

Abstrakt

Deficience limbálních kmenových buněk je onemocnění způsobené poškozením limbálních epiteliálních kmenových buněk (LESC), které vede k přerůstání průhledné rohovky netransparentní spojivkou a ztrátě zraku. Léčba není standardně dostupná. Tato práce se věnuje přípravě buněk pro léčbu jedno- i oboustranné formy deficience pomocí moderní buněčné terapie. Zkoumá růst LESC na různých substrátech (fibrin, nanovlákná), dále buňky epitelu bukální sliznice (OMEC), kultivované ve standardním komplexním médiu i v podmínkách bez xenobiotik. K detekci markerů kmenových buněk, stanovení proliferační a diferenciací kapacity kultivovaných buněk byla použita imunocytochemie a genová exprese. Kromě toho byl hodnocen vliv dlouhodobého skladování OMEC v médiích s různými kryoprotektivními látkami. Součástí teze bylo i hodnocení hojivých vlastností amniové membrány (AM).

Zjistili jsme, že přidání interleukinu-13 do kultivačního média zvýšilo kmenovost LESC. LESC pěstované na fibrinu více exprimovaly márkry kmenovosti, buňky na nanovlákných polymerech exprimovaly více márkrů mezenchymálních. Na fibrinu se nám kultivací ve standardním komplexním médiu, ale i v prostředí bez cizorodých látek (xeno-free) podařilo připravit kultury OMEC. Buňky vykazovaly vysokou expresi kmenových márkrů (*ANp63α*, *NGFR*, *KLF4*) a sníženou diferenciaci do fenotypu epitelu bukální sliznice (nižší exprese *KRT13*). Keratiny typické pro bazální vrstvou a progenitorové buňky (*KRT14*, *KRT15*, *KRT17*, *KRT19*), byly exprimovány v obou podmínkách. Buňky v komplexním médiu rostly rychleji (upregulace *MKI67*). Tyto buňky také dosáhly ve srovnání s buňkami kultivovanými v xeno-free médiu rychleji 100% konfluenci. OMEC vytvořily souvislou vrstvu buněk i po kryokonzervaci. Lepší výsledky (konfluence, viability) byly pozorovány u OMEC skladovaných v komplexním médiu bez kryoprotektiv, nebo v komplexním médiu s 5% glycerolem ve srovnání s komplexním médiem s 10% glycerolem nebo 10% dimethylsulfoxidem, zejména pokud byly mrazeny po první pasáži. Prokázali jsme, že kryokonzervovaná AM je bezpečná a účinná v léčbě dlouhodobě se nehojících ran, že má silný analgetický účinek, a že mezi AM štěpy není patrný rozdíl v intenzitě hojení.

Závěrem: připravili jsme postupy pro kultivaci limbálních buněk a epitelových buněk ústní sliznice. Kultivace lze nyní přenést do podmínek čistých prostor tkáňové banky k ověření, a protokoly předat Státnímu ústavu pro kontrolu léčiv ke schválení klinického hodnocení.

Klíčová slova: deficience limbálních kmenových buněk, kmenové buňky, povrch oka, bukální sliznice, kultivace buněk, amniová membrána, transplantace.