J. B., Kim, H. S., Kim, D. S., Park, D. J., & Kang, S. J. (máj 2011). Neuron-like differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Yonsei Med J*, 52(3), s. 401-412.
- Bongso, A., & Richards, M. (2004). History and perspective of stem cell research. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18(6), s. 827-842.
- Bronzi, D., Bramanti, V., Tomassoni, D., Laureanti, F., Grasso, S., Volsi, G. L., a iní. (december 2010). Neural markers expression in rat bone marrow mesenchymal stem cell cultures treated with neurosteroids. *Neurochemical research*, 35(12), s. 2154-2160.
- Caplan, A. (júl 1994). The mesengenic process. *Clinics in plastic surgery*, 21(3), s. 429-435.
- Chen, Y., Shao, J.-Z., Xiang, L.-X., Dong, X.-J., & Zhang, G.-R. (2008). Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40, s. 815-820.
- Cooke, M. J., Zahir, T., Phillips, S. R., Shah, D. S., Athey, D., Lakey, J. H., a iní. (jún 2010). Neural differentiation regulated by biomimetic surfaces presenting motifs of extracellular matrix proteins. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 93(3), s. 824-832.
- Cova, L., Armentero, M.-T., Zennaro, E., Calzarossa, C., Bossolasco, P., Busca, G., a iní. (2012). Multiple neurogenic and neurorescue effects of human mesenchymal stem cell after transplantation in an experimental model of Parkinson's disease. *Brain research*, 1311, s. 12-27.
- Dharmasaroja, P. (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for the treatment of ischemic stroke. *Journal of Clinical Neuroscience*, 16, s. 12-20.
- Egea, V., Baumgarten, L., Schichor, C., Berninger, B., Popp, T., Neth, T., a iní. (december 2010). TNF- $\alpha$  respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma. *Cell Death and Differentiation*, s. 1-11.
- Ferreira, L. M., & Mostajo-Radji, M. A. (2013). How induced pluripotent stem cells are redefining personalized medicine. *Gene*, 520, s. 1-6.

- Ferroni, L., Gardin, C., Tocco, I., Epis, R., Casadei, A., Vindigni, V., a iní. (2013). Potential for neural differentiation of mesenchymal stem cells. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 129, s. 89-115.
- Forostyak, S., Jendelova, P., Kapcalova, M., Arboleda, D., & Sykova, E. (október 2011). Mesenchymal stromal cells prolong the lifespan in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cytotherapy*, 13(9), s. 1036-1046.
- Foudah, D., Redondo, J., Caldara, C., Carini, F., Tredici, G., & Miloso, M. (2012). Expression of neural markers by undifferentiated rat mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Glavaski-Joksimovic, A., & Bohn, M. C. (2013). Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 247, s. 25-38.
- Götherström, C., Ringdén, O., Tammik, C., Zetterberg, E., Westgren, M., & Le Blanc, K. (január 2004). Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190(1), s. 239-245.
- Götherström, C., Ringdén, O., Westgren, M., Tammik, C., & Le Blanc, K. (2003). Immunomodulatory effects of human foetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Bone Marrow Transplantation*, 32, s. 265-272.
- Huang, B., Tabata, Y., & Gao, J.-Q. (2012). Mesenchymal stem cells as therapeutic agents and potential targeted gene delivery vehicle for brain diseases. *Journal of Controlled Release*, 162, s. 464-473.
- Ikegame, Y., Yamashita, K., Hayashi, S.-I., Mizuno, H., Tawada, M., You, F., a iní. (2011). Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy*, 13, s. 675-685.
- Karussis, D., & Kassis, I. (2008). The potential use of stem cells in multiple sclerosis: An overview of the preclinical experience. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 110, s. 889-896.
- Khang, G., Kim, H. L., Hong, M., & Lee, D. (marec 2012). Neurogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells onto  $\beta$ -mercaptoethanol-loaded PLGA film. *Cell and tissue research*, 347(3), s. 713-724.
- Lai, C. R., Arslan, F., Tan, S. S., Tan, B., Choo, A., Lee, M. M., a iní. (jún 2010). Derivation and characterization of human fetal MSCs: An alternative cell source for large-scale production of cardioprotective microparticles. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(6), s. 1215-1224.
- Lam, P. K., Lo, A. W., Wang, K. K., Lau, H. C., Leung, K. K., Li, K. T., a iní. (2013). Transplantation of mesenchymal stem cells to the brain by topical application in

- an experimental traumatic brain injury model. *Journal of Clinical Neuroscience*, 20, s. 306-309.
- Lambert, A. P., Zandonai, A. F., Bonatto, D., Machado, D. C., & Henriques, J. A. (march 2009). Differentiation of human adipose-derived adult stem cells into neuronal tissue: Does it work? *Differentiation*, 77(3), s. 221-228.
- Lee, J. K., Jin, H. K., & Bae, J.-s. (2009). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells reduce brain amyloid- $\beta$  deposition and accelerate the activation of microglia in an acutely induced Alzheimer's disease mouse model. *Neuroscience Letters*, 450, s. 136-141.
- Lu, P., Blesch, A., & Tuszynski, M. H. (júl 2004). Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? *Journal of Neuroscience Research*, 77(2), s. 174-191.
- Ma, K., Fox, L., Shi, G., Shen, J., Liu, Q., Pappas, J., a iní. (december 2011). Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Neurological research*, 33(10), s. 1083-1093.
- Mammadov, B., Karakas, N., & Isik, S. (august 2011). Comparison of long-term retinoic acid-based neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells. *In vitro cellular & developmental biology. Animal.*, 47(7), s. 484-491.
- Mareschi, K., Novara, M., Rustichelli, D., Ferrero, I., Guido, D., Carbone, E., a iní. (2006). Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K<sup>+</sup> channel types. *Experimental Hematology*, 34, s. 1563-1572.
- Morita, E., Watanabe, Y., Ishimoto, M., Nakano, T., Kitayama, M., Yasui, K., a iní. (október 2008). A novel cell transplantation protocol and its application to an ALS mouse model. *Experimental Neurology*, 213(2), s. 431-438.
- O'Donoghue, K., & Fisk, N. M. (2004). Fetal stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18(6), s. 853-875.
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (november 2007). Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem cells*, 25(11), s. 2896-2902.
- Reh, T. A. (2002). Neural stem cells: form and function. *Nature Neuroscience*(5), s. 392-394.
- Sadan, O., Shemesh, N., Barzilay, R., Dadon-Nahum, M., Blumenfeld-Katzir, T., Assaf, Y., a iní. (2012). Mesenchymal stem cells induced to secrete neurotrophic factors attenuate quinolinic acid toxicity: A potential therapy for Huntington's disease. *Experimental Neurology*, 234, s. 417-427.

- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (august 2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), s. 663-676.
- Tondreau, T., Lagneaux, L., Dejeneffe, M., Delforge, A., Massy, M., Mortier, C., a iní. (2004). Isolation of BM mesenchymal stem cells by plastic adhesion or negative selection: phenotype, proliferation kinetics and differentiation potential. *Cytotherapy*, 6(4), s. 372-379.
- Verfaillie, C. M. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *TRENDS in Cell Biology*, 12(11).
- Wislet-Gendebien, S., Laudet, E., Neirinckx, V., & Rogister, B. (2012). Adult bone marrow: Which stem cells for cellular therapy protocols in neurodegenerative disorders? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.
- Wislet-Gendebien, S., Wautier, F., Leprince, P., & Rogister, B. (2005). Astrocytic and neuronal fate of mesenchymal stem cells expressing nestin. *Brain Research Bulletin*, 68, s. 95-102.
- Wong, R. S. (2011). Mesenchymal stem cells: Angels or demons? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011.
- Ye, Y., Zeng, Y.-M., Wan, M.-R., & Lu, X.-F. (apríl 2011). Induction of human bone marrow mesenchymal stem cells differentiation into neural-like cells using cerebrospinal fluid. *Cell biochemistry and biophysics*, 59(3), s. 179-184.
- Zafranskaya, M. M., Nizheharodova, D. B., Yurkevich, M. Y., Lamouskaya, N. V., Motuzova, Y. M., Bagatka, S. S., a iní. (2013). In vitro assessment of mesenchymal stem cells immunosuppressive potential in multiple sclerosis patients. *Immunology Letters*, 149, s. 9-18.
- Zhang, Z.-X., Guan, L.-X., Zhang, K., Zhang, Q., & Dai, L.-J. (2008). A combined procedure to deliver autologous mesenchymal stromal cells to patients with traumatic brain injury. *Cytotherapy*, 10(2), s. 134-139.
- Zilka, N., Zilkova, M., Kazmerova, Z., Sarissky, M., Cigankova, V., & Novak, M. (2011). Mesenchymal stem cells rescue the Alzheimer's disease cell model from cell death induced by misfolded truncated tau. *Neuroscience*, 193, s. 330-337.