

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Buněčná terapie pomocí kmenových buněk
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Denisa Šourková**
Osobní číslo: **C21230**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Buněčná terapie pomocí kmenových buněk**
Téma práce anglicky: **Cell Therapy Using Stem Cells**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Zpracujte literární rešerši na dané téma bakalářské práce.

1. Prostudujte a shrňte současný stav zavádění buněčné terapie v klinické praxi. Zaměřte se na vývoj léčby pomocí kmenových buněk u poškození nervového systému. Popište historii výzkumu a různé typy buněčné terapie.
2. Porovnejte výsledky jednotlivých publikovaných prací, a popište výhody a nevýhody buněčné terapie u neurodegenerativních onemocnění (Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, Huntingtonova choroba, amyotrofická laterální skleróza, aj.).
3. Diskutujte o budoucnosti buněčné terapie u těchto onemocnění, etické otázky, apod. Bakalářskou práci přehledně zpracujte, použijte obrázky a schémata. Ke zpracování kompilace využijte elektronických databází, např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *WoS*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Lenka Šmíd, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Buněčná terapie pomocí kmenových buněk jsem vypracovala 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 19. 06. 2024

Denisa Šourková v.r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěla poděkovat paní Mgr. Lence Šmíd, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady, které mi poskytovala během zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala mé mamince za veškerou podporu během studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zabývá buněčnou terapií pomocí kmenových buněk při léčbě neurodegenerativních onemocnění. Popisuje jednotlivé typy kmenových buněk a jejich potencionální využití. Součástí práce je také přehled vybraných neurodegenerativních onemocnění a možné přístupy jejich léčby pomocí kmenových buněk.

KLÍČOVÁ SLOVA

buněčná terapie, kmenové buňky, neurodegenerativní onemocnění

TITLE

Cell therapy using stem cells

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on cell therapy using stem cells in the treatment of neurodegenerative diseases. It describes various types of stem cells and their potential applications. Additionally, it provides an overview of selected neurodegenerative diseases and potencional approaches to their treatment using stem cells.

KEYWORDS

cell therapy, stem cells, neurodegenerative diseases

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	11
ÚVOD.....	12
1 Buněčná terapie.....	13
1.1 Kmenové buňky v buněčné terapii	13
1.2 Embryonální kmenové buňky	15
1.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky	15
1.4 Mezenchymální kmenové buňky	16
1.5 Historie.....	17
2 Kmenové buňky při léčbě neurodegenerativních onemocnění.....	18
2.1 Neurální kmenové buňky	19
2.1.1 NSC izolované z lidského fetálního neuroektodermu	20
2.1.2 NSC odvozené z pluripotentních kmenových buněk.....	21
2.2 Transplantace NCS	22
3 Léčba Alzheimerovy choroby pomocí kmenových buněk.....	23
3.1 Alzheimerova choroba	23
3.2 Patogeneze a patofyziologie onemocnění	24
3.3 Terapie pomocí kmenových buněk.....	24
3.4 Embryonální kmenové buňky	25
3.5 Mezenchymální kmenové buňky	25
3.6 Indukované pluripotentní kmenové buňky	26
3.7 Neurální kmenové buňky	26
3.8 Podávání myších progenitorů thymického epitelu odvozených od ESC	27
3.8.1 Postup a příprava buněk.....	28
3.9 Intracerebroventrikulární injekce MSC z lidské pupečnickové krve	28
3.9.1 Příprava hUCB-MCS	29
3.10 Budoucí výzvy	29

4	Léčba Parkinsonovy choroby pomocí kmenových buněk.....	30
4.1	Parkinsonova choroba.....	30
4.2	Terapie pomocí kmenových buněk.....	31
4.3	Embryonální kmenové buňky.....	32
4.4	Mezenchymální kmenové buňky.....	32
4.5	Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	32
4.6	Neurální kmenové buňky.....	33
4.7	MSC u PD: Účinky v postransplantačním období.....	34
4.7.1	Příprava buněk.....	35
4.7.2	Závěr studie.....	35
4.8	Transplantace NSC v kombinaci s ethylstearátem.....	36
4.8.1	Příprava buněk.....	36
4.8.2	Závěr studie.....	37
5	Léčba Huntingonovy choroby pomocí kmenových buněk.....	38
5.1	Patogeneze HD.....	38
5.2	Terapie pomocí kmenových buněk.....	39
5.3	Embryonální kmenové buňky.....	39
5.4	Mezenchymální kmenové buňky.....	39
5.5	Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	40
5.6	Nervové kmenové buňky.....	40
5.7	Striální progenitory odvozené od lidských ESC.....	40
5.7.1	Příprava buněk.....	40
5.7.2	Výsledky a závěr studie.....	41
5.8	Intranazální podání MSC.....	41
5.8.1	Příprava buněk.....	42
5.8.2	Výsledky a závěr studie.....	42
6	Léčba amyloτροφické laterální sklerózy pomocí kmenových buněk.....	43
6.1	Terapie pomocí kmenových buněk.....	44
6.2	Mezenchymální kmenové buňky.....	45

6.3	Indukované pluripotentní kmenové buňky	45
6.4	Nervové kmenové buňky	46
6.5	Sekretom kmenových buněk zubní dřene u myšího modelu ALS.....	46
6.5.1	Příprava buněk	46
6.5.2	Výsledky a závěr studie	47
6.6	iPSC u pacientů s ALS nesoucí různé mutace superoxiddismutázy 1.....	47
6.6.1	Příprava buněk	47
6.6.2	Výsledky a závěr studie	48
	Závěr	49
	POUŽITÁ LITERATURA.....	50

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Hierarchie kmenových buněk	14
Obrázek 2: Zdroje pro výrobu NSC	21
Obrázek 3: Typy kmenových buněk v léčbě AD	27
Obrázek 4: Terapeutické strategie s využitím buněk u ALS	44

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ESC – embryonální kmenové buňky (Embryonic Stem Cells)

MSC – mezenchymální kmenové buňky (Mesenchymal Stem Cells)

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

BM-MSK – stromální kmenové buňky kostní dřeně (Bone Marrow Stromal Stem Cells)

UC-MSK – mezenchymální kmenové buňky extrahované z pupečnickové šňůry (Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells)

AD-MSK – mezenchymální kmenové buňky odvozené z tukové tkáně (Adipose tissue Derived Mesenchymal Stem Cells)

CNS – centrální nervový systém (Central Nervous System)

NSC – neurální kmenové buňky (Neural Stem Cells)

NPC – neurální progenitorové buňky (Neural Progenitor Cells)

qNSC – klidové neurální kmenové buňky (quiescent Neural Stem Cells)

fNSC – fetální neurální kmenové buňky (fetal Neural Stem Cells)

GRP – gliálně omezené progenitorové buňky (Glial Progenitor Cells)

PSC – pluripotentních kmenové buňky (Pluripotent Stem Cells)

AD – Alzheimerova choroba (Alzheimer 's disease)

A β – β -amyloidní peptidy (beta amyloid peptides)

APP – amyloidní prekurzorový protein (Amyloid Precursor Protein)

hUCB-MSK – mezenchymální kmenové buňky odvozené z lidské pupečnickové krve (human Umbilical Cord Blood-derived Mesenchymal Stem Cells)

TEC – epiteliální buňky brzlíku (Thymic Epithelial cells)

TEP – thymické epiteliální progenitory (Thymic Epithelial Progenitors)

ASN – abnormální α -synuklein (Abnormal α -synuclein)

PD-Parkinsonova choroba (Parkinson's disease)

DA – dopaminergní neurony (Dopaminergic neurons)

TH – tyrosinhydroxyláza (Tyrosine Hydroxylase)

HD – Huntingtonova choroba (Huntington's Disease)

HTT – protein huntingtin (Huntington's protein)

BDNF – mozkový neurotrofický faktor (BDNF, Brain-derived neurotrophic factor)

ALS – amyotrofická laterální skleróza (Amyotrophic Lateral Sclerosis)

ÚVOD

Buněčná terapie pomocí kmenových buněk představuje unikátní způsob léčby a jedno z nejperspektivnějších odvětví moderní medicíny. Kmenové buňky lákají vědce kvůli jejich jedinečným schopnostem, jako je schopnost dělit se a diferencovat do různých typů buněk, čehož lze využít při regeneraci poškozených tkání. Jednou z možností jejich klinického využití je při léčbě neurodegenerativních onemocnění, které postihují miliony lidí na celém světě a závažně tak ovlivňují kvalitu jejich života. Současné léčebné strategie pouze zmírňují symptomy bez vlivu na progresi těchto onemocnění.

Cílem této bakalářské práce je seznámení s typy kmenových buněk, jejich charakterizací a potencionálním využitím, dále stručný popis vybraných neurodegenerativních onemocněních, jako je Alzheimerova, Parkinsonova, Huntingonova choroba a amyloτροφická laterální skleróza s analýzou současného stavu výzkumu v oblasti buněčné terapie pomocí kmenových buněk.

1 Buněčná terapie

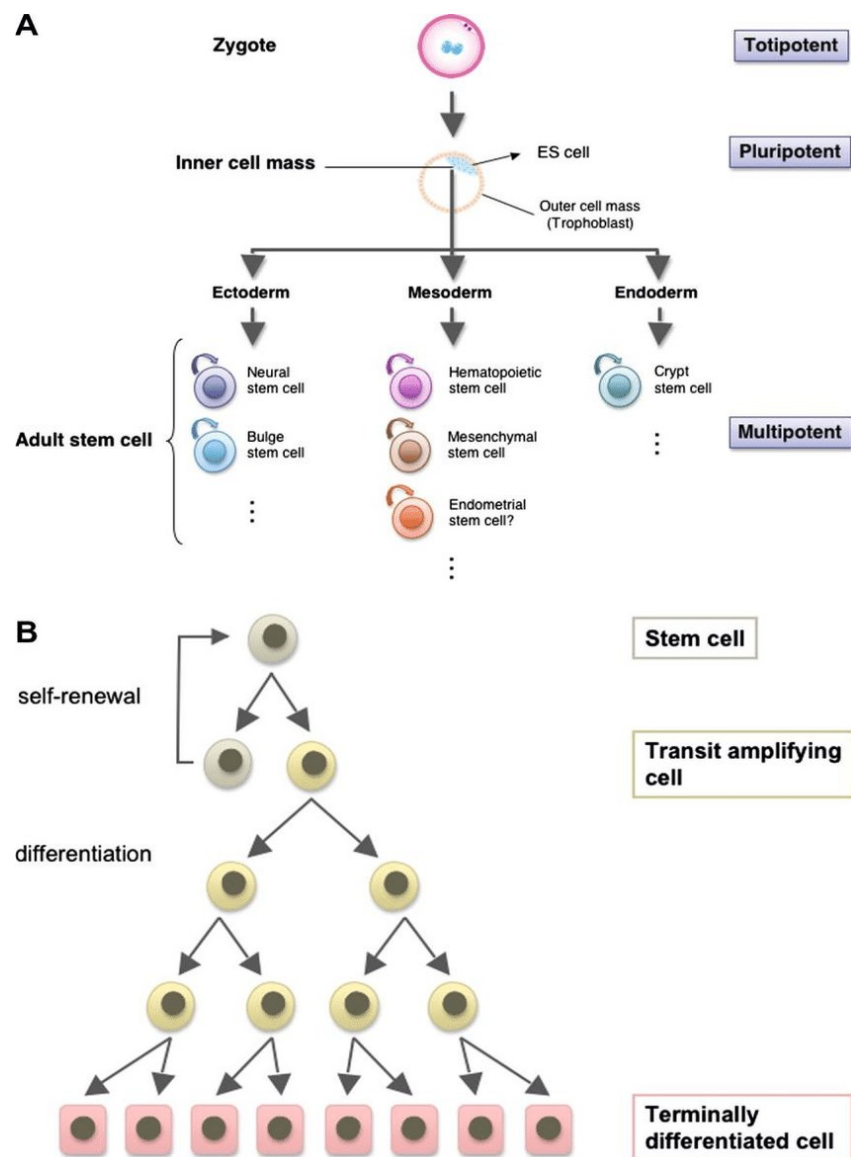
Buněčná terapie je inovativní způsob léčby využívající přenosu živých buněk do pacienta za účelem zmírnění nebo vyléčení nemoci. Buňky používané při buněčné terapii mohou pocházet od pacienta (autologní buňky) nebo od dárce (alogenní buňky) a lze je transformovat do různých typů buněk. Stala se tak významnou inovací ve zdravotní péči zaměřenou na opravu nebo náhradu poškozených lidských buněk, tkání a orgánů za účelem obnovení normální funkce a využívá se při léčbě řady onemocnění jako je: onemocnění nervového a kardiovaskulárního systému, rakoviny, diabetu, onemocnění kostí a kloubů, genetických poruch, aj [1].

Buněčná terapie využívá především kmenových buněk, které mají obrovský potenciál v lékařství k léčbě různých onemocnění a poruch. Kmenové buňky tak rozšířily chápání vývoje i patogeneze onemocnění. Navzdory jejich významnému pokroku omezují jejich užitečnost otázky týkající se etické kontroverze s embryonálními kmenovými buňkami a tvorby teratomů [2]. Přestože zájem o kmenové buňky celosvětově roste, toto nadšení musí být zmírněno skutečností, že tento způsob léčby by měl být nejdříve globálně klinicky prokázán. Mezi budoucí výzvy patří zdokonalování terapeutické manipulace s kmenovými buňkami, ověřování těchto technologií v klinických studiích a regulace globální expanze terapií regenerativními kmenovými buňkami [3].

1.1 Kmenové buňky v buněčné terapii

Pluripotentní kmenové buňky jsou populací nediferencovaných buněk, které mají schopnost sebeobnovy a dokáží se diferencovat do jakékoli buňky organismu. Existuje několik zdrojů kmenových buněk s různou účinností. Lze je využít k léčbě různých onemocnění, jako je cukrovka 1. typu, neurodegenerativní onemocnění, poranění míchy a rakovina [4]. Existují tři hlavní skupiny kmenových buněk, které se používají pro terapeutické účely: embryonálních kmenové buňky (ESC, embryonic stem cell), indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC, induced pluripotent stem cells) a dospělé kmenové buňky, jako jsou mezenchymální kmenové buňky (MSC, mesenchymal stem cells) [5].

Lidské tělo se vyvíjí ze zygoty a blastocysty, do zárodečných vrstev endodermu, mezodermu a ektodermu. Specifické orgány vznikají ze zárodečných vrstev a některé z progenitorových buněk, které se terminálně nediferencují, ale zůstávají zachovány jako tkáňové kmenové buňky a lze je nalézt v kostní dřeni, kostech, krvi, svalech, játrech, mozku, tukové tkáni, kůži a gastrointestinálním traktu. Tkáňové kmenové buňky mohou být nazývány progenitorovými buňkami, protože dávají vznik terminálně diferencovaným a specializovaným buňkám tkáně nebo orgánu. Schopnost diferenciaci se u kmenových buněk liší v závislosti na jejich původu a odvození. Lze je kategorizovat podle jejich diferenciacního potenciálu [6].



Obrázek 1: Hierarchie kmenových buněk [2]

1.2 Embryonální kmenové buňky

ESC patří mezi pluripotentní kmenové buňky, které jsou odvozené z vnitřní buněčné hmoty blastocysty preimplantačních embryí. Mohou se diferencovat do všech zárodečných vrstev a lze je diferencovat *in vivo* přidáním vnějších faktorů do kultivačního média nebo genetickou modifikací [7]. Představují jedny z nejslibnějších buněk pro regenerativní medicínu, avšak použití lidských ESC je omezené z několika technických a etických problémů od způsobu, jakým jsou odvozeny, charakterizovány, zavedeny a udržovány, až po jejich diferenciaci a transplantaci *in vitro* [8]. Dalšími komplikacemi souvisejícími s jejich využitím jsou změny v jejich epigenetických profilech, chromozomální aberace během jejich vývoje a problémy po transplantaci, jako je riziko nádoru, genetická nestabilita a odmítnutí imunity [9].

1.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky

iPSC odvozené z epiblastové vrstvy implantovaných embryí jsou produkovány z dospělých somatických buněk, které jsou geneticky přeprogramovány do stavu podobného ECS, se kterými sdílejí mnoho charakteristik jako je samoobnovitelnost, pluripotentní diferenciaci, morfologie, genová exprese markerů a tvorba teratomů. V současné době jsou iPSC užitečnými nástroji pro vývoj léčiv, modelování nemocí a regenerativní medicínu [6].

Retrovirové vektory, které se používají k zavedení přeprogramovacích faktorů do dospělých buněk a onkogeny jako c-Myc, omezují použití iPSC v klinické praxi, protože mohou způsobit rakovinu. Navzdory těmto bezpečnostním problémům můžeme přeprogramováním dospělých somatických kmenových buněk do nediferencovaných stádií vygenerovat iPSC, které vytvářejí identickou shodu s dárcem buněk, a tím předcházet problémům s odmítnutím [8]. Slibné přínosy má léčba pomocí autologních iPSC, avšak i ta má určitá omezení. Jejich příprava s sebou nese vysoké náklady na léčbu a k jejich vytvoření jsou zapotřebí více než tři měsíce. Výhoda této metody je, že není spojena s imunologickou rejekcí nebo infekcí neidentifikovanými viry či jinými patogeny. Další výhodou spočívá v možnosti získu více klonů od jednoho dárce. Nejrealističtější metodou terapie pomocí iPSC je odběr zásob od různých HLA-homozygotních dárců [10].

1.4 Mezenchymální kmenové buňky

MSC patří mezi dospělé kmenové buňky, které se mohou diferencovat do různých mezenchymálních tkání. Pochází z mezodermy a v kostní dřeni se tyto buňky diferencují hlavně na kostní, chrupavkové a tukové buňky. Primárně jsou izolovány z myeloidních a tukových tkání, dále také ze sítnice, jater, žaludeční sliznice, šlach, chrupavek, placenty a pupečnickové krve. Studie ukázaly, že MSC lze diferencovat na buňky, které nejsou odvozené z mezodermy, jako jsou gliové buňky a neurony [2]. Mají omezenou diferenciací kapacitu a ukázalo se, že působí protizánětlivě. Jednou z výhod jejich použití je skutečnost, že mají nízkou imunogenicitu, a proto jsou během transplantace dobře snášeny [4]. Mají imunosupresivní funkce, které zabraňují proliferaci aktivovaných T lymfocytů, inhibují sekreci cytokinů a potlačují signalizaci vedoucí k buněčné smrti. Další jejich výhodou je, že nevyvolávají otázky etické kontroverze [6].

MSC mají různou charakteristiku v závislosti na orgánu, ze kterého jsou izolovány. Stromální kmenové buňky kostní dřene (BM-MSK, bone marrow stromal stem cells), mají využití jak v autologním, tak v alogenním kontextu. Proces izolace buněk z kostní dřene je však doprovázen rizikem infekce a má nižší účinnost než jiné zdroje MSC [11]. Kmenové buňky odvozené z tukové tkáně mají silnou charakteristiku adipogenní diferenciace, proto se využívají jako alternativa k BM-MSK. MSC extrahované z pupečnickové šňůry (UC-MSK, umbilical cord mesenchymal stem cell) se dostávají do centra pozornosti díky jejich snadnému odběru ve srovnání s jinými kmenovými buňkami. Mají lepší proliferací a diferenciací schopnosti oproti BM-MSK a MSC odvozených z tukové tkáně (AD-MSK, adipose tissue derived mesenchymal stem cells). UC-MSK vyvolávají obavy kvůli jejich nízké úspěšnosti během extrakce, což je způsobeno expozicí kryogenních protektorů během kryogenního skladování. Mají též omezenou schopnost sebeobnovy, přičemž při dlouhodobém kultivačním procesu stárnou rychleji než jiné typy kmenových buněk [12].

1.5 Historie

Myšlenka hojení ran a regenerace orgánů je stará jako lidstvo samo a odráží se již ve starověkém řeckém mýtu o Prométheovi, ve kterém mu orel každý den trhal játra z těla, která mu přes noc opět dorostla. V moderní medicíně začal výzkum zahrnující kmenové buňky a regeneraci orgánů s prvními pokusy o transplantaci kostní dřeně na zvířatech v 50. letech 20. století. Tyto průkopnické studie vydláždily cestu pro transplantaci lidské kostní dřeně na konci 60. let 20. století a odhalila se tak existence kmenových buněk. První populace kmenových buněk byla identifikována v kostní dřeni dospělých myší McCullochem a Tillem. Průkopnická práce na těchto koloniích tvořících jednotkové buňky sleziny, později nazývané hematopoetické kmenové buňky, stanovila dvě funkční vlastnosti populace kmenových buněk: sebeobnovu a multipotenci [2]. V roce 1962 vědec John Gurdon úspěšně klonoval žáby přenesením jádra ze somatických buněk do oocyty. Výsledky jeho experimentu způsobily zvrát vývoje somatických buněk a staly se obrovským objevem, protože se dříve věřilo, že buněčná diferenciaci je pouze jednosměrná. Avšak tento experiment odhalil, že je možné, aby somatická buňka znovu získala pluripotenci [1].

Od 90. let 20. století došlo k významnému rozšíření základního a klinického výzkumu v oblasti izolace, generování a aplikace různých typů terapeuticky využitelných kmenových buněk. V roce 1998 byly poprvé izolovány lidské ESC a o dvanáct let později, v roce 2010 bylo USA uděleno povolení k jejich klinickým studiím. První linie ESC byla vytvořena z myších embryí v roce 1981 metodou prakticky identickou s králičími modely, které použili Cole RJ a kol. asi o 30 let dříve. Tyto ESC byly použity pro zavedení specifických genových modifikací u myší. V roce 2007 získal Sir Martin Evans Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu za jeho přínos k vývoji zvířecích modelů nemocí pomocí cílené genetické modifikace ESC [7]. Zlom v terapii pomocí kmenových buněk nastal v roce 2006, kdy vědci Shinya Yamanaka společně s Kazutoshi Takahashim objevili, že je možné přeprogramovat multipotentní dospělé kmenové buňky do pluripotentního stavu, čímž se zabránilo ohrožení života plodu. Nejdříve provedli transdukcii myších fibroblastů a o rok později experiment uspěl i s lidskými buňkami. Tato nová forma kmenových buněk byla pojmenována iPCS [8]. V roce 2007 byl popsán koncept terapeutického využití iPCS na myším modelu srpkovité anémie. Homologní genová korekce zprostředkovaná rekombinací u mutantních iPCS umožnila vyléčit onemocnění u dárcovských myší, což ukázalo potenciál využití iPSC pro regenerativní medicínu. První klinickou studii, která použila autologní iPSC k léčbě pacienta s věkem podmíněnou makulární degenerací, zahájil v roce 2014 japonský vědec Masayo Takahashi [2].

2 Kmenové buňky při léčbě neurodegenerativních onemocnění

Neurodegenerativní onemocnění jsou chronické, progresivní a smrtelné neurologické poruchy centrálního nervového systému (CNS, central nervous systém), při kterých dochází k degeneraci specifických podskupin neuronů, jako jsou dopaminergní, cholinergní a motorické neurony. Klíčovým patologickým rysem těchto onemocnění je hromadění chybně složených proteinů v mozku, což vede k dysfunkci nervového systému. Bylo prokázáno, že etiologie těchto onemocnění souvisí s řadou buněčných a molekulárních mechanismů, patogenese však zůstává nejasná a patogenní faktory jsou složité. U většiny pacientů je včasná diagnóza ztížena také nedostatkem účinných biomarkerů [13]. V současné době postrádají neurodegenerativní onemocnění účinnou léčbu, která by zabránila rozvoji onemocnění. Mezi možné alternativní způsoby léčby patří buněčná terapie, zejména s použitím kmenových buněk. Transplantace neurálních kmenových buněk (NSC, neural stem cells) je studována jako potenciálně terapeutický přístup a zdá se, že má příznivý účinek proti neurodegeneraci prostřednictvím různých mechanismů, jako je produkce neurotrofických faktorů, snížení neurozánětu, zvýšení plasticity neuronů a náhrada buněk [14].

Pro terapeutické účely jsou k dispozici různé potenciální zdroje kmenových buněk. Mezi ně patří MSC, které mohou sloužit jako spolehlivý zdroj nervových buněk pro potenciální buněčnou substituční terapii nebo léčbu regenerativní medicínou [13]. Další možností je použití NSC, které jsou schopny generovat neurony a glie během vývoje centrálního nervového systému [14]. Vzhledem k nedávným pokrokům v oblasti kmenových buněk lze NSC odlišit přímo od pluripotentních kmenových buněk, jako jsou lidské ESC a iPSC, pomocí buněčných signálů a morfogenů zapojených do vývojových procesů [14]. NSC mohou být odvozeny z různých druhů a mnoha zdrojů, včetně již zmiňovaných ESC a iPSC, dále také z dospělých CNS nebo přímým přeprogramováním neurálních buněk. Nejběžnější technikou je však izolace primárních NSC přímo z tkáně plodu [20].

2.1 Neurální kmenové buňky

Neurální kmenové buňky jsou samoobnovující, multipotentní buňky, které během vývoje generují neurony, gliové buňky a udržují homeostázu mozku. NSC představují atraktivní nástroj pro vývoj regeneračních terapií a jsou testovány v klinických studiích pro několik neurologických onemocnění [15]. Během vývoje jsou nervové kmenové buňky zodpovědné za tvorbu centrálního nervového systému, diferencují se na radiální gliové buňky a prolifерují do skupin neurálních progenitorových buněk (NPC, neural progenitor cells) [19]. NPC jsou třídou neurálních prekursorových buněk, které mají omezenější účinnost a kapacitu pro sebeobnovu oproti NSC [20]. Proliferace NCS probíhá dvěma způsoby: symetrickým dělením, při kterém dochází k produkci dvou kmenových nebo dvou progenitorových buněk a asymetrickým dělením, při kterém se produkuje jedna nová kmenová a jedna progenitorová buňka [25].

NSC mohou potenciálně migrovat do poškozených oblastí, aby podpořily funkční a strukturní opravu tkáně. Kromě toho mají schopnost vylučovat trofické faktory, které mohou stimulovat endogenní opravné mechanismy. Podobně jako MSC mohou mít NSC imunomodulační účinky a bylo dokázáno, že jejich transplantace inhibuje proliferaci T-buněk. Všechny tyto vlastnosti činí NSC atraktivním zdrojem pro regenerační terapii [15]. Další jedinečnou charakteristikou je jejich schopnost zůstat v klidu po dlouhou dobu, což poskytuje rezervní zásobu buněk dostupných pro regeneraci tkání po celý život [16]. NSC můžeme dělit podle způsobu kultivace. Endogenní NSC jsou kultivovány *in vivo*, zatímco exogenní NSC *in vitro*. Za normálních podmínek jsou endogenní NSC v těle ve statickém, nediferencovaném klidovém stavu. Tyto buňky jsou nazývány jako klidové NSC (qNSC, quiescent neural stem cells), které udržují dynamickou rovnováhu v zásobních kmenových buňkách. Jakmile jsou vystaveny vnějším podmětům, jako je např. poškození mozku, mohou být qNSC aktivovány a podílet se tak na procesu opravy poškozené nervové tkáně [26].

Lidské nervové kmenové buňky mohou být izolovány z centrálního nervového systému nebo mohou být odvozeny *in vitro* z pluripotentních kmenových buněk. Jejich přímé přeprogramování se může stát další alternativou, je však nutné zajistit genetickou a fenotypovou stabilitu přeprogramovaných buněk [15]. Dosud většina klinických studií využívá fetální neurální kmenové buňky (fNSC), ale využívá se i NSC z jiných zdrojů, jako jsou iPSC a ECS, dále se jako primární zdroj využívá mozkomíšní mok. NSC lze také izolovat z biopsií CNS dospělých a plodů nebo pitevnických vzorků [14]. Gliální progenitorové buňky (GPR, glial progenitor cells) představují další terapeutickou alternativu. Jsou to samoobnovující se buňky

odvozené z tkáně CNS, které mají omezený diferenciací potenciál. Jsou získávány z embryonální tkáně a mohou se diferencovat na oligodendrocyty a astrocyty, ale ne na neurony. Mozek dospělých savců obsahuje dva primární rezervoáry regenerativních NSC, které jsou známy jako neurogení niky, a to subventrikulární zónu laterální komory a subgranulární zónu *gyrus dentatus* hipokampu. Třetí skupina NSC byla popsána v hypotalamu [21].

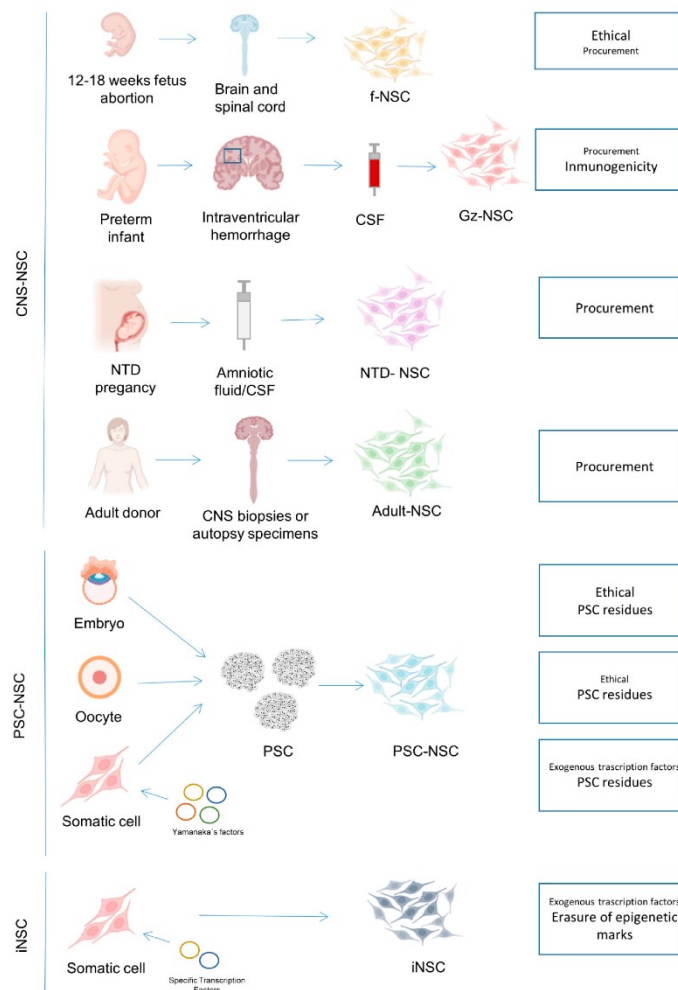
Neurogení niky jsou specializované mikroprostředí, které zahrnuje řadu různých typů buněk, včetně buněk z linie NSC, ale také endoteliálních buněk a mikroglíí. Linie NSC se skládá z klidových NSC, ty mohou být aktivovány za vzniku proliferujících buněk, dále aktivovaných NSC, ze kterých vznikají neurální progenitorové buňky [18]. Neurální kmenové buňky se primárně nacházejí v neurálních nikách centrální nervové soustavy, progenitorové lze nalézt v celé CNS díky zvýšené migrační kapacitě [19]. Během vývoje a stárnutí podporují přirozené niky NSC homeostázu zdravé tkáně a nabízejí potenciální rezervoáry pro regeneraci CNS po poškození. Kromě vytváření nových diferencujících buněk, produkují endogenní NCS rozmanitý sekretom, tj. vylučované produkty CNS, složený z růstových faktorů, cytokinů, chemokinů, morfogenů, mikroRNA a dalších. Studie těchto endogenních faktorů poskytují informace o interakci NSC s tkáněmi CNS, což přispívá k hlubšímu porozumění jejich funkcí a potenciálu terapeutického využití [28].

2.1.1 NSC izolované z lidského fetálního neuroektodermu

Většina dosud provedených studií využívá NSC získané z centrálního nervového systému lidského plodu (mozku nebo míchy). Z tohoto důvodu je použití fNSC společensky kontroverzní a přísně regulované, v některých zemích je dokonce zakázané. Klinické studie s fNSC prokázaly určitý stupeň účinnosti u různých stavů. Například transplantace fNSC u pacientů s poraněním krční míchy vedla k obnovení sensorických funkcí. Dále bylo popsáno zrychlení motorického vývoje a funkční zlepšení u dětí s dětskou mozkovou obrnou. U pacientů s Parkinsonovou chorobou bylo hlášeno zlepšení motoriky a lepší odpověď na medikaci. Ke zlepšení neurologických funkcí po současné transplantaci fNSC a MSC došlo u pacientů s cévní mozkovou příhodou. Celkově jsou důkazy o účinnosti fNSC většinou neoficiální, přičemž žádná klinická studie neprokazuje trvalé zotavení z patologického stavu [14].

2.1.2 NSC odvozené z pluripotentních kmenových buněk

NCS mohou být získány diferenciací pluripotentních kmenových buněk (PSC, pluripotent stem cells), které se odvozují z vnitřní buněčné hmoty embryí ve stádiu blastocysty. Lze je také získat chemickou aktivací partenogenetických kmenových buněk, jaderným přenosem neoplozených oocytů nebo generováním epigenetickým přeprogramováním somatických buněk s definovaným souborem transkripčních faktorů (iPSC) [14]. ESC jsou ideální pro substituční terapii buněk, neboť se mohou neomezeně dlouho množit. Avšak existuje zde již zmiňované zvýšené riziko tvorby nádorů a možnost odmítnutí imunitním systémem spolu s etickými otázkami. ESC by mohly být cíleně diferencovány do specializovaných neurálních podtypů s cílem snížení rizika vzniku nádorů. NSC odvozené od iPSC nabízejí možnost autologní transplantace a jsou užitečné pro modelování onemocnění a screening léků [17]. iPSC získané od pacienta mohou poskytnout důležité poznatky o molekulární podstatě neurologických poruch s potenciálem pro jejich léčbu [20].



Obrázek 2: Zdroje pro výrobu NSC [15]

2.2 Transplantace NCS

Transplantace NCS se v posledním desetiletí stala nově vznikající technologií pro aplikace v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně, která přináší výrazné výhody a jedinečné výzvy [22]. NCS pro transplantaci mohou být získány z primárních vzorků tkáně, nebo mohou být generovány diferenciací PSC, popřípadě transdiferenciací neuronálních buněk. Kultivace NCS před transplantací umožňuje jejich předselekcii, monitorování a modifikaci, které podpoří jejich funkci *in vivo*, ale také funkci již existujících hostitelských buněk. Navzdory svým výhodám zde však existují i podstatné překážky jako je imunorejekce a špatná dlouhodobá funkční integrace [23].

Existuje mnoho způsobů transplantace včetně intravenózních, transarteriálních, nazálních, intraperitoneálních, intratekálních a intramedulárních injekcí. Mezi dva hlavní způsoby však patří transplantace *in vivo* a indukce *in vitro*. Správná kombinace obou technik může mít na pacienta nejlepší účinek [23]. Pro transplantaci se NCS diferencují na neurony nebo gliové buňky a uvolňující trofické faktory. Asymetrickým dělením NCS vznikají různé typy buněk, které nahrazují poškozené neurony a produkují neurotrofické faktory, což hraje významnou roli v neuroprotekcii a zachování synaptické denzity [24]. Významný pokrok byl zaznamenán v nejnovějších studiích, kdy bylo např. prokázáno, že transplantované NPC vykazují místně specifickou fenotypovou diferenciaci, kdy NPC mozku plodu přinesly slibné účinky na pohybové zotavení při poranění míchy [22]. Četné preklinické studie ukázaly, že po léčbě neurologických onemocnění exogenní transplantací NCS se zlepšilo imunitní mikroprostředí v oblasti poraněné tkáně [26]. Účinnost terapie exogenními transplantacemi kmenových buněk je však stále kontroverzní. V současné době nejsou mechanismy léčby transplantací kmenových buněk zcela jasné a jsou zapotřebí další výzkumné metody [27].

3 Léčba Alzheimerovy choroby pomocí kmenových buněk

3.1 Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD, Alzheimer's disease) je běžné progresivní oslabující neurodegenerativní onemocnění, které postihuje miliony lidí na celém světě, ale nemá však v současné době účinnou léčbu [29]. AD je nejčastější příčinou demence, kterou trpí přes 50 milionů lidí na celém světě a přepokládá se, že do roku 2050 bude počet případů okolo 152 milionů. Je způsobena synaptickým selháním a nadměrnou akumulací špatně rozložených proteinů. AD má několik neuropatologických znaků, včetně ukládání β -amyloidních peptidů ($A\beta$, beta amyloid peptides) v extracelulární matici mezi neurony, známých jako amyloidní plaky, dále intracelulární tvorby neurofibrilárních klubek, které vznikají akumulací hyperfosforylovaného tau proteinu v neuronech, ztráty neuronů, neurozánětu a oxidačního stresu [30]. Mezi klíčové charakteristické příznaky AD patří různé kognitivní poruchy a lze je kategorizovat na příznaky mírné, středně těžké nebo těžké. Jedinci s mírnými příznaky se častěji ztrácejí, mají špatný úsudek, zvýšené úzkosti a dochází ke změnám osobnosti. Jedinci se středně těžkými příznaky ztrácejí schopnost učit se novým věcem, mají jazykové problémy, jako je čtení, organizování myšlenek a mají potíže s rozpoznáním členů rodiny. U jedinců se závažnými příznaky dochází k úbytku hmotnosti, kožním infekcím, potížím s polykáním a ztrátě schopnosti komunikovat [29].

Současně schválená farmakologická léčba pouze zmírňuje symptomy, přičemž chybí terapie, která by ovlivnila samotný průběh choroby. Byly schváleny 3 kategorie léčby AD, včetně antagonistů N-methyl-D-aspartátových receptorů, inhibitorů cholinesterázy a kombinované farmakoterapie (memantin s donepezilem). Ačkoli tyto léky mohou relativně zmírnit příznaky demence u pacientů s AD, nemají žádný vliv na patogenezi a nemohou zabránit progresi AD nebo prodloužit přežití pacienta [31]. Neuspokojivé výsledky terapií zaměřených na $A\beta$ naznačují nedostatečnost jednosměrných přístupů k léčbě AD. Místo toho by měla být podporována léčba zaměřená na více mechanismů. V poslední době se stále více uplatňuje transplantace kmenových buněk v léčbě neurodegenerativních onemocnění. Takové terapie umožňují cílení na různé mechanismy, včetně opravy poškozených synapsí, modulačního zánětu a neuroprotektce prostřednictvím neurotrofické sekrece [32].

3.2 Patogeneze a patofyziologie onemocnění

Patofyziologie AD je stále záhadou. Studie ukázaly, že v mozku pacientů s AD se hromadí dva typické chybně složené proteiny. První je A β , což je patologický produkt štěpení amyloidního prekursorového proteinu (APP, amyloid precursor protein). A β může urychlit smrt neuronálních buněk a tvorbu neuronální spleti, nepříznivě ovlivnit synaptické funkce, a nakonec způsobit ztrátu neuronů [32]. Bylo potvrzeno, že mutace APP jsou spojeny s dědičnou familiární AD. Druhým chybně složeným proteinem je tau, který je asociovaný v mikrotubulu a agreguje v buňkách ve formě neurofibrilárních klubek. Většina případů AD, které nezahrnují mutace APP, je sporadická a vyskytuje se u jedinců starších 65 let. Hlavním prediktivním faktorem pro tuto skupinu je genetický rizikový faktor alipoproteinu E (APOE), který transportuje lipidy a cholesterol. APOE je spojen se zvýšeným ukládáním A β a hyperfosforylací tau proteinů, což vede k rychlejšímu kognitivnímu úpadku. Mechanismy, kterými tyto účinky zprostředkovává, však nejsou zcela pochopeny [34]. Někteří vědci zastávají názor, že stárnutí a neurodegenerace související s věkem, včetně AD, jsou charakterizovány hromaděním poškozených mitochondrií. Tato mitochondriální dysfunkce, která představuje klíčový bod patofyziologie AD, vede k poruchám axonálního transportu a mutacím mitochondriální DNA, což může vést k oxidačnímu stresu, depleci adenosintrifosfátu (ATP) a synaptické dysfunkci [33].

3.3 Terapie pomocí kmenových buněk

Terapie kmenovými buňkami může zlepšit kognitivní deficity, jak ukazují různé zvířecí modely podobné AD. Zatím neexistují žádné závěry týkající se srovnání terapeutické účinnosti pomocí různých kmenových buněk. Ve skutečnosti má každý typ buněk své slabiny nebo omezení. Hodnocení terapeutického účinku pomocí kmenových buněk, jako jsou NSC, BM-MSC, MSC odvozené z lidské pupečnickové krve (hUCB-MSC, human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells), ESC a iPSC, byly zkoumány na různých zvířecích modelech podobných AD a zahrnují behaviorální výkonnostní testy na zvířecích modelech, biochemické a patohistologické ukazatele. V klinických studiích je závažnost onemocnění u všech subjektů hodnocena na základě symptomů, kognitivních funkcí, paměti a kvality života [35].

3.4 Embryonální kmenové buňky

Klinické použití ESC je omezené kvůli vysokému riziku tvorby teratomů, nežádoucí imunitní odpovědi a rejekci. Kromě toho je nutné vyřešit etické spory před jejich možným klinickým využitím. Několik studií zkoumalo roli ESC v modelech AD u hlodavců a ukázalo se, že ESC mohou zlepšit prostorové učení a paměť. Myší ESC byly úspěšně použity k produkci bazálních cholinergních neuronů předního mozku, které byly těžce postiženy u pacientů s AD. Lidské ESC mohou také produkovat cholinergní neurony ve sklivcové a hipokampální tkáni, které jsou připojeny k neuronové síti [30]. Rané studie od Farshed et al. zkoumaly tvorbu neuronů pomocí myších ESC. ESC získané z myší byly pěstovány na podkladové monovrstvě primárních myších embryonálních fibroblastů ve tkáňové kultuře obsahující Dulbeccovo modifikované médium (DMEM). NPC poté byly úspěšně diferencovány pro transplantaci. Liu et al. provedli podobný experiment v roce 2013 s použitím lidských ESC, kdy se kmenové buňky diferencovali na neuroepiteliální buňky, a nakonec na cholinergní motorické neurony [29].

3.5 Mezenchymální kmenové buňky

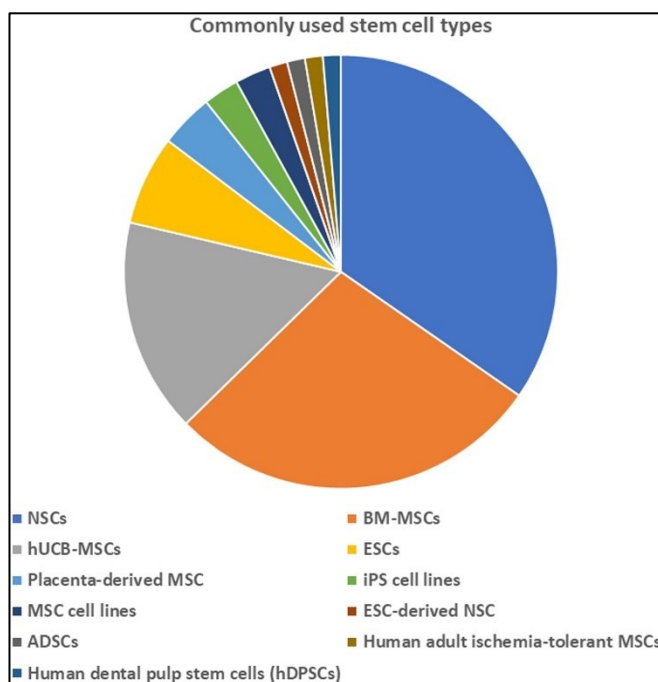
Předchozí studie o MSC využívající myší modely AD ukázaly, že MSC získané z pupečnickové krve mohou zlepšit prostorové učení a zabránit poklesu paměti. Byly pozorovány imunomodulační a protizánětlivé účinky se zvýšením neuroprotektce a snížením regulace prozánětlivých cytokinů. Dalším důležitým způsobem, jak se MSC podílejí na opravě tkání, je sekrece extracelulárních váčků a mikrovezikul. MSC kostní dřene mohou uvolňovat extracelulární vezikuly, které cílí na ukládání A β . Alternativně mohou být MSC regulovány tak, aby nadměrně exprimovaly cytokiny a vaskulární endoteliální růstový faktor a vykazovaly regenerační účinky v modelu AD [30]. Když jsou MSC injikovány do mozku myších modelů AD, místo aby se diferencovaly na neurony a gliové buňky, spíše vylučují různé cytotrofické faktory, které se mohou vypořádat s mnoha pato-mechanismy AD [36]. Funkční neurony odvozené od MSC se zdají být slibnější, pokud jde o neurodegenerativní onemocnění než ESC, a to díky relativně snadným metodám sběru a menšímu souvisejícímu etickému, náboženskému a imunorejekčnímu problému. Kromě toho MSC nemají tendenci vytvářet nádory jako ESC [37].

3.6 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Studie provedené *in vitro* i po transplantaci do mozkové kůry hlodavců ukázaly, že iPSC lze využít ke generování a automatizaci neuronálních podtypů. Například gliové buňky odvozené od iPSC mohou být použity ke studiu zánětlivé odpovědi AD. Další studie, která využila myší model AD, použila iPSC k získání makrofágů schopných exprimovat neprilysin, proteázu degradující A β [30]. Řada studií prokázala úspěšnou implantaci surových iPSC do zvířecích modelů s AD. Jedna taková studie ukázala, že po injekci iPSC do myší s AD se iPSC po implantaci diferencovaly na gliové buňky. Z injikovaných buněk *in vivo* byly generovány zejména mikroglie, oligodendrocyty a astrocyty. Množství ukládání A β plaku se snížilo v souvislosti s poklesem aktivity beta a gama sekretáz a zvýšením genové exprese spojené s oligodendrocyty [38].

3.7 Neurální kmenové buňky

Transplantace NSC představuje slibný přístup k léčbě AD s velkým terapeutickým potenciálem. NSC mohou chránit mozkové kapiláry, potlačovat patologie spojené s A β a tau proteiny, snižovat zánět a podporovat neurogenezi. Kromě toho NSC prokázaly účinnost při léčbě různých preklinických neurodegenerativních modelů a schopnost se diferencovat do buněčných typů relevantních pro CNS. NSC jsou ideálními kandidáty pro buněčné transplantace, protože mají specifický osud a jsou relativně podobné funkčním neuronálním typům během celé své diferenciaci [29]. Studie na modelech AD hlodavců ukázaly, že lidské NSC z embryonálních telomer, po transplantaci do laterální komory mozku myší s AD, mohou migrovat a diferencovat se do neuronů a gliových buněk v laterální komoře. Tento jev snižuje fosforylaci tau a hladiny A β -42, snižuje hyperplazii glií a astrocytů, zvyšuje tvorbu endogenních synapsí a zvyšuje hustotu neuronálních, synaptických a nervových vláken, což v konečném důsledku zlepšuje prostorovou paměť u myší s AD. Těchto účinků je dosaženo řadou mechanismů, včetně regulace signálních drah, metabolické aktivity, sekrece protizánětlivých faktorů a kontaktu mezi buňkami [30].



Obrázek 3: Typy kmenových buněk v léčbě AD [35]

3.8 Podávání myších progenitorů thymického epitelu odvozených od ESC

Tato studie naznačuje, že u AD by měla být posílena systémová imunita, aby se spustila kaskáda potřebná pro clearance $A\beta$ a opravu mozku. Epiteliální buňky brzlíku (TEC, thymic epithelial cells) hrají klíčovou roli při podpoře vývoje T–buněk a také zprostředkovávají delecii autoreaktivních T–buněk exprimací autoantigenů. V této studii bylo popsáno, že ESC mohou být selektivně indukovány k diferenciaci na progenitory thymických epiteliálních buněk (TEP, thymic epithelial progenitors) *in vitro*, které se dále vyvíjejí do TEC *in vivo* a podporují vývoj T–buněk. Ukázalo se, že transplantace myších ESC snížila zatížení mozkového $A\beta$ plaku a zlepšila kognitivní výkon v korelaci se zvýšeným počtem T–buněk, zvýšenou aktivitou brány choroidálního plexu a zvýšeným počtem makrofágů v mozku. Výsledky naznačují, že transplantace má potenciál v prevenci a léčbě pacientů s AD [33]. V jiné studii bylo zjištěno, že imunokompromitované myši vykazovaly vyšší závažnost AD. Po nahrazení chybějících adaptivních imunitních populací, jako jsou T–buňky a B–buňky, došlo ke snížení patologických projevů AD [39].

3.8.1 Postup a příprava buněk

B6 linie myších ESC byla kultivována v kompletním ESGRO médiu (Complete Plus Serum Clonal Grade) s doplňkem inhibitoru kinázy glykogensyntázy-3 (GSK3 β). Pro diferenciaci thymických epiteliálních progenitorů byly myši ESC nejprve indukovány k diferenciaci do definitivního endodermu, a poté do TEP v přítomnosti kostního morfogenetické proteinu BMP-4, růstových faktorů (FGF 7, FGF10, EGF) a diferenciacních proteinů rFOXN1, rHOXA3. Gen APP v myších ESC byl vyřazen editací genomu. B6 myši ESC byly transfekovány APP-specifickými dvojitými nikázovými plazmidy nebo kontrolními dvojitými nikázovými plazmidy. Myši byly znečitlivěny a bylo jim podáno 5×10^4 buněk v 10–20 μ l PBS do brzlíku za horní hrudní kostí pomocí jehly [33].

3.9 Intracerebroventrikulární injekce MSC z lidské pupečnickové krve

V této studii byly devíti pacientům s mírnou až středně těžkou demencí způsobenou AD podány tři intracerebroventrikulární injekce hUCB-MSC. Cílem bylo vyhodnotit bezpečnost transplantace těchto buněk a jejich potencionální schopnost snížit hladiny amyloidů, jak bylo pozorováno v předchozích studiích na zvířatech. Čtyři týdny před podáním MSC byl pacientům implantován rezervoár Ommaya do pravé postranní komory. Tři pacienti dostali nízkou dávku ($1,0 \times 10^7$ buněk/2 ml) a šest pacientů dostalo vysokou dávku ($3,0 \times 10^7$ buněk/2 ml) hUCB-MSC. Vzhledem k tomu, že se jednalo o otevřenou klinickou studii fáze I, nebylo možné prokázat klinickou účinnost injekcí hUCB-MSC. Přesto bylo zaznamenáno snížení hladiny celkového tau, fosforylovaného tau a amyloidu- β . Je zajímavé, že den po transplantaci MSC došlo k výraznému zvýšení exprese galaktinu-3, rozpustné mezibuněčné adhezní molekule-1 (sICAM-1), progranulinu a biomarkeru GDF-15, avšak tyto hladiny dramaticky klesly během 4 týdnů. Tyto výsledky dokládají, že provádění opakovaných podání (případně zkrácení intervalu mezi injekcemi) může být nezbytné k zachování terapeutické účinnosti hUCB-MSC. Po injekci hUCB-MSC byla nejčastějším nežádoucím příznakem horečka, následovaná bolestí hlavy, nauzeou a zvracením. Všechny tyto příznaky odezněly do 36 hodin. Pět účastníků dokončilo 36 měsíční prodlouženou observační studii a nebyly pozorovány žádné další závažné nežádoucí účinky [35]. V další fázi této studie bylo zjištěno, že hUCB-MSC zvýšily hladiny cytokinů, což mohlo vést k horečce pozorované u pacientů s AD, kteří tyto buňky dostávali. K určení metod pro snížení horečky a zánětlivých reakcí po transplantaci MSC je nutný další výzkum, který by mohl zvýšit účinnost terapie MSC při léčbě AD [40].

3.9.1 Příprava hUCB-MCS

Tkáň hUCB byla získána po obdržení písemného informovaného souhlasu od normálních žen v donošené graviditě. hUCB-MSC byly pěstovány v modifikovaném α -MEM médiu (alfa Minimum Essential Medium) doplněném o 10% fetálního bovinního séra. Buňky byly kryokonzervovány při teplotě $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ za použití 10% dimethylsulfoxidu. Aby se připravily na intracerebroventrikulární injekci, byly zmrazené hUCB-MSC nejprve rozmrazeny, naočkovány a kultivovány. Buňky byly odebrány 5 dní po nasazení, opakovaně promyty k odstranění nečistot, jako je fetální bovinní sérum a trypsin, a poté znovu suspendovány v přiměřeném množství α -MEM. hUCB-MSC byly testovány na životaschopnost, fenotyp a přítomnost endotoxinů, bakterií a mykoplazmat. Po testování bylo 50 milionů buněk resuspendováno v 1 ml α -MEM bez fenolové červeně a celkový objem 2 ml byl použit k injekci MSC jednomu pacientovi ze skupiny s nízkou dávkou. Pro skupinu s vysokou dávkou byly připraveny konečné koncentrace 150 milionů buněk na 1 ml MEM- α bez fenolové červeně. Celkový objem 2 ml byl připraven pro podání každému jednotlivému pacientovi. hUCB-MSC pro skupinu s nízkou dávkou byly skladovány při teplotě $4\text{--}20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a měly dobu použitelnosti přibližně 60 hodin od doby výroby. hUCB-MSC pro skupinu s vysokou dávkou byly skladovány při teplotě $4\text{--}12\text{ }^{\circ}\text{C}$ a měly dobu použitelnosti přibližně 48 hodin. Fenotyp použitých buněk byl potvrzen průtokovou cytometrií. Na základě této analýzy byla exprese povrchových antigenů konzistentně pozitivní pro CD73, CD90, CD105 a CD166, ale negativní pro CD45, CD14 a HLA-DR. Takto připravené suspenze hUCB-MSC byly doručeny lékaři v den podání injekce [36].

3.10 Budoucí výzvy

Rostoucí počet studií využívajících zvířecí modely zkoumá roli patogenních proteinů ve vývoji AD. V současné době žádný z dostupných zvířecích modelů nedokázal správně napodobit lidskou AD. Ačkoli terapie kmenovými buňkami byla prokázána jako účinná na zvířecích modelech, několik lidských výzkumných studií na pacientech s AD mělo negativní výsledky. Předchozí výzkum na zvířatech ukázal, že vhodné načasování transplantace buněk je rozhodující pro dosažení maximálního terapeutického účinku. Současné léčebné studie jsou téměř jistě založeny na včasné detekci a intervenci, aby se zabránilo budoucím závažným ztrátám synapsí a neuronů. Vzhledem k tomu, že AD je komplikovaný stav, vyžaduje více zásahů. Kombinace transplantace kmenových buněk s již registrovanými léky tak může vydláždít slibnou cestu pro budoucí léčbu AD [32]

4 Léčba Parkinsonovy choroby pomocí kmenových buněk

4.1 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba (PD, Parkinson's disease) je druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění související s věkem, charakterizované především progresivní ztrátou motorických a nemotorických funkcí v důsledku ztráty dopaminergních neuronů ze *substantia nigra*. Asi 10 % případů PD je familiárních a jsou známy jak autozomálně recesivní, tak autozomálně dominantní kauzální geny PD. Zbytek případů je sporadický a idiopatický. Mutace v řadě genů, včetně některých s kauzálními alelami, mohou způsobit zvýšené riziko sporadické formy PD [41]. Primární patologickou vlastností PD je přítomnost abnormálního α -synukleinu (ASN, abnormal α -synuclein) ve formě nervových inkluzí nazývaných Lewyho tělíska, jejichž toxický účinek přispívá k progresivní degeneraci a ztrátě buněk. Dopaminergní neurony v *substantia nigra pars compacta* specificky podléhají degeneraci, což vede k nedostatku dopaminu a několika dalším biochemickým deficitům v nigrostriálním systému a k rozvoji motorických symptomů, včetně bradykineze, klidového třesu, svalové ztuhlosti a posturální nestability. Kromě toho byla prokázána ztráta jiných typů neuronů a přítomnost Lewyho patologie v mnoha částech centrálního, enterického a autonomního nervového systému, které pravděpodobně přispívají k nemotorickým projevům, jako je autonomní dysfunkce, poruchy čichu a poruchy nálady, kognitivních funkcí nebo spánku přítomné u pacientů s PD [42].

Na základě toho, zda se léčba zaměřuje na základní příčinu onemocnění nebo zmírňuje jeho příznaky, ji lze rozdělit na chorobu modifikující a chorobu nemodifikující terapie. Terapie, která nemodifikuje onemocnění, si klade za cíl zvrátit dopaminergní fungování, aby nejen omezila příznaky, ale také zpomalila progresi onemocnění, a to buď zvýšením hladiny dopaminu, nebo aktivací dopaminových receptorů v mozku. Při dlouhodobém užívání však nežádoucí účinky, jako je dyskineze, nespavost a halucinace, zastiňují pozitivní dopad tohoto přístupu. Vzhledem k těmto nevýhodám se provádí rozsáhlý výzkum s cílem identifikovat chorobu modifikující terapie, které by se mohly přiblížit přesnému cíli onemocnění [43]. V současné době je nejúčinnější a nejrozšířenější léčbou pacientů s PD farmakoterapie, včetně podávání levodopy, agonistů dopaminu, amantadinu, inhibitorů monoaminoxidázy B (MAO-B), inhibitorů katechol-O-methyltransferázy (COMT) a některých anticholinergik. Kromě toho jsou některé adjuvantní terapie účinné také pro remisi a částečnou léčbu pacientů s PD. Ačkoli tato léčba do určité míry zlepšila některé příznaky onemocnění, nezabránila progresi PD a také způsobila některé vedlejší účinky [44]. Používají se také chirurgické postupy, včetně

stereotaktických ablací nebo hluboké mozkové stimulace. Tyto přístupy však jen částečně zvládají závažné motorické symptomy a zmírňují dopaminergních desenzibilizaci podporující dopaminovou substituční terapii u pacientů s pokročilou PD [42]. V posledních letech je buněčná transplantace považována za novou možnost léčby neurodegenerativních onemocnění. Kmenové buňky jsou široce používány u PD k potlačení škodlivých účinků ztráty dopaminergních neuronů [44].

4.2 Terapie pomocí kmenových buněk

Po celá desetiletí kliničtí lékaři vyvíjeli léky a terapie ke zmírnění příznaků Parkinsonovy choroby, ale žádná léčba v současné době nemůže zpomalit nebo dokonce zastavit progresi této nemoci. Vzhledem k relativně lokalizované neurodegeneraci PA jsou zvířecí modely skvělým kandidátem pro testování účinnosti buněčných terapií. Modelové organismy jako jsou octomilky, kvasinky, myši a subhumánní primáti významně přispěly k chápání PA. Při využívání modelových organismů pro studium vědci pečlivě hledají kompromisy mezi anatomickou, genetickou a behaviorální podobností těchto organismů s člověkem. Zvířecí modely mohou být využity ke zkoumání onemocnění, nadměrné exprese lidských genetických rizikových faktorů a sledování buněčných nebo fyziologických odpovědí. Kromě přesnějšího modelování PA lze vytvořit linie kmenových buněk, specifických pro pacienta, které objasní účinky genetické náchylnosti a rozdílné reakce subpopulací na léčbu *in vitro* [45].

V buněčných terapiích pro PD jsou dárcovské dopaminergní progenitory obvykle injikovány do *putamen* ektopickou transplantací, kde vytvářejí lokální nervové okruhy s hostitelskými neurony a stávají se funkčními. Byla také vyzkoušena transplantace dopaminergních neurálních progenitorů do *substantia nigra* homotopickou transplantací. Přestože některé z přeživších dárcovských neuronů v *substantia nigra* rozšiřují neurity do *putamen*, funkční přínos je nižší než u ektopické transplantace. Mnoho laboratoří transplantuje dárcovské buňky ve stadiu nezralých progenitorů. Tyto buňky přežívají, dozrávají a rozšiřují neurity v transplantované oblasti, aby vytvořily synaptická spojení s hostitelskými neurony, což je jev, který nějakou dobu trvá. Mnoho studií *in vivo* skutečně ukázalo, že funkční zotavení začíná několik měsíců po transplantaci. Podle klinických zpráv o nejrůznějších transplantacích plodu se symptomy příjemce postupně zotavují po dobu delší než 4 roky a poté se ustálí [46].

4.3 Embryonální kmenové buňky

ESC přitahují značnou pozornost jako alternativní zdroj pro tvorbu dopaminergních neuronů (DA, dopaminergic neurons). Tyrosinhydroxylázové (TH, Tyrosine Hydroxylase) buňky, odvozené od ESC, mohou uvolňovat dopamin, vytvářet funkční synaptická spojení, prodlužovat axony do hostitelského *striata* a modifikovat farmakologicky indukované chování. Dále se prokázaly jako přínosné při funkčním zotavení amfetaminem indukované motorické asymetrie v potkaním modelu PD. Studie však ukázaly, že přežití DA neuronů odvozených od ESC po transplantaci je relativně nízké. Li et al. v roce 2017 prokázali, že lidské ESC se mohou úspěšně diferencovat na DA neurony. Téměř 92 % kolonií lidských ESC obsahovalo buňky pozitivní na TH, kritický katecholaminergní enzym, po třech týdnech diferenciace [47].

4.4 Mezenchymální kmenové buňky

Ve výzkumných studiích bylo prokázáno, že transplantace MSC zlepšuje zhoršené motorické funkce způsobené PD. Systémová infuze MSC snížila nekoordinovaný pohyb končetin u zvířecích modelů PD, což bylo měřeno pomocí behaviorálních testů. Toto zlepšení bylo spojeno se zvýšenými hladinami dopaminu ve *striatu* u příjemců MSC a s nárůstem TH pozitivních dopaminergních neuronů. Tyto výsledky naznačují regenerační účinky MSC. Přímá striatální injekce MSC v modelech PD u hlodavců zlepšila pohybovou aktivitu, zvýšila neurogenezi a indukovala migraci neuroblastů. Bylo hlášeno, že léčba MSC inhibuje přenos α -synukleinu v PD modelu. Autologní BM-MSC, které byly injikované do subventrikulární zóny sedmi pacientům s PD, se zdály být bezpečné a dobře tolerované, přičemž u některých pacientů bylo pozorováno dlouhodobé zlepšení motorických funkcí [48]. Dále bylo zdokumentováno, že intravenózní infuze MSC ve vyšší koncentraci vyvolává plicní trombózu. Z hlediska buněčné léčby je proto preferována stereotaxická transplantace DAergních neuronů, odvozených od MSC, přímo do *striata* pacientů [49].

4.5 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Před pár lety nebylo možné provést přímou terapeutickou léčbu PD prostřednictvím iPSC. Transplantace čelila mnoha problémům, včetně nízké účinnosti a tvorby teratomů. Pokusy s xenogenními materiály vedly k riziku kontaminace patogeny živočišného původu, které mohou po transplantaci vyvolat imunitní reakci. Od té doby však výzkumníci vyvinuli médium bez xenogenních složek a kultivační systém pro získání iPSC bez transgenů, což vedlo ke zlepšení jejich účinnosti. Ačkoliv je zapotřebí stále provést více testů, zejména na zvířecích modelech, výsledky nedávných studií ukázaly, že iPSC jsou z hlediska účinnosti

životaschopnější než se předpokládalo [47]. Začaly se používat v základním, translačním a klinickém výzkumu, díky jejich schopnosti dlouhodobého udržení a zachování genetické výbavy hostitele. Tato metoda byla testována na modelu subhumánních primátů (NHP), ve kterém byly autologní dopaminergní buňky aplikovány do mozku modelu PD bez imunoprese. Tento přístup vedl k trvalému zlepšení motoriky. Zvířata vykazovala zvýšenou denní aktivitu, která přetrvávala až 18 měsíců a vedla k funkčnímu zotavení a přežití přibližně 20 000 TH neuronů. Tento přístup ukázal, že transplantace založená na iPSC je proveditelná při obnově dopaminergní funkce. Transplantace dopaminergních neuronů, odvozených od iPSC, do modelů PD hlodavců robustně obnovila motorické funkce a integrovala se do mozku hostitele, aniž by se projevila tvorba nádorů nebo redistribuce implantovaných buněk. Neurony produkující dopamin odvozené z iPSC zlepšily chování ve zvířecím modelu PD [50].

4.6 Neurální kmenové buňky

Štěpy z NSC, představují přirozený zdroj silných biologických látek, které mohou podporovat funkční obnovu CNS po akutním nebo chronickém poranění tkáně. NSC odvozené z fetálních, neonatálních a postnatálních tkání jsou pluripotentní a mohou se diferencovat na hlavní typy buněk CNS, včetně neuronů, astrocytů a oligodendrocytů. Jedním ze způsobů, jak NSC přispívají k regeneraci poškozených mozkových tkání, je jejich parakrinní funkce, která spočívá v uvolňování neurotrofických nebo růstových faktorů. NSC nabízejí výhody oproti MSC, protože jsou účinnější při diferenciaci do nervové linie [51]. Yang a kol. ukázali, že klonální linie NSC, pěstované *in vitro* za kontrolních podmínek a transplantované do intaktních nebo neurotoxinem 6-hydroxydopaminem (6-OHDA) poškozených oblastí mozku potkanů, se spontánně vyvinuly do buněk podobných neuronům a integrovaly se do mozku hostitele. Svendsen a kol prokázali, že rozšířené populace lidských progenitorových buněk CNS, udržované v proliferačním stavu, byly schopny migrovat a diferencovat se jak na neurony, tak na astrocyty po intracerebrálním transplantování do *striatu* dospělých potkanů s jednostrannými dopaminergními lézemi. Modely PD subhumánních primátů jsou klíčové pro ověřování terapeutických strategií v preklinických studiích, díky jejich podobnosti s lidskými fyziologickými charakteristikami. Úspěšná transplantace nediferencovaných lidských NSC do *substantia nigra* primátů, vystavených 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinu, podpořila homeostatické úpravy, které jsou připisovány normalizaci poměru endogenního počtu neuronů k velikosti a ochraně hostitelských nigrostriálních obvodů. Tento proces vedl k celkovému zlepšení průběhu

onemocnění a nebyla zaznamenána žádná tvorba nádorů, přemnožení buněk nebo nepřiměřená migrace kmenových buněk [42].

4.7 MSC u PD: Účinky v postransplantačním období

V této studii byly MSC transplantovány 12 pacientům s PD pomocí intravenózních a tandemových injekcí. Intenzita motorických symptomů byla hodnocena pomocí standardizované stupnice pro hodnocení PD a intenzita nemotorických příznaků pomocí následujících škál: Hamiltonova škála hodnocení deprese, Pittsburghský index kvality spánku (PSQI), Epworthská škála ospalosti, škála nemotorických příznaků a 39 položkový dotazník Parkinsonovy choroby. Srovnávací soubor zahrnoval 11 pacientů s PD léčených léky s levodopou, agonisty dopaminových receptorů a amantadinem. Kontrolní subjekty nedostávaly žádnou injekci, včetně placeba. Průměrný věk pacientů byl 52 let, doba trvání onemocnění byla 6 let a závažnost onemocnění na Hoehnově a Yahrově škále činila 2 body. Skóre před léčbou a skóre v 1. měsíci mimo období ve studované skupině vykazovalo 9 % rozdíl. Dosažený výsledek byl udržován po dobu 3 měsíců po transplantaci. Ve srovnávací skupině nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skóre. Ve studované skupině bylo zjištěno zlepšení nálady, významné snížení denní spavosti a zlepšení kvality spánku pacientů. V 1. měsíci byl pozorován 36% pokles skóre podle Hamiltonovy stupnice deprese. Po 3 měsících bylo také zaznamenáno 44 % zlepšení nálady a snížení depresivních příznaků. Do 3. měsíce se zlepšila kvalita spánku, hodnocená škálou PSQI, o 46 % ve srovnání s původními údaji. Denní spavost, hodnocená Epworthovou stupnicí, se snížila o 42 %. Došlo také ke statisticky významnému zlepšení celkové kvality života. Dosažený výsledek byl zachován po dobu 3 měsíců po transplantaci. [52]. V další studii, kdy bylo pacientovi s PD podáváno několik infuzí s MSC, došlo k celkovému zlepšení motorických příznaků, které zahrnovaly třes v klidu, pohyby rukou, hbitost nohou, chůzi, stejně jako tělesnou bradykinezi a hypokinezi. Tato zjištění naznačují účinnost a možné potencionální využití těchto buněk v léčbě PD [53].

4.7.1 Příprava buněk

Buněčný materiál byl odebrán od pacientů s PD, kteří podstoupili transplantaci MSC, ze zadního horního hřebene kyčelní kosti standardní metodou. Mononukleární buňky z punktátu kostní dřeně byly izolovány separační metodou. Suspenze byla odstředěna po dobu 10 minut při 1500 ot. /min při pokojové teplotě. Peleta byla poté resuspendována v 10–15 ml média pro kultivaci MSC. Buněčná suspenze byla upravena na koncentraci inokula kultivačním médiem pro MSC a umístěna do kultivačních láhví v CO₂ inkubátoru (37°C, 5 % CO₂, 90 % vlhkost). Po 24–48 hodinách inkubace byly buňky, které neadherovaly ke dnu láhve, 3x promyty proudem sterilního fosfátového pufru (PBS), poté byly láhve naplněny specializovaným kultivačním médiem pro MSC. Každé 3–4 dny se měnila 1/2 objemu kultivačního média a buňky byly pasážovány, dokud nebylo dosaženo potřebného množství MSC. Transplantace autologních MSC u pacientů s PD byla provedena dvěma metodami. Systémovou (intravenózní) metodou podání byla aplikována celková dávka buněk ve výši 0,5–2,0 milionu/kg hmotnosti pacienta. Tandemovým způsobem podání byla suspenze autologních MSC aplikována v dávce 5,0–12,6 milionů buněk do submukózní vrstvy čichové epitelové zóny z obou stran. Sedm dní po intranazálním podání se pomalu intravenózně aplikovalo 10–50 milionů buněk ve dvou fázích s týdenním intervalem [52].

4.7.2 Závěr studie

V současné době jsou k dispozici pouze předběžné údaje o použití MSC u lidské PD. V souladu se zjištěními tato studie ukazuje, že intranazální a tandemové metody autologního podávání MSC jsou bezpečné a mají příznivé neuroprotektivní a neurorestriativní účinky. Vzhledem ke krátkému období pooperačního sledování, nelze zcela vyloučit vliv možného placebo efektu, který se nejčastěji vyskytuje v časných fázích otevřeného výzkumu. Vzhledem k tomu, že životnost MSC je v těle omezena na několik týdnů, je důležité studovat dlouhodobé účinky jejich transplantace, účinnost opakované reintrodukce MSC a časové intervaly, ve kterých musí být prováděny. Získaná data jsou nepochybně pouze předběžná a je zapotřebí podrobnějších studií [52]. Obecně lze říci, že jsou MSC v klinických studiích dobře tolerovány. Nicméně je důležité plánovat do budoucna další studie s vyšším počtem transplantovaných MSC, aby byl získán komplexnější obraz jejich účinnosti [54].

4.8 Transplantace NSC v kombinaci s ethylstearátem

V posledních letech se stále více upřednostňuje transplantace NSC pro léčbu PD. Většina transplantovaných NSC se diferencuje spíše na gliové buňky než na neurony a v mnoha studiích navíc vykazují značně omezenou migrační schopnost, což omezuje jejich terapeutický dopad. Chemokiny jsou malé vylučované proteiny s mnoha fyziologickými funkcemi. Bylo prokázáno, že hrají roli v řízení migrace nervových progenitorů ve vyvíjejícím se mozku. C-C motiv chemokinový receptor 5 (CCR5), sedmitransmembránový G-protein-spřážený receptor exprimovaný v nervovém systému, je stimulován chemokinovými ligandy CCL3, CCL4 a CCL5. Nedávné studie ukázaly, že NSC mohou exprimovat CCR5 a vykazovat chemotaktické reakce na relativní chemokinové ligandy. Byl také uveden vliv CCL5/CCR5 na migraci transplantovaných NSC u PD. V této studii byly NSC s ethylstearátem transplantovány do *striata* zvířecích modelů PD. Výsledky ukázaly, že transplantace NSC v kombinaci s ethylstearátem zlepšila behaviorální deficity tím, že podpořila migraci a diferenciaci NSC [55]. V předchozích studiích bylo také zjištěno, že extrakt z *plastrum testudinis* (PTE), jehož aktivní složkou byl ethylstearát, zlepšil chování modelových potkanů a došlo ke snížení motorické dysfunkce, obnovení hladiny TH proteinu a zvýšení hladiny dopaminu ve *striatu* [56].

4.8.1 Příprava buněk

Embrya byla odebrána z 14–17 březích potkanů. NSC byly izolovány z mozků embryí pomocí mechanické disociace a trávením trypsinem za aseptických podmínek. Trávení preparovaných tkání bylo ukončeno použitím DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mix F-12) s obsahem 10% fetálního bovinního séra. Po dvojitým promytí fyziologickým roztokem pufovaným fosfáty byly buňky umístěny do kultivačních lahví v bezsérovém DMEM/F12 médiu doplněném o 20 ng/ml epidermálního růstového faktoru, 20 ng/ml základního fibroblastového růstového faktoru, 2 % lidského leukocytárního antigenu B27, 100 jednotek/ml penicilinu a 100 µg/ml streptomycinu. Poté byly buňky kultivovány při 37 °C v inkubátoru s obsahem 5 % CO₂. NSC byly kultivovány a pasážovány s médiem bez séra. Potkanům s PD byl injekčně podán 6-hydroxydopamin (6-OHDA) do pravého *substantia nigra* a *striatu* s 8 µl buněčné suspenze NSC obsahující 100 µM ethyl stearátu a 8·10⁵ buněk [55].

4.8.2 Závěr studie

Potkani byli náhodně rozděleni do tří skupin: modelová skupina, skupina NSC a skupina ethylstearát+NSC. Potkani s indukovaným modelem PD pomocí 6-OHDA vykazovali signifikantní pokles exprese TH a akumulaci alfa-synukleinu. Transplantace NSC v kombinaci s ethylstearátem vedla ke zmírnění motorických deficitů a zvýšení exprese TH. Zjistilo se, že potkani s PD, kteří obdrželi NSC v kombinaci s ethylstearátem, vykazovali lepší zotavení než potkani ve skupině pouze s NSC. Ukázalo se, že ethylstearát efektivně zvyšoval počet TH pozitivních buněk jak v *substantia nigra*, tak ve *striatu*, a podporoval migraci transplantovaných buněk ze *striatu* do *substantia nigra*. Počet transplantovaných buněk byl také zvýšen ve skupině ethylstearátem, což naznačuje, že ethylstearát může podporovat migraci transplantovaných NSC a zvýšit přežití transplantovaných NSC. Výsledky této studie tedy ukázaly, že ethylstearát může zlepšit diferenciaci NSC na dopaminergní neurony a podpořit jejich migraci do léze, což mohou být dva klíčové kroky při zmírňování behaviorálních deficitů PD. Avšak mechanismus, kterým ethylstearát podporuje migraci transplantovaných NSC, však není znám [55]. Jiná studie potvrdila neuroprotektivní účinek ethylstearátu na základě molekulární analýzy. Bylo spekulováno, že se ethylstearát může vázat na DNA methyltransferázu 1 a blokovat agregaci alfa-synukleinu, avšak tato otázka zůstává pro budoucí výzkum [57].

5 Léčba Huntingtonovy choroby pomocí kmenových buněk

Huntingtonova choroba (HD, Huntington's Disease) je vzácné, dědičné, neurodegenerativní onemocnění, které způsobuje progresivní motorické deficity, psychiatrické příznaky a kognitivní poruchy. HD je charakterizovaná ztrátou GABAergních inhibičních spinových neuronů ve *striatu* předního mozku, doprovázená degenerací v kůře, mozkovém kmeni a hipokampu. Patofyziologie HD je zaměřená na abnormální expanze opakujících se kódů cytosin-adenin-guanin (CAG) na N-konci proteinu huntingtonu (HTT, Huntington's protein), což vede k preferenční ztrátě středně spinových neuronů a k projevům mimovolní motorické aktivity, demence, kognitivním a emočním deficitům [37]. Gen HD kóduje HTT, jehož funkce není dosud zcela objasněna. Má se za to, že hraje klíčovou roli v několika buněčných událostech, jako je transport proteinů, vezikul a selektivní autofagie. Diagnóza HD může být stanovena kdykoliv během života jedince, ale ve většině případů k tomu dochází ve středním věku. V raných stádiích HD mohou pacienti pociťovat mírné mimovolní pohyby, potíže s exekutivními funkcemi a depresivní náladu. V pozdních stádiích mohou být pacienti upoutáni na lůžko, potřebují vyživovací sondy a nemohou mluvit kvůli ztrátě motorické kontroly. V této fázi je také častá progresse onemocnění směrem k závažné demenci. Průměrná délka dožití od nástupu příznaků je 18 let, přičemž nejčastější příčinou úmrtí jsou infekce, konkrétně aspirační anémie [51].

5.1 Patogeneze HD

Předpokládá se, že HD vzniká převážně toxickým účinkem mutovaného proteinu huntingtin (mHHT). Opakovaná expanze CAG kóduje zvětšený polyglutaminový trakt v N – koncovém fragmentu proteinu, což způsobuje abnormální skládání mutovaného HTT a jeho hromadění v mozkových buňkách. Výsledná exprese mutovaného HTT narušuje fyziologii neuronů, následkem je detekovatelná atrofie v jádrech bazálních ganglií a subkortikální bíle hmotě. Postupem onemocnění dochází k významné ztrátě neuronů v kortikální, thalamické a hypotalamické oblasti, a nakonec v celém mozku. Základní mechanismus onemocnění zahrnuje deregulaci systémů ubikvitin/proteazom a autofagie, což přispívá k akumulaci toxických proteinů. Oxidační stres s periferním a centrálním zánětem se vyskytuje již v raných stádiích onemocnění. Kromě toho mutovaný HTT ovlivňuje transkripční regulaci a axonální transport, to vede ke snížení signalizace zprostředkované neurotrofickým faktorem odvozeným od mozku. Také dochází ke změnám v kortikální glutamatergní a striatální dopaminergní neurotransmisí a jsou pozorovány důkazy o synaptické dysfunkci u HD [58].

5.2 Terapie pomocí kmenových buněk

V současné době neexistuje žádná účinná léčba HD, současná farmakologická léčba poskytuje pouze paliativní účinky. Vzhledem k tomu, že mutovaný protein huntingtin spouští smrt neuronů v *caudatu* a *putamenu*, je náhrada těchto ztracených buněk klíčovou strategií pro terapii [59]. Pokrok ve výzkumu kmenových buněk je pracný, časově náročný a vyžaduje mnoho kroků, včetně zkoušek *in vitro*, pokusů na laboratorních zvířatech, a kvůli etickým úvahám také přísná omezení při použití lidské embryonální tkáně. Další vývoj vyžaduje absolvování klinických studií fáze I, II a III na lidech, než bude možné získat konečné schválení pro jejich použití v praxi [60].

5.3 Embryonální kmenové buňky

Jedna z největších klinických studií HD týkající se transplantace ESC je studie Bachoud-Lévi et al. z roku 2020. Tato klinická studie se zaměřila na transplantaci lidské fetální gangliové tkáně na 45 účastnících pomocí intracerebrálních injekcí. Bohužel v této studii nebyly pozorovány žádné klinické přínosy, což bylo považováno za důsledek odmítnutí štěpu nebo nesprávného umístění transplantátu. Kritici studie však uvedli, že v době transplantace existovalo jen málo důkazů o tom, že by byl buněčný produkt vůbec životaschopný [54]. Další studie se zaměřila na vytvoření kombinovaného terapeutického přístupu zahrnujícího buněčnou náhradu neutrálními progenitory, odvozenými od ESC s BDNF (neurotrofický faktor odvozený od mozku) na myších modelech HD, tento přístup vedl k ke zlepšení motorických funkcí [61].

5.4 Mezenchymální kmenové buňky

MSC se ve většině doposud provedených transplantačních studiích HD podávaly intracerebrálně. Myši léčené BM-MSK vykazovaly snížené motorické deficity a zlepšení prostorové paměti. Transplantované BM-MSK stimulovaly endogenní proliferaci neurálních kmenových buněk, pravděpodobně indukci trofické podpory se zvýšenými hladinami mozkového neurotrofického faktoru (BDNF, Brain-derived neurotrophic factor) ve *striatu* myší s HD. U myší s HD léčených geneticky upravenými MSC s nadměrnou expresí BDNF nebo nervových růstových faktorů došlo k redukci apoptotických buněk ve striatální oblasti a ke snížení atrofie mozku. V experimentálních modelech HD, kde byly aplikovány MSC, došlo ke snížení chybně poskládaných forem agregátů HTT a prodloužení délka života v porovnání s kontrolními myšmi. Intranazální podání MSC bylo provedeno na myším modelu HD. Léčené myši vykazovaly pravidelný spánkový cyklus a prodlouženou dobu přežití ve srovnání s neléčenými zvířaty, která vykazovala narušené cirkadiánní rytmy a kratší délku

života. Na základě experimentálních studií odhalila léčba MSC zlepšení motorických a kognitivních deficitů u myších a potkanů s HD. Lidské MSC snížily atrofii pozorovanou v agregátech *striata*, stimulovaly endogenní neurogenезi a prodloužily délku života [48].

5.5 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Modely s iPSC se používají ke zkoumání mechanismů, které jsou základem HD a dalších neurodegenerativních onemocnění. U neuronů γ -aminomáselné kyseliny GABA byly pozorovány agregáty HTT, autofagie, dysregulovaná adheze, dysregulace lysosomů a metabolismu, což nakonec vedlo k aktivaci kaspáz a buněčné smrti [59]. Bylo zjištěno, že buňky odvozené od pacientů s HD vykazují buněčné změny, jako jsou změny exprese proteinů a mitochondriální dysfunkce, ve srovnání s kontrolními buněčnými liniemi. HD-iPSC mohou přispět ke zlepšení CAG lokusu v HTT genu. Obnova fenotypů onemocnění, jako jsou mitochondriální abnormality, může být dosažena neurony odvozenými z izogenních linií. Kromě toho může být produkce geneticky korigovaných izogenních linií pro *in vitro* neuronální indukci prováděna pomocí systému CRISPR/Cas9 [62].

5.6 Nervové kmenové buňky

Ve studiích na zvířecích modelech HD byly NSC úspěšně transplantovány přímo do *striata*, což naznačuje, že tyto buňky přežívají a distribuují se v poškozených oblastech mozku. Transplantované NSC navíc zlepšily motorické i psychologické symptomy, ale vykazovali omezenou migraci v transplantovaných tkáních [63].

5.7 Striální progenitory odvozené od lidských ESC

Zavedené technologie založené na lidských ESC umožňují generovat rozsáhlé neurální populace *in vitro* prostřednictvím řízené diferenciaci, což otevírá nové možnosti pro strategie buněčné substituce. Tato studie zkoumala potenciál lidských prekursorů striálních neuronů získaných z ESC k testování jejich *in vivo* diferenciaci a terapeutické účinnosti na modelu HD s lézí chinolinové kyseliny [64]. Předchozí studie prokázala, že krátkodobé implantace lidských NSC odvozených z ESC u myši přežívají, jsou funkční a zlepšují příznaky HD [65].

5.7.1 Příprava buněk

Lidská linie ESC byla pěstována na miskách pro buněčné kultury potažených extracelulární matricí Cultrexem v kultivačním médiu mTeSR určeném pro kultivaci lidských ESC a iPSC buněk. Médium bylo obohaceno o suplementy: N2, B27 podporující růst a diferenciaci buněk, inhibitor SB431542, který blokuje signální dráhu TGF- β a dále napomáhá udržení pluripotence buněk a naltrexonem (LDN), který se používá k modulaci buněčné

aktivity a zlepšení růstových podmínek. Pro terminální diferenciaci byly buňky kultivovány v médiu obsahujícím 50 ng/ml mozkového neurotrofického faktoru BDNF společně se suplementy N2 a B27. Potkani byli náhodně přiřazeni buď k transplantaci buněk, nebo k fingovanému zákroku. U kontrolní skupiny potkanů byl do lézí *striata* aplikován ekvivalentní objem fosfátového pufru, PBS [64].

5.7.2 Výsledky a závěr studie

Po 6 měsících vykazovaly transplantované buňky zanedbatelnou proliferaci, což zajistilo absenci nekontrolovaného přerůstání. Po dlouhodobé transplantaci štěpy znovu osídlily *striatum* a diferencovaly se do několika typů striatálních buněk. Dále se objevily peptidy a dopaminové receptory, typické pro striální trnité neurony, přímé nebo nepřímé dráhy s širší přítomností markerů nepřímých drah. Štěpy také obsahovaly významné frakce striatálních interneuronů. Studie prokázala, že transplantace striatálních progenitorů odvozených od lidských ESC dlouhodobě podporuje funkční motorickou regeneraci tím, že přežívá, diferencuje, samoorganizuje se a připojuje se k léznímu striatu [64]. V jiné studii se zjistilo, že striální progenitory, které byly odvozeny z kmenových buněk a transplantovány do potkanů, se diferencovaly na střední spinální neurony. Ukázalo se, že vlákna těchto buněk směřovala k vhodným striálním cílům, což přispělo k pozorovanému funkčnímu zotavení. Aby se však potvrdila schopnost těchto štěpů dlouhodobě udržovat komplexní motorické funkce, je zapotřebí dalších dlouhodobých experimentů [66].

5.8 Intranazální podání MSC

Invazivní povaha chirurgického zákroku při aplikaci kmenových buněk a potenciální riziko vyvolání imunitní reakce hostitele, mohou omezovat jejich klinické použití. Tato studie posuzuje neinvazivní intranazální podání MSC jako efektivní alternativní cestu pro léčbu HD. Na základě slibných *in vivo* dat byly v této studii hodnoceny terapeutické účinky MSC podávaných intranazální cestou pomocí myšího modelu R6/2. Myší model R6/2 nesl N-terminální fragment exonu 1 lidského HD genu, který obsahoval přibližně 145 CAG repetit [67]. Již v dřívějších studiích byla prokázána účinnost intranazálně podávaných MSC na 6-hydroxydopaminovém modelu PD. Podobné příznivé účinky intranazálně podávaných MSC byly hlášeny u myšího modelu PD indukovaného rotenonem [68].

5.8.1 Příprava buněk

Kostní dřevina byla odebrána z holenní a stehenní kosti. MSC byly kultivovány v minimálním esenciálním médiu s GlutaMAX™, které obsahovalo 15 % fetálního bovinního séra a 20 ng/ml bazického fibroblastového růstového faktoru (FGFb). MSC byly zmrazeny v druhé pasáži v 10 % dimethylsulfoxidu DMSO/90% kultivačního média až do transplantace. Po rozmrazení byl fenotyp buněk potvrzen markery mezenchymálních kmenových buněk myši. Panel se skládal z následujících protilátek: anti-CD11b, anti-CD45, anti-Sca-1, anti-CD106, anti-CD105, anti-CD73, anti-CD29 a anti-CD44, krysí IgG2A a krysí IgG2B. Jeden milion MSC byl připraven ze zmrazených zásob a resuspendován ve 24 µl sterilního PBS a aplikován každé myši ve skupině R6/2-MS, zatímco další skupiny dostávaly pouze stejné množství PBS. Po třech dnech bylo podávání opakováno tak, že každá myš ve skupině R6/2-MS obdržela celkem dva miliony buněk, zatímco myši v kontrolních skupinách dostaly 24 µl vehikulového pufru (PBS) podruhé [67].

5.8.2 Výsledky a závěr studie

Tato studie ukazuje, že MSC podávané intranazálně myším R6/2 HD byly schopny migrovat a infiltrovat do čichového bulbu, středního mozku a *striata*. Intranazální podání MSC významně zvýšilo míru přežití a zlepšilo poruchy spánku myši R6/2 a také vykazovalo trend ke zlepšení motorických funkcí. Dále léčba zvýšila expresi cAMP-regulovaného neuronálního fosfoproteinu DARPP-32 ve *striatu*, zatímco hladiny exprese synaptických markerů a zůstaly nezměněny. Všechny zkoumané imunomodulátory prokázaly buď významnou obnovu, nebo vykazovaly trend k obnově ve většině zkoumaných oblastí mozku po léčbě MSC. Studie ukázala, že tato metoda je účinnou cestou podávání MSC pro terapii HD. Vzhledem k tomu, že se jedná o neinvazivní způsob podání, MSC lze aplikovat opakovaně, což vede k dlouhodobému terapeutickému účinku a překonávání problému nízkého přežití buněk a imunitní odpovědi hostitele po chirurgickém podání [67]. Podobných výsledků bylo také dosaženo ve studii, která zkoumala intranazální podání MSC u modelu AD a rovněž prokázala, že tento způsob aplikace je bezpečný a málo invazivní [69].

6 Léčba amyotrofické laterální sklerózy pomocí kmenových buněk

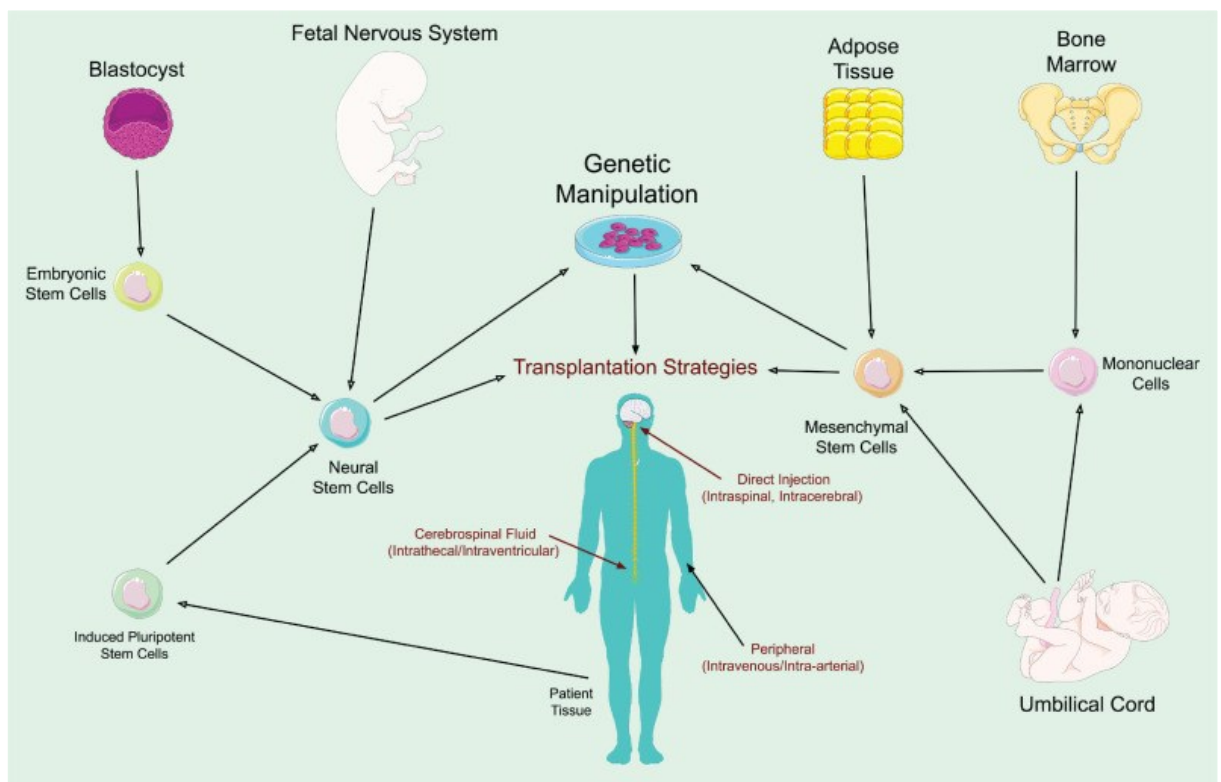
Amyotrofická laterální skleróza (ALS, amyotrophic lateral sclerosis) je smrtelné neurodegenerativní onemocnění u dospělých, které poprvé popsal neurobiolog Jean-Martin Charcot v 70. letech 19. století a původně se nazývalo Charcotova triáda. ALS způsobuje postižení jak horních motorických neuronů (UMN), tak dolních motorických neuronů (LMN), což vede k progresivní paralýze. Mezi příznaky nervového systému patří křeče, svalová ztuhlost, hyperreflexie a patologické reflexy, což jsou příznaky postižení UMN, svalová slabost a atrofie jsou příznaky poranění LMN. ALS obvykle postupuje rychle a během jednoho až pěti let po nástupu onemocnění dochází k úmrtí na respirační selhání. Imunohistochemická detekce indikuje akumulaci ubikvitinovaných proteinů v motorických neuronech ALS a gliových buňkách. Většina případů ALS je sporadická, přičemž 10 % případů je familiárních. V posledních 20 letech přibývá důkazů o tom, že pacienti s diagnózou ALS mají klinické příznaky frontotemporální demence (FTD), což naznačuje, že obě formy tohoto onemocnění sdílejí společné příznaky a biologické charakteristiky [70]. Bohužel, navzdory rozsáhlému výzkumu ALS, dnes neexistuje žádná klinická ani profylaktická léčba. Existuje pouze jeden schválený lék s názvem riluzol, který v této oblasti modifikuje onemocnění a prodlužuje průměrnou délku života pacienta o 3 až 6 měsíců. Tato účinnost se však liší od člověka k člověku [71]. Prodloužení délky života pacientů s ALS může prohloubit porozumění její patogeneze a podpořit rozvoj časných a specifických diagnostických metod. Je naléhavě nutné vypracovat léčebný plán, který nejen zpomalí progresi onemocnění, ale také se bude věnovat sekundárním důsledkům, jako je podvýživa a respirační selhání [70].

Vědci doposud provedli mnoho souvisejících studií, ale patogeneze ALS je bohužel stále nejasná. Existují vědecké důkazy o tom, že jak genetika, tak i životní prostředí se podílejí na patogenezi ALS. Výzkum ukazuje, že některé konkrétní genové mutace jsou spojeny s destrukcí motorických neuronů a rozvojem ALS. Některé z těchto mutací jsou přímo zodpovědné za indukci onemocnění, protože jsou zděděny od rodičů a jsou známé jako mutované familiární geny ALS včetně superoxidodismutázy (SOD1), TARDBP (TAR DNA Binding Protein) a dalších. Mnoho epidemiologických studií zkoumalo faktory životního prostředí, které se podílejí na rozvoji ALS. Získané výsledky ukazují, že nevhodný životní styl a různé faktory prostředí mohou ovlivnit vznik a šíření onemocnění, včetně expozice toxinům, těžkým kovům, pesticidům, zemědělským chemikáliím, elektrickým, magnetickým polím a virům. Za další vlivné faktory se považuje také fyzické trauma, strava, kouření, pracovní

rizika, geografická oblast, věk a pohlaví. Bylo například prokázáno, že prevalence ALS je vyšší u mužů než u žen, a to přibližně dvakrát [71].

6.1 Terapie pomocí kmenových buněk

Kmenové buňky byly původně navrženy jako léčba ALS s cílem doplnit populace postupně ztracených motorických neuronů. V současné době se k léčbě ALS používají dva hlavní typy kmenových buněk: NSC a MSC. Přestože léčba kmenovými buňkami prokázala v klinických studiích ALS určitou bezpečnost a účinnost, přetrvává řada problémů a omezení. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují účinnost léčby kmenovými buňkami a neexistují žádné jednotné standardy nebo pokyny pro regulaci těchto faktorů [72].



Obrázek 4: Terapeutické strategie s využitím buněk u ALS [73]

6.2 Mezenchymální kmenové buňky

Preklinický výzkum zkoumající příčiny a potenciální léčbu ALS se primárně opírá o modely potkanů a myší, které nadměrně exprimují mutované lidské geny SOD1 a vykazují podobné vzorce patologie a progresse onemocnění jako ty, které byly pozorovány u lidí. Pomocí těchto modelů vědci zjistili, že transplantace MSC různými cestami, jako je intratekální, intravenózní, intramuskulární a intracerebrální, může být bezpečným a účinným přístupem k oddálení poklesu motorických funkcí a podpoře neurogeneze [71]. Terapie ALS pomocí MSC využívá jejich účinků buď přímo na motoneurony, nebo nepřímo na gliové a imunitní buňky. MSC produkují a vylučují širokou škálu růstových faktorů a cytokinů, o kterých je známo, že chrání motoneurony, jako jsou: neurotrofický faktor odvozený z gliových buněčných linií (GDNF), inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), neurotrofický faktor (BDNF), nervový růstový faktor (NGF) a vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Z tohoto důvodu mnoho preklinických studií injikovalo MSC přímo do míchy v naději, že se zvýší dostupnost těchto faktorů pro motoneurony. Po alogenní transplantaci na počátku onemocnění u potkanů zůstávají buňky v místě vpichu až do konečného stadia onemocnění. Tento přístup zlepšuje motorickou kapacitu, prodlužuje přežití motoneuronů a délku života. Na druhé straně, lidské MSC injikované dlouho před nástupem příznaků u myší, nebyly detekovány ani 70 dní po injekci. Tato data tedy naznačují, že doba integrace MSC do cílové tkáně může ovlivnit výsledek terapie [73].

6.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky

iPSC urychlují modelování ALS *in vitro* tím, že mohou generovat buňky s genetickým pozadím pacientů relevantních pro onemocnění a reprodukovat klíčové charakteristiky nemoci ve výzkumných modelech. Bylo prokázáno, že s patogenezí a progresí ALS souvisí více typů buněk, jako jsou motorické neurony, astrocyty, oligodendrocyty a mikroglie. S technologií iPSC lze motorické neurony a další typy nervových buněk odvozených od pacientů s ALS získat téměř neomezeně. V současné době jsou tyto typy buněk úspěšně generovány ze somatických buněk pacientů pomocí přeprogramovaných iPSC [74].

6.4 Nervové kmenové buňky

Ukázalo se, že transplantované NSC se integrují do míchy ALS a diferencují se na neurony s funkčními synapsemi, což vede ke zlepšení přežití motoneuronů a motorických funkcí. Vytvoření nového motoneuronu u dospělého člověka by vyžadovalo prodloužení jeho axonu do specifického svalového cíle. I když jen málo studií prokázalo proveditelnost tohoto přístupu, v modelech ALS zatím nebyla tato schopnost prokázána. NSC mohou být použity jako zdroj tzv. servisních buněk, jako astrocyty a interneurony, které vylučují růstové faktory a působí jako mediátory ke snížení lokálního zánětu. Mohou být indukovány tak, aby produkovaly trofické faktory, jako je gliální neurotrofický faktor (GDNF), a diferencovaly se na astrocyty. Thomsen a kolegové prokázali, že lidské NSC, které exprimují GDNF, zlepšily symptomy a prodloužily přežití po diferenciaci na astrocyty [73].

6.5 Sekretom kmenových buněk zubní dřeně u myšího modelu ALS

Sekretomy kmenových buněk obsahují různé prospěšné trofické faktory a cytokiny. Nedávné studie prokázaly, že podávání sekretomu kmenových buněk získaných z tukové tkáně během časně denervace neuromuskulárního spojení (NMJ) u myšího modelu ALS s mutací superoxiddismutázy (mSOD1G93A) zmírnila narušení NMJ. V této studii bylo zkoumáno, zda podání sekretomu kmenových buněk zubní dřeně ve formě kondicionovaného média (DPSC-CM) v různých stádiích onemocnění zabrání ztrátě motorických neuronů, prodlouží životnost a podpoří inervaci NMJ [75]. Dřívější výzkum prokázal terapeutický potenciál systémového podávání kondicionovaného média obsahujícího trofické a další sekrety z lidských kultur kmenových/stromálních buněk odvozených z tukové tkáně (ASC-CM). Ukázalo se, že časná presymptomatická léčba ASC-CM oddálila denervaci NMJ, pokud byla podána před a během časných stádií onemocnění [76].

6.5.1 Příprava buněk

Lidské kmenové buňky zubní dřeně (DPSC) byly odebrány ze třetích molárů a kultivovány v nízkoglukózovém modifikovaném médiu s obsahem L-glutaminu, pyruvátu a 10% fetálního bovinního séra. Odebrané médium (sekretom) bylo zmrazeno při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v 1 ml alikvotu. Myším bylo poté intraperitoneálně injikováno 200 μl sekretomu DPSC nebo vehikula (DMEM) ve třech různých fázích onemocnění: v časném presymptomatickém, pozdním presymptomatickém a konečném stádiu nemoci [77].

6.5.2 Výsledky a závěr studie

Bylo pozorováno zlepšení denervace NMJ u myši léčených DPSC-CM ve srovnání se skupinou léčenou vehikulem v pozdním presymptomatickém stadiu a došlo k signifikantnímu zvýšení počtu intaktních inervačních NMJ. Dále bylo zjištěno, že gliová reaktivita byla výrazně zvýšena v centrálním nervovém systému mSOD1 myši. Výsledky také ukázaly, že reaktivita astrocytů a mikroglíí se dramaticky zvýšila ve ventrálním rohu bederní míchy. U myši s ranými příznaky, léčených DPSC-CM ošetřené mSOD1, se zvýšila celková délka života ve srovnání s myši léčenými vehikulem. Tato studie prokázala terapeutické přínosy systémového sekretomu DPSC a vytvořila tak základ pro budoucí výzkum léčebných účinků a dalších terapií sekretomu kmenových buněk u ALS. Zjištění, že systémové podávání DPSC-CM od nástupu příznaků až do konečného stadia významně prodloužilo přežití, je klinicky nejrelevantnější ze všech nálezů. Je to proto, že většina pacientů s nedědičnou formou ALS je léčena až poté, co jsou patrné příznaky [77]. Podobná studie se zaměřila na neurotrofické faktory, které vylučují DPSC a také prokázala terapeutický potenciál sekretomu DPSC při podpoře přežití motoneuronů. Mezi hlavní oblasti zájmu budoucích studií by mělo patřit zaměření na další faktory, které nebyly nikdy prozkoumány, záchrana motoneuronů před smrtí a také posouzení nových kombinací komplementárních molekul [78].

6.6 iPSC u pacientů s ALS nesoucí různé mutace superoxiddismutázy 1

V této studii se zkoumala exprese mutantního proteinu superoxiddismutázy 1 (SOD1) v motorických neuronech (MN) odvozených z iPSC buněčných linií pacientů s ALS, nesoucích různé mutace SOD1, ke zlepšení pochopení problematiky ovlivňující MN. Byly vytvořeny dvě buněčné linie iPSC od dvou familiárních pacientů s ALS (FALS) s mutacemi SOD1-V14M a SOD1-C111Y, které se poté diferencovaly na MN. Zkoumaly se hladiny proteinu SOD1 v iPSC a MN, následně aktivita laktátdehydrogenázy (LDH) v procesu diferenciaci na MN odvozené z kontrolních iPSC pacientů s ALS [79]. Již v dřívějších studiích bylo zjištěno, že mnoho transkriptů relevantních pro mitochondriální funkce se specificky mění v SOD1 ALS, což naznačuje, že transkripční signatury a expresní vzorce se mohou významně lišit podle toho, který kauzální gen je mutován [80].

6.6.1 Příprava buněk

Lidské fibroblasty byly kultivovány ve fibroblastovém médiu (FM) doplněném o 10 % fetálního bovinního séra (FBS), glutaminu a penicilinu/streptomycinu. Lidské ESC a iPSC byly kultivovány ve standardním médiu pro lidské ESC. Humánní iPSC derivační médium bylo stejné jako humánní iPSC kultivační médium, s tím rozdílem, že koncentrace fibroblastového

růstového faktoru beta (bFGF) byla 10 ng/ml. Do fibroblastových buněk byly zavedeny retroviry obsahující lidský oktamer vázající transkripční faktor 4 (OCT4), SRY (sex určující oblast Y) -box 2 (SOX2), Kruppel-like faktor 4 (KLF4) a myelocytomatózový celulární onkogen (c-MYC). Po 48 hodinách transfekce bylo médium obsahující virus odebráno a koncentrováno centrifugací po dobu 2 hodin při 22 000 ot. /min, 4 °C. Virová peleta byla resuspendována v 1 ml FM a použita k infikování 5×10^4 fibroblastů. Po 8 až 12 hodinách inkubace bylo čerstvé fibroblastové médium (FM) nahrazeno infikovanými fibroblastovými buňkami. Po 3–4 dnech byly buňky trypsinizovány a naočkovány na myší embryonální fibroblastové buňky (MEF) ošetřené mitomycinem C (MMC) do kultivačních misek. Použité médium bylo určeno pro odvození lidských iPSC. Po 3 až 4 týdnech se objevily kolonie iPSC, které byly mechanicky pasážovány každé 3 až 4 dny [79].

6.6.2 Výsledky a závěr studie

V této studii byly motorické neurony a iPSC od pacientů s různými mutacemi pozorovány s mnohem vyššími hladinami proteinu SOD1, ve srovnání s kontrolními skupinami. iPSC od dvou pacientů s familiární ALS byly schopné diferenciaci na motorické neurony s různými mutacemi SOD1. Byla také zaznamenána vysoká exprese proteinu SOD1 a vysoké intracelulární hladiny vápníku v motorických neuronech a iPSC odvozených od těchto pacientů. Dále byla pozorována cytoplazmatická chybná lokalizace a tvorba FUS-
imunopozitivních agregátů inkluzí v motorických neuronech, které se odlišovaly od iPSC specifických pro pacienty s ALS nesoucími mutaci FUS-P525L. Dále byly provedeny metabolické testy pro sledování intracelulárního Ca^{2+} . Jak se očekávalo, motorické neurony vykazovaly významnější změny v intracelulárním Ca^{2+} než kontroly. Z této studie vyplývá, že motorické neurony diferencované z iPSC linií specifických pro pacienty, mohou monitorovat klíčové aspekty patogeneze ALS a poskytnout buněčný model onemocnění pro další objasnění patogeneze onemocnění a účinnost buněčné terapie založené na změně genetické informace [79]. I dřívější studie uvedly, že motorické neurony odvozené od iPSC, částečně objasňují mechanismy onemocnění ALS souvisejícího s mutovanými proteiny, nicméně je třeba dalších experimentálních ověření, která budou poskytovat potenciálně užitečné důkazy a nápady pro další zkoumání základních mechanismů patogeneze ALS [80].

Závěr

V této bakalářské práci jsem zjišťovala možnosti využití kmenových buněk při léčbě neurodegenerativních onemocnění. Nejdříve jsem stručně popsala příčinu vzniku a mechanismus působení u vybraných onemocněních. Popsala jsem různé typy kmenových buněk, jejich vlastnosti a potenciál, které je činí vhodnými kandidáty pro buněčnou terapii. Dále jsem se zaměřila na nejnovější klinické studie, které zkoumají využití kmenových buněk v této problematice.

Výsledky studií na zvířecích modelech ukázaly, že terapie pomocí kmenových buněk může výrazně zlepšit neurologické funkce, snížit ztrátu neuronů a podpořit regeneraci mozkové tkáně. I přes tyto velmi slibné výsledky je nutné pokračovat ve výzkumu, aby byl tento způsob terapie účinný a bezpečný pro použití u lidí. Budoucí výzkum by se měl zaměřit na zdokonalení technik diferenciací kmenových buněk, prevenci vzniku imunitní reakce a tvorby teratomů. Celkově lze říci, že buněčná terapie představuje velmi nadějnou a slibnou metodu k léčbě neurodegenerativních onemocnění. Přesto je před námi ještě dlouhá cesta, než tento způsob terapie bude aplikovatelný v klinické praxi.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Ratcliffe E, Glen KE, Naing MW, Williams DJ. Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies. *Br Med Bull.* 2013; 108:73-94. doi: 10.1093/bmb/ldt034.
- [2] Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration.* 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615.
- [3] Wong VW, Sorkin M, Gurtner GC. Enabling stem cell therapies for tissue repair: current and future challenges. *Biotechnol Adv.* 2013;31(5):744-51. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.11.006.
- [4] Ratcliffe E, Thomas RJ, Williams DJ. Current understanding and challenges in bioprocessing of stem cell-based therapies for regenerative medicine. *Br Med Bull.* 2011; 100:137-55. doi: 10.1093/bmb/ldr037.
- [5] Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, Liu C, Liu J, Luo Y. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Rev Rep.* 2022;18(5):1525-1545. doi: 10.1007/s12015-022-10369-1.
- [6] Charitos IA, Ballini A, Cantore S, Boccellino M, Di Domenico M, Borsani E, Nocini R, Di Cosola M, Santacroce L, Bottalico L. Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues. *Stem Cells Int.* 2021 29; 2021:9978837. doi: 10.1155/2021/9978837.
- [7] Deb KD, Sarda K. Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J Transl Med.* 2008; 6:7. doi: 10.1186/1479-5876-6-7
- [8] Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M, Rybak Z. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther.* 2019 26;10(1):68. doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
- [9] Romeo F, Costanzo F, Agostini M. Embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells: two faces of the same coin? *Aging (Albany NY).* 2012;4(12):878-86. doi: 10.18632/aging.100513.
- [10] Ohnuki M, Takahashi K. Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015 19;370(1680):20140367. doi: 10.1098/rstb.2014.0367.

- [11] Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(6):747-54. doi: 10.1038/aps.2013.50.
- [12] Mousaei Ghasroldasht M, Seok J, Park HS, Liakath Ali FB, Al-Hendy A. Stem Cell Therapy: From Idea to Clinical Practice. *Int J Mol Sci.* 2022 5;23(5):2850. doi: 10.3390/ijms23052850.
- [13] Yao P, Zhou L, Zhu L, Zhou B, Yu Q. Mesenchymal Stem Cells: A Potential Therapeutic Strategy for Neurodegenerative Diseases. *Eur Neurol.* 2020;83(3):235-241. doi: 10.1159/000509268.
- [14] De Gioia R, Biella F, Citterio G, Rizzo F, Abati E, Nizzardo M, Bresolin N, Comi GP, Corti S. Neural Stem Cell Transplantation for Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 28;21(9):3103. doi: 10.3390/ijms21093103.
- [15] Fernandez-Muñoz B, Garcia-Delgado AB, Arribas-Arribas B, Sanchez-Pernaute R. Human Neural Stem Cells for Cell-Based Medicinal Products. *Cells.* 2021 9;10(9):2377. doi: 10.3390/cells10092377.
- [16] Michaelidesová A, Konířová J, Bartůněk P, Zíková M. Effects of Radiation Therapy on Neural Stem Cells. *Genes (Basel).* 2019 24;10(9):640. doi: 10.3390/genes10090640.
- [17] Ottoboni L, von Wunster B, Martino G. Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells. *Front Neurol.* 2020 20; 11:148. doi: 10.3389/fneur.2020.00148.
- [18] Navarro Negredo P, Yeo RW, Brunet A. Aging and Rejuvenation of Neural Stem Cells and Their Niches. *Cell Stem Cell.* 2020 6;27(2):202-223. doi: 10.1016/j.stem.2020.07.002.
- [19] Finkel Z, Esteban F, Rodriguez B, Fu T, Ai X, Cai L. Diversity of Adult Neural Stem and Progenitor Cells in Physiology and Disease. *Cells.* 2021 10;10(8):2045. doi: 10.3390/cells10082045.
- [20] Zholudeva LV, Jin Y, Qiang L, Lane MA, Fischer I. Preparation of Neural Stem Cells and Progenitors: Neuronal Production and Grafting Applications. *Methods Mol Biol.* 2021; 2311:73-108. doi: 10.1007/978-1-0716-1437-2_7.
- [21] Chang BL, Chang KH. Stem Cell Therapy in Treating Epilepsy. *Front Neurosci.* 2022 27; 16:934507. doi: 10.3389/fnins.2022.934507.

- [22] Xia L, Zhu W, Wang Y, He S, Chai R. Regulation of Neural Stem Cell Proliferation and Differentiation by Graphene-Based Biomaterials. *Neural Plast.* 2019 16; 2019:3608386. doi: 10.1155/2019/3608386.
- [23] Gao L, Peng Y, Xu W, He P, Li T, Lu X, Chen G. Progress in Stem Cell Therapy for Spinal Cord Injury. *Stem Cells Int.* 2020 5; 2020:2853650. doi: 10.1155/2020/2853650.
- [24] Hayashi Y, Lin HT, Lee CC, Tsai KJ. Effects of neural stem cell transplantation in Alzheimer's disease models. *J Biomed Sci.* 2020 27;27(1):29. doi: 10.1186/s12929-020-0622-x.
- [25] Liao LY, Lau BW, Sánchez-Vidaña DI, Gao Q. Exogenous neural stem cell transplantation for cerebral ischemia. *Neural Regen Res.* 2019;14(7):1129-1137. doi: 10.4103/1673-5374.251188
- [26] Zhang GL, Zhu ZH, Wang YZ. Neural stem cell transplantation therapy for brain ischemic stroke: Review and perspectives. *World J Stem Cells.* 2019 26;11(10):817-830. doi: 10.4252/wjsc. v11.i10.817.
- [27] Damle EB, Morrison VE, Cioma J, Volic M, Bix GJ. Co-administration of extracellular matrix-based biomaterials with neural stem cell transplantation for treatment of central nervous system injury. *Front Neurosci.* 2023 15; 17:1177040. doi: 10.3389/fnins.2023.1177040.
- [28] Dause TJ, Denninger JK, Smith BM, Kirby ED. The neural stem cell secretome across neurodevelopment. *Exp Neurol.* 2022; 355:114142. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114142.
- [29] Chan HJ, Yanshree, Roy J, Tipoe GL, Fung ML, Lim LW. Therapeutic Potential of Human Stem Cell Implantation in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021 21;22(18):10151. doi: 10.3390/ijms221810151
- [30] Liu XY, Yang LP, Zhao L. Stem cell therapy for Alzheimer's disease. *World J Stem Cells.* 2020 26;12(8):787-802. doi: 10.4252/wjsc. v12.i8.787.
- [31] Mohebichamkhorami F, Niknam Z, Khoramjouy M, Heidarli E, Ghasemi R, Hosseinzadeh S, Mohseni SS, Hajikarim-Hamedani A, Heidari A, Ghane Y, Mahmoudifard M, Zali H, Faizi M. Brain Homogenate of a Rat Model of Alzheimer's Disease Modifies the Secretome of 3D Cultured Periodontal Ligament Stem Cells: A Potential Neuroregenerative Therapy. *Iran J Pharm Res.* 2022 12;21(1): e133668. doi: 10.5812/ijpr-133668.

- [32] Chen X, Jiang S, Wang R, Bao X, Li Y. Neural Stem Cells in the Treatment of Alzheimer's Disease: Current Status, Challenges, and Future Prospects. *J Alzheimers Dis.* 2023;94(s1): S173-S186. doi: 10.3233/JAD-220721.
- [33] Zhao J, Su M, Lin Y, Liu H, He Z, Lai L. Administration of Amyloid Precursor Protein Gene Deleted Mouse ESC-Derived Thymic Epithelial Progenitors Attenuates Alzheimer's Pathology. *Front Immunol.* 2020 11; 11:1781. doi: 10.3389/fimmu.2020.01781.
- [34] Blanchard JW, Akay LA, Davila-Velderrain J, von Maydell D, Mathys H, Davidson SM, Effenberger A, Chen CY, Maner-Smith K, Hajjar I, Ortlund EA, Bula M, Agbas E, Ng A, Jiang X, Kahn M, Blanco-Duque C, Lavoie N, Liu L, Reyes R, Lin YT, Ko T, R'Bibo L, Ralvenius WT, Bennett DA, Cam HP, Kellis M, Tsai LH. APOE4 impairs myelination via cholesterol dysregulation in oligodendrocytes. *Nature.* 2022;611(7937):769-779. doi: 10.1038/s41586-022-05439-w.
- [35] Qin C, Wang K, Zhang L, Bai L. Stem cell therapy for Alzheimer's disease: An overview of experimental models and reality. *Animal Model Exp Med.* 2022;5(1):15-26. doi: 10.1002/ame2.12207.
- [36] Kim HJ, Cho KR, Jang H, Lee NK, Jung YH, Kim JP, Lee JI, Chang JW, Park S, Kim ST, Moon SW, Seo SW, Choi SJ, Na DL. Intracerebroventricular injection of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells in patients with Alzheimer's disease dementia: a phase I clinical trial. *Alzheimers Res Ther.* 2021 14;13(1):154. doi: 10.1186/s13195-021-00897-2.
- [37] Sivandzade F, Cucullo L. Regenerative Stem Cell Therapy for Neurodegenerative Diseases: An Overview. *Int J Mol Sci.* 2021 22;22(4):2153. doi: 10.3390/ijms22042153.
- [38] Yefroyev DA, Jin S. Induced Pluripotent Stem Cells for Treatment of Alzheimer's and Parkinson's Diseases. *Biomedicines.* 2022 19;10(2):208. doi: 10.3390/biomedicines10020208.
- [39] Zhao J, Zhang Z, Lai KC, Lai L. Administration of recombinant FOXN1 protein attenuates Alzheimer's pathology in mice. *Brain Behav Immun.* 2023; 113:341-352. doi: 10.1016/j.bbi.2023.07.027.
- [40] Myeong SH, Kim H, Lee NK, Hwang JW, Kim HJ, Jang H, Choi SJ, Na DL. Intracerebroventricular Administration of Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells Induces Transient Inflammation in a Transgenic Mouse Model and Patients with Alzheimer's Disease. *Biomedicines.* 2022 28;10(3):563. doi: 10.3390/biomedicines10030563.

- [41] Bose A, Petsko GA, Studer L. Induced pluripotent stem cells: a tool for modeling Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 2022;45(8):608-620. doi: 10.1016/j.tins.2022.05.001.
- [42] Oz T, Kaushik A, Kujawska M. Neural stem cells for Parkinson's disease management: Challenges, nanobased support, and prospects. *World J Stem Cells.* 2023 26;15(7):687-700. doi: 10.4252/wjsc.v15.i7.687.
- [43] Pinjala P, Tryphena KP, Prasad R, Khatri DK, Sun W, Singh SB, Gugulothu D, Srivastava S, Vora L. CRISPR/Cas9 assisted stem cell therapy in Parkinson's disease. *Biomater Res.* 2023 16;27(1):46. doi: 10.1186/s40824-023-00381-y.
- [44] Xiao Z, Lei T, Liu Y, Yang Y, Bi W, Du H. The potential therapy with dental tissue-derived mesenchymal stem cells in Parkinson's disease. *Stem Cell Res Ther.* 2021 6;12(1):5. doi: 10.1186/s13287-020-01957-4.
- [45] Stoddard-Bennett T, Pera RR. Stem cell therapy for Parkinson's disease: safety and modeling. *Neural Regen Res.* 2020;15(1):36-40. doi: 10.4103/1673-5374.264446.
- [46] Morizane A. Cell therapy for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells. *Inflamm Regen.* 2023 27;43(1):16. doi: 10.1186/s41232-023-00269-3.
- [47] Chen ZZ, Niu YY. Stem cell therapy for Parkinson's disease using non-human primate models. *Zool Res.* 2019 18;40(5):349-357. doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2019.053.
- [48] Andrzejewska A, Dabrowska S, Lukomska B, Janowski M. Mesenchymal Stem Cells for Neurological Disorders. *Adv Sci (Weinh).* 2021 24;8(7):2002944. doi: 10.1002/advs.202002944.
- [49] Unnisa A, Dua K, Kamal MA. Mechanism of Mesenchymal Stem Cells as a Multitarget Disease – Modifying Therapy for Parkinson's Disease. *Curr Neuropharmacol.* 2023;21(4):988-1000. doi: 10.2174/1570159X20666220327212414.
- [50] Shastry S, Hu J, Ying M, Mao X. Cell Therapy for Parkinson's Disease. *Pharmaceutics.* 2023 Nov 22;15(12):2656. doi: 10.3390/pharmaceutics15122656.
- [51] Lee EJ, Choi Y, Lee HJ, Hwang DW, Lee DS. Human neural stem cell-derived extracellular vesicles protect against Parkinson's disease pathologies. *J Nanobiotechnology.* 2022 25;20(1):198. doi: 10.1186/s12951-022-01356-2.

- [52] Boika A, Aleinikava N, Chyzhyk V, Zafranskaya M, Nizheharodava D, Ponomarev V. Mesenchymal stem cells in Parkinson's disease: Motor and nonmotor symptoms in the early posttransplant period. *Surg Neurol Int.* 2020 11; 11:380. doi: 10.25259/SNI_233_2020.
- [53] Vij R, Prossin A, Tripathy M, Kim H, Park H, Cheng T, Lotfi D, Chang D. Long-term, repeated doses of intravenous autologous mesenchymal stem cells for a patient with Parkinson's disease: a case report. *Front Neurol.* 2023 27; 14:1257080. doi: 10.3389/fneur.2023.1257080.
- [54] Roesch EA, Bonfield TL, Lazarus HM, Reese J, Hilliard K, Hilliard J, Khan U, Heltshe S, Gluvna A, Dasenbrook E, Caplan AI, Chmiel JF. A phase I study assessing the safety and tolerability of allogeneic mesenchymal stem cell infusion in adults with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2023;22(3):407-413. doi: 10.1016/j.jcf.2022.12.
- [55] Huang J, Yi L, Yang X, Zheng Q, Zhong J, Ye S, Li X, Li H, Chen D, Li C. Neural stem cells transplantation combined with ethyl stearate improve PD rats motor behavior by promoting NSCs migration and differentiation. *CNS Neurosci Ther.* 2023;29(6):1571-1584. doi: 10.1111/cns.14119.
- [56] Yi L, Ma H, Yang X, Zheng Q, Zhong J, Ye S, Li X, Chen D, Li H, Li C. Cotransplantation of NSCs and ethyl stearate promotes synaptic plasticity in PD rats by Drd1/ERK/AP-1 signaling pathway. *J Ethnopharmacol.* 2024 1; 321:117292. doi: 10.1016/j.jep.2023.117292.
- [57] Ye S, Zhong J, Huang J, Chen L, Yi L, Li X, Lv J, Miao J, Li H, Chen D, Li C. Protective effect of plastrum testudinis extract on dopaminergic neurons in a Parkinson's disease model through DNMT1 nuclear translocation and SNCA's methylation. *Biomed Pharmacother.* 2021; 141:111832. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111832.
- [58] Tabrizi SJ, Estevez-Fraga C, van Roon-Mom WMC, Flower MD, Scahill RI, Wild EJ, Muñoz-Sanjuán I, Sampaio C, Rosser AE, Leavitt BR. Potential disease-modifying therapies for Huntington's disease: lessons learned and future opportunities. *Lancet Neurol.* 2022;21(7):645-658. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00121-1.
- [59] Kim A, Lalonde K, Truesdell A, Gomes Welter P, Brocardo PS, Rosenstock TR, Gil-Mohapel J. New Avenues for the Treatment of Huntington's Disease. *Int J Mol Sci.* 2021 4;22(16):8363. doi: 10.3390/ijms22168363.
- [60] Conner LT, Srinageshwar B, Bakke JL, Dunbar GL, Rossignol J. Advances in stem cell and other therapies for Huntington's disease: An update. *Brain Res Bull.* 2023; 199:110673. doi: 10.1016/j.brainresbull.2023.110673.

- [61] Zimmermann T, Remmers F, Lutz B, Leschik J. ESC-Derived BDNF-Overexpressing Neural Progenitors Differentially Promote Recovery in Huntington's Disease Models by Enhanced Striatal Differentiation. *Stem Cell Reports*. 2016;11;7(4):693-706. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.08.018.
- [62] Alkanli SS, Alkanli N, Ay A, Albeniz I. CRISPR/Cas9 Mediated Therapeutic Approach in Huntington's Disease. *Mol Neurobiol*. 2023;60(3):1486-1498. doi: 10.1007/s12035-022-03150-5.
- [63] Cecerska-Heryć E, Pękała M, Serwin N, Gliźniewicz M, Grygorcewicz B, Michalczyk A, Heryć R, Budkowska M, Dołęgowska B. The Use of Stem Cells as a Potential Treatment Method for Selected Neurodegenerative Diseases: Review. *Cell Mol Neurobiol*. 2023;43(6):2643-2673. doi: 10.1007/s10571-023-01344-6.
- [64] Schellino R, Besusso D, Parolisi R, Gómez-González GB, Dallere S, Scaramuzza L, Ribodino M, Campus I, Conforti P, Parmar M, Boido M, Cattaneo E, Buffo A. hESC-derived striatal progenitors grafted into a Huntington's disease rat model support long-term functional motor recovery by differentiating, self-organizing and connecting into the lesioned striatum. *Stem Cell Res Ther*. 2023 28;14(1):189. doi: 10.1186/s13287-023-03422-4.
- [65] Holley SM, Reidling JC, Cepeda C, Wu J, Lim RG, Lau A, Moore C, Miramontes R, Fury B, Orellana I, Neel M, Coleal-Bergum D, Monuki ES, Bauer G, Meshul CK, Levine MS, Thompson LM. Transplanted human neural stem cells rescue phenotypes in zQ175 Huntington's disease mice and innervate the striatum. *Mol Ther*. 2023;6;31(12):3545-3563. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.10.003.
- [66] Besusso D, Schellino R, Boido M, Belloli S, Parolisi R, Conforti P, Faedo A, Cernigoj M, Campus I, Laporta A, Bocchi VD, Murtag V, Parmar M, Spaiardi P, Talpo F, Maniezzi C, Toselli MG, Biella G, Moresco RM, Vercelli A, Buffo A, Cattaneo E. Stem Cell-Derived Human Striatal Progenitors Innervate Striatal Targets and Alleviate Sensorimotor Deficit in a Rat Model of Huntington Disease. *Stem Cell Reports*. 2020 12;14(5):876-891. doi: 10.1016/j.stemcr.2020.03.018

- [67] Yu-Taeger L, Stricker-Shaver J, Arnold K, Bambynek-Dziuk P, Novati A, Singer E, Lourhmati A, Fabian C, Magg J, Riess O, Schwab M, Stolzing A, Danielyan L, Nguyen HHP. Intranasal Administration of Mesenchymal Stem Cells Ameliorates the Abnormal Dopamine Transmission System and Inflammatory Reaction in the R6/2 Mouse Model of Huntington Disease. *Cells*. 2019 15;8(6):595. doi: 10.3390/cells8060595.
- [68] Fatoba O, Kloster E, Reick C, Saft C, Gold R, Epplen JT, Arning L, Ellrichmann G. Activation of NPY-Y2 receptors ameliorates disease pathology in the R6/2 mouse and PC12 cell models of Huntington's disease. *Exp Neurol*. 2018; 302:112-128. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.01.001.
- [69] Losurdo M, Pedrazzoli M, D'Agostino C, Elia CA, Massenzio F, Lonati E, Mauri M, Rizzi L, Molteni L, Bresciani E, Dander E, D'Amico G, Bulbarelli A, Torsello A, Matteoli M, Buffelli M, Coco S. Intranasal delivery of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles exerts immunomodulatory and neuroprotective effects in a 3xTg model of Alzheimer's disease. *Stem Cells Transl Med*. 2020;9(9):1068-1084. doi: 10.1002/sctm.19-0327.
- [70] Yang X, Ji Y, Wang W, Zhang L, Chen Z, Yu M, Shen Y, Ding F, Gu X, Sun H. Amyotrophic Lateral Sclerosis: Molecular Mechanisms, Biomarkers, and Therapeutic Strategies. *Antioxidants (Basel)*. 2021 24;10(7):1012. doi: 10.3390/antiox10071012.
- [71] Najafi S, Najafi P, Kaffash Farkhad N, Hosseini Torshizi G, Assaran Darban R, Boroumand AR, Sahab-Negah S, Khodadoust MA, Tavakol-Afshari J. Mesenchymal stem cell therapy in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients: A comprehensive review of disease information and future perspectives. *Iran J Basic Med Sci*. 2023;26(8):872-881. doi: 10.22038/IJBMS.2023.66364.14572.
- [72] Lu L, Deng Y, Xu R. Current potential therapeutics of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Neurol*. 2024 24; 15:1402962. doi: 10.3389/fneur.2024.1402962.
- [73] Vasques JF, Teixeira Pinheiro LC, de Jesus Gonçalves RG, Mendez-Otero R, Gubert F. Cell-based Research and Therapy for Amyotrophic Lateral Sclerosis: Promises and Challenges. In: Araki T, editor. *Amyotrophic Lateral Sclerosis [Internet]*. Brisbane (AU): Exon Publications; 2021 25. Chapter 7.
- [74] Du H, Huo Z, Chen Y, Zhao Z, Meng F, Wang X, Liu S, Zhang H, Zhou F, Liu J, Zhang L, Zhou S, Guan Y, Wang X. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Applications in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Cells*. 2023 22;12(6):971. doi: 10.3390/cells12060971.

- [75] Wang J, Zuzzio K, Walker CL. Systemic Dental Pulp Stem Cell Secretome Therapy in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Sci.* 2019 14;9(7):165. doi: 10.3390/brainsci9070165.
- [76] Gancheva MR, Kremer KL, Gronthos S, Koblar SA. Using Dental Pulp Stem Cells for Stroke Therapy. *Front Neurol.* 2019; 29; 10:422. doi: 10.3389/fneur.2019.00422.
- [77] Wang J, Zuzzio K, Walker CL. Systemic Dental Pulp Stem Cell Secretome Therapy in a Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Brain Sci.* 2019 14;9(7):165. doi: 10.3390/brainsci9070165.
- [78] Younes R, Issa Y, Jdaa N, Chouaib B, Brugiotti V, Challuau D, Raoul C, Scamps F, Cuisinier F, Hilaire C. The Secretome of Human Dental Pulp Stem Cells and Its Components GDF15 and HB-EGF Protect Amyotrophic Lateral Sclerosis Motoneurons against Death. *Biomedicines.* 2023;30;11(8):2152. doi: 10.3390/biomedicines11082152
- [79] Liu WC, Liu N, Wang Y, Huang C, Li YF, Wang H, Li XG, Deng M. Induced pluripotent stem cell-derived motor neurons from amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients carrying different superoxide dismutase 1 mutations recapitulate pathological features of ALS. *Chin Med J (Engl).* 2021 6;134(20):2457-2464. doi: 10.1097/CM9.0000000000001693.
- [80] Dash BP, Freischmidt A, Weishaupt JH, Hermann A. Downstream Effects of Mutations in SOD1 and TARDBP Converge on Gene Expression Impairment in Patient-Derived Motor Neurons. *Int J Mol Sci.* 2022 25;23(17):9652. doi: 10.3390/ijms23179652.