

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Kristýna Krňanská

Možnosti léčby Parkinsonovy choroby kmenovými buňkami
Possibilities of treatment of Parkinson's disease with stem cells

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lucie Hejnová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení:

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

V Praze, 30.7.2024

.....

Kristýna Krňanská

Poděkování

Můj největší dík patří vedoucí mé závěrečné práce RNDr. Lucii Hejnové, PhD. za obrovskou trpělivost, ochotu a veškeré rady. Zároveň bych chtěla poděkovat své rodině a nejbližším za podporu.

Abstrakt

Parkinsonova choroba je druhé nejčastější neurodegenerativní onemocnění postihující čím dál tím více lidí. Projevuje se nejenom kognitivními problémy, ale především i motorickými symptomy, které silně ovlivňují kvalitu života nemocných. Příčin této choroby může být několik. Současná léčba je pouze symptomatická a je provázena nežádoucími účinky. Jedním z moderních přístupů terapie Parkinsonovy choroby je transplantace kmenových buněk za účelem nahrazení postižených neuronů nebo alespoň zpomalení jejich odumírání. Tato bakalářská práce popisuje různé možnosti využití kmenových buněk k léčbě, používané zdroje těchto buněk a jejich případné modifikace v modelových i klinických studiích.

Klíčová slova: Parkinsonova choroba, léčba, kmenové buňky, dopaminergní neurony, mezenchymální kmenové buňky, pluripotentní buňky, neurální progenitory

Abstract

Parkinson's disease is the second most common neurodegenerative disorder affecting more and more people. It manifests itself not only by cognitive problems but primarily by motor symptoms which influence the patient's quality of life. There are many causes of this disease. Current treatment is only symptomatic and is influenced by side effects. One of the modern approaches of therapy is stem cell transplantation in order to replace the affected neurons or at least slow down their dying. This bachelor's thesis describes different possibilities of stem cell use for therapy, the used sources of these cells and their possible modifications in model and clinical studies.

Key words: Parkinson's disease, treatment, stem cells, dopaminergic neurons, mesenchymal stem cells, pluripotent cells, neural progenitor cells

Seznam použitých zkratk

6-OHDA	6-hydroxydopamin
AD-MSC	mezenchymální kmenové buňky odvozené od tukové tkáně
BDNF	mozkový neurotrofický faktor
BM-MSC	mezenchymální kmenové buňky odvozené od kostní dřevě
CDNF	mozkový dopaminový neurotrofický faktor
COMT	katechol-O-methyltransferáza
CORIN	atriální natriuretický peptid-konvertující enzym
DBS	hluboká mozková stimulace
DR2	dopaminový receptor 2
EN1	protein engrailed 1
ESC	embryonální kmenové buňky
FGF-20	fibroblastový růstový faktor 20
FOXA2	forkhead box protein A2
GDNF	neurotrofický faktor odvozený od gliových buněk
GFAP	gliální fibrilární kyselý protein
HLA	human leukocyte antigen, lidský hlavní histokompatibilitní komplex
iPSC	indukované pluripotentní kmenové buňky
L-DOPA	levodopa
LIM	proteinová doména obsahující 2 zinkové prsty
LMX1A	LIM homeobox transkripční faktor 1
LTP	dlouhodobá potenciace
MAO-B	monoaminoxidáza B
MAP2	protein asociovaný s mikrotubuly 2
MG-132	inhibitor proteasomu
MPTP	4-fenyl-1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

MSC	mezenchymální kmenové buňky
NDF	neurální diferenciační médium
Nestin	protein neuroepiteliálních kmenových buněk
NeuN	neuronal nuclei, protein typický pro jádra neuronů
NGF	nervový růstový faktor
NPC	neurální progenitorové buňky
NuMa	protein jaderného mitotického aparátu
OCT4	oktamerní transkripční faktor 4
OTX2	orthodenticle homeobox protein 2
Pax6	paired box protein 6
PD	Parkinsonova choroba
PDG-39	dotazník mapující zdravotní status pacienta s Parkinsonovou chorobou
PET	pozitronová emisní tomografie
ROS	reaktivní formy kyslíku
SHH	Sonic hedgehog
SOX2	box 2 v oblasti Y rozhodující o pohlaví
SVF	stromální vaskulární frakce
TGF-β	transformující růstový faktor β
TH	tyrozin hydroxyláza
Tuj-1	beta-tubulin III. třídy
UC-MSC	mezenchymální kmenové buňky odvozené od pupečnickové šňůry
UPDRS	Unified Parkinson's disease rating scale
WHO	světová zdravotnická organizace

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Parkinsonova choroba	2
2.1	Definice onemocnění	2
2.1.1	α -synuclein.....	2
2.1.2	Neurozánět.....	3
2.1.3	Mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres.....	3
2.1.4	Modely PD.....	3
2.2	Léčba.....	3
2.2.1	Farmakologická terapie	3
2.2.2	Neurochirurgická léčba.....	5
2.2.3	Moderní přístupy	5
3	Kmenové buňky	6
3.1	Definice.....	6
3.2	Klasifikace	6
4	Využití kmenových buněk v terapii PD.....	6
4.1	Počátky buněčné terapie.....	6
4.2	Mezenchymální kmenové buňky	7
4.2.1	Kostní dřev	8
4.2.1.1	Modifikované BM-MSc v modelech PD	8
4.2.1.2	Naivní BM-MSc v modelech PD.....	9
4.2.1.3	Klinické studie BM-MSc	10
4.2.2	Tuková tkáň	11
4.2.2.1	Modifikované AD-MSc v modelech PD.....	11
4.2.2.2	Naivní AD-MSc v modelech PD.....	12
4.2.2.3	Klinické studie AD-MSc.....	12
4.2.3	Pupeční šňůra.....	12
4.2.3.1	Naivní UC-MSc	13
4.2.3.2	MSc v kombinaci s levodopou.....	13
4.2.3.3	Použití exosomů.....	14
4.2.3.4	Modifikace UC-MSc.....	14
4.3	Embryonální kmenové buňky	14
4.3.1	Diferenciace.....	14
4.3.2	ESC v modelech PD	15
4.4	Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	16
4.4.1	Indukce a diferenciace	16
4.4.2	Lidské studie s iPSC.....	16

4.5	Neurální progenitorové buňky	17
4.5.1	NPC z dospělé tkáně.....	17
4.5.2	Použití sekretomu	17
4.6	Retinální pigmentový epitel	18
4.6.1	Model PD.....	18
4.6.2	Klinické studie.....	18
5	Závěr.....	19
6	Seznam použité literatury.....	20

1 Úvod

Parkinsonova choroba (Parkinson's disease, PD) je po Alzheimerově chorobě druhé nejčastěji se vyskytující neurodegenerativní onemocnění, které bylo popsáno již v roce 1817 lékařem Jamesem Parkinsonem. Tato nemoc postihuje 1 % populace nad 60 let. Prevalence Parkinsonovy choroby se podle Světové zdravotnické organizace (WHO) v průběhu let stále zvyšuje, v roce 2019 bylo zaznamenáno více než 8,5 miliónů případů po celém světě. Z uvedených údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR vyplývá, že v České republice bylo za rok 2022 evidováno celkem přes 18 tisíc pacientů s PD ve věku nad 65 let.

Parkinsonova choroba je chronické onemocnění projevující se mnoha symptomy. Mezi symptomy patří jak motorické, tak nemotorické potíže. Motorické projevy jsou především bradykineze, třes, ztuhlost a zpomalení pohybů, nemotorické zahrnují mentální poruchy jako úzkosti či deprese, bolesti, problémy se spánkem, paměť a myšlením. K měření závažnosti symptomů a progresu PD se od roku 1987 používá stupnice Unified Parkinson's disease rating scale (UPDRS). Tato stupnice má 4 jednotlivě měřené části zahrnující motorické i mentální potíže. Nemotorické symptomy lze dodatečně měřit mnoha dalšími testy, včetně kvality života.

Příčiny PD mohou být geneticky podmíněné i nepodmíněné, kdy hraje roli životní styl a prostředí, ve kterém člověk žije. Největším rizikovým faktorem pro výskyt choroby je především věk, riziko roste u pacientů nad 65 let. Zároveň bývají častěji postiženi muži než ženy, poměr nemocných mužů vůči nemocným ženám se pohybuje od 1,5 až nad 2. Tento poměr se s věkem v populaci zvyšuje (Willis et al., 2022).

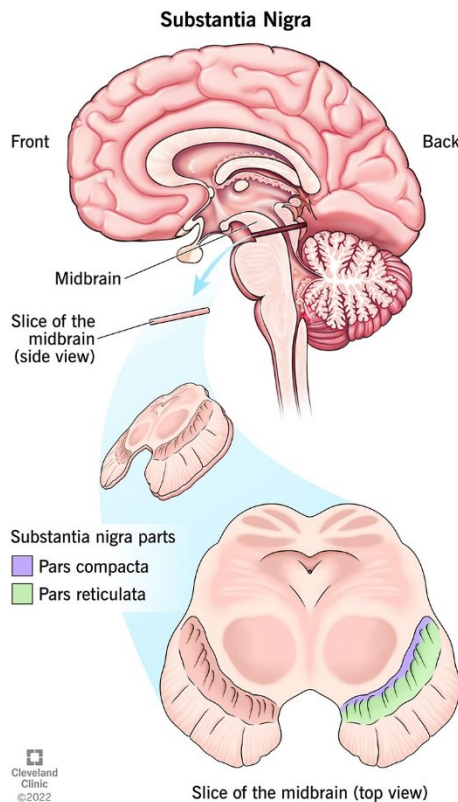
Momentální dostupná léčba PD je pouze symptomatická, zaměřuje se pouze na ulevění od potíží spojených s PD. Jako základ pro léčbu motorických symptomů se používá léčivo levodopa, často kombinované s dalšími léky majícími efekt na pohybové potíže, které většinou snižují nežádoucí projevy levodopy (dyskineze). Zároveň může být léčba doplněna o léky na mentální poruchy, jako antidepresiva apod., rehabilitacemi, cvičením a terapiemi.

V současné době se zkoumané moderní přístupy snaží nalézt způsob, jak léčit příčiny Parkinsonovy choroby, nebo alespoň zastavit či zpomalit progresi onemocnění. Jedním z těchto přístupů je terapie pomocí kmenových buněk, které by mohly nahradit postižené neurony, nebo svým působením ovlivnit přežití neuronů. Cílem této práce je shrnout možnosti použití kmenových buněk při léčbě Parkinsonova onemocnění. Práce bude zaměřena na to, jak kmenové buňky použít, nebo které typy kmenových buněk k terapii vybrat, kdy každá možnost má jiné vlastnosti, výhody, nevýhody nebo omezení.

2 Parkinsonova choroba

2.1 Definice onemocnění

PD je charakteristická specifickou degenerací a ztrátou dopaminergních neuronů ve středním mozku, v části zvané *substantia nigra pars compacta* (obr.1). Tato oblast je součástí bazálních ganglií, její funkcí je produkce neurotransmiteru dopaminu, který ovlivňuje *corpus striatum*, a tvoří tak nigrostriatální systém důležitý pro pohyb.



Obrázek 1: Lokalizace substantia nigra

Substantia nigra je součástí středního mozku. Dopaminergní neurony obsahuje její část – pars compacta. Převzato z CLEVELAND CLINIC, 2022

2.1.1 α -synuclein

Typickým znakem PD je výskyt Lewyho tělísek v postižených neuronech. Jedná se o agregáty proteinů, především α -synucleinu (Baba et al., 1998), který se běžně vyskytuje v presynaptické oblasti. Fyziologická funkce monomerů tohoto proteinu spočívá v kontrole exocytózy presynaptických váčků obsahující neurotransmitter interakcí se SNARE komplexem (Burré et al., 2010), a také v kontrole endocytózy interakcí s klathrinem (Calabresi et al., 2023). Pokud je exprese genu pro α -synuclein deregulována (produkce proteinu se navýší), zvyšuje se tím riziko vzniku PD (Soldner et al., 2016). Overexprese tohoto proteinu narušuje tvorbu signálů, dostupnost dopaminových receptorů 2 (DR2) a vylévání dopaminu do synaptické štěrby (Lin et al., 2020). Zároveň je prokázána i souvislost střevní mikrobioty s PD. Konkrétní mikrobiota je schopna ovlivnit vznik α -synucleinové patologie,

transplantovaný mikrobiom od pacienta s Parkinsonovou chorobou zhoršuje motorické funkce myši více, než od zdravého dárce (Sampson et al., 2016).

2.1.2 Neurozánět

Mezi další procesy ovlivňující progresi PD patří dlouhodobý chronický neurozánět vyskytující se již v časných stádiích nemoci, který způsobuje poškození a degradaci neuronů (Yacoubian et al., 2023). Neurozánět v postižených oblastech mozku je způsoben aktivovanými mikroglie, které produkují prozánětlivé cytokiny a aktivují tak další složky imunity. Zároveň byla potvrzena infiltrace *substantia nigra* CD4+ a CD8+ T buňkami ve zvířecím modelu PD, modely s deficitem CD4+ T buněk zaznamenaly sníženou ztrátu neuronů po navození PD patologie (Brochard et al., 2009). Neurozánět také souvisí s dalšími patologickými procesy jako jsou mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres.

2.1.3 Mitochondriální dysfunkce a oxidativní stres

Mitochondriální dysfunkce, především komplexu I elektrontransportního řetězce (Janetzky et al., 1994), snižuje syntézu adenosintrifosfátu a zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují s tím spojený oxidativní stres (Hsu et al., 2000). Tyto faktory mohou zase zpětně aktivovat nebo podporovat imunitní reakce.

2.1.4 Modely PD

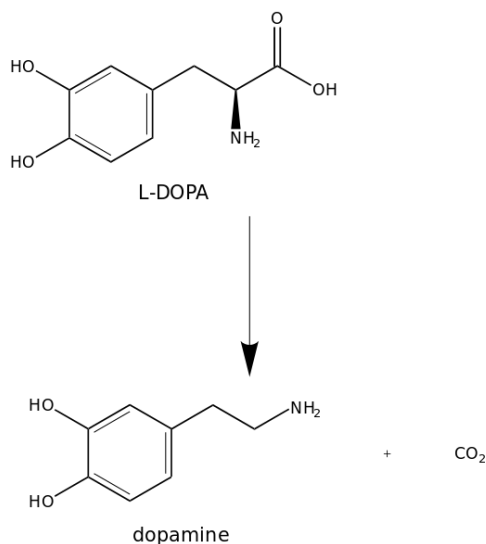
Mezi nejčastěji používané zvířecí modely PD patří myši nebo potkani, popřípadě opice, kdy patologie je navozena především látkami 4-fenyl-1-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) nebo 6-hydroxydopaminem (6-OHDA). Organická sloučenina MPTP po vniknutí do mozku působí jako neurotoxin, který selektivně poškozuje komplex I dopaminergních neuronů v *substantia nigra*. Způsobuje tak motorické i nemotorické projevy PD (Choudhury & Daadi, 2018). Sloučenina 6-OHDA po vstupu do neuronů podporuje tvorbu ROS, oxidativního stresu a apoptózy, a ničí tak dopaminergní neurony ve striatu (Chi et al., 2019).

2.2 Léčba

V současné době neexistuje používaná léčba, která by dokázala Parkinsonovu chorobu vyléčit. Veškerá terapie se zaměřuje na potlačování symptomů, a to jak motorických, tak nemotorických.

2.2.1 Farmakologická terapie

Levodopa je standardně používaný lék ke snížení bradykinetických symptomů PD (Cilia et al., 2020). Jedná se o prekurzor dopaminu, který může přecházet přes hematoencefalickou bariéru, a doplňovat tak chybějící dopamin v mozku. Na dopamin je levodopa přeměňována enzymem DOPA-dekarboxylázou (obr.2).



Obrázek 2: Reakce přeměny levodopy na dopamin
Přeměna levodopy (L-DOPA) na dopamin je zprostředkována enzymem DOPA-dekarboxylázou. Převzato z MYS 721TX, 2013

Jelikož se tento prekurzor může přeměnit na dopamin již v periférii a ztratit tak schopnost přejít přes hematoencefalickou bariéru do místa určení, je s levodopou podávána další chemická látka karbidopa. Ta působí jako inhibitor periferní DOPA-dekarboxylázy, zvyšuje tak biologickou dostupnost levodopy a také snižuje výskyt vedlejších účinků, např. zlepšení off stavů, nebo nevolnost (Trenkwalder et al., 2019). On stavy nastupují v době po podání léku, kdy léčivo poskytuje žádoucí účinek, zatímco off stavy nastávají po několika hodinách a jsou typické zhoršenými symptomy. Dalším nežádoucím účinkem dlouhodobého užívání levodopy může být snižování účinnosti nebo dyskinezy, což jsou mimovolné záškuby, které se časem zhoršují (Wu et al., 2019). U pokročilých stádií PD nemusí být orální podávání levodopy dostačující kvůli zhoršujícím se vedlejším účinkům. Tento problém lze vyřešit kontinuálním podáváním léčivé látky pomocí intestinálního gelu, ten umožní stálou hladinu levodopy v plazmě a vede ke zlepšení dyskinezi (Olanow et al., 2014).

Agonisté dopaminu jsou další možností terapie PD, jedná se o chemické látky, které mimikují funkci dopaminu jako neurotransmiteru, váží se především na DR2 receptory a tím je aktivují. Při jejich samostatném užívání mají menší výskyt vedlejších účinků než levodopa, delší poločas, ale nižší účinnost, proto se nejčastěji podávají společně s levodopou za účelem snížení jejich nežádoucích účinků (Cacareni & Musicco, 2001). Dopaminové agonisty dělíme na ergolinové a non-ergolinové. Agonisty s ergolinovou strukturou se ovšem v klinické praxi nepoužívají z důvodu vyvolávání zdravotních potíží srdečních chlopní (Peralta et al., 2006).

Další léky používané pro léčbu Parkinsonovy choroby jsou inhibitory enzymu monoaminoxidázy B (MAO-B). Tento enzym se nachází ve vnější mitochondriální membráně a jeho funkcí je degradace dopaminu vychytávaného ze synaptické štěrby. Když dojde k její inhibici, zvýší

se množství dopaminu na synapsi. Tyto látky se dají používat v rané fázi choroby, nebo v pozdější fázi společně s levodopou a napomáhají zmírňovat motorické symptomy (Rascol et al., 2005).

Inhibitory katechol-O-methyltransferázy (COMT) jsou další možností doplňující léčby k levodopě. COMT je enzym degradující katecholaminy, tedy i levodopu a snižuje tak její dostupnost pro přechod přes hematoencefalickou bariéru do mozku (Fabbri et al. 2022). Inhibice tohoto enzymu tedy prodlužuje životnost levodopy v periférii, zkracuje off periody, zlepšuje motorické problémy a snižuje potřebnou dávku levodopy (Ferreira et al., 2016).

Amantadin je léčivo původně používané proti chřipkovému onemocnění, ale je účinné i při terapii Parkinsonovy choroby. Jedná se o antagonistu N-methyl-D-aspartátových receptorů, který zvyšuje extracelulární hladinu dopaminu v mozku (Mizoguchi et al., 1994). Pomáhá tak zmírňovat dyskineze vyvolané užíváním levodopy (Wolf et al., 2010).

Anticholinergika jsou látky, které blokují aktivitu neurotransmiteru acetylcholinu a tím napravují nerovnováhu hladin s dopaminem. Jedná se o první léčiva používaná k terapii PD, v dnešní době se ovšem od nich upouští z důvodu výskytu četných nežádoucích účinků ovlivňujících motorické i kognitivní funkce pacientů (Saeedi et al., 2021).

2.2.2 Neurochirurgická léčba

Chirurgickou možností terapie pokročilé PD, především pohybových symptomů, je hluboká mozková stimulace (deep brain stimulation, DBS). Tento zákrok spočívá v zavedení sond do mozku napojených na neurostimulátor. Tento stimulátor poté vysílá slabé elektrické impulzy a stimuluje tak danou část mozku, která je centrem pro řízení hybnosti. Nejčastější cílové oblasti mozku pro neurostimulaci jsou subthalamické jádro vedle *substantia nigra* a *globus pallidus medialis* (Reddy et al., 2019). Tato terapie je nejvhodnější pro pacienty spíše nižšího věku, bez kognitivních poruch, kteří reagují na dopaminovou léčbu, ale mají zhoršené vedlejší symptomy (Moro et al., 2016)

2.2.3 Moderní přístupy

Imunoterapie jako moderní přístup terapie PD spočívá v aplikaci monoklonálních protilátek, které se navazují na extracelulární agregující α -synuclein. U tohoto proteinu bylo prokázáno jeho šíření z buňky na buňku, a tudíž i progresi této patologie spojené s PD (Desplats et al., 2009). Protilátky proti α -synucleinu snižují jeho agregaci, způsobují tak zlepšení neurodegenerativní patologie a mají neuroprotektivní účinek v myších modelech (Masliah et al., 2005). Nedávné studie prováděné na pacientech s PD bohužel neprokázaly dlouhodobější účinky a progresse choroby byla srovnatelná jako při použití placebo (Lang et al., 2022).

Přístupy k léčbě PD genovou terapií se dají rozdělit na 2 typy s odlišnými cíli. Prvním typem jsou nemoc nemodifikující a druhým nemoc modifikující cíle. Cílem prvního typu jsou enzymy

podílející se především na syntéze dopaminu / přeměně levodopy v dopamin – dekarboxyláza aromatických L-aminokyselin, tyrozin hydroxyláza (TH), a guanosintrofosfát cyklohydroláza, jejichž exprese se zvýší zavedením genů virovými vektory do příslušné části mozku (Palfi et al., 2014). Nemoc modifikující cíle mají za úkol ovlivnit progresi samotné PD, tedy snížit ztrátu buněk nebo podpořit jejich regeneraci (Dumbhare et al. 2023). Příkladem zaváděného genu může být gen pro neurotrofický faktor odvozený od gliových buněk (GDNF), který podporuje růst a přežití neuronů (Kells et al., 2010).

Díky selektivní degeneraci dopaminergních neuronů při PD se nabízí jako další možnost léčby buněčná terapie, tedy transplantace tkání nebo kmenových buněk, které zpomalí degeneraci postižených neuronů nebo je nahradí (Fričová et al. 2020). Možnostmi využití různých druhů kmenových buněk jako léčby PD se budou zabývat následující části této práce.

3 Kmenové buňky

3.1 Definice

Kmenové buňky jsou charakterizovány především 2 vlastnostmi: schopností obnovovat sebe sama a diferencovat se v různé buněčné linie. Klasifikovat je můžeme na základě počtu linií, ve které mohou diferencovat, tedy podle jejich potence. Tyto typy buněk se postupně během vývoje mění v ty s nižší potencí (Singh et al., 2016).

3.2 Klasifikace

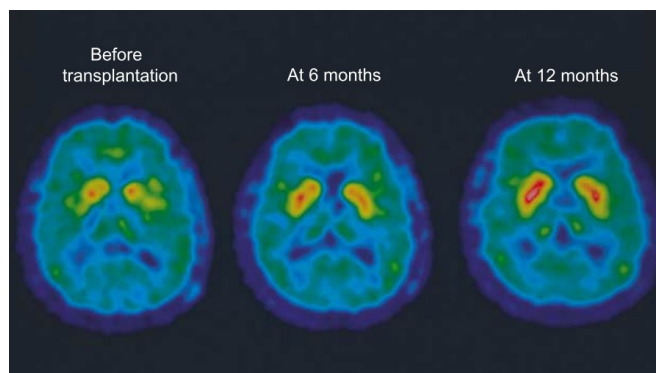
Největší potenciál mají buňky totipotentní, které vznikají ze zygoty a jsou schopné dát vznik veškerým embryonálním a neembryonálním buňkám, tedy i celému organismu. O stupeň níže jsou buňky pluripotentní, které mají potenciál generovat veškeré buněčné typy v organismu, tedy diferencovat se ve všechny 3 zárodečné listy. Multipotentní kmenové buňky mají svůj diferenciační potenciál omezený jen na buňky typické pro jednu konkrétní tkáň. Příkladem mohou být hematopoetické buňky, které se podílejí na krvevorbě generováním krevních buněk (červených i bílých krvinek a krevních destiček). Takto potentní typ lze nalézt na několika místech i v dospělém jedinci. Poslední možnou potencí je unipotence, tedy schopnost diferencovat se pouze v jeden buněčný typ (Singh et al., 2016).

4 Využití kmenových buněk v terapii PD

4.1 Počátky buněčné terapie

První pokusy o transplantaci buněk za účelem léčby PD byly provedeny již před několika desetiletími, a to za použití fetální tkáně jako zdroje. Transplantace fetální tkáně středního mozku (6,5 až 9 týdnů staré) do putamenu pacienta s Parkinsonovou chorobou prokázala zlepšení motorických symptomů při každodenních aktivitách i zlepšení off stavů. Neuropatologická vyšetření potvrdila

dlouhodobé přežití transplantovaných buněk (18 měsíců), jejich normální morfologii, striatální reinervaci a znatelný růst neuritů. Pozitronová emisní tomografie (PET) zaznamenala zvýšené vstřebávání fluorodopy v putamenu (obr.3). Jiné studie ovšem takto úspěšné výsledky nezaznamenaly, jelikož se zdá, že záleží mimo jiné na stáří plodu, ze kterého jsou buňky použity (z důvodu stupně vývoje mozkové tkáně), a kvalitě uchovávání (Kordower et al., 1995).



Obrázek 3: PET sken zobrazující zvýšené vstřebávání fluorodopy.

PET skeny zobrazují vstřebávání fluorodopy v putamenu pacienta s PD před, 6 měsíců a 12 měsíců po transplantaci fetální tkáně. Převzato z Kordower et al., 1995

Přestože výsledky na zvířecích modelech byly vesměs pozitivní, klinické studie ovšem měly závěry různorodé, nejednoznačné a potýkající se s různými komplikacemi, jako imunitní reakce na transplantát, nezaznamenaná zlepšení či etické problémy (Fričová et al. 2020). Některé studie hlásily i zhoršení některých symptomů, např. dyskineze, a samy nedoporučovaly použití fetální tkáně k transplantaci a léčbě PD (Olanow et al., 2003). Od té doby jsou cílem studií především jiné druhy kmenových buněk a jejich zdrojů, které jsou popsány v následujících kapitolách.

Níže popsané přístupy se liší původem transplantátu – při alogenní transplantaci pocházejí buňky z jiné osoby (od dárce) a v případě autologní jsou použité buňky odebrány přímo z nemocného pacienta. Zároveň existuje několik způsobů vnesení transplantovaných buněk do pacienta, např. intravenózní či intranasální injekce, nebo operační transplantace přímo do mozkové tkáně.

4.2 Mezenchymální kmenové buňky

Prvním typem buněk používaných pro transplantaci jsou mezenchymální kmenové buňky (mesenchymal stem cells, MSC). V těle je lze nalézt na mnoha místech, zde jsou zmíněna tři nejčastěji používaná, a to buňky izolované z kostní dřeně, tukové tkáně a pupeční šňůry. MSC jsou charakterizovány jako buňky mající adhezenci k plastu, exprimující specifické povrchové antigeny (+CD105, +CD73, +CD90, -CD45, -CD34, ...) a schopné *in vitro* diferencovat v osteoblasty, adipocyty a chondroblasty (Dominici et al., 2006). Výhodnou vlastností podporující využití MSC k transplantacím jsou jejich imunomodulační schopnosti, jako je inhibice proinflamačních cytokinů (Aggarwal & Pittenger, 2005), snížení aktivity mikroglie, ochrana neuronů produkcí transformujícího růstového

faktoru β (TGF- β), nebo zpomalení neurodegenerace (Chao et al., 2009). Stejně tak nemají tumorogenní potenciál a jejich používání neprovází etické problémy.

4.2.1 Kostní dřeň

První možností původu použitých buněk jsou MSC získané z kostní dřene (BM-MS). Níže popsané studie různě modifikovaly MSC před transplantací, aby podpořily jejich terapeutický účinek.

4.2.1.1 Modifikované BM-MS v modelech PD

Mezenchymální kmenové buňky z kostní dřene lidí byly pomocí virového vektoru geneticky upraveny tak, aby produkovaly GDNF. Potkaní model PD byl navozen neurotoxinem 6-OHDA injikovaným do striata, kde jeho podání vytvořilo lézi. Efekt transplantace modifikovaných MSC do striata na zlepšení stavu potkanů po vyvolání léze byl měřen jednak behaviorálním testem stanovením počtu rotací potkana navozených amfetaminem a také imunohistochemicky sledováním obnovy dopaminergních axonů v místě transplantace MSC. Zlepšení v pohybových testech nastalo jen u potkanů s MSC produkujícími GDNF, u potkanů s netransdukovanými MSC se tak nestalo. Stejně tak hustota axonů dopaminergních neuronů se po 5 týdnech zvýšila u GDNF-MS, ale ne u kontrol. Nicméně zároveň byla pozorována nízká schopnost přežití transplantovaných buněk, jako možný důvod byl uveden alogenní původ transplantátu (Glavaski-Joksimovic et al., 2010).

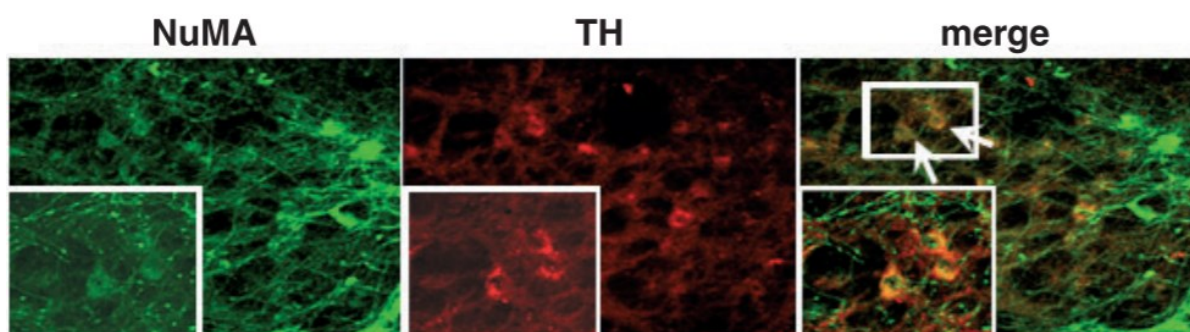
Následující studie zkoumala efektivitu tří různých způsobů transplantace MSC taktéž v potkaním 6-OHDA modelu PD. Buňky byly geneticky upraveny, aby exprimovaly mozkový dopaminový neurotrofický faktor (CDNF), a byly jednorázově zavedeny potkanům těmito třemi způsoby: intravenózně, intrastriálně a do laterální mozkové komory. Potkani byli testováni po dobu 6 týdnů od transplantace opět stanovením počtu rotací navozených amfetaminem a počtu dopaminergních neuronů v *substantia nigra* pozitivních na TH. Intravenózně transplantovaní potkani neprokazovali žádné statisticky významné zlepšení oproti kontrolám ani v jednom z testů, jako nejúčinnější se ukázala injekce MSC do striatu. Sami autoři navrhli, že důvodem nedostatečného účinku intravenózního podání mohl být příliš nízký počet použitých buněk (Jiaming & Niu, 2014).

Další možností úpravy MSC před transplantací je jejich priming. Kyselinu močovou jako silný antioxidant lze k tomuto primingu použít, v naivních MSC navozuje vyšší hladinu glykolýzy, podporuje jejich sebeobnovovací schopnost, ale nezpůsobuje diferenciaci, zvyšuje expresi transkripčních faktorů regulujících vlastnosti kmenových buněk, jako jsou Nanog, oktamerní transkripční faktor 4 (OCT4) a (oblast Y rozhodující o pohlaví)-box 2 (SOX2), inhibuje apoptotické signální dráhy, a takto ošetřené buňky mají poté neuroprotektivní účinky. MPTP myší modely s intravenózně podanými MSC pěstovanými s kyselinou močovou zaznamenaly na rozdíl od modelů s MSC bez primingu vyšší výskyt TH-pozitivních neuronů, významnější neuroprotektivní účinky (naměřené podle snížení hladiny štěpené

kaspázy 3), snížení proinflamačních cytokinů a nejvýraznější zlepšení motorické koordinace na rotarodu (Kim et al., 2021).

4.2.1.2 Naivní BM-MSc v modelech PD

Na rozdíl od předchozích tvrzení následující studie prokázala vcelku velký účinek nijak upravených a intravenózně podaných MSC z kostní dřeně. Byl použit potkaní model PD vyvolaný subkutánním podáním inhibitoru proteasomu (MG-132) v šesti dávkách po dobu 2 týdnů. Po třech týdnech po ukončení podávání MG-132 byly aplikovány lidské MSC 1x týdně po dobu 3 týdnů do ocasní žíly. Imunohistochemická analýza mozku prokázala, že zaléčení MSC způsobilo 50% nárůst přežití neuronů v *substantia nigra* pozitivních na TH oproti kontrolám, navýšení hladiny dopaminu, a zároveň snížení mikroglialního markeru signalizujícího jejich aktivaci. Použité buňky byly po transplantaci identifikovány pomocí barvení proteinu jaderného mitotického aparátu (NuMA) specifického pro lidské buňky (obr. 4), a bylo zjištěno, že na místě určení přežilo asi 1,7 % celkového injikovaného počtu. Zároveň byly tyto buňky testovány použitím protilátky proti TH, které dokázaly, že 36 % přeživších MSC mělo fenotyp TH-pozitivních neuronů. Výsledky testů chování taktéž prokazovaly zlepšení po dobu 10 týdnů, jednalo se však o jiný princip testování než výše uvedené studie, který se obtížně porovnává s jinými studiemi (Park et al., 2008).



Obrázek 4: Imunofluorescenční barvení buněk v substantia nigra
MSC buňky byly označeny NuMA barvením (zeleně), neurony pozitivní na TH (červeně)
a překrytí těchto signálů ukazuje, že daná MSC se transformovala v dopaminergní neuron. Převzato
z Park et al., 2008

Z těchto poznatků by se dalo usuzovat, že velmi záleží na použitém počtu buněk v dávce. Studie neprokazující vliv naivních MSC injikovala 60 000 buněk, zatímco druhá studie dokazující pozitivní efekt použila celkem 6 milionů buněk rozdělených do 3 dávek. Studie se zároveň lišily v použitém modelu PD. Park et al. použil MG-132, který po systémovém podání způsobuje postupnou degeneraci dopaminergních neuronů, a experiment zaznamenal především zpomalení progresu odumírání těchto neuronů (Park et al., 2008). Na druhou stranu ostatní studie použily model vyvolání léze působením 6-OHDA nebo MPTP, které v tu chvíli zničí část dopaminergních neuronů a MSC měly efekt převážně v obnovení jejich vláken. Stejně tak se vyskytuje problém v absolutním porovnávání efektu na motorické symptomy, jelikož studie nemají jednotnou formu a mohou používat jiné typy testů.

4.2.1.3 Klinické studie BM-MSC

Přestože neurotoxiny dokážou v modelech PD navodit degradaci dopaminergních neuronů a s tím spojené pohybové nedostatečnosti, nejedná se o přirozený průběh nemoci. Parkinsonova choroba je komplexní onemocnění a je třeba zkoumat vliv terapie na celkovou přirozenou patologii na lidských pacientech.

Příkladem studie, která provedla autologní transplantaci MSC z kostní dřeně, je studie Aleksandra Boiky z roku 2020. Transplantace byla uskutečněna na 12 pacientech s PD a byla měřena změna motorických i nemotorických symptomů 1 a 3 měsíce po transplantaci. Naivní kmenové buňky byly odebrány z kostní dřeně, inkubovány a namnoženy do potřebného množství. Podle osobních potřeb a potencionálních hrozeb pro pacienta byly zvoleny 2 možnosti zavedení MSC do těla. Prvním způsobem byla systémová – intravenózní transplantace, s dávkou 0,5 – 2 miliony buněk na 1 kg hmotnosti pacienta. Druhý přístup byl tandemový – nejprve první várka MSC intranasální aplikací a poté druhá intravenózní. Po prvním měsíci se prokázalo zlepšení motorických symptomů podle stupnice UPDRS o 9 % v off stavu, stejně tak po 3 měsících. Změny v on stavech byly statisticky nevýznamné. U nemotorických symptomů byly změny výraznější, např. podle Hamilton depression scale došlo ke zlepšení o 36 % po 1 měsíci a o 44 % po 3 měsících. Nedostatkem této studie bylo její vcelku krátkodobé trvání (Boika et al., 2020).

Druhá studie z roku 2021 používající alogenní MSC z kostní dřeně testovala navíc bezpečnost a imunogenicitu po transplantaci u 20 pacientů. Byly použity buňky od zdravého donora a dopraveny do pacientů intravenózně pouze 1 dávkou, ve 4 skupinách po 5 lidech, které se lišily množstvím buněk (1, 3, 6 a 10 milionu na kg pacienta). Vyhodnocování probíhalo po 2, 12, 24 a 52 týdnech v těchto aspektech – koncentrace cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, hladina anti-human leukocyte antigen (anti-HLA) protilátek a zlepšení motorických symptomů. Výsledkem bylo potvrzení bezpečnosti, jako nejčastější potíže se vyskytly u 20 % pacientů dyskineze či hypertenze. Hladina anti-HLA protilátek se po provedené jednorázové infuzi nezměnila nebo snížila, nevyvolala tedy imunitní odpověď. Zároveň byla zaznamenána snížená koncentrace proinflamačních cytokinů a zvýšená koncentrace mozkového neurotrofického faktoru (BDNF), a to nejvýznamněji u skupin s vyšší dávkou MSC. Stejně tak bylo u těchto skupin prokázáno největší zlepšení motorických symptomů dle UPDRS. Tato studie tedy dokázala bezpečnost intravenózního dodání MSC, jejich protizánětlivé a terapeutické působení na PD (Schiess et al., 2021).

Další možností zavedení MSC do těla je přímá transplantace buněk do mozku. V této studii byla transplantace provedena bilaterální injekcí alogenních buněk za anestezie do subventrikulární zóny mozku. Ta je sídlem neurálních kmenových buněk, dochází tak po transplantaci k jejich aktivaci a proliferaci. U pacientů bylo 12 měsíců po transplantaci zaznamenáno zlepšení UPDRS skóre o 22 %

a to tak, že úroveň zlepšení korelovala s délkou nemoci, čím časnější fáze PD, tím významnější pokles projevů (Venkataramana et al., 2012).

4.2.2 Tuková tkáň

Mezenchymální kmenové buňky získané z tukové tkáně (AD-MSK) lze odebrat jednodušeji a mnohem méně invazivně než v případě kostní dřeně. I tyto buňky lze před transplantací modifikovat.

4.2.2.1 Modifikované AD-MSK v modelech PD

V následujícím případě byly použity lidské MSC v myším modelu PD navozeném 6-OHDA. Celkem byly v experimentu testovány 4 skupiny myši – kontrolní model PD, myši s intrakraniálně injikovaným samostatným GDNF, poté neupravených MSC, a nakonec geneticky upravené MSC exprimující GDNF. Po 6 týdnech tohoto experimentu studie potvrdila vliv GDNF na přežití transplantovaných buněk a jejich diferenciaci v neuronální buňky. Ze všech čtyřech skupin byl prokázán nejvyšší počet přeživších a diferencovaných transplantovaných buněk u skupiny MSC-GDNF, stejně tak TH-pozitivních buněk a nejvýznamnější zlepšení v motorických testech (apomorfinem vyvolané rotace a rotarod). Druhé nejlepší zlepšení zaznamenaly MSC neexprimující GDNF. Jako důvod nejlepších výsledků u upravených MSC autoři navrhují, že by mohla být kapacita těchto buněk diferencovat v neuroepiteliální protein (Nestin), gliální fibrilární kyselý protein (GFAP) a beta-tubulin III. třídy (Tuj-1) pozitivní buňky způsobená kontinuálním uvolňováním GDNF z nich samých (Sun et al., 2020).

Další možností úpravy AD-MSK před transplantací je jejich kultivace v neurálním diferenciacním médiu (NDF) indukující neuronální diferenciaci. Tento postup použila následující studie, kde byly v 6-OHDA vyvolaném potkaním modelu PD transplantovány autologní buňky, jedné skupině naivní MSC a druhé buňky pěstované v NDF. Diferenciace těchto buněk byla potvrzena *in vitro* (přítomnost markerů Nestin, Tuj-1, TH, neuronální jaderný protein (NeuN) a mnoho dalších), bylo ovšem prokázáno, že tato diferenciaci je nestabilní a docházelo ke snižování exprese markerů v čase. Výsledkem tohoto experimentu po 4 týdnech bylo stejné zlepšení v amfetaminem indukovaných rotacích u obou skupin (až na polovinu oproti kontrole), ukazující stejný účinek naivních i upravených MSC buněk a potvrzující, že diferenciaci MSC pomocí média před transplantací je nedostatečná. Imunohistologická analýza prokázala přežití transplantovaných buněk v *substantia nigra*, ale nedetekovala ko-expresi s TH, tedy nedošlo k diferenciaci v dopaminergní neurony. Došlo ovšem ke snížení zánětu a aktivace mikroglíí potvrzující neuroprotektivní efekt na postižené neurony a poukazující na terapeutický mechanismus, který spočívá v modulaci neurozánětu způsobeném oxidativním stresem a sekrecí růstových faktorů podporujících přežívání neuronů. Toto bylo potvrzeno *in vitro* pomocí polymerázové řetězové reakce, která prokázala produkci BDNF, GDNF a nervového růstového faktoru (NGF) u použitých AD-MSK (McCoy et al., 2008).

4.2.2.2 Naivní AD-MSK v modelech PD

Vcelku velkým nedostatkem studií na modelech PD je jejich velmi krátké trvání, což vede k nedostatku dat o dlouhodobém účinku a přežití transplantovaných buněk. Toto se snažila napravit následující studie z roku 2015, která zkoumala vliv nejen na motorické ale i kognitivní symptomy, které k projevům PD neodmyslitelně patří. Využití naivních lidských AD-MSK na potkaním 6-OHDA modelu PD ukázalo po 6 měsících zvýšení počtu TH pozitivních buněk, posílení hipokampální a subventrikulární neurogenese, zvýšenou expresi protizánětlivého interleukinu 10 a BDNF. Toto znovu naznačuje, že terapeutický účinek MSC spočívá ve vytvoření mikroprostředí v místě potřeby vyvolávající neuroprotektivní efekt. Jako kognitivní test paměti bylo použito bludiště a motorickým testem bylo měření amfetaminem vyvolaných rotací. Výsledkem po 6 měsících bylo znatelné zlepšení paměti, ale efekt na motorické symptomy se postupně vytrácel až na hladinu kontroly bez transplantace (Schwerk et al., 2015).

Z tohoto se zdá, že pouze geneticky upravené MSC mají potenciál diferencovat v neuronální buňky, což se liší od výsledků studie od Park et al. 2008. Potvrzeno ovšem bylo, že naivní MSC vyvolávají neuroprotektivní efekt, který dokáže alespoň zpomalit degenerativní postup PD. Problémem zůstává nedostatečný dlouhodobý účinek, který se po jednorázové transplantaci může vytráčet.

4.2.2.3 Klinické studie AD-MSK

Následující studie použila k léčbě 77leté pacientky s dlouhou historií PD autologní buňky z tukové tkáně. MSC byly odebrány liposukcí z abdomenu, centrifugovány, pomocí kolagenázy izolovány buňky stromální vaskulární frakce (SVF), ty adherentní byly poté pasážovány a před infuzemi byla také kontrolována jejich kvalita (sterilita, přítomnost povrchových markerů apod.). Infuze byly pacientce podávány intravenózně po dobu 2 a půl let, prvních dvacet dávek jednou za měsíc a poté jednou za 2 měsíce. Na jednu dávku připadlo pokaždé přibližně 200 milionů buněk. Po 8–10 dávkách došlo k signifikantnímu zlepšení řady motorických symptomů dle škály UPDRS (ze 14 na 2), zmírnění dyskinezi i možnosti snížení dávek již podávaných léků. Po 21. infuzi nastalo lehké zhoršení v některých pozorovaných aspektech, což mohlo být způsobeno změnou dávkování (Vij et al., 2023).

V další studii byla provedena u 2 pacientů jednorázová transplantace autologních buněk z SVF. Lišila se ovšem způsobem injekce. Dávka přibližně 60 milionů buněk byla u prvního pacienta injikována do obličejových fascií a svalů. U druhého pacienta byla provedena kombinace zmíněných injekcí a intranasálního podání. Zlepšení motorických (v on stavech, dle UPDRS) i nemotorických symptomů bylo pozorovatelné již po 2 týdnech, u prvního pacienta sledované stále i po 5 letech. (Carstens et al., 2020).

4.2.3 Pupeční šňůra

Poslední možností zdroje použitelného k izolaci MSC je pupeční šňůra. Jedná se o neinvazivní zákrok, na rozdíl do předešlých, buňky ovšem budou vždy alogenní. Zároveň pupeční šňůra obsahuje

největší koncentraci kmenových buněk (UC-MSc) oproti tukové tkáni a kostní dřeni (ta obsahuje vůbec nejméně MSC) (Fričová et al., 2020).

4.2.3.1 Naivní UC-MSc

Následující studie použila lidské UC-MSc a po intranazální implantaci pozorovala jejich účinky v myším MPTP modelu PD. Pupeční šňůra byla několikrát promyta, zbavena cév a kousičky Whartonova rosolu byly přeneseny do speciálního média, kde byly buňky pasážovány. Po cytometrické analýze byly MSC injikovány do nasální dutiny, a to každý den po dobu 5 dní. Poté byly provedeny na myších 2 různé testy na vyhodnocení motorických schopností, zaléčené myši se dostaly na téměř stejné skóre jako myši zdravé. Důvodem takto úspěšného výsledku by mohlo být kontinuální podávání MSC a velmi krátké trvání experimentu (nevypovídající o dlouhodobém účinku). Stejně tak došlo k zvýšení hladiny dopaminu, snížení počtu mikroglíí a koncentrace proinflamačních cytokinů, faktoru nekrotizující nádory- α a interleukinu-6, nebo ovlivnění složení mikrobioty a neurotransmiterů ve střevě. Byly tedy dokázány pozitivní účinky MSC na pohyb, degradaci dopaminergních neuronů inhibicí neurologického zánětu, a propojení mozku se střevem v myším PD modelu (Sun et al., 2022).

Následující studie použila intravenózně transplantované UC-MSc v myším 6-OHDA modelu a po 14 dnech zaznamenala zvýšený počet TH-pozitivních neuronů, snížení hladin pro-apoptotických proteinů, nižší aktivaci mikroglíí, zvýšení exprese antioxidantů superoxid dismutázy a glutathionu v mozku, slezině i séru, a snížení počtu apomorfinem indukovaných rotací při testování motorických symptomů myši. Účinek MSC tedy spočíval ve snižování oxidativního stresu a apoptózy. Tato studie zkoumala účinky na ranou fázi progresu PD a zajímavostí je, že nenalezla transplantované MSC v mozku v místě postižení, nepřešly tedy přes hematoencefalickou bariéru, ale byly nalezeny především ve slezině a jiných orgánech. Toto naznačuje, že neuroprotektivní účinky MSC spočívající především v ochraně před oxidativním stresem mohou působit i systémově (Chi et al., 2019).

4.2.3.2 MSC v kombinaci s levodopou

Potvrzen byl také pozitivní efekt použití transplantace kmenových buněk společně se zaléčením levodopou-karbidopou, které se v klinické praxi vyskytuje v podstatě u každého pacienta. V tomto případě neupravené MSC z Whartonova rosolu pupečnickové šňůry podané intravenózně do ocasní žíly v potkaním 6-OHDA modelu PD migrovaly do striata a *substantia nigra* a způsobily navýšení exprese NGF a BDNF, zlepšení paměti a zamezení expanze ztráty neuronů v hipokampu. Nejlepší zlepšení často srovnatelné se zdravou kontrolou vykazovaly vždy skupiny s transplantovanými MSC, nejvíce skupina v kombinaci s léčivem. Zároveň došlo i ke zlepšení synaptické plasticity v hipokampu potvrzené elektrofyzilogickým měřením dlouhodobé potenciace (LTP) v hipokampu, nejsrovnatelnější křivky s kontrolou opět vykazovala skupina s podanou kombinací MSC a léčiva (Jalali et al., 2020).

4.2.3.3 Použití exosomů

Ze všech poznatků vyplývá, že hlavním mechanismem účinku MSC je jejich exprese různých molekul a faktorů (růstové a trofické faktory, cytokiny, ...) modulujících přežití postižených neuronů. Dalším možným krokem je tedy testování exosomů produkovaných kmenovými buňkami, které přesně tyto molekuly obsahují, zároveň díky své velikosti snadno přecházejí přes hematoencefalickou bariéru (oproti celým buňkám) a dostávají se do místa potřeby, v tomto případě do *substantia nigra*. V tomto experimentu byl zaznamenán proliferaci podporující účinek produkovaných exosomů *in vitro*, kdy MSC byly od 6-OHDA stimulovaných buněk odděleny membránou, která propustila podle velikosti maximálně exosomy. V *in vivo* modelu byly před transplantací exosomy izolovány z kultivačního média MSC a purifikovány. Studie potvrdila, že intravenózní podání exosomů snižuje v 6-OHDA potkaním modelu PD motorické symptomy a ztrátu neuronů v *substantia nigra*, zároveň zvyšuje hladinu dopaminu ve striatu, počet TH-pozitivních neuronů a ochranu před apoptózou způsobenou 6-OHDA (Chen et al., 2020).

4.2.3.4 Modifikace UC-MSC

Další možností úpravy MSC je jejich transdukce, aby produkovaly fibroblastový růstový faktor (FGF-20), jehož účinkem je mimo jiné ochrana dopaminergních neuronů. Transplantace těchto buněk zlepšila symptomy PD, zvýšila počet TH-pozitivních buněk v *substantia nigra* a hlavně podpořila degradaci nukleárního faktoru- κ B, který ovlivňuje expresi prozánětlivých cytokinů a ve vysoké hladině se vyskytuje při PD patologii (Jinfeng et al., 2016).

4.3 Embryonální kmenové buňky

4.3.1 Diferenciace

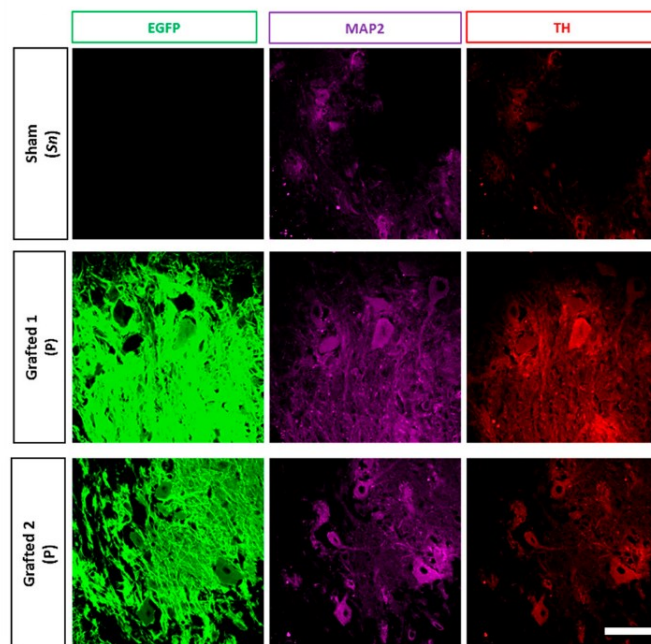
Embryonální kmenové buňky (embryonic stem cells, ESC) jsou pluripotentní buňky, které lze izolovat z embrya ve stádiu blastocysty. Tyto buňky ovšem mají širokou potenci, před jejich použitím je třeba je diferencovat, a v případě PD se jedná o diferenciaci v progenitory dopaminergních neuronů. Po získání ESC jsou tyto buňky kontrolovány, zda mají pluripotentní potenciál, pěstovány v médiu s inhibitory Smad signálních drah, aktivátory Sonic hedgehog (SHH) drah, BDNF, GDNF, kyselinou askorbovou a mnoho dalšími molekulami. Tyto buňky exprimují markery LIM homeobox transkripční faktor 1 (LMX1A), forkhead box protein A2 (FOXA2), orthodenticle homeobox protein 2 (OTX2), a engrailed 1 (EN1). Poté dojde v diferenciálním médiu k maturaci v neurony, které jsou TH-pozitivní, elektrofyziologicky aktivní a nemají markery typické pro nediferencované buňky. Tyto neurony transplantované intrastriálně v potkaním 6-OHDA modelu PD kontinuálně snižovaly amfetaminem indukované rotace po dobu 6 měsíců, a zároveň přežily jako maturované neurony a vytvořily nové synapse v místě implantace (Naderi et al., 2023).

Postupy a protokoly vedoucí k diferenciaci pluripotentních ESC v neuronální buňky se v různých experimentech liší, základ ovšem zůstává podobný. Při transplantaci ESC, které stále mají

svůj diferenciální potenciál, do zvířecích modelů dochází k tvorbě velkého teratomu již po pár týdnech (Kirkeby et al., 2023).

4.3.2 ESC v modelech PD

V následující studii byly použité lidské ESC, které byly vystaveny molekulám stimulující signální kaskády během vývoje středního mozku, a byly tak generovány dopaminergní neurony. Úspěšná diferenciace byla potvrzena přítomností markerů jako LMX1A, FOXA2, nebo TH, schopností vyvolat akční potenciál a tvořit dopamin. Tyto buňky byly bilaterálně transplantovány do putamenu v opičím MTPT modelu PD. Po dobu 10 měsíců byly prováděny 3 různé behaviorální testy, jejich výsledky naznačovaly částečné zlepšení, i když se obě testované opice zlepšily v různých testech odlišně. Zároveň byla mikrodialýzou zaznamenána vyšší hladina dopaminu a pomocí PET přežití neuronů 10 měsíců po transplantaci (obr. 5). Nedošlo k vyvolání imunitní reakce ani tvorbě nádoru (López-Ornelas et al., 2023).



Obrázek 5: Přežití transplantovaných buněk

Diferencované ESC byly transplantovány do putamen a následně po 10 měsících byly detekovány v substantia nigra. Diferencované ESC (značené EGFP, zelená), zobrazení ko-exprese s TH (červená) a proteinem asociovaným s mikrotubuly 2 (MAP2, fialová). První řádek je kontrolní model PD bez transplantace (Sham), zbylé 2 řádky jsou po transplantaci (Grafted 1 a 2). Převzato z López-Ornelas et al., 2023

Stejně jako v dříve popsaných případech záleželo na počtu buněk v podané dávce, jelikož přežití a začlenění transplantovaných ESC není stoprocentní. Jedna studie vypočítala, že úspěšnost je asi 2 835 TH-positivních neuronů na 1×10^5 transplantovaných buněk, a největší terapeutické zlepšení zaznamenala skupina potkaních modelů PD s nejvyšší podanou dávkou (Kirkeby et al., 2023).

4.4 Indukované pluripotentní kmenové buňky

4.4.1 Indukce a diferenciac

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) jsou další možností, jak získat pluripotentní kmenové buňky, a to autologně z dospělého jedince, díky čemuž se předchází možným imunitním reakcím a etickým problémům při použití embryonálních buněk. iPSC se vytvářejí reprogramováním somatických buněk, jako jsou především fibroblasty z kůže, krevní buňky nebo jiné. Reprogramování probíhá transfekcí pomocí virových vektorů obsahujících geny pro pluripotentní transkripční faktory OCT4, SOX2, Krüppel-like faktor 4 a c-Myc, a následně jsou iPSC vyselektovány pomocí speciálního média. Ve studii zabývající se přípravou iPSC z fibroblastů se účinnost přípravy pohybovala kolem 0,1 až 0,2 %. Diferenciac v neurální buňky (TH a Tuj-1 pozitivní) již probíhala obdobně jako u ESC, pomocí inhibitorů Smad dráhy, SHH, BDNF, askorbové kyseliny, TGF- β a dalších. Po transplantaci těchto buněk v 6-OHDA potkaním modelu PD došlo ke zlepšení amfetaminem indukovaných rotací, ale až po více než 2 měsících, což naznačuje, že buňky potřebují čas ke své správné funkci. Zároveň byla potvrzena diferenciac v neurony i dopaminergní neurony po transplantaci do striata, zajímavostí bylo zjištění, že přes polovinu buněk se diferencovalo v astrocyty (GFAP-pozitivní) (Han et al., 2015).

Postup přípravy iPSC z krevních buněk periferní krve je obdobný, každá studie ovšem používá lehce odlišný protokol. Při diferenciaci v neurální progenitory nebo neurony je před transplantací třeba pečlivě ověřit čistotu buněk. Kolonie nesmí obsahovat nediferencované iPSC nebo časné neurální kmenové buňky, tyto typy jsou náchylné na silnou proliferaci a tvorbu nádorů. Zamezení výskytu těchto buněk se provádí kontrolou markerů typických pro nediferencované buňky (OCT3/4 a Nanog) a selekcí na atriální natriuretický peptid-konvertující enzym (CORIN) pozitivní buňky. Důsledná kontrola kritérií je předpokladem pro použití takto připravených buněk v klinických studiích (Doi et al., 2020). Purifikace diferencovaných buněk podle CORIN, což je serinová proteáza typická pro dopaminergní neurony při vývoji mozku, se ukázala po transplantaci jako úspěšnější metoda než použití neselektovaných buněk, jelikož CORIN pozitivní transplantáty v 6-OHDA potkaním modelu PD lépe diferencovaly, obsahovaly více TH-pozitivních neuronů a neproliferovaly (Doi et al., 2014).

4.4.2 Lidské studie s iPSC

V příkladu klinické studie z roku 2020 byly odebrány fibroblasty z kůže a indukovány v pluripotentní buňky, které daly později vznik dopaminergním progenitorovým buňkám. Ty byly charakterizovány specifickými markery a zkontrolovány na přítomnost mutací i produkci dopaminu. Následně byla provedena kontrolní transplantace těchto buněk do myši za účelem ověření přežití transplantátu a imunogenicity. Následně bylo celkem 8 milionů buněk zavedeno bilaterálně do pacientova putamenu. Měření UPDRS a hodnocení dotazníku mapujícího zdravotní status pacienta (PDG-39) probíhalo po dobu 2 let. Vyhodnocení dat ukázalo snížení motorických symptomů v off i on stavech, stejně tak i zlepšení u ukazatele kvality života. Zároveň bylo zaznamenáno skromné zlepšení

podle PET, které signalizovalo zvýšení množství dopaminu v místě transplantace. Nedostatkem této studie je ovšem stále její krátké trvání, malý počet pacientů a absence kontroly (Schweitzer et al., 2020).

4.5 Neurální progenitorové buňky

Dříve již zmíněné neurální progenitorové buňky (neural progenitor cells, NPC) jsou kmenové buňky mající potenciál diferencovat v různé typy buněk nervové tkáně. Tyto buňky k transplantaci lze získat několika způsoby – z fetální tkáně, diferencované z embryonálních nebo indukovaných kmenových buněk, a z mozku dospělého jedince.

4.5.1 NPC z dospělé tkáně

V dospělém savčím mozku dochází k neurogenезi jen na několika místech, nejvíce v hipokampu. NPC izolované ze subependymální zóny hipokampu dospělých potkanů byly v následující studii unilaterálně transplantovány do striata v 6-OHDA potkaním modelu PD. Po 2 týdnech došlo ke snížení amfetaminem indukovaných rotací (až o 24 %), ale transplantované buňky nediferencovaly v maturované neurony (nebyly NeuN pozitivní), i když polovina dávek buněk byla *in vitro* pěstována v diferenciačním médiu. Všechny buňky ovšem byly ve striatu Nestin pozitivní, to znamená, že si ponechaly svůj progenitorový charakter. Příčinou zlepšení motorických symptomů byla pravděpodobně schopnost NPC zvýšit expresi dopaminových transportérů v okolní hostitelské tkáni (Richardson et al., 2005).

Další skupina prokázala, že transplantace agregátu buněk lidských NPC do potkaního modelu způsobuje lepší diferenciaci a zapojení do hostitelské tkáně než suspenze jednotlivých buněk. Jako důvod tohoto zlepšení byla navržena hypotéza, že funkce buněk v již existující síti napomáhá jejich aktivnější funkci. Došlo tak k růstu dendritů transplantátu i do okolní tkáně striata a buňky byly zároveň TH-pozitivní (Shin et al., 2014).

4.5.2 Použití sekretomu

Jiná studie transplantovala lidské NPC nebo pouze jejich sekretom do *substantia nigra* a striata v potkaním 6-OHDA modelu PD. V tomto případě transplantace samotných buněk nevyvolala signifikantní zlepšení motorických deficitů, a pouze lehké navýšení koncentrace TH-pozitivních neuronů oproti kontrole. Pravděpodobným důvodem byl fakt, že transplantované buňky v mozku nepřežily. Na druhou stranu skupina potkanů, která obdržela pouze sekretom NPC, zaznamenala výrazné zlepšení ve všech motorických testech i v množství TH-pozitivních neuronů. Analýza sekretomu odhalila mnoho molekul jako GDNF, BDNF, faktor odvozený z pigmentového epitelu nebo od glií derivovaný nexin, které měly vliv na přežití a ochranu neuronů a vyvolaly tak lepší výsledky oproti kontrole (Mendes-Pinheiro et al., 2018).

4.6 Retinální pigmentový epitel

4.6.1 Model PD

Poslední možností zdroje buněk, které lze transplantovat, jsou buňky retinálního pigmentového epitelu díky jejich schopnosti syntetizovat levodopu jako prekurzor melaninu. *In vitro* byla potvrzena neuroprotektivní schopnost těchto buněk prostřednictvím sekrece GDNF a BDNF, hladina těchto faktorů byla zvýšená i po transplantaci v 6-OHDA potkaním modelu PD. Stejně tak tyto buňky dokážou z levodopy syntetizovat dopamin a snižovat motorické deficity (Ming et al., 2009).

4.6.2 Klinické studie

Příkladem využití buněk retinálního pigmentového epitelu je následující klinická studie, která odebrala buňky z lidských rohovek plodů a diferenciovala je v neurální progenitorové buňky, pozitivní na Nestin, paired box protein 6 (Pax6) a další. Jejich transplantace do putamenu pacientů s PD vyvolala zlepšení na škále UPDRS, po 12 měsících začalo docházet ke snižování účinku. Zároveň během prvních 6 měsíců byl zaznamenán nárůst sekrece dopaminu, zdá se ale, že dlouhodobý účinek zaručen nebyl (Yin et al., 2012).

5 Závěr

Terapie Parkinsonovy choroby pomocí kmenových buněk má vcelku dlouhou historii, ovšem od v prvopočátcích používaných fetálních tkání se postupně upouští z důvodu častých negativních výsledků a etických problémů. Současný přístup se snaží používat spíše čisté a lépe charakterizované buněčné typy, které mohou pocházet z různých zdrojů.

Mechanismus účinku kmenových buněk by se mohl rozdělit do dvou možností – buď je cílem, aby transplantované buňky diferencovaly v dopaminergní neurony, začlenily se do hostitelské tkáně a nahradily funkci postižených neuronů, nebo je cílem sekrece trofických faktorů, imunomodulačních cytokinů a mnoha dalších molekul, které podporují regeneraci, přežití postižených neuronů, snížení neurozánětu nebo obnovení hladiny dopaminu. Výsledky často naznačují, že kmenové buňky vykazují oba tyto mechanismy najednou.

Očekávaný účinek od mezenchymálních kmenových buněk je především tvorba neuroprotektivního prostředí, ovšem při vysokých dávkách se mohou i diferencovat v neurony. Protektivní efekt byl detekován i v případě, kdy se buňky nedostaly do mozku, ale periferně dokázaly ovlivnit zánětlivou reakci. Potvrzen byl účinek samotných exosomů nebo sekretomů buněk, které lépe prostupují hematoencefalickou bariérou. Zároveň může být jejich účinek posílen modifikacemi, jako např. transfekcí genů pro neurotrofické faktory, které podporují vznik žádaného mikroprostředí, i diferenciací v neurony, nebo jejich pěstováním ve speciálních diferenciacích médiích.

Vysoký potenciál v diferenciaci v dopaminergní neurony vykazují neurální progenitorové buňky, které lze získat z dospělé tkáně mozku, nebo diferenciací embryonálních či indukovaných pluripotentních buněk. Některé studie prokázaly diferenciaci v neurony nebo i astrocyty v místě transplantace, i když s nízkou účinností. Jiné studie diferenciaci neprokázaly, ale vždy se projevil alespoň nějaký pozitivní účinek.

Výsledek může ovlivnit i styl implantace kmenových buněk do těla. Celkově přímá transplantace do mozku vykazuje nejpřesnější nasměrování do místa potřeby největšího množství buněk, jedná se ale o nejinvazivnější zákrok. Na druhou stranu intravenózní podání invazivní není, ale úspěšnost je nižší, z důvodu omezené prostupnosti buněk přes hematoencefalickou bariéru. Toto se ovšem dá kompenzovat velikostí dávky, která u intravenózní transplantace musí být k navození účinku mnohem vyšší. Stejně tak bylo pozorováno snižování účinnosti v čase naznačující, že k udržení efektu je potřeba vícenásobná kontinuální transplantace buněk.

Porovnávání jednotlivých studií je celkem obtížné, jelikož se zatím neuplatnil jednotný přístup, studie se vždy v nějakém postupu liší. Celkově ale dle mého názoru vyplývá, že terapie PD kmenovými buňkami je při pečlivém a kvalitním přístupu bezpečná, bez komplikací a většinou alespoň částečně úspěšná. Do budoucna by mohl tento přístup pomoci zlepšit kvalitu života mnoha lidí.

6 Seznam použité literatury

*Sekundární citace označeny hvězdičkou **

- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, *105*, 1815–1822. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-04>
- Baba, M., Nakajo, S., Tu, P.-H., Tomita, T., Nakaya, K., M-Y Lee, V., Trojanowski, J. Q., & Iwatsubo, T. (1998). Short Communication Aggregation of α -Synuclein in Lewy Bodies of Sporadic Parkinson's Disease and Dementia with Lewy Bodies. *American Journal of Pathology*, *152*(4), 879–884.
- Boika, A., Aleinikava, N., Chyzyk, V., Zafranskaya, M., Nizheharodava, D., & Ponomarev, V. (2020). Mesenchymal stem cells in Parkinson's disease: Motor and nonmotor symptoms in the early posttransplant period. *Surgical Neurology International*, *11*(380), 1–8. https://doi.org/10.25259/SNI_233_2020
- Brochard, V., Combadière, B., Prigent, A., Laouar, Y., Perrin, A., Beray-Berthat, V., Bonduelle, O., Alvarez-Fischer, D., Callebert, J., Launay, J. M., Duyckaerts, C., Flavell, R. A., Hirsch, E. C., & Hunot, S. (2009). Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *The Journal of Clinical Investigation*, *119*(1), 182–192. <https://doi.org/10.1172/JCI36470>
- Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M., & Südhof, T. C. (2010). α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in vivo and in vitro. *Science*, *329*(5999), 1663–1667. <https://doi.org/10.1126/science.1195227>
- Cacareni, T., & Musicco, M. (2001). Levodopa or dopamine agonists, or deprenyl as initial treatment for Parkinson's disease. A randomized multicenter study. *Parkinsonism and Related Disorders*, *7*, 107–114. [https://doi.org/10.1016/s1353-8020\(00\)00023-7](https://doi.org/10.1016/s1353-8020(00)00023-7)
- *Calabresi, P., Lazzaro, G. Di, Marino, G., Campanelli, F., & Ghiglieri, V. (2023). Advances in understanding the function of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease. *Brain*, *146*(9), 3587–3597. <https://doi.org/10.1093/brain/awad150>
- Carstens, M., Haq, I., Martinez-Cerrato, J., Dos-Anjos, S., Bertram, K., Correa, D., Danilo, O., Argüello, R., & Leon, N. (2020). Sustained clinical improvement of Parkinson's disease in two patients with facially-transplanted adipose-derived stromal vascular fraction cells. *Journal of Clinical Neuroscience*, *81*, 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.09.001>
- Chao, Y. X., He, B. P., & Tay, S. S. W. (2009). Mesenchymal stem cell transplantation attenuates blood brain barrier damage and neuroinflammation and protects dopaminergic neurons against MPTP toxicity in the substantia nigra in a model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmunology*, *216*(1–2), 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.09.003>
- Chen, H.-X., Liang, F.-C., Gu, P., Xu, B.-L., Xu, H.-J., Wang, W.-T., Hou, J.-Y., Xie, D.-X., Chai, X.-Q., & An, S.-J. (2020). Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a Parkinson's disease model by inducing autophagy. *Cell Death and Disease*, *11*(288), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2473-5>
- Chi, H., Guan, Y., Li, F., & Chen, Z. (2019). The Effect of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells in Protection of Dopaminergic Neurons from Apoptosis by Reducing Oxidative Stress in the Early Stage of a 6-OHDA-Induced Parkinson's Disease Model. *Cell Transplantation*, *28*(15), 875–995. <https://doi.org/10.1177/0963689719891134>

- Choudhury, G. R., & Daadi, M. M. (2018). Charting the onset of Parkinson-like motor and non-motor symptoms in nonhuman primate model of Parkinson's disease. *PLOS ONE*, *13*(8), 1–20. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0202770>
- Cilia, R., Cereda, E., Akpalu, A., Sarfo, F. S., Cham, M., Laryea, R., Obese, V., Oppon, K., Sorbo, F. Del, Bonvegna, S., Zecchinelli, A. L., & Pezzoli, G. (2020). Natural history of motor symptoms in Parkinson's disease and the long-duration response to levodopa. *Brain*, *143*(8), 2490–2501. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa226>
- Desplats, P., Lee, H.-J., Bae, E.-J., Patrick, C., Rockenstein, E., Crews, L., Spencer, B., Masliah, E., & Lee, S.-J. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of-synuclein. *PNAS*, *106*(31), 13010–13015. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903691106>
- Doi, D., Magotani, H., Kikuchi, T., Ikeda, M., Hiramatsu, S., Yoshida, K., Amano, N., Nomura, M., Umekage, M., Morizane, A., & Takahashi, J. (2020). Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nature Communications*, *11*(3369), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17165-w>
- Doi, D., Samata, B., Katsukawa, M., Kikuchi, T., Morizane, A., Ono, Y., Sekiguchi, K., Nakagawa, M., Parmar, M., & Takahashi, J. (2014). Isolation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Dopaminergic Progenitors by Cell Sorting for Successful Transplantation. *Stem Cell Reports*, *2*, 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.01.013>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- *Dumbhare, O., & Gaurkar, S. S. (2023). A Review of Genetic and Gene Therapy for Parkinson's Disease. *Cureus*, *15*(2), 1–8. <https://doi.org/10.7759/cureus.34657>
- *Fabbri, M., Ferreira, J. J., & Rascol, O. (2022). COMT Inhibitors in the Management of Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, *36*, 261–282. <https://doi.org/10.1007/s40263-021-00888-9>
- Ferreira, J. J., Lees, A., Rocha, J. F., Poewe, W., Rascol, O., & Soares-da-Silva, P. (2016). Opicapone as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and end-of-dose motor fluctuations: A randomised, double-blind, controlled trial. *The Lancet Neurology*, *15*(2), 154–165. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00336-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00336-1)
- *Fričova, D., Korchak, J. A., & Zubair, A. C. (2020). Challenges and translational considerations of mesenchymal stem/stromal cell therapy for Parkinson's disease. *Regenerative Medicine*, *5*(20), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00106-y>
- Glavaski-Joksimovic, A., Virag, T., Mangatu, T. A., McGrogan, M., Wang, X. S., & Bohn, M. C. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor-secreting genetically modified human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience Research*, *88*(12), 2669–2681. <https://doi.org/10.1002/jnr.22435>
- Han, F., Wang, W., Chen, B., Chen, C., Li, S., Lu, X., Duan, J., Zhang, Y., Zhang, Y. A., Guo, W., & Li, G. (2015). Human induced pluripotent stem cell-derived neurons improve motor asymmetry in a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. *Cytotherapy*, *17*(5), 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.02.001>
- Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M., & Masliah, E. (2000). α -Synuclein Promotes Mitochondrial Deficit and

Oxidative Stress. *The American Journal of Pathology*, 157, 401–410.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64553-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64553-1)

- Jalali, M. S., Sarkaki, A., Farbood, Y., Azandeh, S. saeed, Mansouri, E., Ghasemi Dehcheshmeh, M., & Saki, G. (2020). Transplanted Wharton's jelly mesenchymal stem cells improve memory and brain hippocampal electrophysiology in rat model of Parkinson's disease. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 110, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2020.101865>
- Janetzky, B., Hauck, S., Youdim, B. H., Riedereff, P., Jellinger, K., Pantucek, F., Zöchling, R., Boissl, K. W., & Reichmann, H. (1994). Unaltered aconitase activity, but decreased complex I activity in substantia nigra pars compacta of patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*, 169, 126–128. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90372-7](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90372-7)
- Jiaming, M., & Niu, C. (2014). Comparing neuroprotective effects of CDNF-expressing bone marrow derived mesenchymal stem cells via differing routes of administration utilizing an in vivo model of Parkinson's disease. *Neurol Sci*, 36, 281–287. <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1929-8>
- Jinfeng, L., Yunliang, W., Xinshan, L., Shanshan, W., Chunyang, X., Peng, X., Xiaopeng, Y., Zhixiu, X., Honglei, Y., Xia, C., Haifeng, D., & Bingzhen, C. (2016). The Effect of MSCs Derived from the Human Umbilical Cord Transduced by Fibroblast Growth Factor-20 on Parkinson's Disease. *Stem Cell International*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/5016768>
- Kells, A. P., Eberling, J., Su, X., Pivrotto, P., Bringas, J., Hadaczek, P., Narrow, W. C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Forsayeth, J., & Bankiewicz, K. S. (2010). Development/Plasticity/Repair Regeneration of the MPTP-Lesioned Dopaminergic System after Convection-Enhanced Delivery of AAV2-GDNF. *The Journal of Neuroscience*, 30(28), 9567–9577. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0942-10.2010>
- Kim, H. N., Shin, J. Y., Kim, D. Y., Lee, J. E., & Lee, P. H. (2021). Priming mesenchymal stem cells with uric acid enhances neuroprotective properties in parkinsonian models. *Journal of Tissue Engineering*, 12, 1–14. https://doi.org/10.1177/20417314211004816/SUPPL_FILE/SJ-DOCX-1-TEJ-10.1177_20417314211004816.DOCX
- Kirkeby, A., Nelander, J., Hoban, D. B., Rogelius, N., Bjartmarz, H., Storm, P., Fiorenzano, A., Adler, A. F., Vale, S., Mudannayake, J., Zhang, Y., Cardoso, T., Mattsson, B., Landau, A. M., Glud, A. N., Sørensen, J. C., Lillethorup, T. P., Lowdell, M., Carvalho, C., ... Parmar, M. (2023). Preclinical quality, safety, and efficacy of a human embryonic stem cell-derived product for the treatment of Parkinson's disease, STEM-PD. *Cell Stem Cell*, 30(10), 1299–1314. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2023.08.014>
- Kordower, J., Freeman, T., Snow, B., Vingerhoets, F., Mufson, E., Sanberg, P., Hauser, R., Smith, D., Nauert, G., Perl, D., & Olanow, C. (1995). Neuropathological evidence of graft survival and striatal reinnervation after the transplantation of fetal mesencephalic tissue in a patient with Parkinson's disease. *The New England Journal of Medicine*, 332(17), 1118–1124. <https://doi.org/10.1056/NEJM199504273321702>
- Lang, A. E., Siderowf, A. D., Macklin, E. A., Poewe, W., Brooks, D. J., Fernandez, H. H., Rascol, O., Giladi, N., Stocchi, F., Tanner, C. M., Postuma, R. B., Simon, D. K., Tolosa, E., Mollenhauer, B., Cedarbaum, J. M., Fraser, K., Xiao, J., Evans, K. C., Graham, D. L., ... Dam, T. (2022). Trial of Cinpanemab in Early Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 387(5), 408–420. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2203395>
- Lin, M., Mackie, P. M., Shaerzadeh, F., Gamble-George, J., Miller, D. R., Martyniuk, C. J., & Khoshbouei, H. (2020). In Parkinson's patient-derived dopamine neurons, the triplication of α -

- synuclein locus induces distinctive firing pattern by impeding D2 receptor autoinhibition. *Acta Neuropathologica Communications*, 9(107), 1–28. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01203-9>
- López-Ornelas, A., Escobedo-Avila, I., Ramírez-García, G., Lara-Rodarte, R., Meléndez-Ramírez, C., Urrieta-Chávez, B., Barrios-García, T., Cáceres-Chávez, V. A., Flores-Ponce, X., Carmona, F., Reynoso, C. A., Aguilar, C., Kerik, N. E., Rocha, L., Verdugo-Díaz, L., Treviño, V., Bargas, J., Ramos-Mejía, V., Fernández-Ruiz, J., ... Velasco, I. (2023). Human Embryonic Stem Cell-Derived Immature Midbrain Dopaminergic Neurons Transplanted in Parkinsonian Monkeys. *Cells*, 12(2738), 1–25. <https://doi.org/10.3390/cells12232738>
- Masliyah, E., Rockenstein, E., Adame, A., Alford, M., Crews, L., Hashimoto, M., Seubert, P., Lee, M., Goldstein, J., Chilcote, T., Games, D., & Schenk, D. (2005). Effects of α -synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron*, 46(6), 857–868. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.05.010>
- McCoy, M. K., Martinez, T. N., Ruhn, K. A., Wrage, P. C., Keefer, E. W., Botterman, B. R., Tansey, K. E., & Tansey, M. G. (2008). Autologous transplants of Adipose-Derived Adult Stromal (ADAS) cells afford dopaminergic neuroprotection in a model of Parkinson's disease. *Experimental Neurology*, 210(1), 14–29. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2007.10.011>
- Mendes-Pinheiro, B., Teixeira, F. G., Anjo, S. I., Manadas, B., Behie, L. A., & Salgado, A. J. (2018). Secretome of Undifferentiated Neural Progenitor Cells Induces Histological and Motor Improvements in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells Transl Med*, 7(11), 829–838. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0009>
- Ming, M., Li, X., Fan, X., Yang, D., Li, L., Chen, S., Gu, Q., & Le, W. (2009). Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: Possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in Parkinson's disease. *Journal of Translational Medicine*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-7-53/FIGURES/6>
- Mizoguchi, K., Yokoo, H., Yoshida, M., Tanaka, T., & Tanaka, M. (1994). Amantadine increases the extracellular dopamine levels in the striatum by re-uptake inhibition and by N-methyl-D-aspartate antagonism. *Brain Research*, 662, 255–258. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)90821-4](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90821-4)
- Moro, E., Schüpbach, M., Wächter, T., Allert, N., Eleopra, R., Honey, C., Rueda, M., Schiess, M., Shimo, Y., Valkovic, P., Whone, A., & Stoevelaar, H. (2016). Referring Parkinson's disease patients for deep brain stimulation: a RAND/UCLA appropriateness study. *Journal of Neurology*, 263, 112–119. <https://doi.org/10.1007/s00415-015-7942-x>
- Naderi, S., Shiri, Z., Zarei-Kheirabadi, M., Mollamohammadi, S., Hosseini, P., Rahimi, G., Moradmand, A., Samadian, A., Shojaei, A., Yeganeh, M., Mousavi, S. A., Badri, M., Taei, A., Hassani, S. N., & Baharvand, H. (2023). Cryopreserved clinical-grade human embryonic stem cell-derived dopaminergic progenitors function in Parkinson's disease models. *Life Sciences*, 329, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121990>
- Olanow, C. W., Goetz, C. G., Kordower, J. H., Stoessl, A. J., Sossi, V., Brin, M. F., Shannon, K. M., Nauert, G. M., Perl, D. P., Godbold, J., & Freeman, T. B. (2003). A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 54(3), 403–414. <https://doi.org/10.1002/ANA.10720>
- Olanow, C. W., Kieburtz, K., Odin, P., Espay, A. J., Standaert, D. G., Fernandez, H. H., Vanaganas, A., Othman, A. A., Widnell, K. L., Robieson, W. Z., Pritchett, Y., Chatamra, K., Benesh, J., & Lenz, R. A. (2014). Articles Continuous intrajejunal infusion of levodopa-carbidopa intestinal gel for

- patients with advanced Parkinson's disease: a randomised, controlled, double-blind, double-dummy study. *Lancet Neurol*, 13, 141–149. <https://doi.org/10.1016/S1474>
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Scott Ralph, G., Lepetit, H., Lavisse, S., Buttery, P. C., Watts, C., Miskin, J., Kelleher, M., Deeley, S., Iwamuro, H., Lefaucheur, J. P., Thiriez, C., Fenelon, G., Lucas, C., Brugières, P., Gabriel, I., Abhay, K., Drouot, X., ... Mitrophanous, K. A. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: A dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet*, 383(9923), 1138–1146. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61939-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61939-X)
- Park, H. J., Lee, P. H., Bang, O. Y., Lee, G., & Ahn, Y. H. (2008). Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 107(1), 141–151. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05589.X>
- Peralta, C., Wolf, E., Alber, H., Seppi, K., Müller, S., Bösch, S., Wenning, G. K., Pachinger, O., & Poewe, W. (2006). Valvular heart disease in Parkinson's disease vs. controls: An echocardiographic study. *Movement Disorders*, 21(8), 1109–1113. <https://doi.org/10.1002/mds.20887>
- Rascol, O., Brooks, D. J., Melamed, E., Oertel, W., Poewe, W., Stocchi, F., & Tolosa, E. (2005). Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations (LARGO, Lasting effect in Adjunct therapy with Rasagiline Given Once daily, study): a randomised, double-blind, parallel-group trial. *Lancet*, 365, 947–954. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)71083-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)71083-7)
- Reddy, P. H., Cai, H., Yu, X., Mao, Z., Ling, Z., Pan, L., Xu, X., Cui, Z., & Liang, S. (2019). Comparison of Efficacy of Deep Brain Stimulation of Different Targets in Parkinson's Disease: A Network Meta-Analysis. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(23), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00023>
- Richardson, R. M., Broadus, W. C., Holloway, K. L., & Fillmore, H. L. (2005). Grafts of adult subependymal zone neuronal progenitor cells rescue hemiparkinsonian behavioral decline. *Brain Research*, 1032(1–2), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.10.043>
- Saeedi, Y., Ghadimi, M., Rohani, M., Emamikhah, M., Shahidi, G., Moghaddasi, M., & Habibi, S. A. H. (2021). Impact of anticholinergic drugs withdrawal on motor function in patients with Parkinson's disease. *Clinical Neurology and Neurosurgery*, 202, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2021.106480>
- Sampson, T. R., Debelius, J. W., Thron, T., Wittung-Stafshede, P., Knight, R., & Mazmanian, S. K. (2016). Human gut microbiota from PD patients induce enhanced motor dysfunction in mice. *Cell*, 167, 1469–1480. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.018>
- Schiess, M., Suescun, J., Doursout, M. F., Adams, C., Green, C., Saltarelli, J. G., Savitz, S., & Ellmore, T. M. (2021). Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Safety in Idiopathic Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 36(8), 1825–1834. <https://doi.org/10.1002/mds.28582>
- Schweitzer, J. S., Song, B., Herrington, T. M., Park, T.-Y., Lee, N., Ko, S., Jeon, J., Cha, Y., Kim, K., Li, Q., Henchcliffe, C., Kaplitt, M., Neff, C., Rapalino, O., Seo, H., Lee, I.-H., Kim, J., Kim, T., Petsko, G. A., ... Kim, K.-S. (2020). Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *New England Journal of Medicine*, 382(20), 1926–1932. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1915872>

- Schwerk, A., Altschüler, J., Roch, M., Gossen, M., Winter, C., Berg, J., Kurtz, A., Akyüz, L., & Steiner, B. (2015). Adipose-derived human mesenchymal stem cells induce long-term neurogenic and anti-inflammatory effects and improve cognitive but not motor performance in a rat model of Parkinson's disease. *Regenerative Medicine*, 10(4), 431–446. <https://doi.org/10.2217/rme.15.17>
- Shin, E. S., Hwang, O., Hwang, Y. S., Suh, J. K. F., Chun, Y. Il, & Jeon, S. R. (2014). Enhanced efficacy of human brain-derived neural stem cells by transplantation of cell aggregates in a rat model of parkinson's disease. *Journal of Korean Neurosurgical Society*, 56(5), 383–389. <https://doi.org/10.3340/jkns.2014.56.5.383>
- *Singh, V. K., Saini, A., Kalsan, M., Kumar, N., & Chandra, R. (2016). Describing the Stem Cell Potency: The Various Methods of Functional Assessment and In silico Diagnostics. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4(134), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00134>
- Soldner, F., Stelzer, Y., Shivalila, C. S., Abraham, B. J., Latourelle, J. C., Inmaculada Barrasa, M., Goldmann, J., Myers, R. H., Young, R. A., Jaenisch, R., & Contributions, F. S. (2016). Parkinson-associated risk variant in enhancer element produces subtle effect on target gene expression HHS Public Access. *Nature*, 533(7601), 95–99. <https://doi.org/10.1038/nature17939>
- Sun, S., Zhang, Q., Li, M., Gao, P., Huang, K., Beejadhursing, R., Jiang, W., Lei, T., Zhu, M., & Shu, K. (2020). GDNF Promotes Survival and Therapeutic Efficacy of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Mouse Model of Parkinson's Disease. *Cell Transplantation*, 29, 1–14. <https://doi.org/10.1177/0963689720908512>
- Sun, Z., Gu, P., Xu, H., Zhao, W., Zhou, Y., Zhou, L., Zhang, Z., Wang, W., Han, R., Chai, X., & An, S. (2022). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Locomotor Function in Parkinson's Disease Mouse Model Through Regulating Intestinal Microorganisms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.808905>
- Trenkwalder, C., Kuoppamäki, M., Vahteristo, M., Müller, T., & Ellmén, J. (2019). Increased dose of carbidopa with levodopa and entacapone improves “off” time in a randomized trial. *Neurology*, 92(13), 1487–1496. <https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000007173>
- Venkataramana, N. K., Pal, R., Rao, S. A. V, Naik, A. L., Jan, M., Nair, R., Sanjeev, C. C., Kamble, R. B., Murthy, D. P., Chaitanya, K., & Dazzi, F. (2012). Clinical Study Bilateral Transplantation of Allogenic Adult Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into the Subventricular Zone of Parkinson's Disease: A Pilot Clinical Study. *Stem Cells International*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2012/931902>
- Vij, R., Prossin, A., Tripathy, M., Kim, H., Park, H., Cheng, T., Lotfi, D., & Chang, D. (2023). Long-term, repeated doses of intravenous autologous mesenchymal stem cells for a patient with Parkinson's disease: a case report. *Frontiers in Neurology*, 14, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1257080>
- Willis, A. W., Roberts, E., Beck, J. C., Fiske, B., Ross, W., Savica, R., Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Marras, C., Alcalay, R., Schwarzschild, M., Racette, B., Chen, H., Church, T., Wilson, B., & Doria, J. M. (2022). Incidence of Parkinson disease in North America. *Npj Parkinson's Disease*, 8(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41531-022-00410-y>
- Wolf, E., Seppi, K., Katzenschlager, R., Hochschorner, G., Ransmayr, G., Schwingenschuh, P., Ott, E., Kloiber, I., Haubenberger, D., Auff, E., & Poewe, W. (2010). Long-Term Antidyskinetic Efficacy of Amantadine in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 25(10), 1357–1363. <https://doi.org/10.1002/mds.23034>

- Wu, J., Lim, E.-C., Nadkarni, N. V, Tan, E.-K., & Kumar, P. M. (2019). The impact of levodopa therapy-induced complications on quality of life in parkinson's disease patients in singapore. *Scientific Reports*, 9(9248), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45110-5>
- Yacoubian, T. A., Fang, Y.-H. D., Gerstenecker, A., Amara, A., Stover, N., Ruffrage, L., Collette, C., Kennedy, R., Zhang, Y., Hong, H., Qin, H., Mcconathy, J., Benveniste, E. N., & Standaert, D. G. (2023). Brain and Systemic Inflammation in De Novo Parkinson's Disease. *Movement Disorders*, 38(5), 743–754. <https://doi.org/10.1002/mds.29363>
- Yin, F., Tian, Z. M., Liu, S., Zhao, Q. J., Wang, R. M., Shen, L., Wieman, J., & Yan, Y. (2012). Transplantation of Human Retinal Pigment Epithelium Cells in the Treatment for Parkinson Disease. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 18(12), 1012–1020. <https://doi.org/10.1111/CNS.12025>

Internetové zdroje obrázků

- CLEVELAND CLINIC. *Substantia nigra*. Online. In: Cleveland clinic, 15.5.2022. Dostupné z: <https://my.clevelandclinic.org/health/body/23010-substantia-nigra-sn>. [cit. 2024-07-24].
- MYS 721TX. *L-DOPA-to-dopamine*. Online. In: Wikimedia Commons, 24.10.2013. Dostupné z: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=29175793>. [cit. 2024-07-24].