

Léčíme poraněnou míchu probuzením mechanismu embryonálního vývoje

1.2.2024 - Petr Andreas, Kristýna Kolovratová | 2. lékařská fakulta UK

Neurovědkyně Mgr. Kateřina Štěpánková studuje doktorské studium na 2. lékařské fakultě UK a pracuje v Centru rekonstrukčních neurověd v Ústavu experimentální medicíny AV ČR. Dostala se do letošního prestižního výběru talentovaných a úspěšných mladých lidí časopisu Forbes 30 pod 30.

Spolu s týmem se jí podařilo přivést ke srůstání přerušenu míchu potkanů, a i když je s možnostmi aplikace postupu na lidskou míchu zdrženlivá, dává tento objev určitou naději. V rozhovoru jsme si kromě axonů a integrinů, které vyvolávají jejich růst, povídali i o ženách ve vědě.

Jak jste se dostala k problematice poškození míchy a genové terapie?

To docela vtipná cesta. Studovala jsem molekulární biologii a biochemii organismu. Záhy jsem ale pochopila, že to není úplně pro mě: potřebuju větší obrázek problematiky, nejen soustředit se na roli konkrétního proteinu.

Hledala jsem laborku, která by mi jako bakalářské studentce dala šanci. Po asi pětadvaceti odmítnutích jsem přes Studijní informační systém našla paní docentku Jendelovou, která na přírodovědecké fakultě jako téma vypsalala Alzheimerovu chorobu. Už bylo zabrané, ale zrovna začínali nový projekt týkající se poranění míchy. A že prý se můžu přijít podívat. Já v té době věděla asi tolik, že poranění míchy je velký problém! Začala jsem načítat a zjistila, jak komplexní problematika to je, a už jsem u toho zůstala. A nelituju!

Jak jste se setkala s vedoucím vaší skupiny na Akademii věd Jamesem Fawcettem, který je kapacitou v oboru také na John van Geest Centre for Brain Repair na Cambridgeské univerzitě?

James se zná s bývalou ředitelkou Ústavu experimentální medicíny AV, podali společně grant a vytvořili Centrum rekonstrukčních neurověd. James pak vymyslel několik projektů - většina začala už na Cambridge a bylo je třeba zopakovat jinde. A začal oslovovat lidi...

O co tedy jde v genové terapii poranění míchy a jakou roli v ní hraje adeno-asociovaný virus?

Genová terapie spočívá v tom, že se snažíme vnést nějakou DNA informaci do buňky organismu. Vnášíme nový nebo nahrazujeme nefunkční gen. Virových vektorů, které se k tomu využívají, je celá řada: adenoviry, retroviry, adeno-asociované virové vektory a podobně - podle toho, od jakého viru je daný vektor odvozený.

Proč zrovna adeno-asociovaný virus?

Tyto vektory jsme zvolili proto, že jsou poměrně netoxické a nezpůsobují velkou imunitní odpověď. Zároveň umožňují možné dosáhnout dlouhodobé exprese. Přece jen jde o míšní poranění, je to nervový systém a my potřebujeme, aby neurony produkovaly integrin - klíčový receptor na buněčné membráně - docela dlouho, tak aby axony měly čas dorůst, kam potřebujeme. Také je důležité, že tyto virové vektory se neintegrují do genomu a zůstávají mimo buněčné jádro a nejedná se tak o editaci genomu. Takže i eticky je to schůdné.

Ganglium zadních rohů míšních. Červeně integrin, zeleně jeho aktivátor kindlin 1.

A jak se tedy stane, že mícha dorůstá?

Vycházíme z vývoje centrálního nervového systému. Pro vývoj buněk je důležitá buněčná migrace a v ní zmíněné integriny. Ty se vážou na mezibuněčnou hmotu a díky tomu buňka vlastně může migrovat.

Růst axonů – výběžků neuronů –, o který nám při regeneraci míchy jde, je typem buněčné migrace. Snažíme se dostat do senzorických neuronů jeden konkrétní integrin, $\alpha 9$. Ten se pak transportuje do axonů, ty se navážou na extracelulární matrici, která je v oblasti léze hodně up regulovaná (*regulovaná tak, aby se zvýšila odpověď na stimulus, pozn. red.*).

Proč axony neregenerují samy?

Ony regenerují, ale spontánní regenerace není úspěšná. Představme si axon, který nám vede z oblasti kyčle nahoru. I když část axonu od poranění nahoru degeneruje, axon i neuron jsou stále živé a mají určitou kapacitu regenerovat. Membrána axonu – její část, která nedegeneruje a je spojená s neuronem – se ovšem zavře a vytvoří se takzvaný retrakční bulb (*neorganizovaná síť vláken, pozn. red.*).

My se snažíme, aby se tento retrakční bulb znovu „rozhýbal“ k regeneraci. V oblasti léze se vytváří obrovská jizva, podobná klasické jizvě na kůži od říznutí. Funguje ale i jako biochemická a mechanická bariéra. Když na ni axon narazí, nemůže se už vázat na mezibuněčnou hmotu, která se tam up regulovala, a růst dál.

Takže máme dvě možnosti, jak se k poranění míchy postavit: Buď můžeme odstranit jizvu jako takovou, na to máme jiný projekt. Anebo donutit axony, aby exprimovaly (*produkovaly, pozn. red.*) ve své membráně právě nějaký integrin. Ten se naváže na mezibuněčnou hmotu a umožní tak růst axonů i přes oblast léze. A to je celá ta myšlenka.

Odkud se integriny berou?

Integriny se podílejí na vývoji centrální nervové soustavy – navádějí axony, aby rostly správným směrem. My jsme využili zmíněný konkrétní integrin, protože víme, že v oblasti léze je up regulovaný právě ten komponent mezibuněčné hmoty, který je důležitý ve vývoji v kombinaci s ním. Snažíme se tělo naučit znovu něco, co umělo před ukončením vývoje.

Dokdy v sobě integriny přirozeně máme, souvisí s ukončením růstu míchy u dospělého člověka?

Integriny přestáváme potřebovat ještě daleko dříve: během embryonálního a postnatálního vývoje. Při narození už je mícha plně vyvinutá, axony si našly cestu, mozek s míchou je propojen. My se snažíme rekapitulovat embryonální mechanismus vývoje, byť jde jen o jednu molekulu.

Reakce na poranění připomíná vývoj – s rozdílem, že integrin, protein, který se při vývoji normálně exprimuje, je v dospělé centrální nervové soustavě zastoupen minimálně.

Jak fungovala léčba potkanů?

Co se týče animálního modelu, soustředili jsme se na citlivost především zadních končetin. Namodelovali jsme poranění v oblasti torakální páteře. Injikovali jsme virový vektor do dorzálních ganglií v lumbální části. Senzorické neurony začaly produkovat náš integrin, transportovaly ho do axonu.

Axony, které byly přerízlé, mají nesmírně dlouhou projekci, jdou ze zad směrem nahoru až do mozku.

Po poranění zůstaly v oblasti léze v neregenerujícím stavu. Ale díky integrinu mohly lézi přemostit, vytvořená mezibuněčná hmota jim poskytla jakési lešení.

Ilustrační fotografie (Shutterstock).

Jak kvalitně axony přerostou? Jsou tam nějaká rizika nebo omezení?

Pozorovali jsme, že axony lézi krásně přerostly. Pod lézí jsem viděla okolo dvou tisíc axonů, měli jsme je označené barevně, povedlo se to tedy asi u 50 procent z nich. Ale ani během vývoje to není perfektní.

Určitou překážkou může být, že axony při regeneraci rostou v mírně jiné dráze, než by fyziologicky měly. Na chování zvířat se to ale nijak neprojevalo. Při behaviorálním testování krásně odpovídala na stimuly, odtahovala se, opravdu cítila, co se děje, jejich citlivost se měnila.

Takže potkani mohou cítit trochu jinak než ve zdravém stavu?

Vrátili se na takřka stejné hodnoty jako před poraněním, ale možnost, že budou mít třeba posunutý práh citlivosti, samozřejmě existuje. Ale cítit málo je určitě lepší než necítit vůbec – udělali jsme první krok!

Jak dlouho vznikala vaše oceňovaná studie na *BioRxiv*, v níž jste genovou terapii poranění míchy představili?

Nápad vznikl už v roce 2009 v Cambridge. Použili model periferního nervu, porušili ho a sledovali, jestli se zregeneruje. To bylo publikováno 2016. Naše studie započala v Praze v roce 2017.

Viry nám zpočátku vůbec nefungovaly, neměli jsme žádnou expresi. Museli jsme vyměnit virové vektory, táhlo se to strašně dlouho. Výsledky za Prahu jsme poprvé prezentovali v roce 2022 na konferenci ve Francii. A některé experimenty stále doděláváme, trvají pokaždé tři až čtyři měsíce. Nyní nám vrátili jednu studii, znova ji budeme posílat v dubnu. Je to taková never ending story.

Zeptám se nyní na téma, o kterém se v současnosti diskutuje na univerzitách a v médiích, ženy ve vědě.

Situaci žen ve vědě vnímám z trochu jiné perspektivy, než se o ní většinou hovoří. Osobně nemám pocit znevýhodnění. Dostala jsem všechny možné příležitosti: Když jsem si podala grant, tak jsem ho dostala, a když jsem neuspěla, dostala jsem konstruktivní kritiku, se kterou jsem třeba i souhlasila. Ve svém stádiu nepociťuji, že bych neměla podporu, jakou bych si přála – naše oddělení je ovšem hlavně ženský kolektiv, ve kterém možná více držíme při sobě.

Jiné velké laboratoře a centra ale řídí většinou muži a svět je nastavený směrem k tomu. I když se to mění. A mluvit o tom je prvním krokem k úspěchu. Na grantech se nyní snaží o gender equality, rovnější zastoupení žen a mužů.

Absolvovala jste řadu stáží na západních univerzitách, máte nějaké zajímavé postřehy?

Ve Spojených státech jsem se zúčastnila setkání Women in SCI pořádaného Society for Neuroscience. Bavili jsme se o tom, jak skloubit rodinu a děti s vedoucí pozicí v nějaké laboratoři. Většina žen se vyjádřila, že nemají žádný vzor, ke kterému by se mohly vztahovat. Vysoce postavené ženy jsou – to cítuji, není to moje zkušenost – buď extrémně přísné, osobní život nemají a vyžadují totéž po svých zaměstnancích, anebo na vedoucí pozici nejsou.

Já jsem ale vždycky přemýšlela o otázce, jak jsou na tom muži ve vědě? Jsou jinak nastavení? Opravdu mají tak šťastný život? Daří se jim to skloubit? Nemyslím si, že svět je černobílý... Když někdo chce mít rodinu, věnovat se jí a zároveň mít vědeckou kariéru, nebude to mít jednoduché.

<https://www.lf2.cuni.cz/clanky/lecime-poranenou-michu-probuzenim-mechanismu-embryonalniho-vyv-oje>