

Abstrakt

Cíle: Deficit limbálních kmenových buněk (LSC) patří mezi nejzávažnější onemocnění povrchu oka. Cílem dizertační práce bylo studium obnovy poškozeného povrchu oka. Proto byla zavedena limbální transplantace v experimentálním myším modelu. Byla provedena izolace LSC, přenos LSC a mesenchymálních kmenových buněk (MSC) izolovaných z kostní dřevě na nanovláknových nosičích na povrch poškozeného oka u myši a u králíků.

Materiály a metody: U myši BALB/c byla provedena syngenní, alogenní a xenogenní limbální transplantace. Po transplantaci byla sledována doba přežívání štěpů, imunitní reakce a účinky monoklonálních protilátek (mAb) (anti-CD4 a anti-CD8). Myší LSC byly rozděleny pomocí centrifugace na Percollovém gradientu a následně byla provedena analýza povrchových znaků LSC pomocí PCR a průtokové cytometrie. Na myším a králíčím modelu byly přenášeny LSC a MSC pomocí nanovláknových nosičů na poškozený povrch oka. Byl sledován *in vitro* růst buněk na nosičích, pooperační zánětlivá reakce a přežívání buněk na povrchu oka po přenosu nosičů.

Výsledky: K odhojení alogenních limbálních štěpů došlo promptně a v průběhu rejekce převažovala Th1 imunitní odpověď (IL-2, IFN- γ) mediovaná CD4⁺ buňkami a NO produkovaným makrofágy. U xenotransplantátů převažovala Th1 i Th2 (produkce IL-2, IFN- γ , IL-4 a IL-10) imunitní odpověď. Pomocí anti-CD4 monoklonálních protilátek došlo k signifikatnímu prodloužení přežívání alogenních a xenogenních štěpů. Frakce získané po izolaci z vrchní (40% Percoll) a spodní (80% Percoll) vrstvy gradientu obsahovaly buňky s vysokou expresí znaků kmenových buněk a side-population fenotypu. Spodní frakce obsahovala buňky s expresí znaků K12⁻/p63⁺ vykazující vlastnosti bližší kmenovým buňkám na rozdíl od vrchní frakce. Společný přenos LSC a MSC výrazně inhiboval zánětlivou reakci v myším modelu. Přenos MSC na nanovlákněch u králíků potlačil oxidativní stres rohovky způsobený poleptáním a podpořil proces hojení.

Závěr: U transplantace limbálních štěpů se neuplatňuje imunologická privilegovanost oka. Anti-CD4 monoklonální protilátky představují slibnou imunosupresi u alotransplantátů. Pomocí centrifugace na Percollovém gradientu lze získat dvě odlišné populace buněk vykazující vlastnosti kmenových buněk, ze kterých K12⁻/p63⁺ populace je bližší k LSC. Nanovláknové nosiče jsou vhodné pro léčbu poškozeného povrchu oka pomocí LSC a MSC v experimentálním modelu.

Klíčová slova: limbální kmenové buňky, deficit limbálních kmenových buněk, limbální transplantace, mesenchymální kmenové buňky, nanovláknové nosiče.