

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Kmenové buňky v terapii neurodegenerativních
onemocnění

Martin Mucha

Bakalářská práce

2017

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Stem cells in therapy of neurodegenerative diseases

Martin Mucha

Bachelor work

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin Mucha**
Osobní číslo: **C13358**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Kmenové buňky v terapii neurodegenerativních onemocnění**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Vypracujte literární rešerši obsahující:

1. Seznamte se s literárními údaji o kmenových buňkách a buněčné terapii neurodegenerativních chorob. Popište možnosti a omezení kmenových buněk.
2. Kmenové buňky a Alzheimerova choroba (popis, příčina, rizikové faktory, příznaky, léčba a buněčná terapie).
3. Parkinsonova choroba.
4. Amyotrofická laterální skleróza.
5. Roztroušená skleróza.
6. Huntingtonova choroba.
7. Využití kmenových buněk při léčbě poranění míchy.
8. Využití kmenových buněk při cévní mozkové příhodě.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Lenka Brůčková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

18. prosince 2015

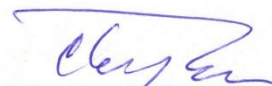
Termín odevzdání bakalářské práce:

3. července 2016



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne:

Martin Mucha

Poděkování

Rád bych poděkoval paní Mgr. Lence Brůčkové, Ph.D. za odborné vedení, konzultace a trpělivost během zpracování této bakalářské práce.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá neurodegenerativními chorobami a jejich léčbou pomocí kmenových buněk. Práce se zaměřuje na charakteristiky jednotlivých chorob, klinické projevy, současnou léčbu a nejnovější úspěchy s využitím terapie kmenovými buňkami.

KLÍČOVÁ SLOVA

Neurodegenerativní choroba, Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, roztroušená skleróza, poškození míchy, cévní mozková příhoda

ANNOTATION

This bachelor thesis deals with neurodegenerative diseases and their treatment with stem cell therapy. The work focuses on the characteristics of individual diseases, clinical manifestations, existing treatment and latest success with using stem cell therapy.

KEY WORDS

Neurodegenerative disease, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, multiple sclerosis, spinal cord injury, brain stroke

SEZNAM ZKRATEK

α SYN – protein α -synuclein

A β peptidy – beta amyloidové peptidy

AD – Alzheimerova choroba (Alzheimer's Disease)

ALS – amyotrofická laterální skleróza (Amyotrophic Lateral Sclerosis)

APOE – Apolipoprotein E

APP – amyloidní prekurzorový protein (Amyloid Precursor Protein)

BS – cévní mozková příhoda (Brain Stroke)

CD – diferenciační skupina (Cluster of Differentiation)

ESCs – embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells)

FTD – frontotemporální demence (Frontotemporal Dementia)

HD – Huntingtonova choroba (Huntington's Disease)

iPSC – indukované pluripotentní kmenové buňky (induced Pluripotent Stem Cells)

MS – roztroušená skleróza (Multiple Sclerosis)

MHC – hlavní histokompatibilní komplex (Major Histocompatibility Complex)

MSCs – mezenchymální kmenové buňky (Mesenchymal Stem Cells)

NDs – neurodegenerativní choroby (Neurodegenerative Diseases)

NFTs – „neurofibrilární klubka“ (Neurofibrillary Tangles)

NSCs – neurální kmenové buňky (Neural Stem Cells)

PD – Parkinsonova choroba (Parkinson's Disease)

PSEN1 – protein presenilin 1

PSEN2 – protein presenilin 2

SCI – poškození míchy (Spinal Cord Injury)

SOD1 – superoxid dismutáza 1

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Příprava indukované kmenové buňky z fibroblastu, pomocí retrovirových transkripčních faktorů [3].	16
Obrázek 2: Schéma potenciálního využití kmenových buněk v terapii Alzheimerovy choroby [134].	25
Obrázek 3: Zvířecí model autologní transplantace dopaminergních neuronů získaných z indukovaných pluripotentních kmenových buněk [89].	31
Obrázek 4: Schéma zobrazující přípravu fenotypicky specifických iPSCs a jejich využití v terapii amyotrofické laterální sklerózy [102].	34
Obrázek 5: Schéma terapeutických přístupů v léčbě Huntingtonovi choroby [115].	39
Obrázek 6: Mechanizmy účinku mezenchymálních kmenových buněk v léčbě cévní mozkové příhody [130].	44

Obsah

SEZNAM ZKRATEK	9
SEZNAM OBRÁZKŮ	10
ÚVOD.....	13
1 BUNĚČNÁ TERAPIE NEURODEGENERATIVNÍCH CHOROB	14
1.1 Embryonální kmenové buňky	14
1.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	15
1.3 Mezenchymální kmenové buňky	17
1.4 Neurodegenerativní choroby	17
1.5 Využití kmenových buněk jako modelu neurodegenerativních chorob	18
2 KMENOVÉ BUŇKY A ALZHEIMEROVA CHOROBA	20
2.1 Alzheimerova choroba	20
2.2 Amyloidní plaky	21
2.3 Tau patologie.....	21
2.4 Další rizikové faktory	22
2.5 Gliové buňky a Alzheimerova choroba	23
2.6 Zvířecí modely Alzheimerovy choroby a stárnutí.....	24
2.7 Farmakologická léčba.....	25
2.8 Kmenové buňky a Alzheimerova choroba	25
2.8.1 Mezenchymální kmenové buňky	26
2.8.2 Neurální kmenové buňky	26
2.8.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	27
3 KMENOVÉ BUŇKY A PARKINSONOVA CHOROBA.....	28
3.1 Parkinsonova choroba.....	28
3.2 Genetické faktory	28
3.3 Farmakologická léčba.....	29
3.4 Kmenové buňky a Parkinsonova choroba	29
4 KMENOVÉ BUŇKY A AMYOTROFICKÁ LATERÁLNÍ SKLERÓZA	32
4.1 Amyotrofická laterální skleróza	32
4.2 Genetické faktory	32
4.3 Kmenové buňky a amyotrofická laterální skleróza	33
4.3.1 Embryonální kmenové buňky.....	33
4.3.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	33
4.3.3 Neurální kmenové buňky	34
4.3.4 Mezenchymální kmenové buňky	34

5 KMENOVÉ BUŇKY A ROZTROUŠENÁ SKLERÓZA	36
5.1 Roztroušená skleróza	36
5.2 Genetické faktory	36
5.3 Kmenové buňky a roztroušená skleróza	36
6 KMENOVÉ BUŇKY A HUNTINGTONOVA CHOROBA	38
6.1 Huntingtonova choroba	38
6.2 Kmenové buňky a Huntingtonova choroba	38
7 VYUŽITÍ KMENOVÝCH BUNĚK PŘI LÉČBĚ PORANĚNÍ MÍCHY	41
7.1 Poranění míchy	41
7.2 Kmenové buňky a poranění míchy	41
8 VYUŽITÍ KMENOVÝCH BUNĚK PŘI CÉVNÍ MOZKOVÉ PŘÍHODĚ	43
8.1 Cévní mozková příhoda	43
8.2 Kmenové buňky a cévní mozková příhoda	43
9 ZÁVĚR	45
10 ZDROJE	46

ÚVOD

Od původního objevu kmenových buněk bylo v této perspektivní oblasti učiněno mnoho objevů, které vedly jak k rozšíření poznatků o samotných kmenových buňkách, tak i jejich klinickém využití.

Jednou z mnoha oblastí klinického využití kmenových buněk se v posledních letech staly neurodegenerativní choroby. Nejen terapie, ale i samotné studium příčin a mechanismů, které působí v rámci těchto chorob, bylo doposud velmi složité. Z toho důvodu jsou velké naděje vkládány do výzkumu kmenových buněk.

Cílem této bakalářské práce je nejprve krátké seznámení s určitými typy kmenových buněk, které jsou v rámci experimentů využívány, dále stručný popis neurodegenerativních onemocnění a využití kmenových buněk v rámci jejich studia a terapie. V práci je postupně zmíněna Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, Amyotrofická laterální skleróza, Roztroušená skleróza a Huntingtonova choroba. V poslední řadě je zmíněn také pokrok v terapii poranění míchy a cévní mozkové příhody.

1 BUNĚČNÁ TERAPIE NEURODEGENERATIVNÍCH CHOROB

Buněčná terapie je označení pro způsob léčby, který využívá vnesení buněčného materiálu do těla pacienta. V dřívějších dobách se jednalo například o transplantaci dárcovské kostní dřeně leukemickým pacientům, jejíž novější alternativou je transplantace buněk získaných z pupečníku [1].

V současnosti je však pojem buněčná terapie spojený především s klinickým využitím znalostí v oblasti kmenových buněk a jejich derivátů.

V rámci buněčné terapie se využívají především tři typy kmenových buněk: embryonální kmenové buňky, indukované pluripotentní kmenové buňky a mezenchymální kmenové buňky [2].

1.1 Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky (ESCs, Embryonic Stem Cells) jsou získávány z vnitřní masy buněk blastocyst raných embryí. Mezi jejich nejvýraznější rysy patří schopnost nekonečné sebeobnovy a možnost diferenciaci do buněčných linií všech tří zárodečných listů [3].

Zjištění, že ESCs jsou schopny se diferenciovat v požadovaný buněčný typ, se stalo základem vývoje buněčné terapie na bázi kmenových buněk. Při samovolné diferenciaci ESC *in vitro* dochází ke vzniku požadovaného buněčného typu ve smíšené populaci, kterou není možné dále použít v transplantačních studiích [4].

Jak již bylo uvedeno, ESCs jsou schopny produkovat velké množství buněčných linií, a proto je velmi žádoucí selekce požadovaného typu z heterogenní populace. Jedním ze způsobů je využití specifického promotoru, který řídí expresi genu pro antibiotickou rezistenci [5]. Další možností je transdukce genomu se specifickým promotorem, který kontroluje expresi genu pro zeleně fluoreskující protein [6]. Takto geneticky upravené buňky však mohou být odmítnuty, protože exprimují cizí protein nebo u nich může dojít k maligní transformaci [7].

Po úspěšné selekci buněčných derivátů je zjišťována jejich fyziologická funkce. Bylo prokázáno, že mnohé diferencované buněčné typy odvozené z myších ESCs *in vitro* (např. dopaminergní neurony a kardiomyocyty) jsou diferencované terminálně, mají tedy fyziologicky zralý fenotyp a fungují normálním způsobem *in vitro* [8]. Kultury diferencovaných ESCs mohou však obsahovat také multipotentní progenitory [9].

Nejvýraznějším negativem ESCs jsou etické a náboženské otázky spojené s jejich získáváním z raných embryí, které velmi výrazně brzdí výzkum a klinické testy. Zdroj embryí je velmi omezený a stejně tak i množství získávaných kmenových buněk, což vede k dalšímu omezení klinických testů. Také bylo zjištěno, že buňky diferencované z ESCs jsou částečně imunogenní, což vedlo po transplantaci pacientovi k odmítnutí imunitním systémem [3].

Potenciálně by bylo možné omezit imunitní odpověď pacientova organismu snížením imunogenicity transplantovaných buněk. To je prováděno homologní rekombinací, která vyřadí MHC molekuly I. a II. třídy v myších ESCs. Přesto byly štěpy dále odvrhovány a destruovány NK buňkami [10].

Předpokládá se tedy, že kromě vymazání cizích MHC genů by bylo zapotřebí vložit do genomu štěpu i MHC geny příjemce, aby byl transplantát považován za tělu vlastní [11].

Další možností je zavedení genů pro imunosupresivní molekuly, např. Fas-ligand, nebo odstranění imunostimulačních proteinů, jako jsou antigen B7 a CD40-ligand (CD, Cluster of Differentiation) [12].

Je zřejmé, že imunogenita ESCs výrazně omezuje jejich využitelnost a snahy o její snížení nebo odstranění pouze komplikují celý proces.

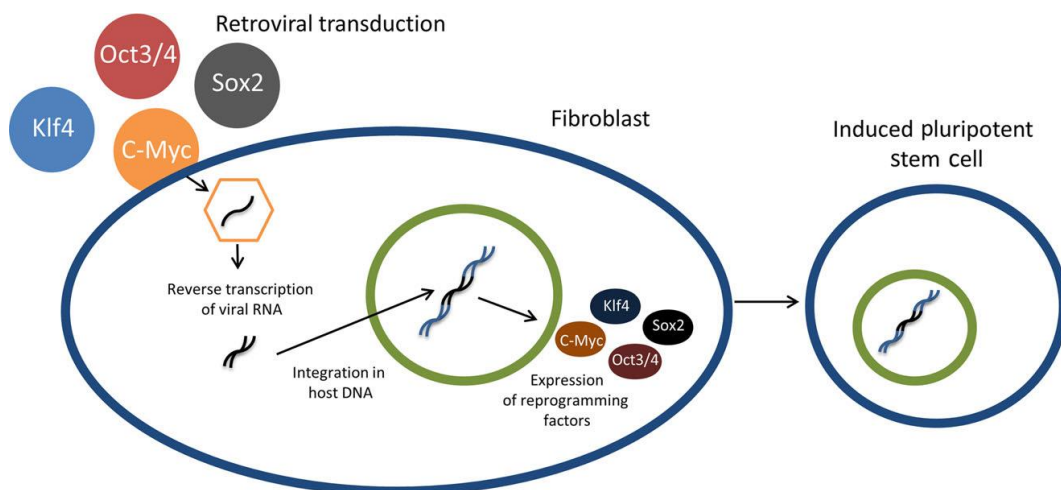
1.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Podobně jako embryonální kmenové buňky, tak i indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs, induced Pluripotent Stem Cells) jsou schopny neomezené sebeobnovy a diferenciaci do buněčných linií všech tří zárodečných listů, ale na rozdíl od výše zmíněných, jejich studium a použití není omežováno etickými otázkami [2].

K výhodám iPSCs patří skutečnost, že mohou být získány autologně, přímo od léčeného pacienta. Díky tomu nedochází k odmítání transplantátů, jako je tomu u ESCs. Jejich kultivací je také možné získat dostatečné množství buněk, aby bylo použito dalších typů kmenových buněk nepotřebné. Tyto vlastnosti přivedly iPSCs do popředí zájmu, zejména pro využití v regenerativní medicíně, ale také pro tvorbu fyziologických modelů různých onemocnění, které by byly určeny ke studiu chorob a testování transplantačních metod nebo účinnosti léků [3].

Produkce prvních iPSCs byla provedena za pomoci čtyř transkripčních faktorů: *Sox2*, *Klf4*, *Oct4* a *C-Myc* (Obr. 1), které jsou známy jako „Yamanaka factors“ po jednom z objevitelů této metody [13].

Při procesu získávání iPSCs jsou dospělé somatické buňky infikovány retrovirem, který obsahuje reprogramovací faktory. Následně jsou tyto buňky kultivovány a za dva až tři týdny mohou být z uvedené kultury získány iPSCs, a to selekcí exprese *Fbx15* [3].



Obrázek 1: Příprava indukované kmenové buňky z fibroblastu, pomocí retrovirových transkripčních faktorů [3].

S genetickou manipulací reprogramovaných buněk ovšem souvisí jejich omezená aplikace v regenerativní medicíně. Dalším vážným tématem při získávání iPSCs je efektivita reprogramovacích metod. Podle některých výzkumů je důležitým faktorem, který efektivitu ovlivňuje, stav původních buněk, který funguje proti změnám v genomu. Odstraněním těchto hlavních bariér je možné teoreticky dosáhnout efektivitu blízcí se 100 %. Mezi základní bariéry patří signální cesty proteinů *p53* a *p21* [13].

Dalším zjištěním bylo, že při použití kmenových nebo progenitorových buněk, které jsou schopny exprimovat faktory pluripotence, může být pro přeprogramování použito méně reprogramovacích faktorů, ačkoli faktor *Oct4* se zdá být klíčový, a do budoucna lze předpokládat, že dospělé kmenové a progenitorové buňky by bylo možné jednoduše přeprogramovat do stavu iPSCs i bez exprese reprogramovacích faktorů, pouhým odstraněním bariér a aktivací zesilovačů [14].

Stále zůstává otázkou, jak rovnocenné jsou schopnosti iPSCs v porovnání s ESCs. Na myším modelu bylo zjištěno, že získání terminální buňky z iPSCs je méně úspěšné, než při použití ESCs [15]. Tato snížená efektivita přeměny iPSCs do požadovaného typu naštěstí neovlivňuje kvalitu výsledné buňky [16].

Doposud se pracovalo s předpokladem, že původní typ přeprogramované buňky nemá na vzniklou indukovanou kmenovou buňku vliv. Zjištění, že si iPSCs ponechávají určitou epigenetickou paměť, která poskytuje výhody při diferenciaci do určitých buněčných linií, tento

předpoklad vyvrátilo. Při snaze o získání konkrétní linie buněk, například neuronů, se zdá být výhodnější, aby původní buněčné linie pocházely ze stejného zárodečného listu, v tomto případě ektodermu. Specifičtějším výběrem původních buněk je možné snížit i množství vznikajících tumorů [17].

1.3 Mezenchymální kmenové buňky

Lidské mezenchymální kmenové buňky (MSCs, Mesenchymal Stem Cells), které svým tvarem připomínají fibroblasty, jsou relativně snadno izolovány z mnoha různých tkání včetně kostní dřeně, tukové tkáně, placenty a pupečnickové krve [18]. Mezi jejich základní rysy patří schopnost *in vitro* se množit a diferencovat do mezodermálních buněčných linií, kam patří osteoblasty, adipocyty a chondroblasty. Dále jsou MSCs schopny se ve vhodném prostředí diferencovat do kardiomyocytů, hepatocytů, endotelových buněk, buněk hladké svaloviny a buněk neurálních [19]. Nejvýraznějším rysem MSCs je jejich interakce s imunitním systémem. Samotné kmenové buňky exprimují velmi nízkou hladinu molekul MHC systému, což z nich činí imunitně privilegované buňky, které nespouští imunitní odpověď. Tohoto faktu se využívá při alogenních transplantacích [20].

Kromě toho jsou schopny uvolňovat imunopresivní faktory, které jsou kromě jiného schopny inhibovat množení imunitních buněk jako jsou lymfocyty T, lymfocyty B a NK buňky. Obecně mají MSCs protizánětlivý vliv a v nedávné době byl hlášen i antimikrobiální účinek potlačující zánětlivou reakci. Mimo to se v klinických studiích zkoumá i jejich pozitivní vliv na novotvorbu cév [19].

1.4 Neurodegenerativní choroby

Centrální nervový systém patří mezi nejkřehčí prvky lidského těla a má omezené regenerační schopnosti jak akutních poškození, tak chronických onemocnění. Neurodegenerativní choroby (NDs, Neurodegenerative Diseases) jsou charakterizovány postupnou ztrátou neurálních buněčných podtypů v mozku nebo míše, a mohou mít ojedinělý nebo dědičný výskyt. Současná terapie je zaměřena na zmírnění symptomů a zpomalení postupu nemoci, což vyvolává potřebu vývoje nových terapeutických přístupů a dalšího studia onemocnění [3]. Nejpatrnější podobností mezi jednotlivými NDs je atypická tvorba proteinů a indukce buněčné smrti. Pro pochopení složitosti řízení rovnovážných hladin, jsou zkoumány cesty syntézy a degradace těchto toxických proteinů [21].

Kmenové buňky dospělého mozku jsou omezené svým počtem i specifickými oblastmi svého výskytu. Na zvířecích modelech již bylo testováno použití kmenových buněk z různých

zdrojů a terapeuticky bylo možné nahradit požadovaný typ nervových buněk, což vedlo k obnově ztracené funkce, např. při poranění míchy nebo Parkinsonově chorobě [22, 23].

Přesto klinické testy provedené na lidech, využívající neurální kmenové buňky (NSCs, Neural Stem Cells), vedly k velmi nejednoznačným výsledkům. V některých případech byla hlášena výrazná zlepšení, ale v jiných docházelo k dalšímu zhoršení funkce a projevům vedlejších účinků. Klinické testy na lidských pacientech tak zůstávají velkou výzvou [24].

1.5 Využití kmenových buněk jako modelu neurodegenerativních chorob

Jak bylo uvedeno výše, kromě přímého použití iPSCs v rámci regenerativní medicíny, je neméně důležitou oblastí i tvorba modelů onemocnění. Zejména v současnosti, kdy úspěšná léčba zvířecích modelů onemocnění neodpovídá výsledkům klinických testů s lidskými pacienty [3].

Je zde důležité zmínit rozlišení neurodegenerativních chorob na základě časnosti jejich propuknutí. Brzy propukající choroby jsou obecně způsobovány expresí proteinů porušených genů a vytvoření modelu pomocí iPSCs je relativně snadné [25]. Na druhé straně leží pozdě propukající NDs, které jsou způsobeny složitým mechanismem, který zahrnuje expresi proteinů porušených genů i faktory prostředí. K tvorbě takového modelu jsou použity specifické genetické mutace, které simulují rozvoj příznaků onemocnění v iPSCs [26, 27].

Použití iPSCs zůstává pro tvorbu modelů důležité, avšak genetická rozmanitost mezi jednotlivými populacemi iPSCs, která vede k rozdílům například v propuknutí a průběhu onemocnění, má velký dopad na výběr buněčných linií vhodných k experimentu. Mnohé vědecké skupiny se pokoušejí tuto rozmanitost překonat výběrem několika málo fenotypů ve velké sbírce buněčných linií, nebo nalezením silného fenotypu v menší skupině [28, 29].

Každá studie iPSCs se potýkala s otázkou, jak dalece studované fenotypy souvisí s chorobou, kterou modelují. A zda daný fenotyp není ovlivněn protektivními nebo obnovujícími faktory v genotypu jedince. Nedávné pokroky v postupech genomové editace, zejména v použití Cas9 nukleázových strategií, umožňují vytvářet izogenní linie iPSCs [30].

V současné době byly odhaleny tři systémy vykonávající editace genomu skrze reparace DNA: „zinc-finger-nucleases“ (ZFN), „transcription activator-like effector nucleases“ (TALENs) a „clustered regularly interspaced short palindromic repeats“ (CRISPR), kdy poslední jmenovaný využívá Cas9 nukleázu. Principem těchto systémů je nejprve vytvoření řízených DNA zlomů a následná oprava zlomů, která vede ke vložení nebo odstranění mutací,

případně může být zlom opraven metodou homologní rekombinace za pomoci vektoru, který nese požadovanou mutaci [31].

Výhodou izogenních buněčných linií je fakt, že jsou studovány pouze rozdíly spojené s modelovanou chorobou, protože genetické pozadí všech linií je totožné. To je ideální pro studium mutací způsobujících chorobu, zatímco ostatní genetické varianty jsou obtížnější k modelaci, protože se mohou k chorobě vztahovat pouze v kombinaci. Tudíž je vhodné využití dvou buněčných linií pacienta, kdy v jedné bude námi žádaná mutace opravena a souběžně bude kultivována kontrolní linie, s mutací přítomnou. Techniky užívající mutovanou nukleázu Cas9 spojenou s transkripčními aktivátory či inhibitory nám umožňují zkoumat důsledky zvýšené nebo snížené exprese specifických genů beze změn samotného genomu. Editace genomu bude důležitou strategií k minimalizování efektu genetických variant v případě buněčných linií lidských iPSCs [32].

2 KMENOVÉ BUŇKY A ALZHEIMEROVA CHOROBA

2.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD, Alzheimer's Disease) patří mezi nejznámější neurodegenerativní choroby. Je zapojena do 50 – 70 % všech případů demence a trpí jí téměř polovina lidí nad 85 let věku [33]. Celosvětově se objeví nový případ každých 8 vteřin, čímž se stává toto onemocnění pomalu epidemií [34]. Už podle odhadů z roku 2007 připadne na každých 85 zdravých jedinců jeden postižený AD a to do roku 2050 [35].

AD je charakterizována ztrátou paměti, zhoršením kognitivních schopností, změnami chování a zhoršeným vykonáváním každodenních činností [36]. Choroba postihuje zejména starší jedince, ale výraznou emocionální, časovou i finanční zátěž pociťuje blízké okolí a především rodiny, které se o nemocné starají. Zvyšující se dlouhověkost a vysoký výskyt choroby skrývají závažný sociální problém [37].

Onemocnění můžeme rozdělit na základě věku kdy propukne. Brzy propukající (early-onset) tzv. familiární forma AD tvoří přibližně 1 – 6 % všech případů a projevuje se zhruba mezi 30. a 60. rokem věku. Později propukající (late-onset) tzv. sporadická forma AD způsobuje okolo 90 % případů a její projevy se začínají objevovat po 60. roce věku [38].

Familiární forma AD (FAD) je ve většině případů spojena s dědičnými mutacemi amyloidního prekurzorového proteinu (APP), jež činí okolo 16 % případů FAD, a dvou proteinů tvořící γ -sekretázu, která APP dále zpracovává: presenilin 1 (PSEN1) tvoří 30 – 70 % FAD a presenilin 2 (PSEN2) méně než 5 % FAD případů [39].

Pro sporadickou formu AD je nejznámějším rizikovým faktorem specifický gen APOE, který leží na 19. chromozomu a kóduje tvorbu apolipoproteinu E. V centrálním nervovém systému je tento protein produkován astrocyty a mikroglie, a podílí se na transportu i metabolismu cholesterolu [37]. Je známa existence genu APOE ve třech izoformách APOE2, APOE3, APOE4. Největší riziko rozvoje AD je spojováno s genem APOE4, jehož zastoupení v populaci je asi 15 % [40].

Mezi dva charakteristické patologické znaky AD v lidském mozku patří hromadění β -amyloidových ($A\beta$) peptidů do mimobuněčných agregátů, tzv. $A\beta$ plaků a druhým znakem je nitrobuněčné hromadění fosforylovaných druhů proteinu tau do „neurofibrilárních klubek“ (NFTs, neurofibrillary tangles) [30].

2.2 Amyloidní plaky

Amyloidní prekurzorový protein (APP), který má důležitou roli v neurálním vývoji, je štěpen pomocí β -sekretázy za vzniku aminokyselinového fragmentu, který je následně štěpen pomocí γ -sekretázy na β -amyloidový fragment a nitrobuněčnou doménu APP (AICD, amyloid precursor protein intracellular domain). Tímto mechanismem štěpení vznikají β -amyloidové fragmenty, které obsahují 36 až 43 aminokyselin. Nejčastějším fragmentem ve zdravém i chorobou postiženém mozku je β -amyloidní peptid o délce 40 aminokyselin ($A\beta_{40}$), následovaný peptidem o délce 42 aminokyselin ($A\beta_{42}$). Vzniklé $A\beta$ peptidy pak svým extracelulárním usazováním vytváří tzv. β -amyloidní plaky [37]. Byl učiněn předpoklad, že ukládání $A\beta$ peptidů a následný vznik plaků, vede k AD, poté ke vzniku „neurofibrilárních klubek“, ztrátě neuronů, poškození cév a demenci [41]. Ztráta paměti v raném stádiu choroby může být částečně způsobena poškozením synapsí, jež je vyvoláno amyloidními oligomery. Kromě toho bylo zjištěno, že $A\beta$ dimery a oligomery vyvolávají fosforylaci Tau proteinu a vznik „neurofibrilárních klubek“, dále se přidává vliv oxidativního stresu, kalciového stresu spojeného s endoplazmatickým retikulem a zvyšuje se citlivost neuronů na excitotoxicitu [37].

K léčbě AD byla použita terapie pomocí aktivní, respektive pasivní imunizace cílicí na $A\beta$ peptidy. Při použití jedné dávky přípravku solanezumab, což je anti-amyloidní monoklonální protilátka, nebylo v klinických testech zaznamenáno žádné zlepšení [42]. Opakované použití přípravku také neukázalo výrazné zlepšení, ale bylo zaznamenáno zpomalení ztráty kognitivních funkcí u přibližně třetiny pacientů s mírným průběhem choroby. Tento nálezn podporuje myšlenku, že terapie cílicí na amyloidní peptidy by mohla být efektivnější při použití v ranějším stádiu AD nebo před objevem viditelných symptomů [43].

2.3 Tau patologie

Tau je protein potřebný pro stabilizaci mikrotubulů a růst neuritů. Normálně se váže s tubulinem, usnadňuje skládání mikrotubulů a stabilizuje jejich strukturu. Neurofibrilární patologie spojená s tímto proteinem byla nalezena u více než 20 neurodegenerativních onemocnění. Fosforylace Tau proteinu na mikrotubuly vázajících opakováních (R – repeats) je nezbytná pro funkční růst axonů. V dospělém mozku je poměr mezi 3R a 4R izoformou Tau obecně 1:1, ale odchylky v poměru mohou způsobit Tau patologii, někdy známou jako tzv. Tauopatie [37]. Hyperfosforylované Tau proteiny se samovolně seskupují do párových spirálovitých vláken, která následně mohou tvořit NFTs. V případě AD se hromadí hyperfosforylované Tau proteiny, což vede k jejich oddělení od mikrotubulů, čímž je

destabilizují a dochází k poruše neurálního transportu. Následně dochází ke ztrátě synapsí a aktivaci mikroglíí [44].

Množství NFTs koreluje s průběhem onemocnění, ale neodpovídá ztrátě neuronů a poruchám paměti, které vzniku NFTs předchází. Jedna studie dokonce uvádí, že schopnost učit se a paměť byly obnoveny se zvyšující se hladinou Tau oligomerů, ačkoli mohou být cytotoxické [45].

S Tau proteinem spojená patologie je přítomna v mozkové kůře všech lidí starších 75 let. Gen pro tento protein, který je lokalizován na lidském chromozomu 17, byl nalezen u různých forem demence mimo AD. Ve více než 100 rodinách bylo popsáno 44 patogenních mutací proteinu Tau [37].

Fosforylovaný Tau protein se začíná objevovat v mozkovém kmeni, přesněji v locus coeruleus, následně v mediálním spánkovém laloku, limbických strukturách, asociační mozkové kůře a primárních mozkových kůrách. Naopak, ukládání A β peptidů se nejprve objevuje v asociační mozkové kůře a poté se rozvíjí v nižších oblastech kůry, hluboké šedé kůře mozkové, mozkovém kmeni a mozečku [46]. To naznačuje, že Tau patologie a ukládání A β peptidů spolu nesouvisí přímo. Imunologická léčba A β peptidů je zcela odstranila, ale patologie spojená s Tau zůstala beze změn a nebylo tedy dosaženo klinického zlepšení [47].

Imunoterapie Tau patologie je v současné době ve stádiu testů. Pomocí pasivní imunizace skrze protilátky proti Tau proteinu, bylo dosaženo snížení patologie a oddálení projevů motorických deficitů u transgenních myší [48].

2.4 Další rizikové faktory

U onemocnění jako je AD, funkční nedostatky v proteinové homeostáze způsobují hromadění poškozených nebo chybně složených proteinů ve stárnoucích buňkách [49]. Tyto nesložené nebo špatně složené proteiny se hromadí v místě syntézy, tedy v endoplazmatickém retikulu, a vedou k aktivaci ubiquitin-proteazomového systému, komplexní sítě signálních drah, řídicí regulaci buněčných procesů k udržení homeostázy. Porucha tohoto obranného mechanismu vede ke spuštění apoptotických signálů, které způsobí nevratné poškození buňky a posléze buněčnou smrt [50]. Ubiquitinový a autofagocytární systém jsou nepostradatelné pro udržení homeostázy proteinů, ale bylo zjištěno, že téměř všechny stárnoucí organismy projevují postupné snížení aktivity těchto dvou systémů [51].

Lidský mozek obsahuje přibližně 25 % celkového množství cholesterolu v těle. Hematoencefalická bariéra brání absorpci lipoproteinů, proto si mozek syntetizuje cholesterol

de novo. Během stárnutí organismu dochází také ke změnám v distribuci lipidů v rámci buněčných membrán mozkových buněk, což je považováno za rizikový faktor pro AD [37].

Více než 50 % celkového množství glukózy v těle je spotřebováno v mozku, ačkoli s věkem a při AD se spotřeba glukózy snižuje [52].

Bylo také zjištěno, že poškození metabolismu glukózy vede k abnormální hyperfosforylaci Tau proteinu a dochází k tvorbě NFTs.

Oxidativní stres, způsobený nerovnováhou mezi oxidačními a antioxidačními systémy, má za následek hromadění reaktivních forem kyslíku. Reaktivní formy kyslíku jsou produkovány zejména mitochondriemi a jejich hromadění způsobuje poškození lipidům, buněčným proteinům, nukleovým kyselinám a glukóze. Převládajícím antioxidantem v mozku je glutathion, jehož hladina se s postupujícím věkem, ale také v případě výskytu AD, snižuje [37].

2.5 Gliové buňky a Alzheimerova choroba

Studium role gliových buněk v patologii AD se dostává v poslední době do popředí zájmu. Mezi gliové buňky mozku řadíme oligodendrocyty (75 %), astrocyty (20 %) a mikroglie (5 %) [53].

Nejčastěji jsou při AD pozorovány aktivované mikroglie. Mají krátké, ztlustělé a méně větvené výběžky. Mikroglie projevují prozánětlivé i protizánětlivé účinky, což se v prvním případě projevuje sekrecí prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α , které vedou k porušení neurogeneze [54]. Jsou ovšem schopné i produkce růstových faktorů, jako IGF-1, který naopak neurogenezi stimuluje [55].

Mikroglie jsou regulovány pomocí chemokinu CX3CL1 a CD200. Jednou z funkcí chemokinu CX3CL1 je, že ovlivňuje signální dráhu zajišťující komunikaci mezi mikroglie a neurony. U pacientů v mozku zasaženém AD je tato dráha negativně ovlivněna [37].

Na povrchu mikroglíí se nachází inhibiční receptor CD200R, který reaguje s transmembránovým glykoproteinem CD200, jež je exprimován na neuronech. Vzájemnou interakcí glykoproteinu CD200 a receptoru CD200R jsou mikroglie udržovány v klidovém stavu [56]. Narušení tohoto stavu může přispět k chronické zánětlivé reakci, která vede k postupu choroby. U pacientů s AD byl zaznamenán výrazný pokles CD200 i CD200R, se specifickým nedostatkem CD200R mRNA v hipokampu a spodní části spánkového laloku [57].

Dále mají mikroglie schopnost fagocytózy A β peptidů a zánětlivých reakcí, které se významně podílí na postupu choroby. Jedna ze dvou základních cest k odstranění A β peptidů z mozku je zprostředkována mikroglialními receptory, které tím umožňují fagocytózu. Druhou

cestu pak zajišťují A β peptidy-degradující enzymy jako je neprilysin, insulin-degradující enzym, metalloproteáza, nebo katepsin B [37].

Fagocytóza za pomoci mikroglíí je spojena s proteinem „beclin 1“ a retromerovým komplexem, který zajišťuje recyklaci membránových receptorů po fagocytóze. U mikroglíí získaných z lidského mozku postiženého AD byla hladina těchto dvou důležitých složek snížena, což vedlo ke snížení fagocytární schopnosti odstraňovat A β peptidy [58].

Astrocyty regulují mimobuněčnou koncentraci iontů, homeostázu vody a acidobazickou rovnováhu v mozku. Také zprostředkovávají produkci a odstraňování neurotransmiterů, ovlivňují zásobu glukózy, antioxidační mechanismy a synaptickou regulaci pomocí produkce cytokinů, chemokinů a růstových faktorů [37].

Astrocyty hrají významnou roli v absorpci glutamátu v mimobuněčném prostoru, čímž udržují hladinu extracelulárního glutamátu mimo toxické hodnoty. U pacientů s AD ovšem dochází ke snížení schopnosti astrocytů, přeměnit extracelulární glutamát na glutamin, který následně přechází do neuronů. To vede ke zvýšené excitotoxicitě a neurodegeneraci. [59].

Astrocyty jsou také zapojeny do odbourávání, stejně jako do produkce A β peptidů. Všechny gliové buňky jsou zapojeny do složitých signálních cest během průběhu choroby a ovlivňují vznik patologických změn. V čelní mozkové kůře vykazuje mozek postižený AD zvýšené množství astrocytů a poškození DNA v astrocytech, které sídlí v hipokampu. Jakmile dojde ke zvýšenému hromadění A β peptidů, mikroglie a astrocyty podpoří zánětlivou odpověď a fagocytózu ve snaze o odstranění těchto peptidů. Naproti tomu trvalá zánětlivá reakce naopak usnadňuje produkci A β peptidů a schopnost fagocytózy se v pozdním stádiu AD zhoršuje, což vede k dalšímu hromadění A β peptidů. Výše uvedené naznačuje, že gliové buňky mají výrazný podíl na patologických projevech Alzheimerovy choroby [37].

2.6 Zvířecí modely Alzheimerovy choroby a stárnutí

Zvířecí modely AD převážně zahrnují modifikaci tří výše uvedených genů, které mají spojitost s familiární formou AD, jedná se o APP, PSEN1 a PSEN2. Použití těchto modelů je spojeno s řadou omezení: familiární forma AD tvoří méně než 1 % všech případů choroby; mechanismus familiární formy je odlišný od formy sporadické; familiární forma může být vysvětlena na základě hypotézy, že ukládání A β vede k tvorbě neurofibrilárních klubek, na rozdíl od této hypotézy, v případě sporadické formy AD se amyloidní plaky a NFTs objevují nezávisle v různých oblastech mozku. Ztráta synapsí a neuronů, což je hlavní příčina symptomů onemocnění, nemůže být ve většině zvířecích modelů napodobena [60].

Zvířecí model stárnutí v podobně negeneticky uzpůsobeného druhu myši, ukázal přítomnost amyloidních plaků, fosforylaci proteinu Tau a oxidativní stres [61].

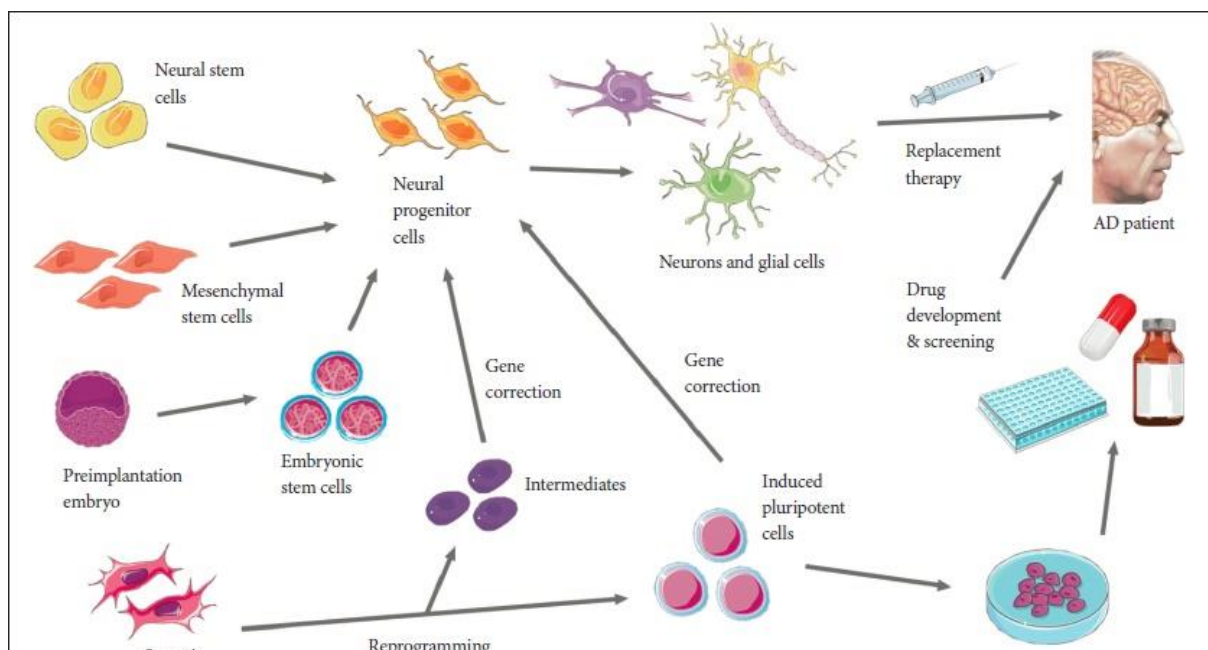
V případě tohoto modelu, transplantace kostní dřeně ozářené myši zlepšila kognitivní schopnosti a to normalizací prozánětlivých cytokinů a oxidačních markerů [62].

2.7 Farmakologická léčba

Léčba pomocí farmakologických přípravků se v současnosti spoléhá na látky inhibující acetylcholinesterázu. Inhibice tohoto enzymu zvyšuje koncentraci acetylcholinu na cholinergních synapsích a vede ke zlepšení přenosu vzruchů. Přesto nejsou žádná přesvědčivá data, že tyto látky zmírňují funkční poruchy způsobené chorobou [63]. Další farmakologické přípravky, jejichž klinické testování probíhá, se zaměřují na mechanismy zpracovávající APP, tvorbu a hromadění A β peptidů a vnitřní interakce APOE4. Ačkoli může léčba přinést zlepšení kognitivních schopností nebo dokonce uchránit před rozvojem choroby, farmakologický přístup nenabízí žádnou možnost regenerace poškozených neuronů a nervových okruhů [51].

2.8 Kmenové buňky a Alzheimerova choroba

Přes značnou snahu zpomalit postup, nebo zlepšit a dokonce vyléčit příznaky Alzheimerovy choroby, bylo doposud schváleno pouze několik léků, které se snaží kompenzovat zhoršující se funkčnost mozku. Imunoterapie amyloidních plaků nebo Tau



Obrázek 2: Schéma potenciálního využití kmenových buněk v terapii Alzheimerovy choroby [134].

patologie není konečným řešením, protože se průběhu choroby účastní řada dalších faktorů [33].

2.8.1 Mezenchymální kmenové buňky

Mezenchymální kmenové buňky jsou široce využívány v buněčné terapii. Umožňují množení *in vitro* a je možné provést jejich autologní transplantaci, čímž se lze vyhnout odmítnutí štěpu nebo použití imunosuprese u pacienta. MSCs mohou být izolovány z kostní dřene, pupečnickové krve a tukové tkáně [64].

Přesto, že jsou MSCs schopny procházet hematoencefalickou bariérou a účinně cestovat do míst zánětu, jejich nitrožilní podání se při léčbě neurodegenerativních poruch neosvědčilo kvůli vysokému záchytu v plicní tkáni. Z toho důvodu je využívána intraventrikulární, intratekální a intranazální aplikace [37].

Mezenchymální kmenové buňky mají řadu parakrinních účinků jako je produkce růstových faktorů, protizánětlivých cytokinů, dále regulují apoptózu a navozují regeneraci nervové tkáně, obnovu myelinizace axonů a upravují reakci imunitního systému [65]. MSCs mimo jiné ovlivňují tvorbu a snižují hladinu A β peptidů, což vede ke zlepšení kognitivních funkcí. Dále snižují toxicitu A β peptidů pomocí exprese cytokinu IL-4, skrze mikroglie působí na mozek protizánětlivě a modulací makrofágů zvyšují produkci IL-10, který snižuje oxidační poškození. Otázkou zůstává vhodný okamžik aplikace MSCs, který se liší pro různá stádia choroby [37].

Transplantace MSCs do subventrikulární zóny nebo gyrus dentatus je schopna stimulovat proliferaci a diferenciaci již přítomných neurálních kmenových buněk [66]. MSCs transplantované do postranních mozkových dutin migrují do hipokampu, včetně gyrus dentatus, kde opět zlepšují neurogenezi. Z výše uvedeného vyplývá, že vzájemné působení transplantovaných MSCs a přítomných NSCs je rozhodující pro zmírnění poškození a ztráty neuronů při Alzheimerově chorobě [67].

2.8.2 Neurální kmenové buňky

Neurální kmenové buňky se v dospělém mozku nachází na dvou místech, v subventrikulární zóně postranních mozkových komor a subgranulární zóně hipokampálního gyrus dentatus. NSCs získané ze starého mozku nejsou schopny se množit a diferencovat do neuronů kvůli kratším telomerám a nedostatečné aktivitě telomerázy [68]. Avšak samotná přítomnost populace kmenových buněk v mozku poskytuje terapeutickou příležitost k obnově neuronů, které byly poškozeny zraněním nebo chorobou [37].

NSCs jsou schopny se po transplantaci diferencovat do neuronů, astrocytů a oligodendrocytů [69]. Na myším modelu bylo zjištěno, že diferenciace do neuronů vyžaduje funkční APP. Jeho poškození ohrožuje normální funkci mozku a může vést k nadměrné tvorbě gliových buněk [70].

Jakmile dojde k ustanovení nepřátelského mikroprostředí v mozku zasaženém AD, transplantované NSCs se nebudou bez vhodné úpravy diferencovat do zralých neuronů. V mozku zasaženém AD byly také nalezeny NSCs se sníženou expresí neuroprotektivního genu „seladin-1“, což je činí náchylnější k oxidačnímu stresu a buněčné smrti. Možnou ochranou by bylo použití MSCs získaných z kostní dřeně, u nichž by byla navozena vysoká hladina exprese genu „seladin-1“ [71].

2.8.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Objev iPSCs umožnil rozvoj buněčných modelů degenerativních chorob včetně AD. Obecně řečeno, zkracování telomer spojené s rostoucím věkem omezuje schopnost množení kmenových buněk. Telomery iPSCs získané od starých dárců byly prodlouženy stejně jako od dárců mladých [72].

Molekulární mechanismy spojené s průběhem AD je možné studovat na modelech onemocnění získaných z iPSCs. Na základě toho zda fibroblasty, určené k získání iPSCs, byly odebrány pacientům se sporadickou nebo familiární formou AD, je možné sledovat molekulární mechanismy konkrétní formy choroby [37].

Za pomoci programování s účinností blížící se 90 % je možné využít iPSCs k regeneraci cholinergních neuronů v bázi předního mozku [73].

Na myším modelu AD bylo prokázáno, že přímá přeměna astrocytů, které sídlí v mozkové kůře, do funkčních neuronů je možná a skrývá klinický potenciál. Takto vzniklé neurony prokázaly po 16 dnech velkou synaptickou aktivitu. Důležité je zmínit, že efektivnost přeměny je vyšší u starších myší [74].

V současnosti je třeba provést další studie využívající iPSCs k modelování a zejména léčbě AD [37].

3 KMENOVÉ BUŇKY A PARKINSONOVA CHOROBA

3.1 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD, Parkinson's Disease) je druhou nejčastější neurodegenerativní chorobou na světě a podle nedávných průzkumů postihuje v Evropě jednoho člověka z tisíce [75]. Mezi charakteristické symptomy patří bradykineze, tedy celkové zpomalení pohybů, ztuhlost, problémy s chůzí a klidový třes. V pozdějších stádiích je choroba spojena s propuknutím demence, postižením autonomních funkcí v organismu a vážnou posturální nestabilitou [76].

Na buněčné úrovni je PD charakterizována zejména masivní ztrátou dopaminových neuronů v pars compacta regionu substantia nigra. V pozdějších fázích choroby se ztráta buněk projevuje i ve středním mozku, bázi předního mozku a neokortexu [77].

Parkinsonovu chorobu dělíme podobně jako AD na sporadické a familiární případy. Více než 90 % případů tvoří sporadická forma onemocnění, jejíž mechanismus není ještě zcela objasněn, ačkoli významnou roli mají toxiny z prostředí, porucha funkce mitochondrií a imunitní reakce gliových buněk [76]. Přibližně 5 – 10 % případů pak tvoří familiární, tedy přímo geneticky podmíněná, forma onemocnění, která je dále dělena na autozomálně recesivní a autozomálně dominantní typ. Tyto dva typy mají rozdílné patologické projevy [78].

K dalším charakteristickým znakům PD patří Lewyho tělíska, která se tvoří v těle a neuritech degenerujících dopaminergních neuronů. Jádro tělísek obsahuje vlákna proteinu α -synuclein (α SYN) a řadu proteinů z cytosolu, které narušují proteinovou rovnováhu v buňce a vedou k cytotoxicitě a ztrátě dopaminergních neuronů [79].

3.2 Genetické faktory

Jak bylo uvedeno výše, familiární chorobu dělíme na dva typy. Autozomálně dominantní typ se vyznačuje rozsáhlou tvorbou Lewyho tělísek v různých částech mozku. Protein α -synuclein, který je součástí tělísek, je kódován genem SNCA (Synuclein Alpha), jehož mutace byla poprvé objevena u pacienta s familiární formou PD [80].

Další významné mutace byly nalezeny v genu pro kinázu LRRK2 „Leucine-rich repeat kinase 2“ u pacientů s autozomálně dominantní familiární formou PD. Výzkum myšičího modelu PD ukázal, že gen LRRK2 je spojen s expresí genu SNCA. Nejběžnější a nejvíce zkoumanou mutací genu LRRK2 je G2019S a stejně jako jeho ostatní mutace, vede ke zvýšené expresi SNCA [81].

Ke studiu mutace G2019S byly použity buněčné modely z iPSCs, získaných od pacientů s danou mutací. Takto diferencované dopaminergní neurony náležící střednímu mozku, k jejichž ztrátě v rámci choroby dochází přednostně, prokázaly vyšší citlivost k oxidačnímu stresu a byla u nich zjištěna vyšší hladina α SYN. Další studie objevila spojitost genu LRRK2 také s expresí genů CPNE8, ANXA1, MAP7, CADPS2 a UHRF2. Experimenty, které využívají vyřazení exprese genů, prokázaly, že porucha regulace výše uvedených genů významně přispívá k neurodegeneraci dopaminergních neuronů středního mozku vystavených oxidačnímu stresu [82].

Mnoho důkazů také naznačilo roli proteinu Tau v patogenezi PD. Ve spojení s mutací G2019S genu LRRK2, byla zjištěna zvýšená exprese genu MAPT, který kóduje protein Tau. Tento protein konkrétně zvyšuje hromadění a toxicitu α SYN a dále souvisí s degenerací axonů [83].

Přes rozmanitost genetického pozadí, které ovlivňuje chování mechanismů v každém jednotlivci s ohledem ke konkrétní mutaci, se zdá, že gen LRRK2 a jím dále ovlivněné geny, mají velmi významnou roli v patogenezi Parkinsonovi choroby. S ohledem k těmto zjištěním, se tyto geny stávají cílem výzkumu nových terapeutických přístupů [82].

3.3 Farmakologická léčba

Farmakologický přístup se v rámci terapie PD zaměřuje na symptomatickou léčbu motorických poruch, které jsou spojeny se ztrátou dopaminergních neuronů a degenerací synapsí. Právě substituční léčba pomocí neurotransmiteru dopaminu je v současné době převažující farmakologický přístup. Vzhledem k tomu, že samotný neurotransmitter není schopen přecházet přes hematoencefalickou bariéru, využívá se jeho prekurzoru zvaného levodopa (L-3,4-dihydroxyfenylalanin), který je metabolizován pomocí aromatické L-aminokyselinové dekarboxylázy [84]. Přes počáteční zmírnění motorických symptomů, efektivnost levodopy s postupem nemoci klesá. V současnosti není bohužel znám terapeutický přístup, který by dokázal zastavit nebo dokonce zvrátit poškození způsobená PD, ale naděje jsou vkládány do buněčné terapie [76].

3.4 Kmenové buňky a Parkinsonova choroba

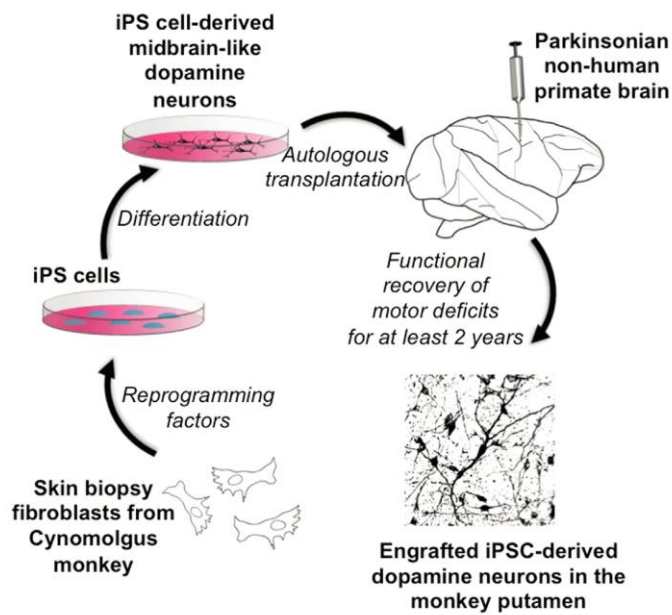
Jak již bylo zmíněno, hlavním znakem PD je masivní ztráta zejména dopaminergních neuronů v oblasti substantia nigra a s tím spojené motorické obtíže. Právě náhrada ztracených

neuronů se stala cílem buněčné terapie a mezi nejperspektivnější léčebné postupy patří terapie využívající iPSCs diferencované v dopaminergní neurony [85].

Doposud bylo zjištěno, že alogenní transplantace mozkové tkáně plodu je schopna přežít a fungovat v lidském mozku postiženém PD po více než 18 let [86]. Stejně jako v případě embryonálních kmenových buněk, omezené zdroje a získávání tkání plodu z potratů, je silně zatíženo etickými a náboženskými otázkami. Další významnou překážkou je silná imunitní odpověď, která se ve většině případů alogenní transplantace vyskytuje [87].

V současnosti se tak jeví autologní transplantace diferencovaných neuronů jako vhodnější a bezpečnější alternativa. Nedávný experiment využívající Makaka jávského (*cynomolgus monkey*), přinesl nové poznatky. Příznaky spojené s PD byly u těchto opic vyvolány podáním nízké dávky 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinu (MPTP), která vedla k postupnému a stálému zhoršení celkové motorické aktivity a stabilním projevům choroby, jako jsou třes, ztuhlost, zpomalení pohybu, problémy s rovnováhou a zhoršení hrubé i jemné motoriky [88].

Po půl roce od autologní transplantace z iPSCs odvozených neurálních buněk (Obr. 3), byla motorická aktivita zvýšena o 146 % a po dvou letech byla aktivita zvýšena téměř o 188 % v porovnání se stavem před transplantací. Po roce od transplantace nevykazoval zvířecí model choroby výše uvedené symptomy, což se do konce studie nezměnilo. Na konci studie bylo posmrtně provedeno vyšetření mozku. Data získaná z celého experimentu naznačují, že nezbytné je zajištění přežití dostatečně vysokého počtu transplantovaných neuronů, v rámci experimentu se jednalo přibližně o 13 000, a obnovení inervace putamenu, jednoho z bazálních ganglií. V rámci experimentu nedošlo k propuknutí imunitní nebo zánětlivé reakce, ani nebyla pozorována tvorba nádoru [89].



Obrázek 3: Zvířecí model autologní transplantace dopaminergních neuronů získaných z indukovaných pluripotentních kmenových buněk [89].

Výše uvedený experiment jednoznačně dokládá využitelnost buněčné terapie pro léčbu Parkinsonovi choroby. Diferenciace kmenových buněk do neurálních buněčných linií však zůstává komplikovaná kvůli nízké efektivitě. Další možností je přímá přeměna gliových buněk do konkrétních funkčních neuronů *in vivo* skrze virovou expresi specifických transkripčních faktorů. V rámci myšího modelu již byla úspěšně provedena přeměna gliových buněk do neuroblast a následně funkčních neuronů, které byly úspěšně začleněny mezi přítomné neurony ve striatu. Potvrzení účinnosti metody vyzdvihuje slibný potenciál metody v léčbě PD [90].

4 KMENOVÉ BUŇKY A AMYOTROFICKÁ LATERÁLNÍ SKLERÓZA

4.1 Amyotrofická laterální skleróza

Amyotrofická laterální skleróza (ALS, Amyotrophic Lateral Sclerosis), známá také jako Lou Gehrigova choroba, je smrtelná neurodegenerativní porucha charakterizovaná postupnou degenerací horních i dolních motorických neuronů. Příznaky, kam řadíme křeče, atrofie svalů a jejich slabost, záškuby svalových vláken a problémy se zahájením volných pohybů, se na počátku vyskytují v jednom místě, odkud se poté šíří do všech motoneuronů. Tyto příznaky jsou spojeny se stažením axonů a postupnou denervací svalů. Přibližně 3 – 5 let po propuknutí nemoci dochází k úmrtí pacientů v důsledku ztráty motoneuronů dýchacích svalů [91].

Kromě výše uvedených příznaků se u choroby velmi často vyskytují kognitivní nedostatky a poruchy, které jsou spojeny s frontotemporální demencí (FTD, frontotemporal dementia). Následně byla vyslovena myšlenka, že ALS a FTD sdílí běžné patologické mechanismy, a proto jsou tyto dvě choroby často studovány společně [92].

Ačkoli většina případů ALS tvoří sporadická forma, přibližně 10 % případů je spojeno s dřívějším výskytem onemocnění v rodině a řadíme je tedy k familiární formě ALS. Nerozeznatelnost obou forem naznačuje, že by k jejich úspěšné léčbě postačoval jednotný terapeutický přístup [93].

4.2 Genetické faktory

První objevený gen ve spojení s ALS byl SOD1 (superoxide dismutase 1), který kóduje enzym superoxid dismutázu s antioxidačním účinkem. Patří mezi nejvíce zkoumané geny a doposud bylo objeveno přibližně 180 rozdílných mutací u případů ALS, z nichž některé ovlivňují skládání enzymu [94]. Vzniklo mnoho dalších hypotéz jakým způsobem mohou zmutované SOD1 enzymy působit na patologii choroby, mimo jiné zvýšením oxidačního stresu, poruchou funkce mitochondrií [95], hromaděním proteinových shluků, poruchou homeostázy proteinů a poruchou homeostázy kovů, jelikož některé formy superoxid dismutázy vážou na své aktivní místo kovy jako měď, zinek nebo mangan [96].

U genu TARDBP (Transactive Response DNA-Binding Protein), který kóduje protein TDP-43, byla v roce 2008 odhalena spojitost s ALS a od té doby bylo objeveno již 40 odlišných mutací. Protein TDP-43 je RNA vázající protein, který se standardně pohybuje mezi cytoplazmou a jádrem, tím se účastní procesů zpracovávajících RNA, tedy transkripce, sestřihu hnRNA (heterogenní nukleární RNA) a translace [97].

Dalším genem, který také exprimuje RNA vázající protein, je FUS (fused in sarcoma). Mutace genů FUS a TARDBP způsobují tvorbu cytoplazmatických shluků, které jsou ukazateli zdraví motoneuronů, ačkoli jejich přesný mechanismus přispívající k patologii choroby zůstává nejasný. Tyto shluky jsou složeny z velkého počtu proteinů, ale hlavní složkou nalezenou v mozku a míše při pitvě byl protein TDP-43 [98].

Gen CHCHD10 (coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10) je lokalizován v mezimembránovém prostoru mitochondrií, kde se účastní oxidativní fosforylace. Určité mutace tohoto genu způsobují odchylky ve funkci mitochondrií. Díky prudkému vývoji v oblasti sekvenčních technologií je v současné době objevováno množství genů spojených s ALS, respektive FTD patologií a většina genů se choroby účastní bez ohledu na to, zda se jedná o sporadickou nebo familiární formu [94].

4.3 Kmenové buňky a amyotrofická laterální skleróza

4.3.1 Embryonální kmenové buňky

Již v roce 2005 byly ESCs úspěšně diferencovány do lidských motorických neuronů. Od té doby byly ESCs užívány především k tvorbě zvířecích modelů familiární formy ALS. Jedna z nedávných studií odhalila, že kromě motorických neuronů mají v průběhu onemocnění významnou roli také gliové buňky. Při společné kultivaci myších gliových buněk se specifickou mutací SOD1 genu a zdravých lidských motorických neuronů, byla u motorických neuronů objevena vyšší citlivost k toxicitě mutovaných gliových buněk [99].

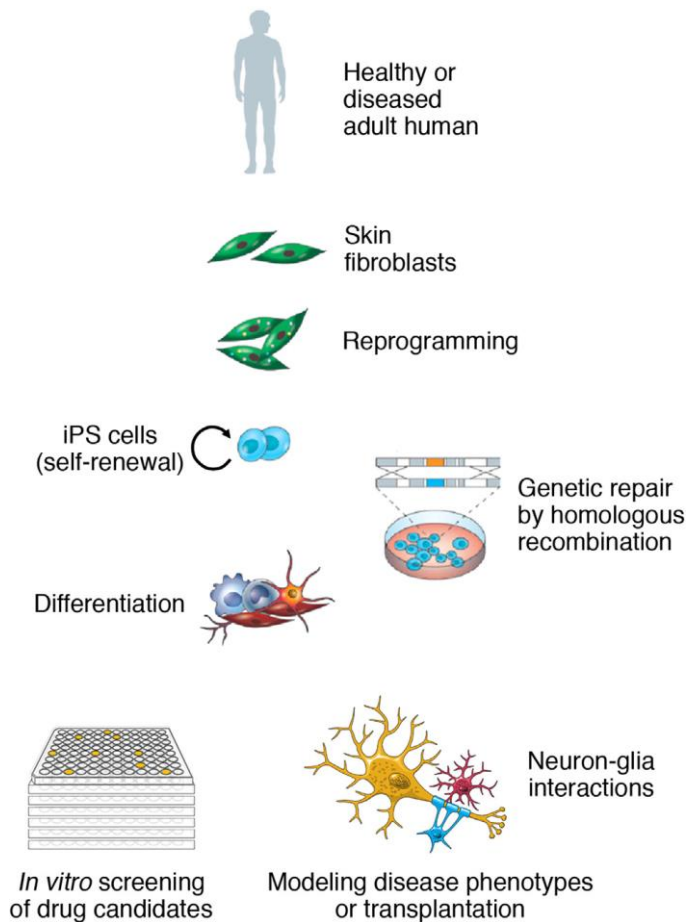
Velmi podobná studie využívající astrocyty s jinou mutací SOD1 genu, vedla k podobné ztrátě motorických neuronů, která byla spojena se zvýšenou zánětlivou reakcí a oxidačním stresem. Přídavek antioxidantů, specificky antioxidantu „apocynin“, byl schopen obrátit tento proces a zajistit přežití motorických neuronů [100].

Oba experimenty naznačují, že škodlivé prostředí způsobené mutacemi choroby brání úspěšné terapii transplantací motorických neuronů. Ačkoli transplantace v myším modelu ukázala počáteční zlepšení, transplantované motoneurony po krátké době zanikly [99].

4.3.2 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Stejně jako ESCs jsou i iPSCs využívány k tvorbě a studiu modelů choroby (Obr. 4), ale pouze iPSCs získané od pacientů umožňují analyzovat sporadickou formu ALS. Při obdobném experimentu k výše uvedenému, kdy byly společně kultivovány astrocyty odvozené z iPSCs původem od pacienta s mutací proteinu TDP-43, a motorické neurony

získané taktéž z buněčných linií iPSCs, nebyla prokázána toxicita astrocytů. Rozdílné výsledky experimentů naznačují, že je nutné hlubší pochopení patofyziologie ALS [101].



Obrázek 4: Schéma zobrazující přípravu fenotypicky specifických iPSCs a jejich využití v terapii amyotrofické laterální sklerózy [102].

4.3.3 Neurální kmenové buňky

Množství studií se zabývá možným terapeutickým potenciálem neurálních kmenových buněk. V jednom z experimentů na myším modelu s mutací SOD1 byly transplantované NSCs schopny zpozdit propuknutí a zpomalit průběh klinických příznaků ALS. Prospěšný efekt transplantace NSCs byl zprostředkován řadou dalších procesů, jako například produkcí výživných faktorů, snížením nadměrné tvorby astrocytů a zánětlivé reakce. Podobných výsledků bylo dosaženo s neurálními kmenovými buňkami, které byly odvozeny z linií iPSCs [103].

4.3.4 Mezenchymální kmenové buňky

Na rozdíl od jiných typů kmenových buněk, které jsou přímo schopny přeměny v motorické neurony, buněčná terapie pomocí MSCs využívá jejich schopnost parakrinní sekrece řady faktorů, které mimo jiné modulují imunitní reakce, působí proti jizvení, podporují

novotvorbu cév a příznivě ovlivňují množení buněk. Předpokládá se, že některé z nich by mohly mít vliv na opravné mechanismy a přestavbu tkání po poškození [104].

Některé populace MSCs produkují z mozku odvozený neurotrofický faktor (BDNF, brain-derived neurotrophic factor) a nervový růstový faktor, které podporují růst axonů, zlepšují správné propojení neuronů v mozku i míše, a ovlivňují tvorbu dendritů i synapsí ve vyvíjejícím se mozku. Tyto vlastnosti naznačují, že využití ochranného vlivu MSCs na nervové tkáně se zdá být velmi slibným terapeutickým přístupem [103].

5 KMENOVÉ BUŇKY A ROZTROUŠENÁ SKLERÓZA

5.1 Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (MS, Multiple Sclerosis) je choroba způsobující ztrátu myelinizace centrálního nervového systému, která postihuje převážně mladé pacienty. Ačkoli příčiny vzniku onemocnění zůstávají z větší části neznámé, MS je řazena k autoimunitním chorobám [105].

Rozvoj onemocnění je spojován s několika současně působícími faktory, kam řadíme genetickou predispozici, vliv zevního prostředí (např. vystavení virovým infekcím) a nedostatek vitamínu D. K počátečnímu poškození se přidává perivaskulární zánětlivá reakce, která je považována za příčinu zhroucení hematoencefalické bariéry u pacientů s MS. Toto zhroucení vede k chronickému pronikání leukocytů do CNS a napadání gliových buněk, jež vede ke ztrátě myelinizace neuronů [106].

Ztráta myelinových vrstev způsobuje omezení v přenosu akčního potenciálu podél nervů a vede k poruchám kognitivních funkcí a invaliditě, typickým znakům onemocnění. Z toho důvodu se v současnosti léčebné postupy zaměřují na zmírnění nebo zablokování autoimunitní reakce [107].

5.2 Genetické faktory

Přesto, že na propuknutí MS má vliv mnoho faktorů, množství důkazů naznačuje, že vliv genetických faktorů je rozhodující. Většina imunologických genů, spojených s patologií onemocnění, je důležitá pro odezvu T lymfocytů. Patří sem cytokinové receptory pro IL-7 a IL-2, dále TYK2 „tyrosine kinase 2“, IL-10 a IL-12 [108].

Další zkoumanou oblastí jsou epigenetické modifikace, kdy dochází k dědičným změnám v genové expresi bez změny DNA sekvence. Modifikace jsou zprostředkovány úpravou histonů, metylací DNA a změnou exprese microRNA. Většina těchto změn ovlivňuje imunitní systém, zejména pak T lymfocyty. Předpokládá se, že obnovou funkce kritických genů, které regulují imunitní odpověď, je možné dále zkoumat vliv epigenetických změn na patologii choroby [106].

5.3 Kmenové buňky a roztroušená skleróza

Zvířecí modely nebyly v případě autoimunitního onemocnění schopny poskytnout dostatečně komplexní pohled na patologii choroby. Přes opatrnost při využití iPSCs pro klinické aplikace, kvůli využití exogenní DNA k indukování pluripotentního stavu a kvůli

přítomnosti epigenetických změn v některých programovaných buněčných liniích, jejich využití se při získání efektivních modelů choroby zdá velmi slibné. Modely založené na iPSCs od pacientů s MS by byly schopny poskytnout náhradu za nepřístupnou mozkovou tkáň a zároveň by obsahovaly specifické genetické pozadí choroby, což by podpořilo studium nových léčiv a dalších typů terapie [109].

V nedávné době byla povolena klinická studie léčby MS autologní transplantací mezenchymálních kmenových buněk. Od těchto MSCs se očekává vysoký potenciál k diferenciaci do buněčných linií neurální tkáně a schopnost posílit přítomné kmenové buňky v mozku a míše skrze výživné faktory. Očekávání vychází ze studie zvířecího modelu MS, která ukázala, že transplantace neurálních progenitorových buněk získaných z MSCs vedla k podpoře opravných mechanismů v oblasti ztráty myelinizace [110].

6 KMENOVÉ BUŇKY A HUNTINGTONOVA CHOROBA

6.1 Huntingtonova choroba

Huntingtonova choroba (HD, Huntington's Disease) je vzácné neurodegenerativní onemocnění, jež propuká v průměru mezi 35. a 42. rokem věku. Choroba je charakteristická především náhodnými pohyby různých částí těla (tzv. chorea) spolu s celkovým zpomalením pohybů a poruchou jejich koordinace. Mimo motorických symptomů jsou typické změny osobnosti, problémy s pozorností a chápáním, podrážděnost s výbušnými projevy emocí a demence [111].

HD je autozomálně dominantní onemocnění způsobené zmnožením CAG nukleotidové sekvence v genu, který exprimuje bílkovinu huntingtin. CAG sekvence kódují polyglutaminová opakování v množství přibližně 11 – 30, více než 36 opakování je již považováno za práh patologie, která vede k rozsáhlé ztrátě buněk ve striatu pacientů [112]. Štěpení mutovaného proteinu huntingtin vede ke vzniku krátkých agregujících peptidů, které jsou pro buňky toxické [113].

V současné době neexistuje farmakologická léčba schopná zpomalit nebo zastavit postup choroby. Některé léky jsou schopny dočasně zmírnit motorické obtíže a psychiatrické poruchy, ale samotné patologické mechanismy HD nijak pozitivně neovlivňují [114].

6.2 Kmenové buňky a Huntingtonova choroba

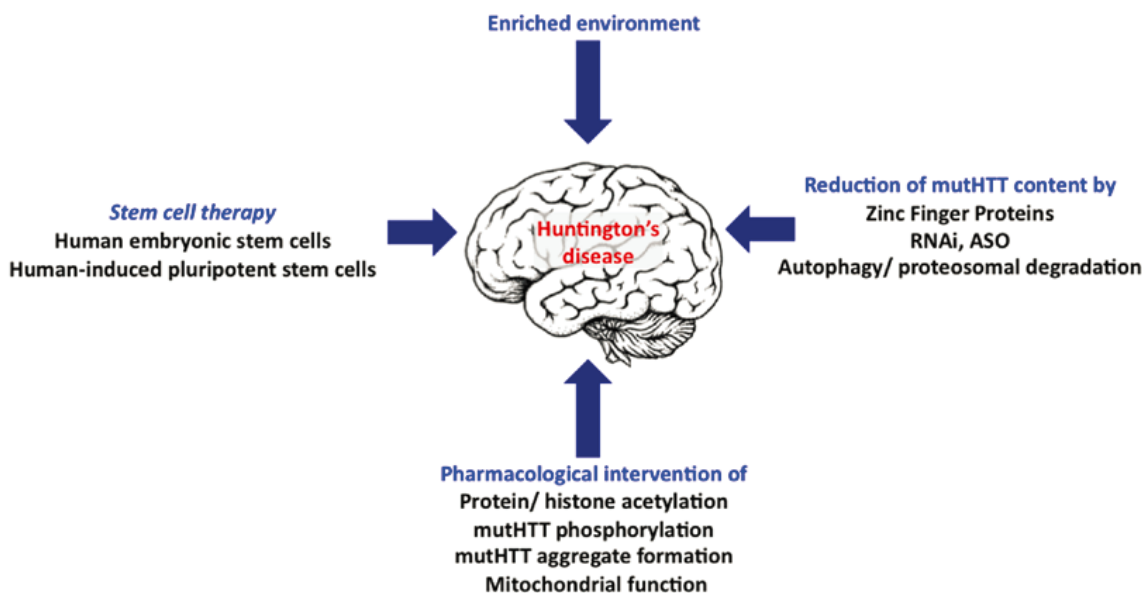
Buněčná terapie využívající transplantaci nových buněk, které nahrazují ztracené neurony nebo podporují funkci oslabených buněk, poskytuje velmi slibný terapeutický přístup i v případě léčby Huntingtonovy choroby (Obr. 5) [116].

Jedním z prvních testů byla transplantace embryonální tkáně striata pacientům s HD. Vyšetření mozku po transplantaci odhalilo přežití transplantátu, ačkoli v nedostatečném množství. Především se ukázalo, že u transplantátů embryonálních kmenových buněk dochází k odmítnutí štěpu [117].

Další možností buněčné terapie jsou mezenchymální kmenové buňky schopny výrazně ovlivňovat imunitní systém. Také jsou schopny úspěšně potlačit množení a reakci T lymfocytů nebo snižovat aktivitu přecitlivělých dendritických buněk a makrofágů, což snižuje pravděpodobnost odmítnutí transplantátu. Jedním z největších omezení MSCs je jejich neschopnost diferenciaci v neurální buňky, ačkoli někteří vědci uvádějí, že schopnost diferenciaci mají, ale vyskytuje se velmi vzácně u méně než 1 % transplantovaných MSCs [116].

Alternativou k využití MSCs je transplantace NSCs, které mají velkou tendenci diferencovat do neurálních fenotypů. Na druhou stranu existuje předpoklad, že přes krátkodobou funkční obnovu, bude transplantát NSCs nakonec organismem pacienta odmítnut [118].

S ohledem k výše uvedeným vlastnostem obou typů kmenových buněk byl proveden experiment zkoumající, zda společná transplantace MSCs a NSCs dosáhne vyšší efektivity než samotná transplantace jednoho, případně druhého typu. Tento experiment provedený na myších modelech HD potvrdil, že společná transplantace prodloužila délku přežití transplantátu až na 20 týdnů, po které byl pokus sledován. Také bylo potvrzeno, že použití MSCs poskytuje výhodné mikroprostředí zahrnující lokální zklidnění imunity, které může usnadnit přežití a efektivnost ostatních typů buněk, v tomto případě NSCs, což vede k dlouhodobému zpomalení degenerativního chorobného procesu [116].



Obrázek 5: Schéma terapeutických přístupů v léčbě Huntingtonovi choroby [115].

Indukované pluripotentní kmenové buňky jsou i v případě HD využity k tvorbě modelů onemocnění, které by umožnily lepší pochopení patologických mechanismů a poskytly prostředí pro testování léků [119].

Zajímavou možností, kterou přinesl objev iPSCs a pokrok v oblasti genové manipulace, je získání iPSCs od pacienta s HD a jejich následná genetická oprava. V experimentu byly získány fibroblasty pacienta s HD a následně přeprogramovány v iPSCs. Pomocí techniky homologní rekombinace byla zmnožená CAG sekvence nahrazena fyziologickou. Takto geneticky opravené iPSCs již neprojevovaly známky fenotypu choroby, zachovaly si schopnost pluripotence a byly schopny se diferencovat *in vivo* i *in vitro* do specifických neuronů striata.

Výsledky experimentu jednoznačně podpořily možnost využití iPSCs v rámci transplantační terapie HD [112].

7 VYUŽITÍ KMENOVÝCH BUNĚK PŘI LÉČBĚ PORANĚNÍ MÍCHY

7.1 Poranění míchy

Příčiny poškození míchy (SCI, spinal cord injury) jsou často spojeny s nehodami nebo násilím, ovšem výrazná část poškození je připisována sedavému životnímu stylu, který negativně ovlivňuje strukturu především krční míchy, jejíž poranění jsou nejzávažnější [120].

Poškození nebo přerušení axonů, ztráta neuronů a gliových buněk i ztráta myelinizace jsou nejčastějšími důsledky poranění míchy. Významným rysem SCI i dalších chorob CNS je ztráta myelinizace i nepoškozených axonů, která přispívá ke ztrátě funkčnosti [121].

Kromě počátečního mechanického poškození se v průběhu několika hodin či dní objevují sekundární patologické procesy, kam patří ischemie, hypoxie, nadměrná tvorba volných radikálů a excitotoxicita [122].

7.2 Kmenové buňky a poranění míchy

Přirozená schopnost regenerace je v CNS velmi limitovaná, proto se většina výzkumů, které využívají kmenové buňky při SCI, zaměřuje na podporu růstu axonů, zmírnění degenerace a sekundárních patologických procesů [123].

Výzkumy ukazují, že NSCs mohou vyvolat značný růst axonů hostitele po jejich poranění, a to i bez samotné diferenciaci kmenových buněk. Pravděpodobným mechanismem účinku NSCs je produkce růstových faktorů NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor) a GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor), které podporují růst axonů mnoha typů, včetně motorického nebo senzorického [124].

Tento mechanismus byl potvrzen v práci z roku 2002, kdy NSCs taktéž nepodléhaly diferenciaci v buněčné linii neurální tkáně a jejich pozitivní vliv tedy zůstal převážně humorální [125].

Studie, která využívala embryonální kmenové buňky, se zabývala terapeutickým přínosem obnovené myelinizace. V této studii byly ESCs diferencovány do oligodendrocytů, které fyziologicky zajišťují tvorbu myelinové pochvy axonů. Byly použity dva myši modely lišící se stářím poškození. V případě sedm dní starého poškození byla zjištěna rozsáhlá obnova myelinizace a zlepšení motorických funkcí. U druhého modelu, kdy bylo přerušení míchy staré 10 měsíců, nebyla zaznamenána obnova myelinizace, ani obnova funkčnosti. Ačkoli

transplantace v obou případech proběhla úspěšně, v druhém případě se předpokládal vliv opožděné ztráty oligodendrocytů v případě SCI [123].

Nejslibnější se v tuto chvíli jeví využití iPSCs v terapii SCI, kde byla potvrzena jejich schopnost diferencovat ve specifické neurony dle cílové oblasti transplantace a zachovat funkčnost v myších modelech akutního poškození míchy. Avšak jejich úspěšné použití v klinické praxi vyžaduje další experimenty a studie [120].

8 VYUŽITÍ KMENOVÝCH BUNĚK PŘI CÉVNÍ MOZKOVÉ PŘÍHODĚ

8.1 Cévní mozková příhoda

Cévní mozková příhoda (BS, brain stroke), známá jako mozková mrtvice nebo mozkový infarkt, je významnou příčinou úmrtí nebo invalidity dospělých. Celosvětově připadá ročně 250 až 400 úmrtí způsobených cévní mozkovou příhodou, na každých 100 000 obyvatel. Ve Spojených státech amerických je BS třetí nejčastější příčinou smrti [126].

V současnosti je hlavním léčebným postupem použití rekombinantního aktivátoru tkáňového plasminogenu. Rehabilitace pacientů po BS by měla pomoci s obnovou mozkových funkcí, ale její účinky nejsou optimální [127].

V nedávné době se ohniskem zájmu v léčbě cévní mozkové příhody staly kmenové buňky, zejména mezenchymální, ale i embryonální, indukované pluripotentní a kmenové buňky izolované z tukové tkáně. Účinnost těchto buněk byla zkoumána v preklinických a klinických studiích. V preklinických studiích byla doposud buněčná terapie schopna snížit velikost oblasti zasažené infarktem a zlepšit obnovu neurálních funkcí [128].

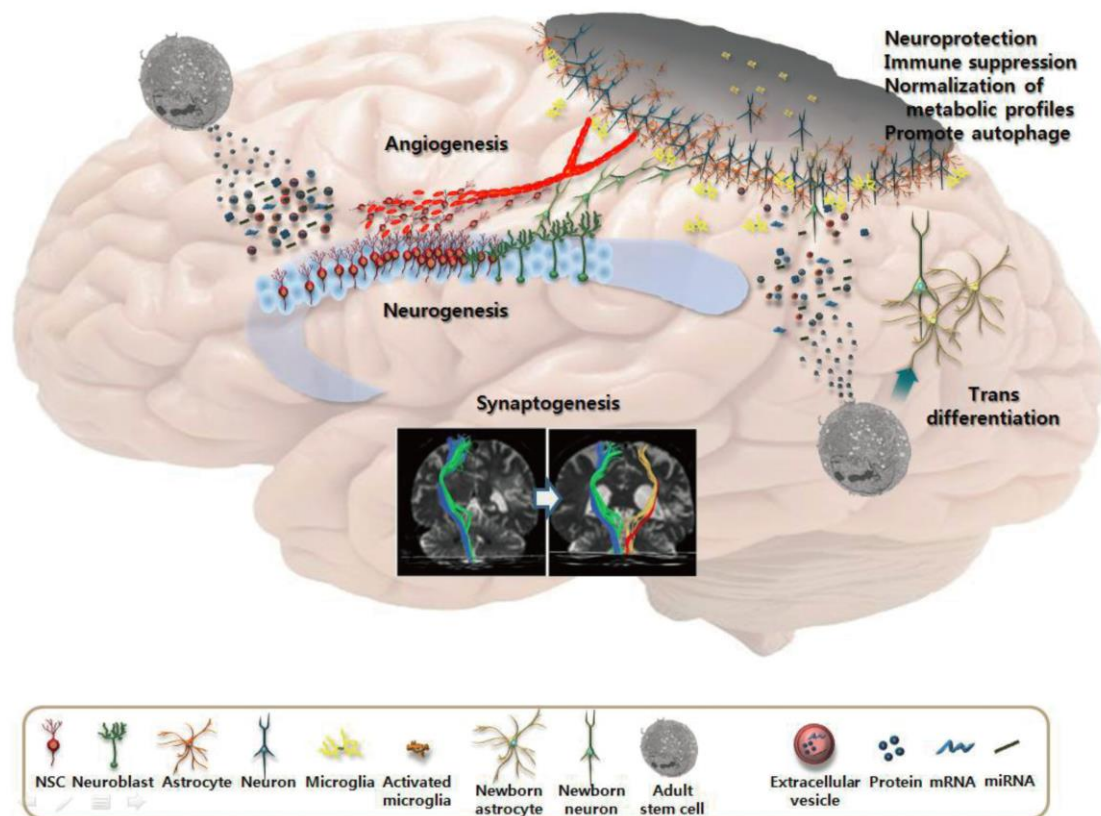
8.2 Kmenové buňky a cévní mozková příhoda

Studie ukázala, že ačkoli neurální kmenové buňky získávané z iPSCs jsou schopny podpořit neurogenezi v mozku, neděje se tak přímou buněčnou náhradou exogenními NSCs, ale skrze solubilní faktory podobným mechanismem účinku, který je typický pro mezenchymální kmenové buňky [129].

V rámci klinických pokusů jsou využívány především mezenchymální kmenové buňky, které je možné lehce získat z různých tkání, nejsou s nimi spojeny žádné etické otázky, jsou bezpečné a produkují růstové faktory [130].

Funkční transplantaci MSCs při léčbě cévní mozkové příhody je možné popsat pomocí teoreticky předpokládaných kroků, které zahrnují průchod hematoencefalickou bariérou, dosažení poškozené oblasti, úpravu imunitní odpovědi a náhradu ztracených nervových buněk. V experimentech na zvířatech byly MSCs schopny proniknout do mozku a nahradit poškozené buňky. Hematoencefalická bariéra člověka se však liší od zvířecí, což se ukázalo být problémem v klinických testech [131].

Přímá transplantace do postižené oblasti mozku, pomocí stereotaktické injekce, umožňuje překonat hematoencefalickou bariéru a také je tímto způsobem dosaženo účinku při nižší dávce kmenových buněk. Významným negativem tohoto postupu je možnost nekontrolované migrace kmenových buněk do mozku, která může způsobit vznik nebezpečných buněčných shluků [132].



Obrázek 6: Mechanizmy účinku mezenchymálních kmenových buněk v léčbě cévní mozkové příhody [130]

Ačkoli léčba cévní mozkové příhody pomocí kmenových buněk doposud neukázala významný přínos, zejména MSCs (Obr. 6) v současnosti zůstávají jedinou cestou ke zlepšení mozkových funkcí pacientů s BS. Terapeutický účinek by mohl být pozitivně ovlivněn novými postupy při izolaci, kultivaci, selekci konkrétních buněčných typů a aplikaci kmenových buněk. Především je zde potřeba dalších studií, na jejichž základě by bylo možné užitečnost kmenových buněk při léčbě BS zhodnotit [133].

9 ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabýval možnostmi využití kmenových buněk v rámci studia a terapie neurodegenerativních onemocnění. Nejprve jsem zmínil v současnosti využívané typy kmenových buněk a jejich přednosti, dále jsem krátce popsal jednotlivá onemocnění, příčiny vzniku, mechanismy působení a dosavadní terapeutické přístupy. K jednotlivým onemocněním jsem poté uvedl současné poznatky, zabývající se využitím kmenových buněk a předpokládaný směr dalších studií.

Jednotlivé typy kmenových buněk jsou využívány k různým terapeutickým postupům, specificky využitelným u konkrétních onemocnění. V některých případech, jako je například Parkinsonova choroba, se využívá náhrada ztracených buněk v substantia nigra, k čemuž jsou vhodné především indukované pluripotentní kmenové buňky, jež je možné diferencovat v různé typy buněk. Huntingtonova choroba je příkladem geneticky podmíněného onemocnění, což značně komplikuje možnosti léčby. S pomocí iPSCs vědci předpokládají, že by bylo možné geneticky modifikovat pacientovi buňky, které by poté posloužily k vytvoření štěpu. Rizikem zůstává neznalost dlouhodobého vlivu léčby pomocí geneticky upravených buněk.

U mnoha dalších onemocnění se osvědčují mezenchymální kmenové buňky, jejichž komplexní účinky jsou schopny zajistit ochranu a podporu vlastní přirozené regeneraci těla.

Ačkoli se výzkum neurodegenerativních chorob a stejně tak klinické studie s kmenovými buňkami, v posledních letech posunuly výrazně vpřed, zůstávají tyto oblasti z velké části neprozkoumány.

10 ZDROJE

- [1] J. N. Barker and J. E. Wagner, "Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, no. 7, pp. 526–532, 2003.
- [2] M. Girlovanu, S. Susman, O. Soritau, D. Rus-Ciuca, C. Melincovici, A.-M. Constantin, and C. M. Mihiu, "Stem cells - biological update and cell therapy progress.," *Clujul Med.*, vol. 88, no. 3, pp. 265–271, 2015.
- [3] A. E. Pen and U. B. Jensen, "Current status of treating neurodegenerative disease with induced pluripotent stem cells," *Acta Neurol. Scand.*, no. 1, p. n/a-n/a, 2016.
- [4] M. J. Shambloott, J. Axelman, J. W. Littlefield, P. D. Blumenthal, G. R. Huggins, Y. Cui, L. Cheng, and J. D. Gearhart, "Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 98, no. 1, pp. 113–118, 2001.
- [5] M. G. Klug, M. H. Soonpaa, G. Y. Koh, and L. J. Field, "Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts," *J. Clin. Invest.*, vol. 98, no. 1, pp. 216–224, 1996.
- [6] P. Jin, T. Guo, and P. W. Bercraft, "FACS for the isolation of individual cells from transgenic mice harboring a fluorescent protein reporter," *Genesis*, vol. 27, no. 3, pp. 95–98, 2000.
- [7] D. a Heim, Y. Hanazono, N. Giri, T. Wu, R. Childs, S. E. Sellers, L. Muul, B. a Agricola, M. E. Metzger, R. E. Donahue, J. F. Tisdale, and C. E. Dunbar, "Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model.," *Mol. Ther.*, vol. 1, no. 6, pp. 533–544, 2000.
- [8] G. Bain, D. Kitchens, M. Yao, J. E. Huettner, and D. I. Gottlieb, "Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro," *Dev Biol*, vol. 168, no. 2. pp. 342–357, 1995.
- [9] S. Okabe, K. Forsberg-Nilsson, A. C. Spiro, M. Segal, and R. D. G. McKay, "Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro," *Mech. Dev.*, vol. 59, no. 1, pp. 89–102, 1996.
- [10] M. J. Grusby, H. Auchincloss Jr., R. Lee, R. S. Johnson, J. P. Spencer, M. Zijlstra, R. Jaenisch, V. E. Papaioannou, and L. H. Glimcher, "Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules," *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 90, no. 9, pp. 3913–3917, 1993.
- [11] C. H. Westphal and P. Leder, "Transposon-generated 'knock-out' and 'knock-in' gene-targeting constructs for use in mice," *Curr. Biol.*, vol. 7, no. 7, pp. 530–533, 1997.

- [12] D. M. Harlan, “The Future of Organ and Tissue Transplantation: Can T-Cell Costimulatory Pathway Modifiers Revolutionize the Prevention of Graft Rejection?,” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 282, no. 11, pp. 1076–1082, 1999.
- [13] B. Ebrahimi, “Reprogramming of adult stem/progenitor cells into iPSCs without reprogramming factors,” *J. Med. Hypotheses Ideas*, vol. 9, no. 2, pp. 99–103, 2015.
- [14] S. E. Vidal, B. Amlani, T. Chen, A. Tsigirigos, and M. Stadtfeld, “Combinatorial modulation of signaling pathways reveals cell-type-specific requirements for highly efficient and synchronous iPSC reprogramming,” *Stem Cell Reports*, vol. 3, no. 4, pp. 574–584, 2014.
- [15] M. Stadtfeld, E. Apostolou, H. Akutsu, A. Fukuda, P. Follett, S. Natesan, T. Kono, T. Shioda, and K. Hochedlinger, “Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells.,” *Nature*, vol. 465, no. 7295, pp. 175–181, 2010.
- [16] B.-Y. Hu, J. P. Weick, J. Yu, L.-X. Ma, X.-Q. Zhang, J. A. Thomson, and S.-C. Zhang, “Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 9, pp. 4335–4340, 2010.
- [17] H. Okano, M. Nakamura, K. Yoshida, Y. Okada, O. Tsuji, S. Nori, E. Ikeda, S. Yamanaka, and K. Miura, “Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells,” *Circ. Res.*, vol. 112, no. 3, pp. 523–533, 2013.
- [18] R. Hass, C. Kasper, S. Böhm, and R. Jacobs, “Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC.,” *Cell Commun. Signal.*, vol. 9, p. 12, 2011.
- [19] M. Otero-Viñas and V. Falanga, “Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy,” *Adv. Wound Care*, vol. 5, no. 4, 2016.
- [20] K. Le Blanc, C. Tammik, K. Rosendahl, E. Zetterberg, and O. Ringdén, “HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells,” *Exp. Hematol.*, vol. 31, no. 10, pp. 890–896, 2003.
- [21] D. C. Rubinsztein, “The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration,” *Nature*, vol. 443, no. 7113, pp. 780–786, 2006.
- [22] A. Antonic, E. S. Sena, J. S. Lees, T. E. Wills, P. Skeers, P. E. Batchelor, M. R. Macleod, and D. W. Howells, “Stem Cell Transplantation in Traumatic Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies,” *PLoS Biology*, vol. 11, no. 12, 2013.

- [23] M. Wernig, J.-P. Zhao, J. Pruszak, E. Hedlund, D. Fu, F. Soldner, V. Broccoli, M. Constantine-Paton, O. Isacson, and R. Jaenisch, “Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson’s disease.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 15, pp. 5856–5861, 2008.
- [24] O. Isacson and J. H. Kordower, “Future of cell and gene therapies for Parkinson’s disease,” *Annals of Neurology*, vol. 64, no. SUPPL. 2. 2008.
- [25] M. C. N. Marchetto, C. Carromeu, A. Acab, D. Yu, G. W. Yeo, Y. Mu, G. Chen, F. H. Gage, and A. R. Muotri, “A Model for Neural Development and Treatment of Rett Syndrome Using Human Induced Pluripotent Stem Cells,” *Cell*, vol. 143, no. 4, pp. 527–539, 2010.
- [26] H. N. Nguyen, B. Byers, B. Cord, A. Shcheglovitov, J. Byrne, P. Gujar, K. Kee, B. Schüle, R. E. Dolmetsch, W. Langston, T. D. Palmer, and R. R. Pera, “LRRK2 mutant iPSC-derived da neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress,” *Cell Stem Cell*, vol. 8, no. 3, pp. 267–280, 2011.
- [27] F. Soldner, D. Hockemeyer, C. Beard, Q. Gao, G. W. Bell, E. G. Cook, G. Hargus, A. Blak, O. Cooper, M. Mitalipova, O. Isacson, and R. Jaenisch, “Parkinson’s Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors,” *Cell*, vol. 136, no. 5, pp. 964–977, 2009.
- [28] C. Bock, E. Kiskinis, G. Verstappen, H. Gu, G. Boulting, Z. D. Smith, M. Ziller, G. F. Croft, M. W. Amoroso, D. H. Oakley, A. Gnirke, K. Eggan, and A. Meissner, “Reference maps of human es and ips cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines,” *Cell*, vol. 144, no. 3, pp. 439–452, 2011.
- [29] C. Y. Chung, V. Khurana, P. K. Auluck, D. F. Tardiff, J. R. Mazzulli, F. Soldner, V. Baru, Y. Lou, Y. Freyzon, S. Cho, A. E. Mungenast, J. Muffat, M. Mitalipova, M. D. Pluth, N. T. Jui, B. Schüle, S. J. Lippard, L. H. Tsai, D. Krainc, S. L. Buchwald, R. Jaenisch, and S. Lindquist, “Identification and rescue of α -synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons,” *Science (80-.)*, vol. 342, no. 6161, pp. 983–987, 2013.
- [30] A. E. Mungenast, S. Siegert, and L.-H. Tsai, “Modeling Alzheimer’s disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells,” *Mol. Cell. Neurosci.*, 2015.
- [31] S. M. Byrne, P. Mali, and G. M. Church, “Genome editing in human stem cells,” *Methods Enzymol.*, vol. 546, no. C, pp. 119–138, 2014.
- [32] L. S. Qi, M. H. Larson, L. A. Gilbert, J. A. Doudna, J. S. Weissman, A. P. Arkin, and

- W. A. Lim, “Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression,” *Cell*, vol. 152, no. 5, pp. 1173–1183, 2013.
- [33] R. Anand, K. D. Gill, and A. A. Mahdi, “Therapeutics of Alzheimer’s disease: Past, present and future,” *Neuropharmacology*, vol. 76, no. PART A, pp. 27–50, 2014.
- [34] C. P. Ferri, M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P. R. Menezes, E. Rimmer, and M. Scazufca, “Global prevalence of dementia: A Delphi consensus study,” *Lancet*, vol. 366, no. 9503, pp. 2112–2117, 2005.
- [35] R. Brookmeyer, E. Johnson, K. Ziegler-Graham, and H. M. Arrighi, “Forecasting the global burden of Alzheimer’s disease,” *Alzheimer’s Dement.*, vol. 3, no. 3, pp. 186–191, 2007.
- [36] M. S. Albert, S. T. DeKosky, D. Dickson, B. Dubois, H. H. Feldman, N. C. Fox, A. Gamst, D. M. Holtzman, W. J. Jagust, R. C. Petersen, P. J. Snyder, M. C. Carrillo, B. Thies, and C. H. Phelps, “The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer’s disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer’s Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer’s disease,” *Alzheimer’s and Dementia*, vol. 7, no. 3, pp. 270–279, 2011.
- [37] T. Amemori, P. Jendelova, J. Ruzicka, L. M. Urdzikova, and E. Sykova, “Alzheimer’s disease: Mechanism and approach to cell therapy,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 11, pp. 26417–26451, 2015.
- [38] R. Anand, K. D. Gill, and A. A. Mahdi, “Therapeutics of Alzheimer’s disease: Past, present and future,” *Neuropharmacology*, vol. 76, no. PART A, pp. 27–50, 2014.
- [39] M. Cacquevel, L. Aeschbach, J. Houacine, and P. C. Fraering, “Alzheimer’s disease-linked mutations in presenilin-1 result in a drastic loss of activity in purified γ -secretase complexes,” *PLoS One*, vol. 7, no. 4, 2012.
- [40] A. Cedazo-Mínguez, “Apolipoprotein E and Alzheimer’s disease: molecular mechanisms and therapeutic opportunities,” *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 11, no. 6, pp. 1227–1238, 2007.
- [41] J. A. Hardy and G. A. Higgins, “Alzheimer’s disease: the amyloid cascade hypothesis,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 256, no. 5054, pp. 184–185, 1992.
- [42] W. F. Goure, G. A. Krafft, J. Jerecic, and F. Hefti, “Targeting the proper amyloid-beta neuronal toxins: a path forward for Alzheimer’s disease immunotherapeutics,” *Alzheimers. Res. Ther.*, vol. 6, no. 4, p. 42, 2014.
- [43] T. Wisniewski and F. Go?i, “Immunotherapy for Alzheimer’s disease,” *Biochemical*

- Pharmacology*, vol. 88, no. 4. pp. 499–507, 2014.
- [44] C. Ballatore, V. M.-Y. Lee, and J. Q. Trojanowski, “Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer’s disease and related disorders,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 8, no. 9, pp. 663–672, 2007.
- [45] C. A. Lasagna-Reeves, D. L. Castillo-Carranza, U. Sengupta, M. J. Guerrero-Munoz, T. Kiritoshi, V. Neugebauer, G. R. Jackson, and R. Kaye, “Alzheimer brain-derived tau oligomers propagate pathology from endogenous tau,” *Sci. Rep.*, vol. 2, p. 700, 2012.
- [46] R. J. Castellani and G. Perry, “The complexities of the pathology-pathogenesis relationship in Alzheimer disease,” *Biochemical Pharmacology*, vol. 88, no. 4. pp. 671–676, 2014.
- [47] C. Holmes, D. Boche, D. Wilkinson, G. Yadegarfar, V. Hopkins, A. Bayer, R. W. Jones, R. Bullock, S. Love, J. W. Neal, E. Zotova, and J. a R. Nicoll, “Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer’s disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial,” *Lancet*, vol. 372, no. 9634, pp. 216–223, 2008.
- [48] X. Chai, S. Wu, T. K. Murray, R. Kinley, C. V. Cella, H. Sims, N. Buckner, J. Hanmer, P. Davies, M. J. O’Neill, M. L. Hutton, and M. Citron, “Passive immunization with anti-tau antibodies in two transgenic models: Reduction of tau pathology and delay of disease progression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 39, pp. 34457–34467, 2011.
- [49] R. C. Taylor and A. Dillin, “Aging as an event of proteostasis collapse,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 1–17, 2011.
- [50] M. Schröder and R. J. Kaufman, “the Mammalian Unfolded Protein Response,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 74, no. 1, pp. 739–789, 2005.
- [51] Y. Huang and L. Mucke, “Alzheimer mechanisms and therapeutic strategies,” *Cell*, vol. 148, no. 6. pp. 1204–1222, 2012.
- [52] F. Liu, J. Shi, H. Tanimukai, J. Gu, J. Gu, I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, and C. X. Gong, “Reduced O-GlcNAcylation links lower brain glucose metabolism and tau pathology in Alzheimer’s disease,” *Brain*, vol. 132, no. 7, pp. 1820–1832, 2009.
- [53] D. P. Pelvig, H. Pakkenberg, A. K. Stark, and B. Pakkenberg, “Neocortical glial cell numbers in human brains,” *Neurobiol. Aging*, vol. 29, no. 11, pp. 1754–1762, 2008.
- [54] C. T. Ekdahl, J.-H. Claassen, S. Bonde, Z. Kokaia, and O. Lindvall, “Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 23, pp. 13632–13637, 2003.
- [55] Y. Ziv, N. Ron, O. Butovsky, G. Landa, E. Sudai, N. Greenberg, H. Cohen, J. Kipnis,

- and M. Schwartz, “Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood.,” *Nat. Neurosci.*, vol. 9, no. 2, pp. 268–275, 2006.
- [56] A. Lyons, E. J. Downer, S. Crotty, Y. M. Nolan, K. H. G. Mills, and M. a Lynch, “CD200 ligand receptor interaction modulates microglial activation in vivo and in vitro: a role for IL-4.,” *J. Neurosci.*, vol. 27, no. 31, pp. 8309–8313, 2007.
- [57] D. G. Walker, J. E. Dalsing-Hernandez, N. A. Campbell, and L. F. Lue, “Decreased expression of CD200 and CD200 receptor in Alzheimer’s disease: A potential mechanism leading to chronic inflammation,” *Exp. Neurol.*, vol. 215, no. 1, pp. 5–19, 2009.
- [58] K. Lucin, C. O’Brien, G. Bieri, E. Czirr, K. Mosher, R. Abbey, D. Mastroeni, J. Rogers, B. Spencer, E. Masliah, and T. Wyss-Coray, “Microglial Beclin 1 Regulates Retromer Trafficking and Phagocytosis and Is Impaired in Alzheimer’s Disease,” *Neuron*, vol. 79, no. 5, pp. 873–886, 2013.
- [59] R. Bhat, E. P. Crowe, A. Bitto, M. Moh, C. D. Katsetos, F. U. Garcia, F. B. Johnson, J. Q. Trojanowski, C. Sell, and C. Torres, “Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer’s Disease,” *PLoS One*, vol. 7, no. 9, 2012.
- [60] H. Oakley, S. L. Cole, S. Logan, E. Maus, P. Shao, J. Craft, A. Guillozet-Bongaarts, M. Ohno, J. Disterhoft, E. L. Van, R. Berry, and R. Vassar, “Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer’s disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation,” *J. Neurosci.*, vol. 26, no. 1529–2401 (Electronic), pp. 10129–10140, 2006.
- [61] Ó. Álvarez-García, I. Vega-Naredo, V. Sierra, B. Caballero, C. Tomás-Zapico, A. Camins, J. J. García, M. Pallàs, and A. Coto-Montes, “Elevated oxidative stress in the brain of senescence-accelerated mice at 5 months of age,” *Biogerontology*, vol. 7, no. 1, pp. 43–52, 2006.
- [62] M. Li, M. Inaba, K. Guo, N. G. Abraham, and S. Ikehara, “Amelioration of cognitive ability in senescence-accelerated mouse prone 8 (SAMP8) by intra-bone marrow-bone marrow transplantation,” *Neurosci. Lett.*, vol. 465, no. 1, pp. 36–40, 2009.
- [63] S. Shah and W. E. Reichman, “Treatment of Alzheimer’s disease across the spectrum of severity.,” *Clinical interventions in aging*, vol. 1, no. 2. pp. 131–142, 2006.
- [64] S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, and K. Bieback, “Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue.,” *Stem Cells*, vol. 24, no. 5, pp. 1294–1301, 2006.

- [65] L. M. Urdzikova, J. Ruzicka, M. LaBagnara, K. Karova, S. Kubinova, K. Jirakova, R. Murali, E. Sykova, M. Jhanwar-Uniyal, and P. Jendelova, “Human mesenchymal stem cells modulate inflammatory cytokines after spinal cord injury in rat,” *Int J Mol Sci*, vol. 15, no. 7, pp. 11275–11293, 2014.
- [66] J. R. Munoz, B. R. Stoutenger, A. P. Robinson, J. L. Spees, and D. J. Prockop, “Human stem/progenitor cells from bone marrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 102, no. 50, pp. 18171–18176, 2005.
- [67] M. Tfilin, E. Sudai, a Merenlender, I. Gispan, G. Yadid, and G. Turgeman, “Mesenchymal stem cells increase hippocampal neurogenesis and counteract depressive-like behavior.,” *Mol. Psychiatry*, vol. 15, no. 12, pp. 1164–1175, 2010.
- [68] S. R. Ferrón, M. A. Marqués-Torrejón, H. Mira, I. Flores, K. Taylor, M. a Blasco, and I. Fariñas, “Telomere shortening in neural stem cells disrupts neuronal differentiation and neuritogenesis.,” *J. Neurosci.*, vol. 29, no. 46, pp. 14394–14407, 2009.
- [69] M. Blurton-Jones, M. Kitazawa, H. Martinez-Coria, N. a Castello, F.-J. Müller, J. F. Loring, T. R. Yamasaki, W. W. Poon, K. N. Green, and F. M. LaFerla, “Neural stem cells improve cognition via BDNF in a transgenic model of Alzheimer disease.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 32, pp. 13594–13599, 2009.
- [70] K. Sugaya, “Possible use of autologous stem cell therapies for Alzheimer’s disease.,” *Curr. Alzheimer Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 367–376, 2005.
- [71] B. Waldau and A. K. Shetty, “Behavior of neural stem cells in the Alzheimer brain,” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 65, no. 15. pp. 2372–2384, 2008.
- [72] M. a Blasco, “Telomere length, stem cells and aging.,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 3, no. 10, pp. 640–649, 2007.
- [73] M.-L. Liu, T. Zang, Y. Zou, J. C. Chang, J. R. Gibson, K. M. Huber, and C.-L. Zhang, “Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons.,” *Nat. Commun.*, vol. 4, no. May, p. 2183, 2013.
- [74] Z. Guo, L. Zhang, Z. Wu, Y. Chen, F. Wang, and G. Chen, “In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer’s disease model,” *Cell Stem Cell*, vol. 14, no. 2, pp. 188–202, 2014.
- [75] European Brain Council, “Parkinson’s disease Fact Sheet,” 2011. [Online]. Available: <http://ebc-brussels.org/wp-content/uploads/2015/07/Parkinsons-fact-sheet-July-2011.pdf>. [Accessed: 16-Jun-2016].
- [76] D. K. Smith, M. He, C.-L. Zhang, and J. C. Zheng, “The therapeutic potential of cell

- identity reprogramming for the treatment of aging-related neurodegenerative disorders,” *Prog. Neurobiol.*, 2016.
- [77] A. E. Lang and A. M. Lozano, “Parkinson’s Disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 339, no. 15, pp. 1044–1053, 1998.
- [78] C. Schiesling, N. Kieper, K. Seidel, and R. Krüger, “Review: Familial Parkinson’s disease - Genetics, clinical phenotype and neuropathology in relation to the common sporadic form of the disease,” *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 34, no. 3. pp. 255–271, 2008.
- [79] J. B. Leverenz, I. Umar, Q. Wang, T. J. Montine, P. J. McMillan, D. W. Tsuang, J. Jin, C. Pan, J. Shin, D. Zhu, and J. Zhang, “Proteomic identification of novel proteins in cortical lewy bodies,” *Brain Pathol.*, vol. 17, no. 2, pp. 139–145, 2007.
- [80] M. H. Polymeropoulos, “Mutation in the -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson’s Disease,” *Science (80-.)*, vol. 276, no. 5321, pp. 2045–2047, 1997.
- [81] I. Carballo-Carbajal, S. Weber-endress, G. Rovelli, D. Chan, B. Wolozin, C. L. Klein, N. Patenge, T. Gasser, and P. J. Kahle, “Leucine-rich repeat kinase 2 induces alpha-synuclein expression via the extracellular signal-regulated kinase pathway,” *Cell. Signal.*, vol. 22, no. 5, pp. 821–827, 2010.
- [82] P. Reinhardt, B. Schmid, L. F. Burbulla, D. C. Sch??ndorf, L. Wagner, M. Glatza, S. H??ing, G. Hargus, S. A. Heck, A. Dhingra, G. Wu, S. M??ller, K. Brockmann, T. Kluba, M. Maisel, R. Kr??ger, D. Berg, Y. Tsytsyura, C. S. Thiel, O. E. Psathaki, J. Klingauf, T. Kuhlmann, M. Klewin, H. M??ller, T. Gasser, H. R. Sch??ler, and J. Sternecker, “Genetic correction of a *lrrk2* mutation in human iPSCs links parkinsonian neurodegeneration to ERK-dependent changes in gene expression,” *Cell Stem Cell*, vol. 12, no. 3, pp. 354–367, 2013.
- [83] N. Badiola, R. M. de Oliveira, F. Herrera, C. Guardia-Laguarta, S. A. Gonçalves, M. Pera, M. Suárez-Calvet, J. Clarimon, T. F. Outeiro, and A. Lleó, “Tau enhances α -synuclein aggregation and toxicity in cellular models of synucleinopathy,” *PLoS One*, vol. 6, no. 10, 2011.
- [84] S. Fahn, D. Oakes, I. Shoulson, K. Kieburtz, A. Rudolph, A. Lang, C. W. Olanow, C. Tanner, K. Marek, and Parkinson Study Group, “Levodopa and the progression of Parkinson’s disease,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 351, no. 24, pp. 2498–2508, 2004.
- [85] X. Liu, F. Li, E. a Stubblefield, B. Blanchard, T. L. Richards, G. a Larson, Y. He, Q. Huang, A.-C. Tan, D. Zhang, T. a Benke, J. R. Sladek, N. R. Zahniser, and C.-Y. Li, “Direct reprogramming of human fibroblasts into dopaminergic neuron-like cells,” *Cell*

- Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 321–332, 2012.
- [86] P. J. Hallett, O. Cooper, D. Sadi, H. Robertson, I. Mendez, and O. Isacson, “Long-Term Health of Dopaminergic Neuron Transplants in Parkinson’s Disease Patients,” *Cell Rep.*, vol. 7, no. 6, pp. 1755–1761, 2014.
- [87] A. Morizane, D. Doi, T. Kikuchi, K. Okita, A. Hotta, T. Kawasaki, T. Hayashi, H. Onoe, T. Shiina, S. Yamanaka, and J. Takahashi, “Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate,” *Stem Cell Reports*, vol. 1, no. 4, pp. 283–292, 2013.
- [88] a L. Brownell, B. G. Jenkins, D. R. Elmaleh, T. W. Deacon, R. D. Spealman, and O. Isacson, “Combined PET/MRS brain studies show dynamic and long-term physiological changes in a primate model of Parkinson disease.,” *Nat. Med.*, vol. 4, no. 11, pp. 1308–1312, 1998.
- [89] P. J. Hallett, M. Deleidi, A. Astradsson, G. A. Smith, O. Cooper, T. M. Osborn, M. Sundberg, M. A. Moore, E. Perez-Torres, A. L. Brownell, J. M. Schumacher, R. D. Spealman, and O. Isacson, “Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson’s disease,” *Cell Stem Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 269–274, 2015.
- [90] W. Niu, T. Zang, Y. Zou, S. Fang, D. K. Smith, R. Bachoo, and C.-L. Zhang, “In vivo reprogramming of astrocytes to neuroblasts in the adult brain.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 10, pp. 1164–1175, 2013.
- [91] W. Robberecht and T. Philips, “The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis.,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 14, no. 4, pp. 248–264, 2013.
- [92] S. Lattante, S. Ciura, G. A. Rouleau, and E. Kabashi, “Defining the genetic connection linking amyotrophic lateral sclerosis (ALS) with frontotemporal dementia (FTD),” *Trends in Genetics*, vol. 31, no. 5, pp. 263–273, 2015.
- [93] A. M. Haidet-Phillips and N. J. Maragakis, “Neural and glial progenitor transplantation as a neuroprotective strategy for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS),” *Brain Res.*, vol. 1628, pp. 343–350, 2015.
- [94] M. Therrien, P. A. Dion, and G. A. Rouleau, “ALS: Recent Developments from Genetics Studies,” *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, vol. 16, no. 6, p. 59, 2016.
- [95] S. Pickles and C. Vande Velde, “Misfolded SOD1 and ALS: Zeroing in on mitochondria,” *Amyotroph. Lateral Scler.*, vol. 13, no. July 2011, pp. 333–340, 2012.
- [96] E. Tokuda and Y. Furukawa, “Copper Homeostasis as a Therapeutic Target in Amyotrophic Lateral Sclerosis with SOD1 Mutations,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 5,

p. 636, 2016.

- [97] C. Lagier-Tourenne, M. Polymenidou, and D. W. Cleveland, “TDP-43 and FUS/TLS: Emerging roles in RNA processing and neurodegeneration,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 19, no. R1, 2010.
- [98] M. Neumann, D. M. Sampathu, L. K. Kwong, A. C. Truax, M. C. Micsenyi, T. T. Chou, J. Bruce, T. Schuck, M. Grossman, C. M. Clark, L. F. McCluskey, B. L. Miller, E. Masliah, I. R. Mackenzie, H. Feldman, W. Feiden, H. A. Kretzschmar, J. Q. Trojanowski, and V. M.-Y. Lee, “Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis.,” *Science*, vol. 314, no. 5796, pp. 130–133, 2006.
- [99] F. P. Di Giorgio, G. L. Boulting, S. Bobrowicz, and K. C. Eggan, “Human Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons Are Sensitive to the Toxic Effect of Glial Cells Carrying an ALS-Causing Mutation,” *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 637–648, 2008.
- [100] M. C. N. Marchetto, A. R. Muotri, Y. Mu, A. M. Smith, G. G. Cezar, and F. H. Gage, “Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells.,” *Cell Stem Cell*, vol. 3, no. 6, pp. 649–657, 2008.
- [101] B. Bilican, A. Serio, S. J. Barmada, A. L. Nishimura, G. J. Sullivan, M. Carrasco, H. P. Phatnani, C. A. Puddifoot, D. Story, J. Fletcher, I.-H. Park, B. A. Friedman, G. Q. Daley, D. J. A. Wyllie, G. E. Hardingham, I. Wilmot, S. Finkbeiner, T. Maniatis, C. E. Shaw, and S. Chandran, “Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 15, pp. 5803–5808, 2012.
- [102] S. Lee and E. J. Huang, “Modeling ALS and FTD with iPSC-derived neurons,” *Brain Res.*, pp. 1–12, 2015.
- [103] G. C. Coatti, M. S. Beccari, T. R. Olávio, M. Mitne-Neto, O. K. Okamoto, and M. Zatz, “Stem cells for amyotrophic lateral sclerosis modeling and therapy: Myth or fact?,” *Cytom. Part A*, vol. 87, no. 3, pp. 197–211, 2015.
- [104] L. da Silva Meirelles, A. M. Fontes, D. T. Covas, and A. I. Caplan, “Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells,” *Cytokine and Growth Factor Reviews*, vol. 20, no. 5–6, pp. 419–427, 2009.
- [105] A. Nylander and D. A. Hafler, “Multiple sclerosis.,” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 4, pp. 1180–1188, 2012.
- [106] A. Di Ruscio, F. Patti, R. S. Welner, D. G. Tenen, and G. Amabile, “Multiple sclerosis:

- getting personal with induced pluripotent stem cells.,” *Cell Death Dis.*, vol. 6, no. 7, 2015.
- [107] F. Patti, “Cognitive impairment in multiple sclerosis.,” *Mult. Scler.*, vol. 15, no. 1, pp. 2–8, 2009.
- [108] D. A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. W. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Ivinson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg, and S. L. Hauser, “Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 9, pp. 851–862, 2007.
- [109] B. Song, G. Sun, D. Herszfeld, A. Sylvain, N. V. Campanale, C. E. Hirst, S. Caine, H. C. Parkington, M. A. Tonta, H. A. Coleman, M. Short, S. D. Ricardo, B. Reubinoff, and C. C. A. Bernard, “Neural differentiation of patient specific iPSCs as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis,” *Stem Cell Res.*, vol. 8, no. 2, pp. 259–273, 2012.
- [110] V. K. Harris, Q. J. Yan, T. Vyshkina, S. Sahabi, X. Liu, and S. A. Sadiq, “Clinical and pathological effects of intrathecal injection of mesenchymal stem cell-derived neural progenitors in an experimental model of multiple sclerosis,” *J. Neurol. Sci.*, vol. 313, no. 1–2, pp. 167–177, 2012.
- [111] T. Pringsheim, K. Wiltshire, L. Day, J. Dykeman, T. Steeves, and N. Jette, “The incidence and prevalence of Huntington’s disease: A systematic review and meta-analysis,” *Mov. Disord.*, vol. 27, no. 9, pp. 1083–1091, 2012.
- [112] M. C. An, N. Zhang, G. Scott, D. Montoro, T. Wittkop, S. Mooney, S. Melov, and L. M. Ellerby, “Genetic correction of huntington’s disease phenotypes in induced pluripotent stem cells,” *Cell Stem Cell*, vol. 11, no. 2, pp. 253–263, 2012.
- [113] W. Yang, J. R. Dunlap, R. B. Andrews, and R. Wetzel, “Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells.,” *Hum. Mol. Genet.*, vol. 11, no. 23, pp. 2905–2917, 2002.
- [114] A. Kumar, S. Kumar Singh, V. Kumar, D. Kumar, S. Agarwal, and M. K. Rana, “Huntington’s disease: An update of therapeutic strategies,” *Gene*, vol. 556, no. 2, pp. 91–97, 2015.
- [115] W. Huang, W. Chen, and X. Zhang, “Huntington’s disease: Molecular basis of pathology and status of current therapeutic approaches (Review),” *Exp. Ther. Med.*, pp. 1951–1956, 2016.
- [116] J. Rossignol, K. Fink, K. Davis, S. Clerc, A. Crane, J. Matchynski, S. Lowrance, M.

- Bombard, N. Dekorver, L. Lescaudron, and G. L. Dunbar, “Transplants of adult mesenchymal and neural stem cells provide neuroprotection and behavioral sparing in a transgenic rat model of huntington’s disease,” *Stem Cells*, vol. 32, no. 2, pp. 500–509, 2014.
- [117] F. Cicchetti, S. Saporta, R. a Hauser, M. Parent, M. Saint-Pierre, P. R. Sanberg, X. J. Li, J. R. Parker, Y. Chu, E. J. Mufson, J. H. Kordower, and T. B. Freeman, “Neural transplants in patients with Huntington’s disease undergo disease-like neuronal degeneration.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 30, pp. 12483–12488, 2009.
- [118] H. Klassen, K. L. Imfeld, J. Ray, M. J. Young, F. H. Gage, and M. A. Berman, “The immunological properties of adult hippocampal progenitor cells,” *Vision Res.*, vol. 43, no. 8, pp. 947–956, 2003.
- [119] N. Zhang, M. C. An, D. Montoro, and L. M. Ellerby, “Characterization of human Huntington’s disease cell model from induced pluripotent stem cells,” *PLoS Curr.*, no. OCT, pp. 1–11, 2010.
- [120] V. Doulames and G. Plant, “Induced Pluripotent Stem Cell Therapies for Cervical Spinal Cord Injury,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, no. 4, p. 530, 2016.
- [121] M. O. Totoiu and H. S. Keirstead, “Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination,” *J. Comp. Neurol.*, vol. 486, no. 4, pp. 373–383, 2005.
- [122] M. S. Beattie, a a Farooqui, and J. C. Bresnahan, “Review of current evidence for apoptosis after spinal cord injury.,” *J. Neurotrauma*, vol. 17, no. 10, pp. 915–925, 2000.
- [123] H. S. Keirstead, “Human Embryonic Stem Cell-Derived Oligodendrocyte Progenitor Cell Transplants Remyelinate and Restore Locomotion after Spinal Cord Injury,” *J. Neurosci.*, vol. 25, no. 19, pp. 4694–4705, 2005.
- [124] P. Lu, L. L. Jones, E. Y. Snyder, and M. H. Tuszynski, “Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury,” *Exp. Neurol.*, vol. 181, no. 2, pp. 115–129, 2003.
- [125] A. Dasgupta, R. P. Darst, K. J. Martin, a Cynthia, D. T. Auble, B. Lavik, X. Qu, K. I. Park, J. Ourednik, R. Langer, E. Y. Snyder, D. Greve, A. Dale, R. Killiany, H. D. Rosas, A. Cocchiarella, P. Firth, B. Rosen, S. Lake, N. Lange, C. Routledge, Y. D. Teng, E. B. Lavik, and D. Zurakowski, “Functional recovery following traumatic spinal cord injury mediated by a unique polymer scaffold,” vol. 99, no. 5, 2002.
- [126] E. Kokmen, J. P. Whisnant, W. M. O’Fallon, C. P. Chu, and C. M. Beard, “Dementia

- after ischemic stroke: a population-based study in Rochester, Minnesota (1960-1984),” *Neurology*, vol. 46, no. 1, pp. 154–159, 1996.
- [127] H. L. Parke, E. Epiphaniou, G. Pearce, S. J. C. Taylor, A. Sheikh, C. J. Griffiths, T. Greenhalgh, and H. Pinnock, “Self-management support interventions for stroke survivors: A systematic meta-review,” *PLoS ONE*, vol. 10, no. 7. 2015.
- [128] A. Popa-Wagner, M. Filfan, A. Uzoni, P. Pourgolafshan, and A. M. Buga, “Poststroke cell therapy of the aged brain,” *Neural Plast.*, vol. 2015, 2015.
- [129] D. Chang, N. Lee, I. Park, C. Choi, I. Jeon, J. Kwon, S. Oh, D. A. Shin, J. T. Do, D. R. Lee, H. Lee, H. Moon, K. S. Hong, G. Q. Daley, and J. Song, “Therapeutic potential of human induced pluripotent stem cells in experimental stroke.,” *Cell Transplant.*, vol. 22, no. 8, pp. 1427–40, 2013.
- [130] O. Y. Bang, “Clinical Trials of Adult Stem Cell Therapy in Patients with Ischemic Stroke,” *J. Clin. Neurol.*, vol. 12, no. 1, pp. 14–20, 2016.
- [131] L. Liu, M. A. Eckert, H. Riazifar, D. K. Kang, D. Agalliu, and W. Zhao, “From blood to the brain: Can systemically transplanted mesenchymal stem cells cross the blood-brain barrier?,” *Stem Cells International*. 2013.
- [132] N. Grigoriadis, A. Lourbopoulos, R. Lagoudaki, J.-M. Frischer, E. Polyzoidou, O. Touloumi, C. Simeonidou, G. Deretzi, J. Kountouras, E. Spandou, K. Kotta, G. Karkavelas, N. Tascos, and H. Lassmann, “Variable behavior and complications of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted in experimental autoimmune encephalomyelitis.,” *Exp. Neurol.*, vol. 230, no. 1, pp. 78–89, 2011.
- [133] Q. Wang, F. Duan, M. Wang, X. Wang, P. Liu, and L. Ma, “Effect of stem cell-based therapy for ischemic stroke treatment: A meta-analysis,” *Clin. Neurol. Neurosurg.*, vol. 146, no. 69, pp. 1–11, 2016.
- [134] J. H. Lee, I. Oh, and H. K. Lim, “Stem Cell Therapy: A Prospective Treatment for Alzheimer’s Disease.,” *Psychiatry Investig.*, vol. 13, no. 6, pp. 583–589, 2016.