

A microscopic image of several spherical stem cells with a highly textured, bumpy surface. The cells are illuminated with a blue light, giving them a vibrant blue appearance. The background is a soft, out-of-focus blue.

Kmenové buňky

Jan Voldřich

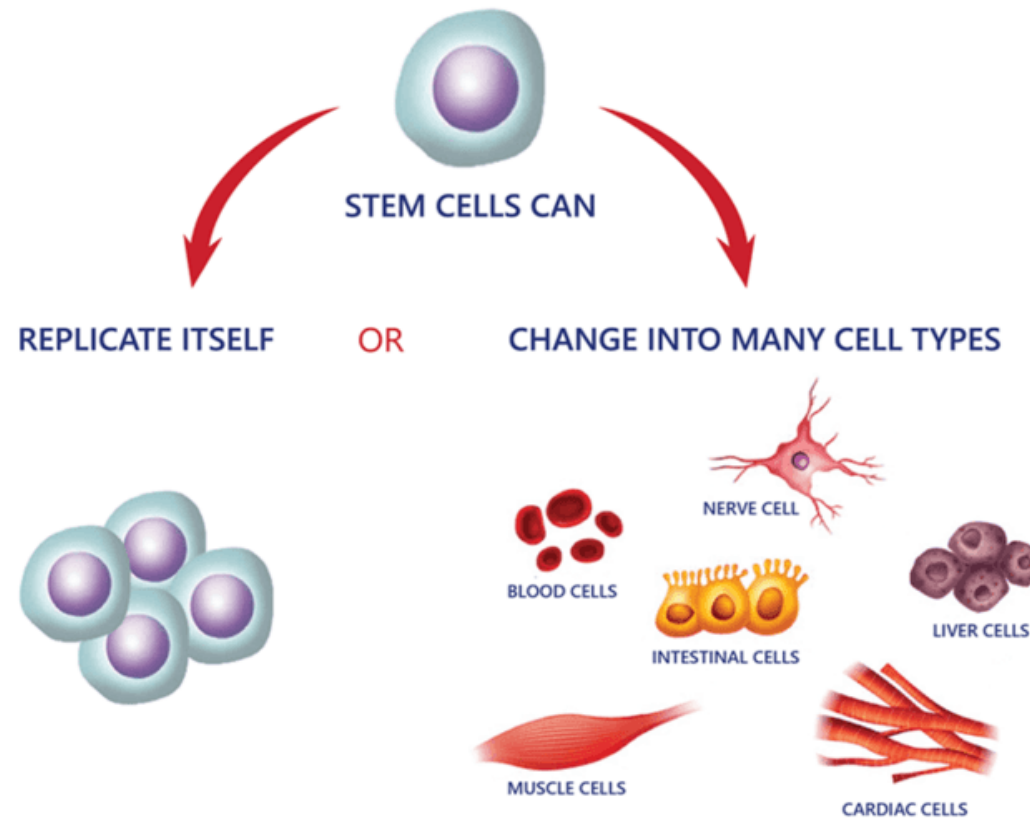
ÚOCHB AVČR

VŠCHT

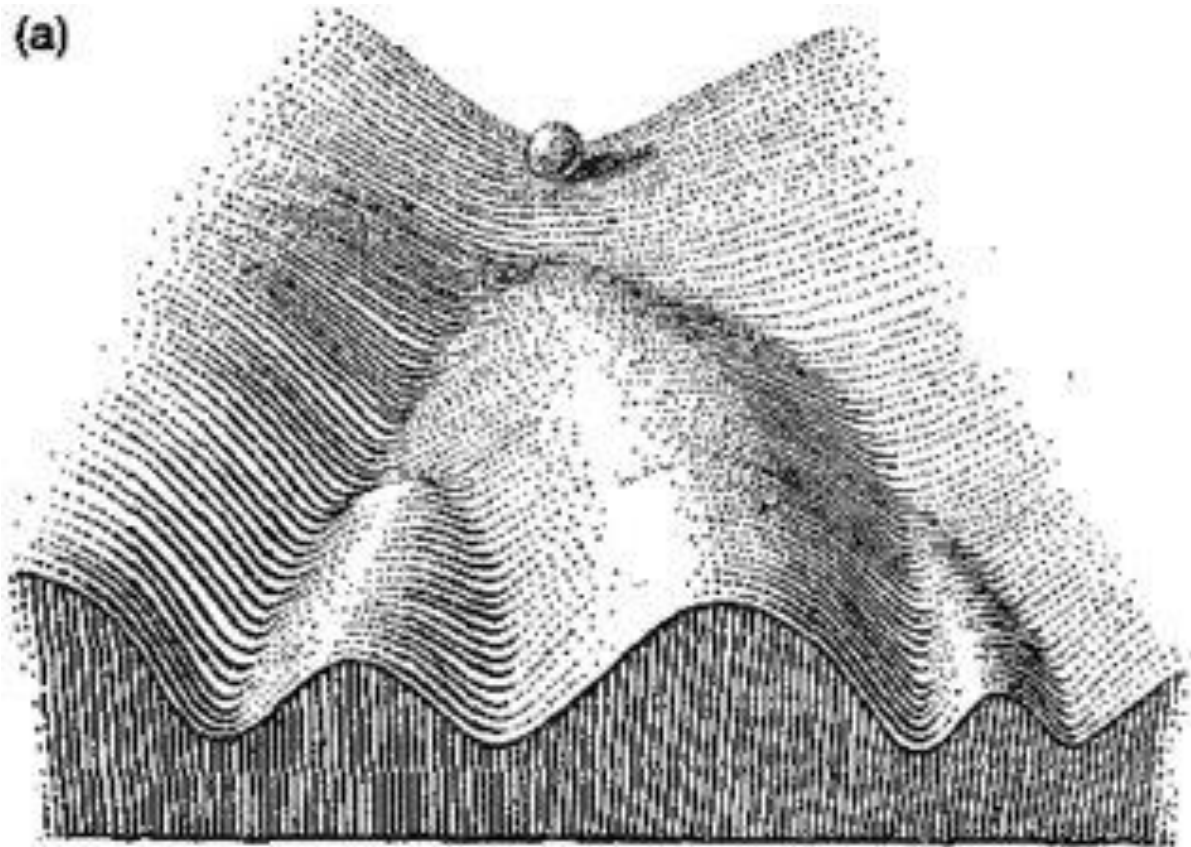
Základní vlastnosti

Samoobnova – mitóza (symetrické dělení)

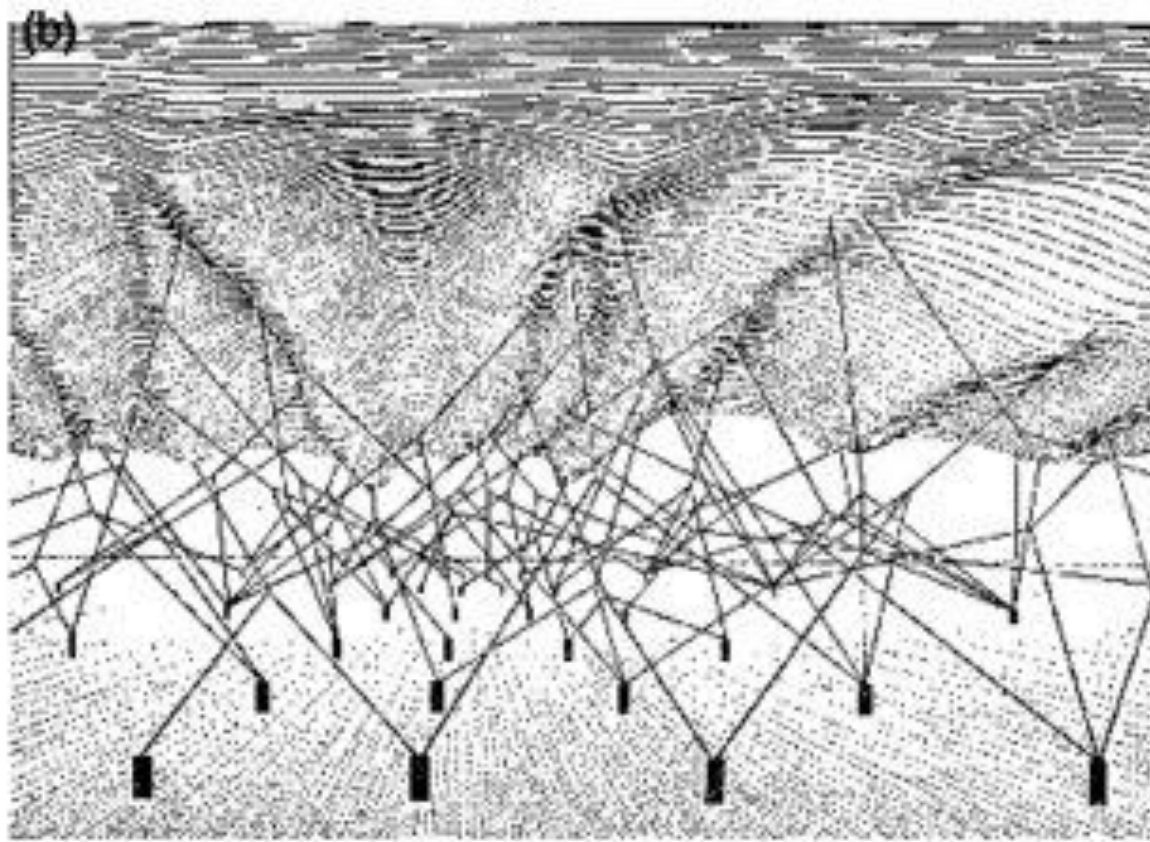
Diferenciace ve více buněčných typů, cca 200 (asymetrické dělení)



(a)



(b)



Conrad Waddington – Epigenetic landscape (1957)

Základní druhy kmenových buněk

Embryonální (ESC)

Z pupečnickové krve

Adultní (ASC) – kostní dřeň (hematopoetické, mesenchymální), adipózní.. (cca 20)

Indukované pluripotentní (iPSC)

multipotentní x pluripotentní

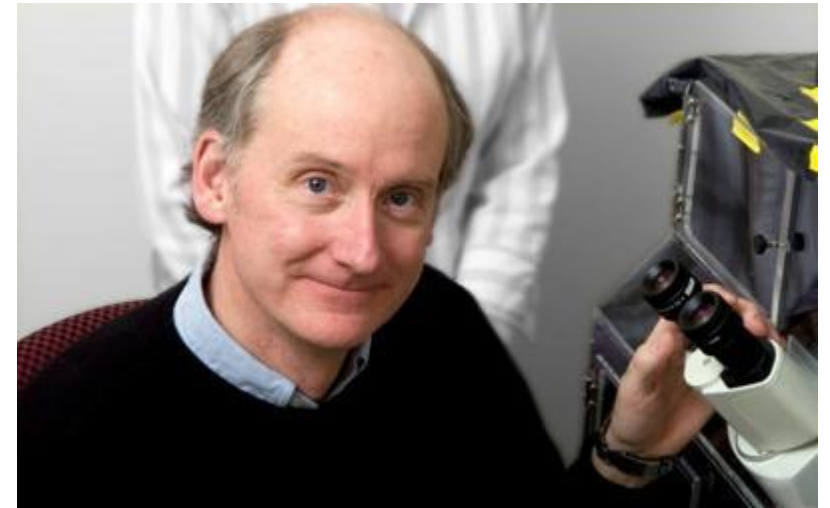
Embryonální KB

1981 – myší embrya – *in vitro*

1998 – lidská embrya

Dr. James Thomson, Wisconsin university

Dr. John Gearhart, Johns Hopkins university



„Pokud vám z výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách není alespoň trochu nevolno, pak jste o něm ještě dostatečně nepřemýšleli.“

(J.Thomson, New York Times, 2007)

Zdroje embryonálních KB

IVF (nadbytečná, nebo nevhodná – ověřeno
preimplantační diagnostikou – jen v některých zemích)

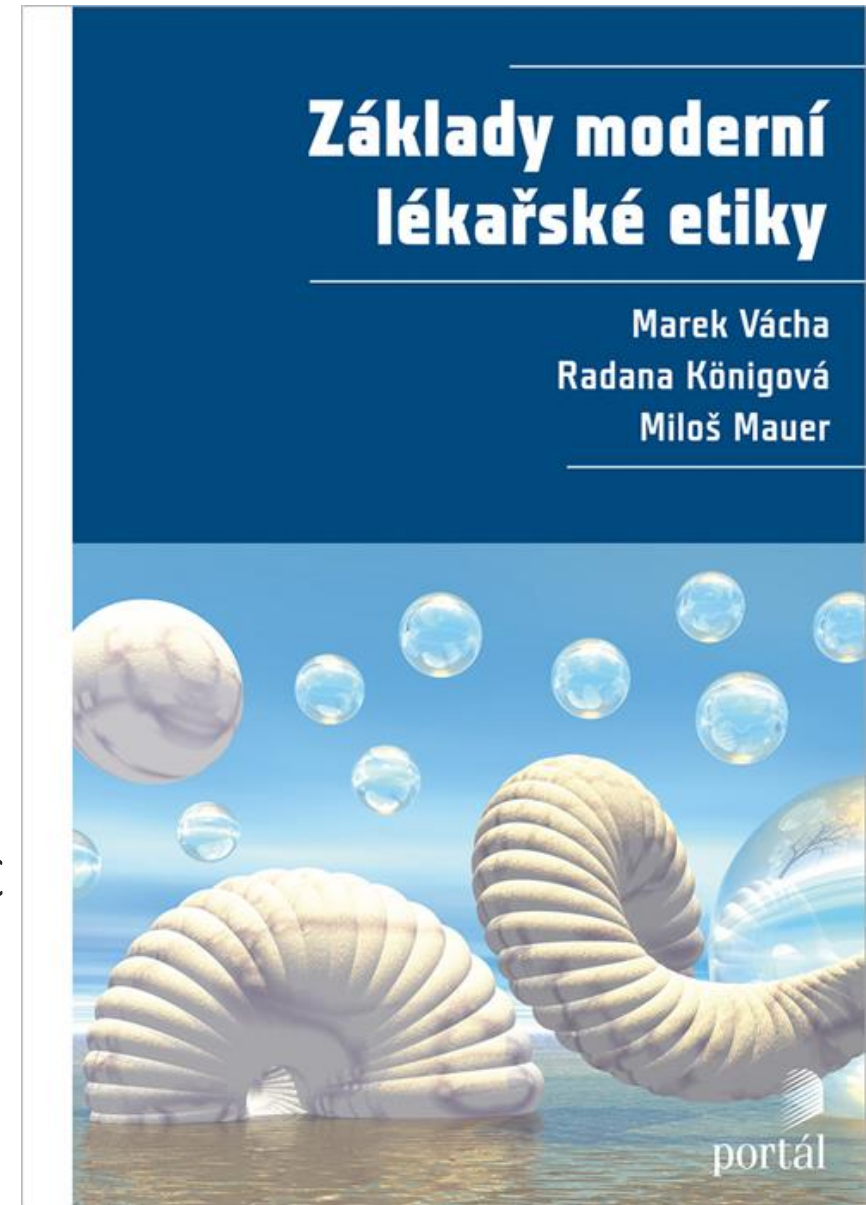
Potratové kliniky

Etika??

2001 – G.W. Bush – omezení státní podpory výzkumu ESC

2004 – Kalifornie – 3 mld. USD

2009 – B. Obama – opět státní podpora



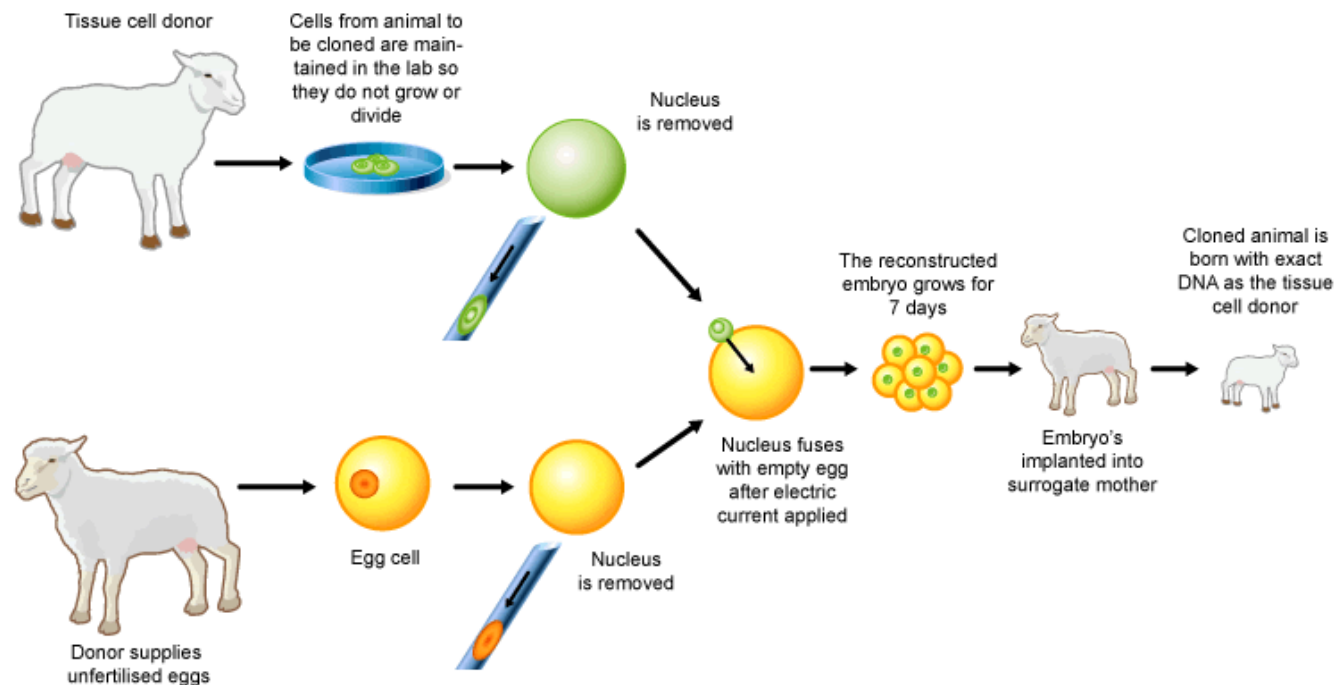
Jaderný přenos somatických buněk (SCNT)

Terapeutické x Reprodukční klonování

1996 – Dolly

2018 – Čína – 2 klony makaků

2019 – Čína – 5 klonů opic, následně editované CRISPRem (metoda He Jiankui), modely různých onemocnění



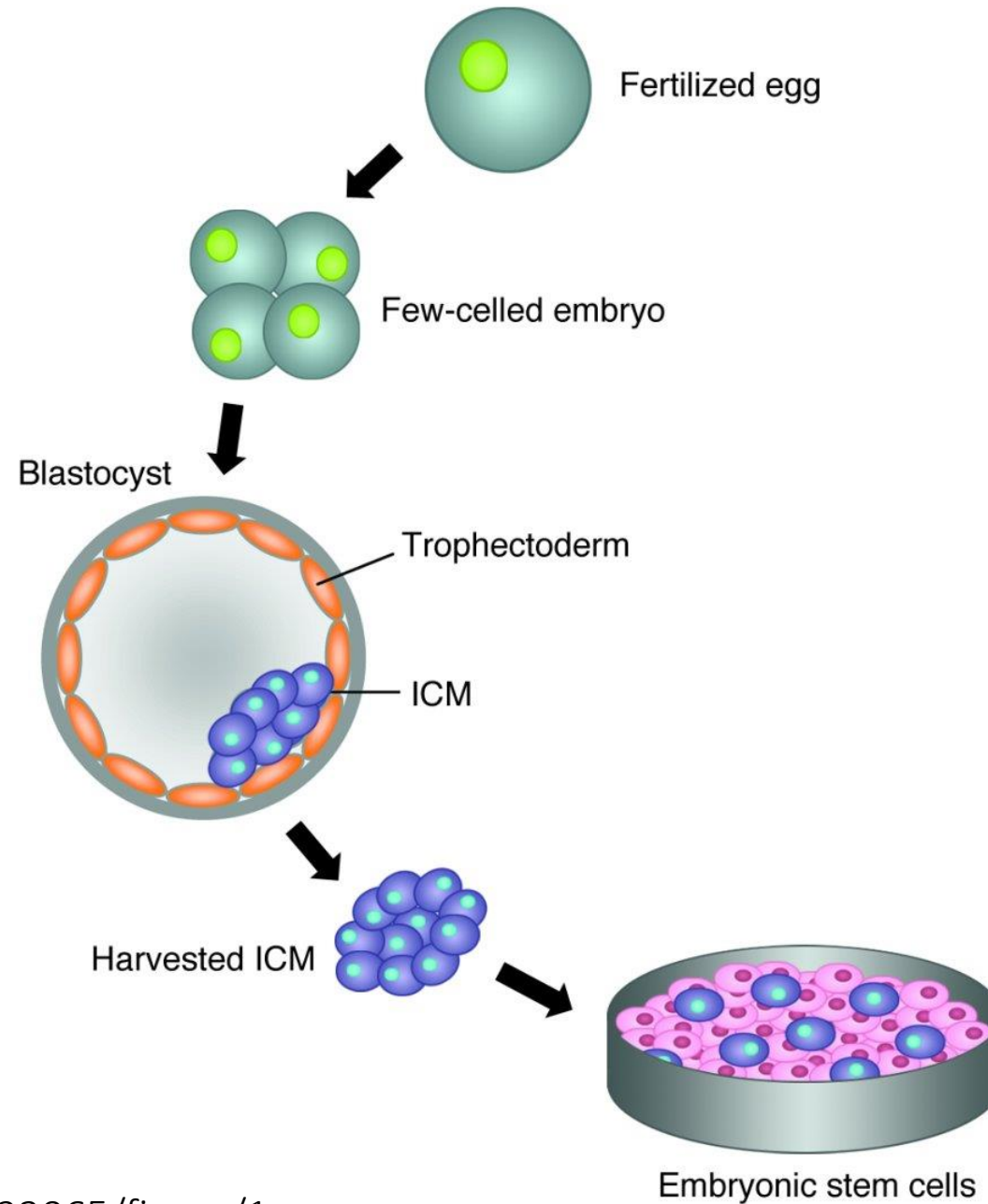
Pro

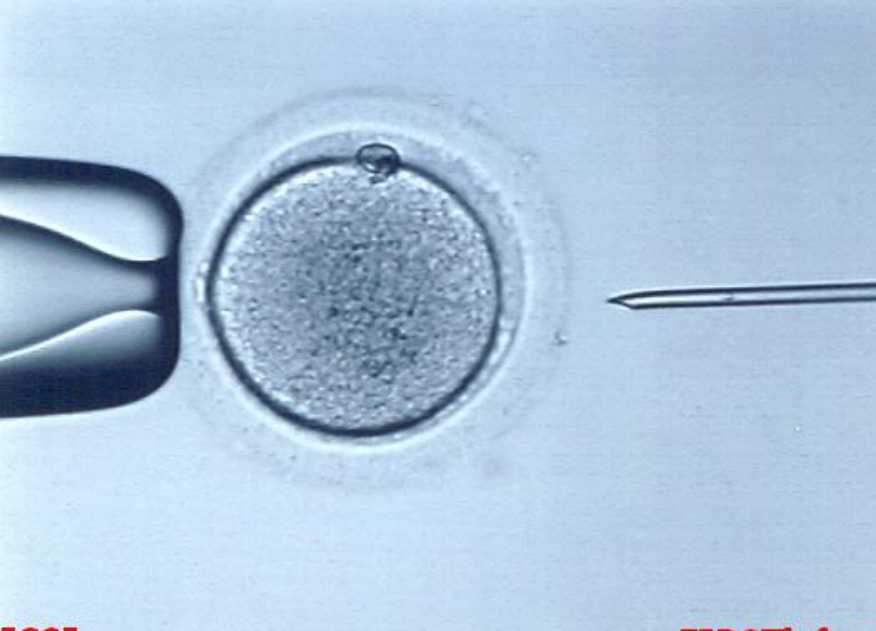
- Embryo nevzniklo „přirozeně“ (fúzí spermie a oocyty), a nikdo jej nezamýšlí implantovat do dělohy
- celý útvar – uprázdněný oocyt + vložené jádro somatické buňky vůbec nemusíme nazývat embryem
- V budoucnu se nám snad podaří signály z oocyty napodobit a použijeme pouze buňku kůže a obejdeme se bez oocyty...
- ... nastal by pak nějaký problém?

Proti

- Je jedno, jak embryo vzniklo, jakmile je to již embryo, má stejný morální status bez ohledu na okolnosti vzniku
- každé klonování je reprodukční
- argument kluzkého svahu, „slippery slope“: pokud povolíme terapeutické klonování, je těžko představitelné, že někdo nezkusí naklonovaná embrya použít pro reprodukční klonování

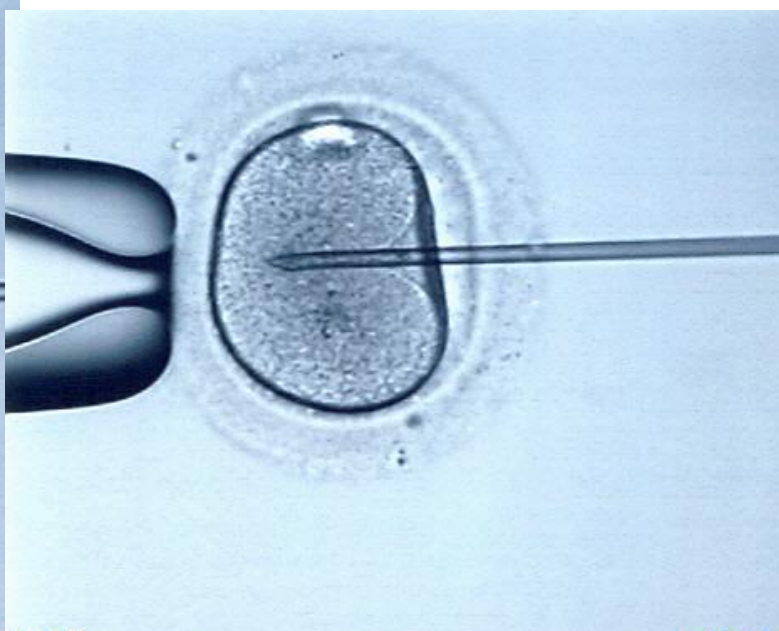
Isolate ESC





ICSI

FIRSTivf.net



ICSI



FIRST Fertilized Egg

FIRSTivf.net



2-Cell Embryo

FIRSTivf.net



4-Cell Embryo

FIRSTivf.net

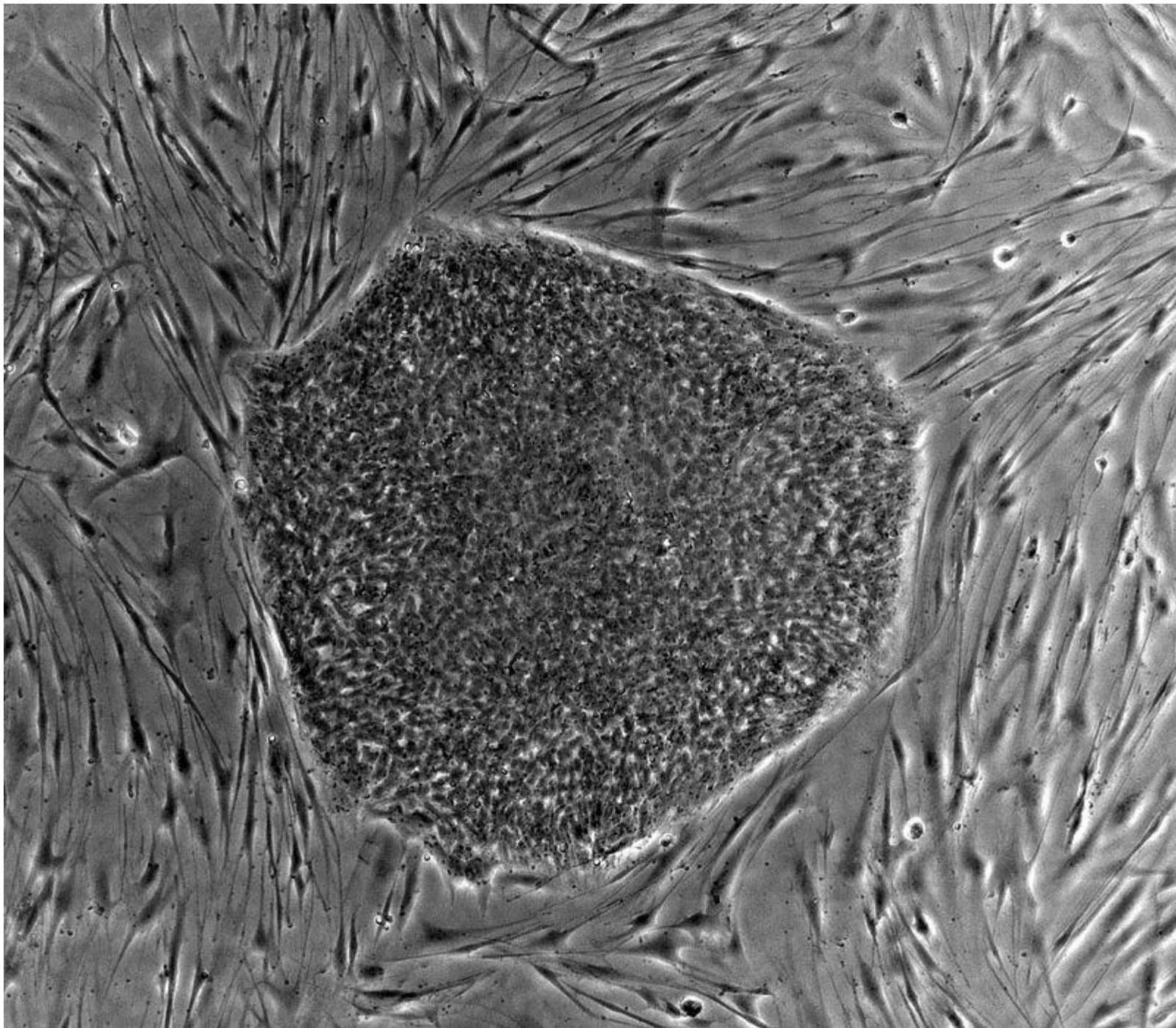


8-Cell Embryo

FIRSTivf.net



https://www.cirm.ca.gov/sites/default/files/files/about_stemcells/Stem_Cell_Day_Talk_without_videos_zs.ppt



https://www.wikiskripta.eu/w/Kmenov%C3%A9_bu%C5%88ky#/media/File:Human_embryonic_stem_cell_colony_phase.jpg

KB z kostní dřeně

1956 – leukemický pacient

Hematopoetické KB, mesenchymální KB

Chemoterapie

Není regulováno FDA ?

Srdeční tkáň

Zvířecí modely - úspěšné

Únor 2012 – klinické testy - izolace KB ze srdce pacienta po infarktu, růst *in vitro*,
navrácení – zlepšení funkčnosti kardiomyocytů

Zatím neschváleno FDA

Kožní tkáň

2017 – Italský tým (Michele De Luca)

7 letý pacient s nemocí motýlých křídel (mutace genu *laminin-332*) – ztráta 80% kůže

Izolace epidermálních kmenových buněk z jeho kožní tkáně, retrovirální transdukce nemutovaného genu, růst buněk *in vitro*, transplantace

Úspěšné!

Zatím neschváleno FDA

KB z pupečnickové krve

Srovnatelné s buňkami kostní dřeně, ale méně imunogenní

Je možné zamražení po narození dítěte – možné budoucí použití.. cena?

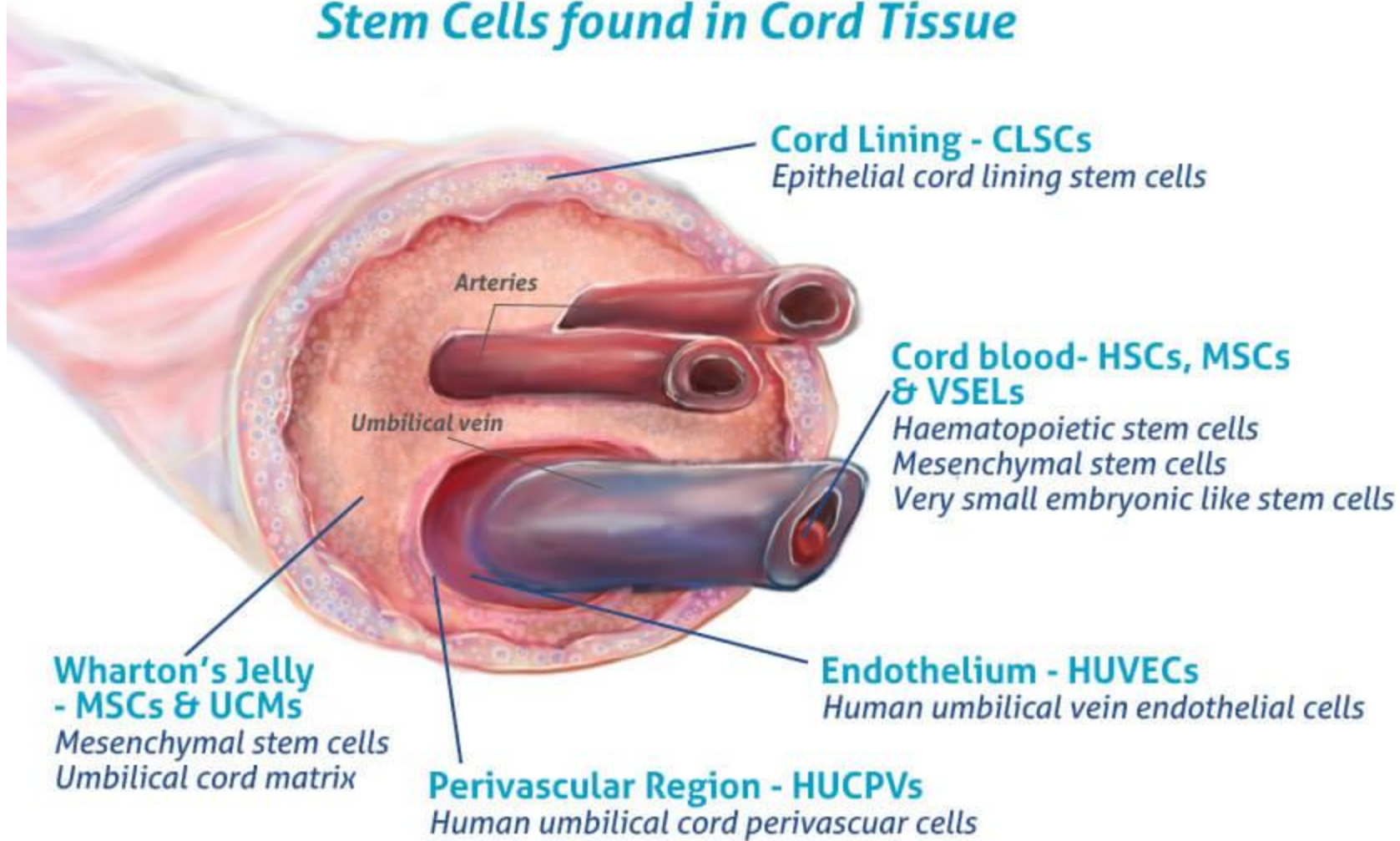
Klinické testy fáze II - spastická mozková obrna – 63 dětí – podání vlastních kmenových buněk z umbilikální krve, zlepšení motorických schopností

8 FDA schválených terapií

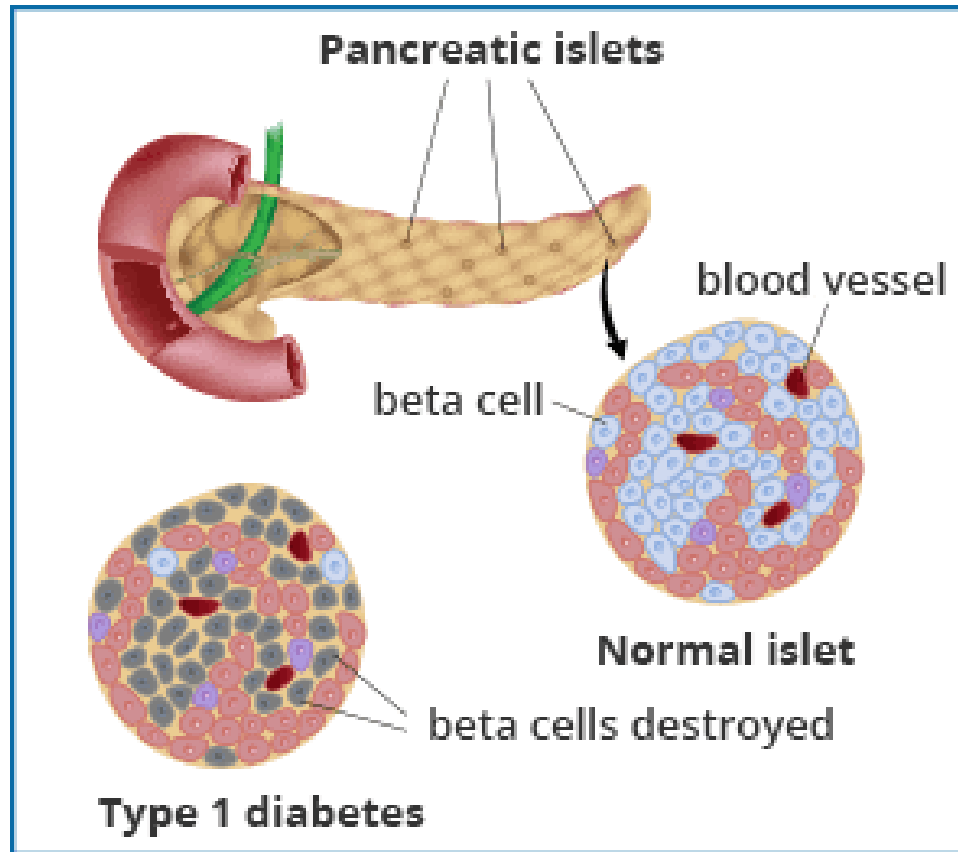
První – 2011 - Hemacord – poruchy krvetvorby, alogenní!



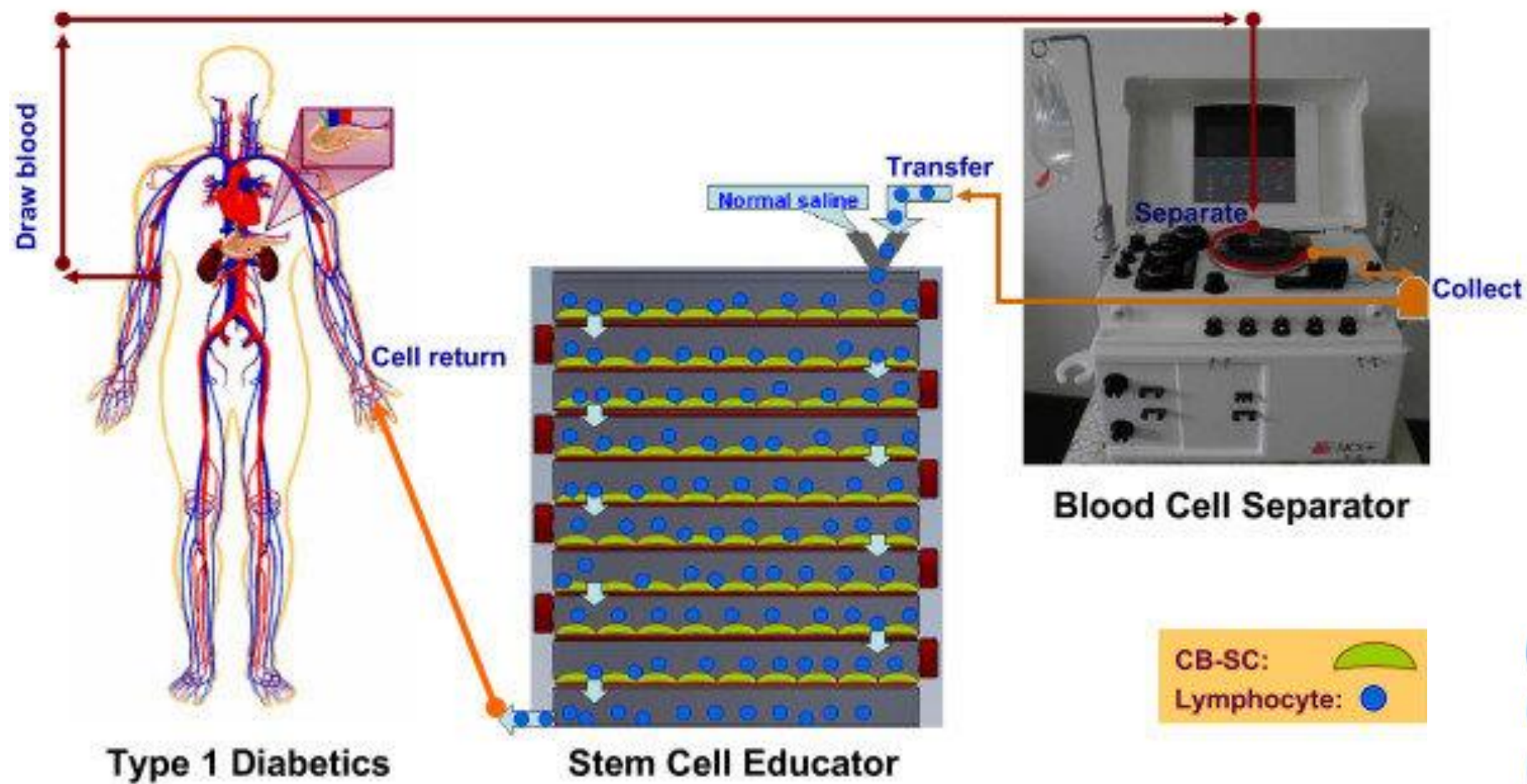
Stem Cells found in Cord Tissue

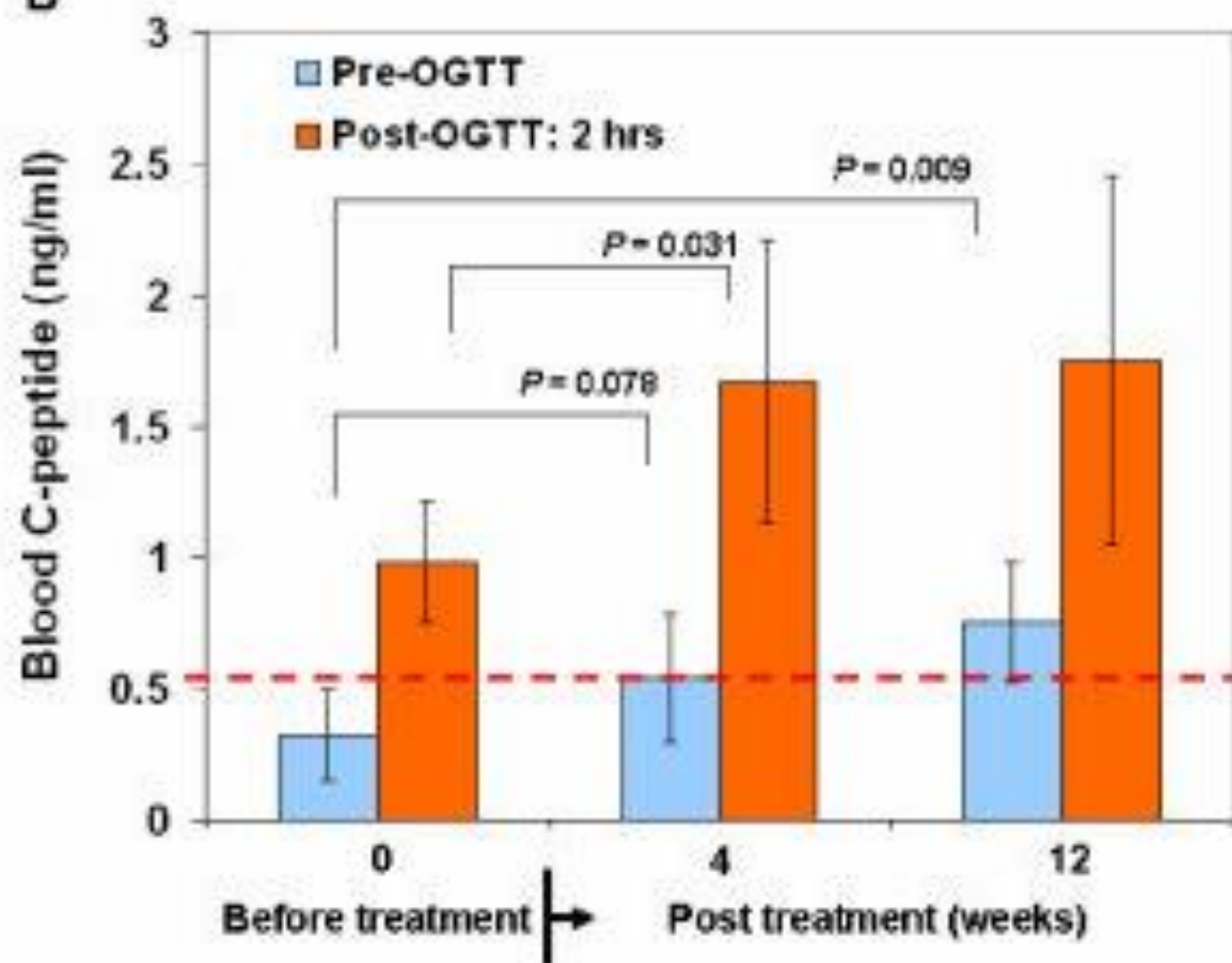


Diabetes mellitus I



Yong Zhao



B

Adipózní KB

Mesenchymální KB z tuku

Multipotentní – kostní, chrupavky, endothelie, adipocyty, myocyty...

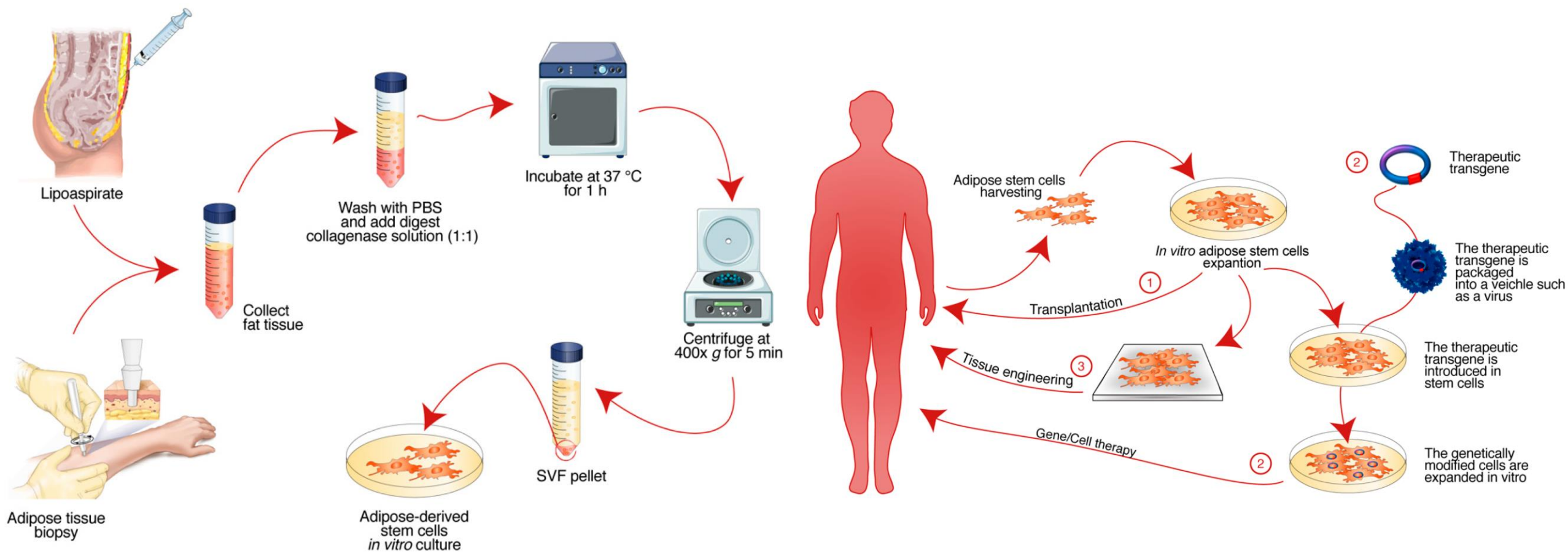
Imunosupresivní efekt – exkrece růstových faktorů, regulační T-lymfocyty – autoimunitní onemocnění

Liposukce méně invazivní než např. odběr kostní dřeně

Klinické testy – regenerace tkání, protizánětlivé účinky, léčba bolesti kloubů

FDA – bez povolení

Jižní Korea – 2012 – Společnost Anterogen - léčba Cupistem – pístěl během Crohnovy choroby, záněty kloubů, autologní léčba



Kvazilegální kliniky v USA vs. FDA

570 klinik v USA nabízí FDA neschválené terapie

Adipózní KB, autologní léčba – až 61% terapií KB (2016)

Zbytek – hlavně hematopoetické KB z kostní dřeně

Léčba zánětlivých onemocnění kloubů, bolesti

Ale i Parkinson, roztroušená skleróza, poškození míchy, obrna, proti stárnutí, zvětšení penisu,... - ???

Bezpečnost – možnost vzniku nádorového bujení!

2017 - U.S. Stem Cell Clinic, FL – KB injektovány do očí 3 starších žen s makulární degenerací - slepota

Poptávka – někteří lidé jsou ochotní platit tisíce dolarů za léčbu

Postoj FDA?

2017 – Guidance for industry - pravidla – transplantace tkání a buněk pouze na místo, ze kterého byly původně izolovány, minimální mimotělní manipulace

Kliniky mají 3 roky na přizpůsobení se novým pravidlům

Prohlášení FDA - nedostatek financí a zaměstnanců kontrolujících všechny kliniky?

3 roky na sledování vývoje trhu a nejvíce poptávaných terapií

<https://www.amazon.com/Stem-Repair-Cream-Alex-Cosmetic/dp/B00V3L7K76>

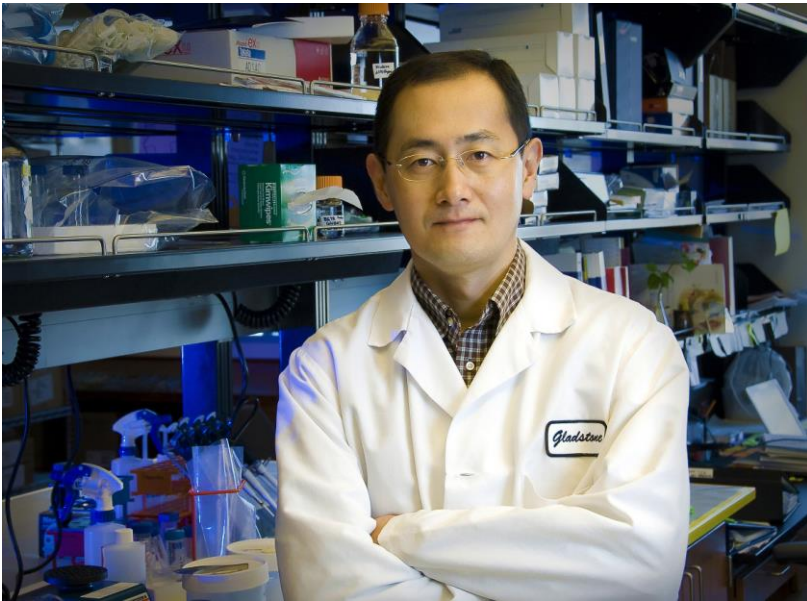
ALEX
COSMETIC
STEM CELL
REPAIR CREAM

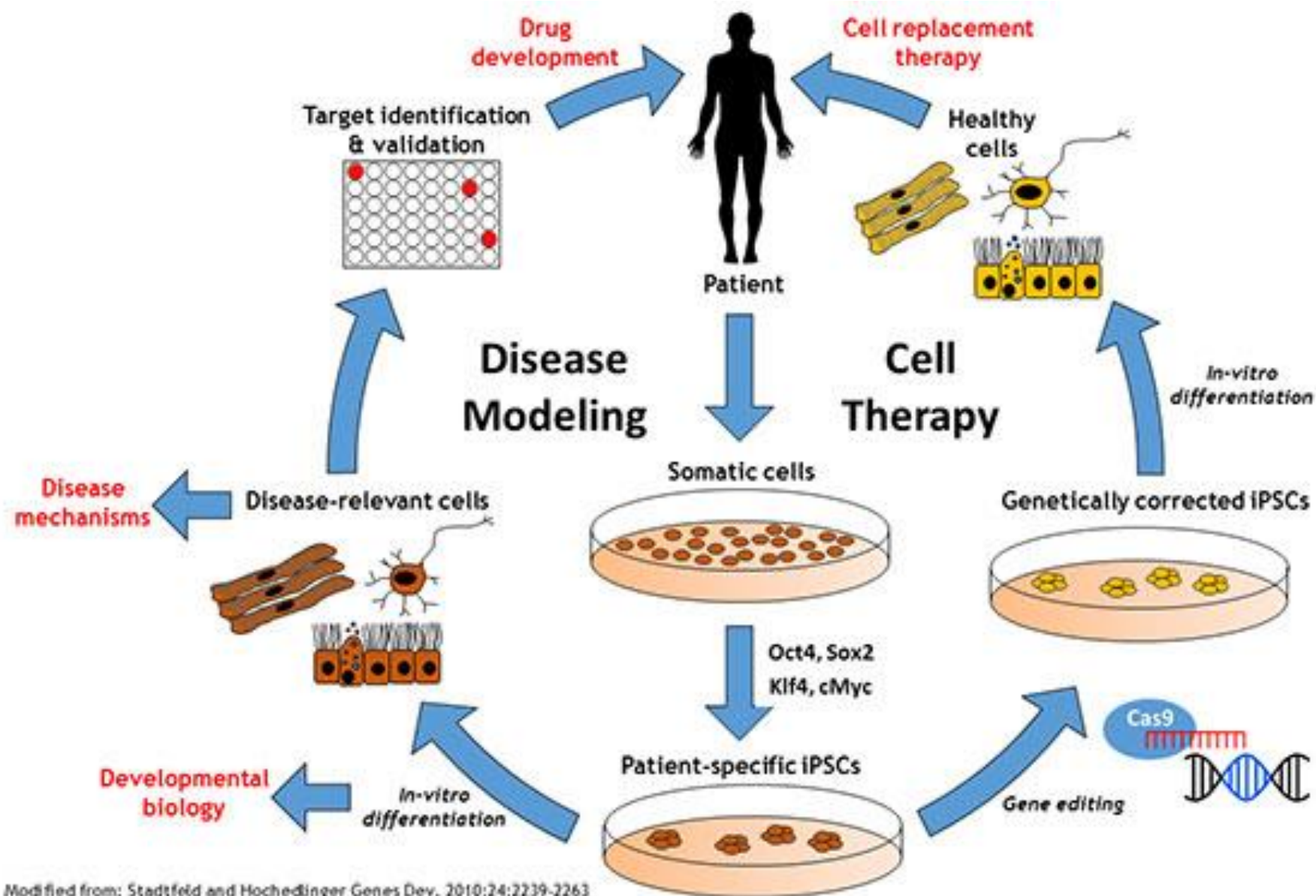
RENEW
[COSMECEUTICALS]

Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

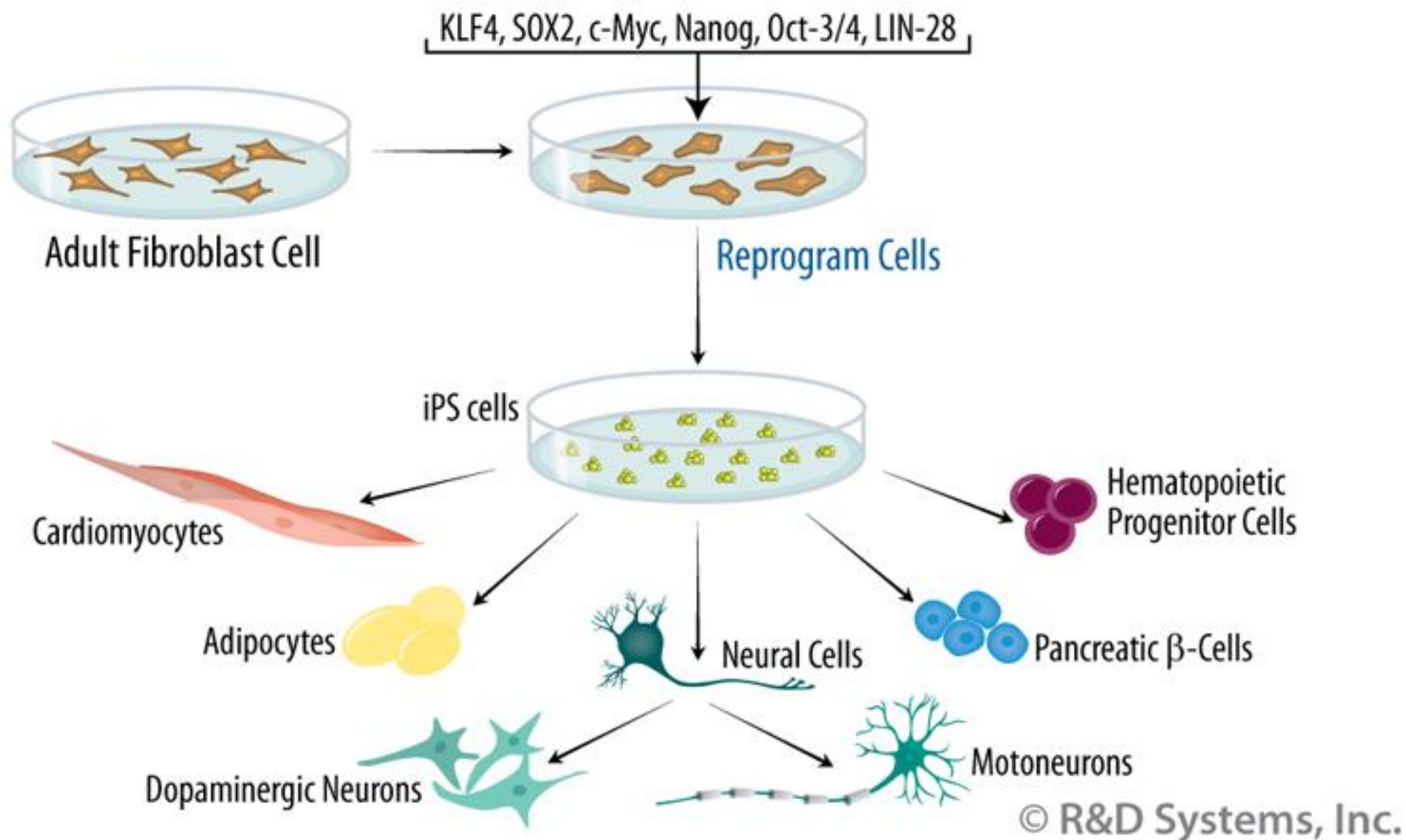
2006 - Shinya Yamanaka, Kazutoshi Takahashi

2012 – Nobelova cena za fyziologii a medicínu (+ Sir John Gurdon)





Modified from: Stadtfeld and Hochedlinger *Genes Dev.* 2010;24:2239-2263



Objev

Testováno 24 transkripčních faktorů aktivních v ESC

Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc

z 20000 genů stačí pouze 4 k indukci pluripotence!

„Vzácný příklad vědeckého objevu, který může vyřešit víc etických problémů, než vytvoří.“

(Tom Douglas, University of Oxford)

Použití

Modelové buňky pro výzkum patologie nemocí a jejich léčby (Parkinson, DM 1. typu, Alzheimer, ...)

Vývoj léčiv (farmakologie, toxicita)

Regeneativní medicína

Výzkum diferenciací

Genové terapie

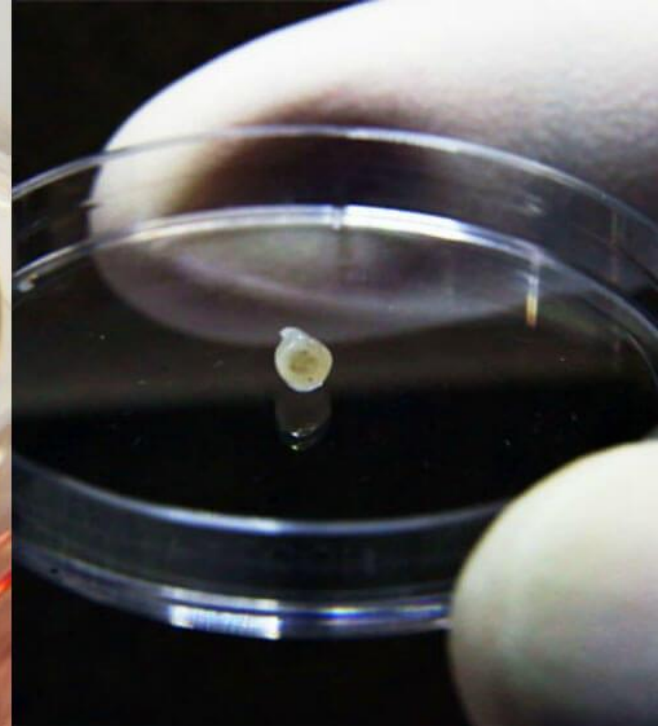
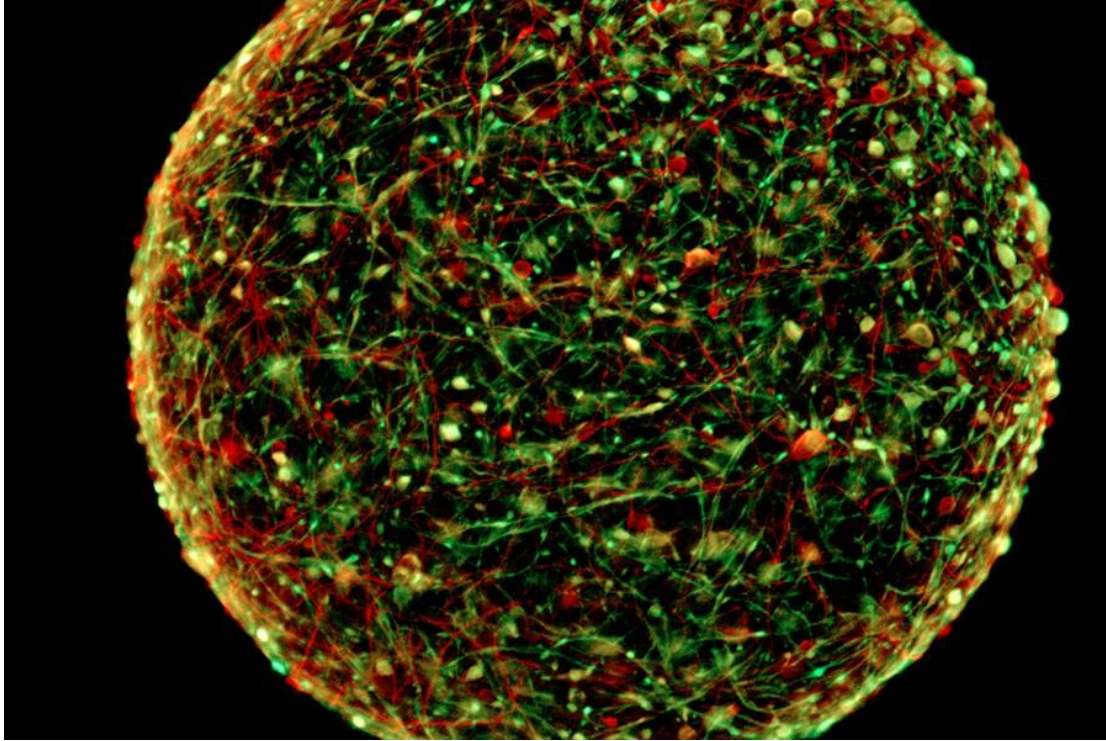
Myši – úspěšná terapie srpkovité anémie

2014 – Takahashi – iPSC ze 70ti leté pacientky s makulární degenerací reprogramovány na retinální buňky, zlepšení vidění

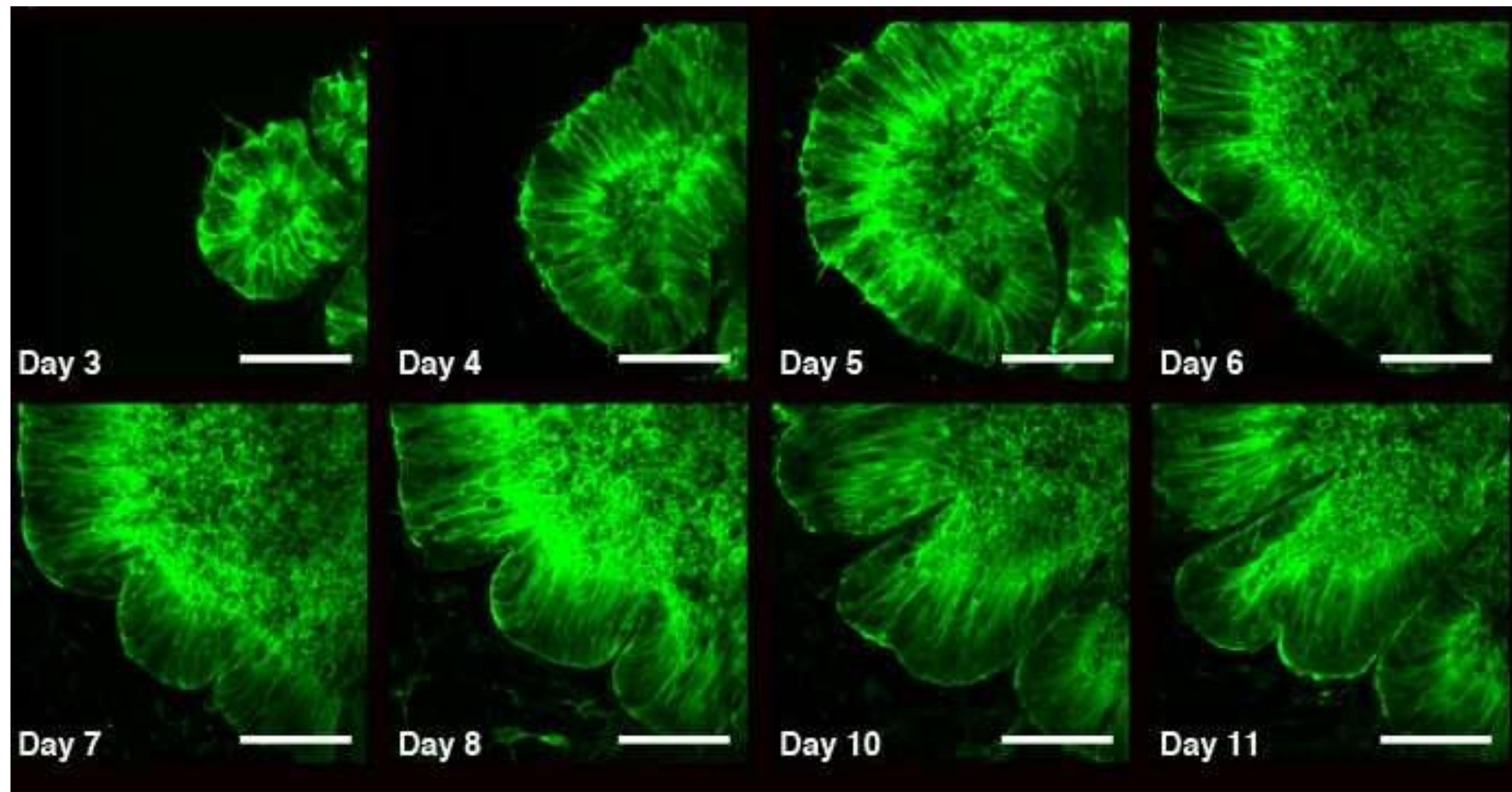
2019 – Zvířecí modely – prevence slepoty u makulární degenerace, postup do klinických studií

Organoidy

Minimozky

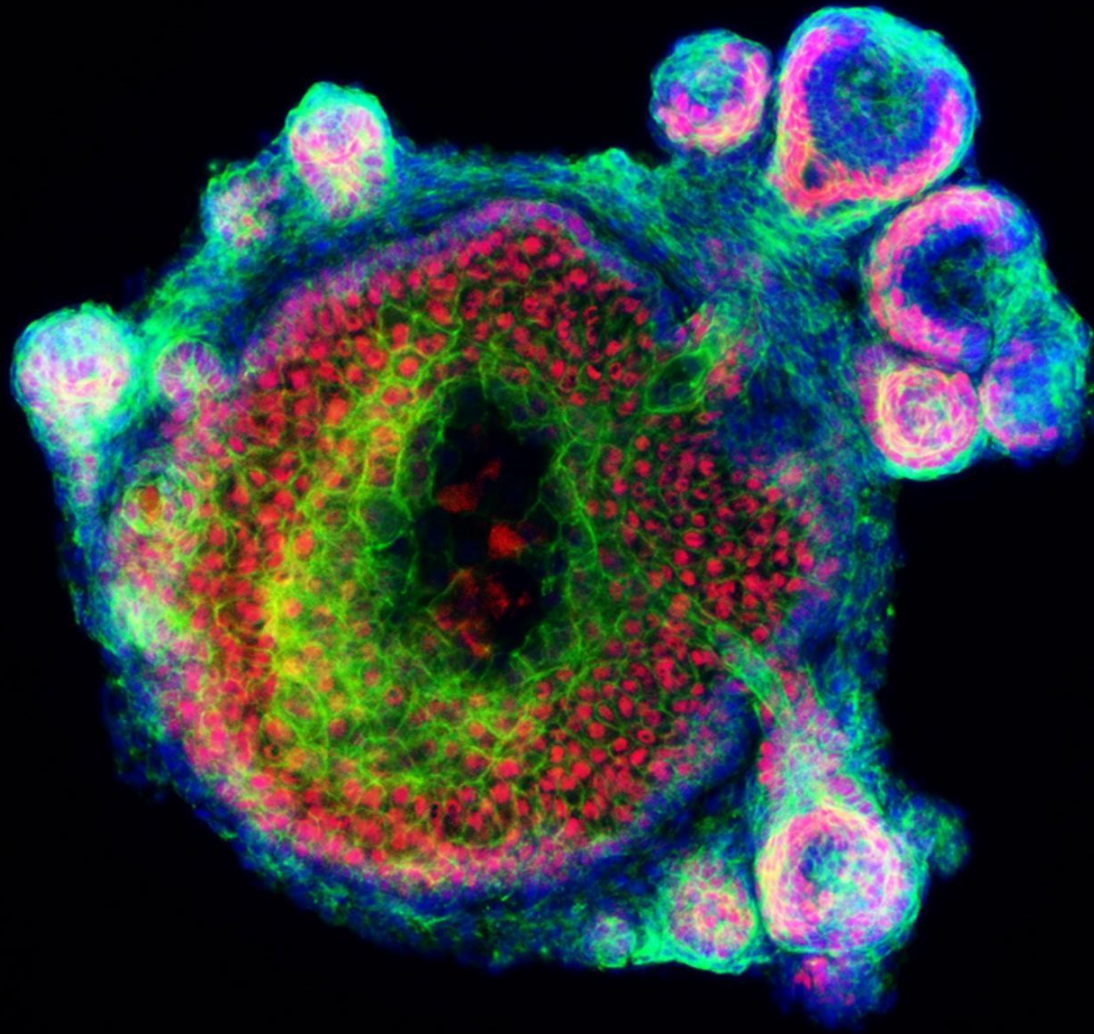


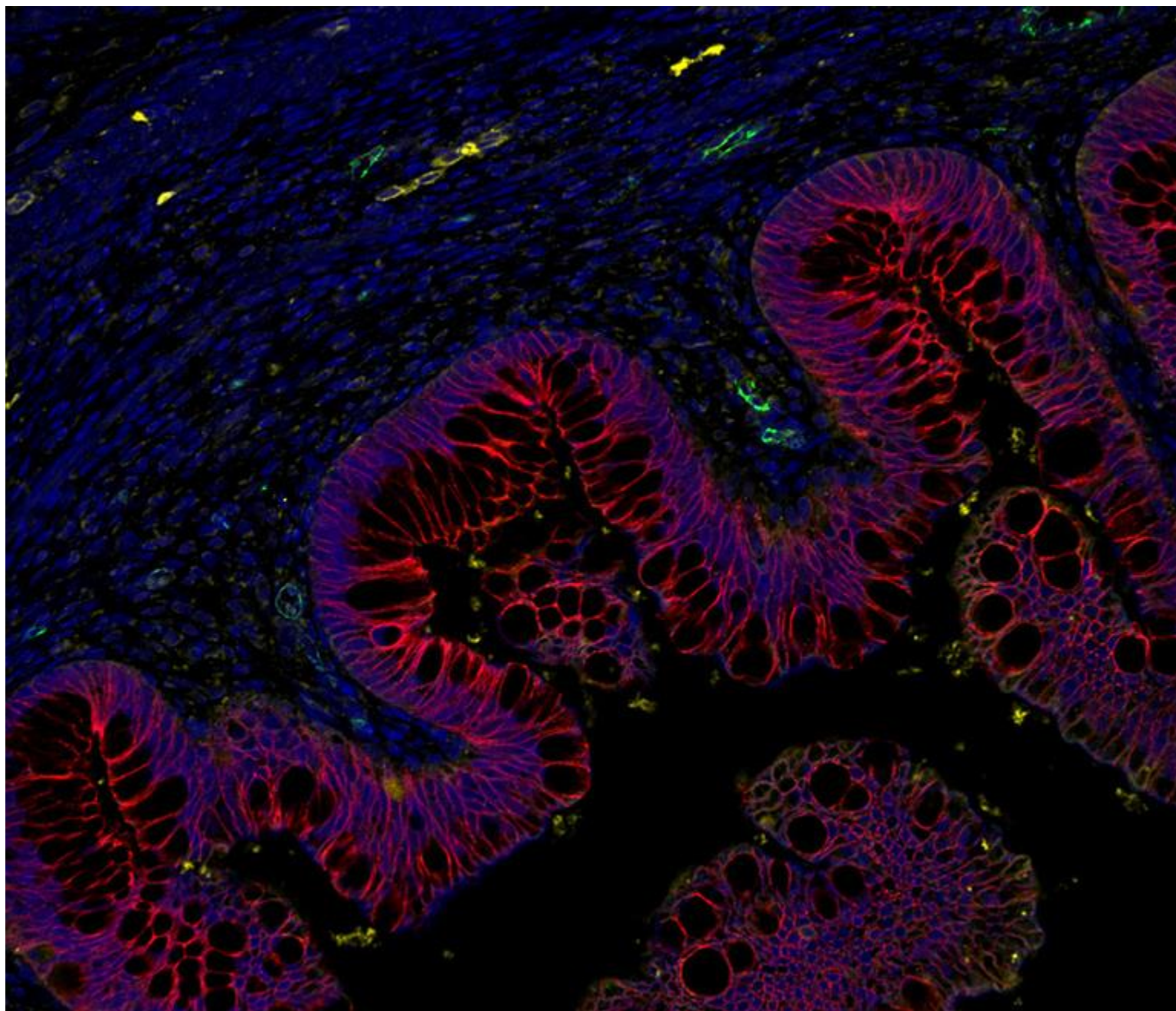
Madeline Lancaster, Laboratory of Molecular Biology, Cambridge – 2019 propojení s míchou a svaly



<https://phys.org/news/2018-02-organoids-brain-wrinkles.html>

Vlasový folikul





<https://www.medgadget.com/2018/06/strained-guts-engineering-human-intestinal-organoids-for-transplantation.html>

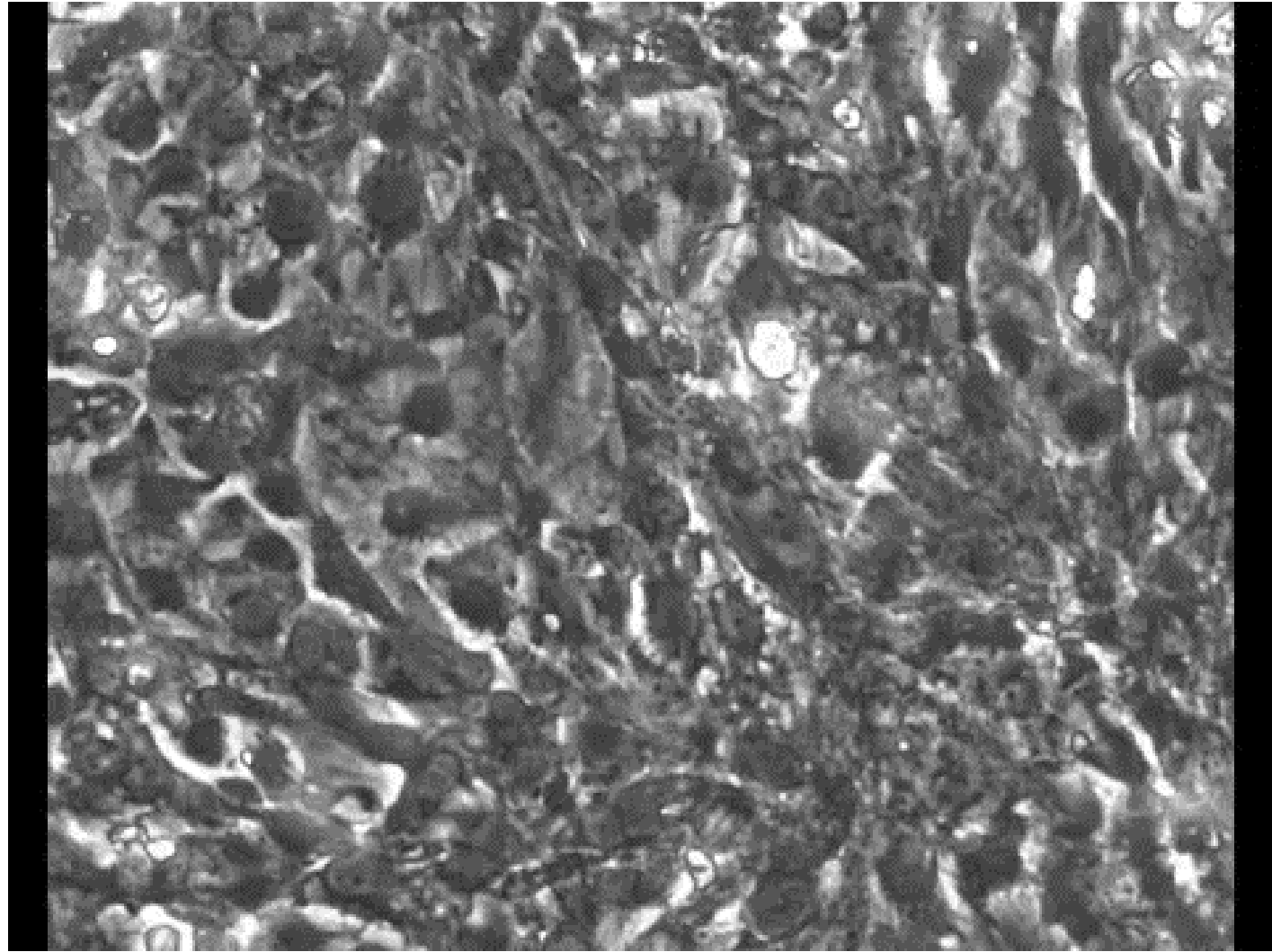
iPSC jako model testování kardiotoxicity potenciálních léčiv

Indukce pluripotence, diferenciaci na funkční kardiomyocyty

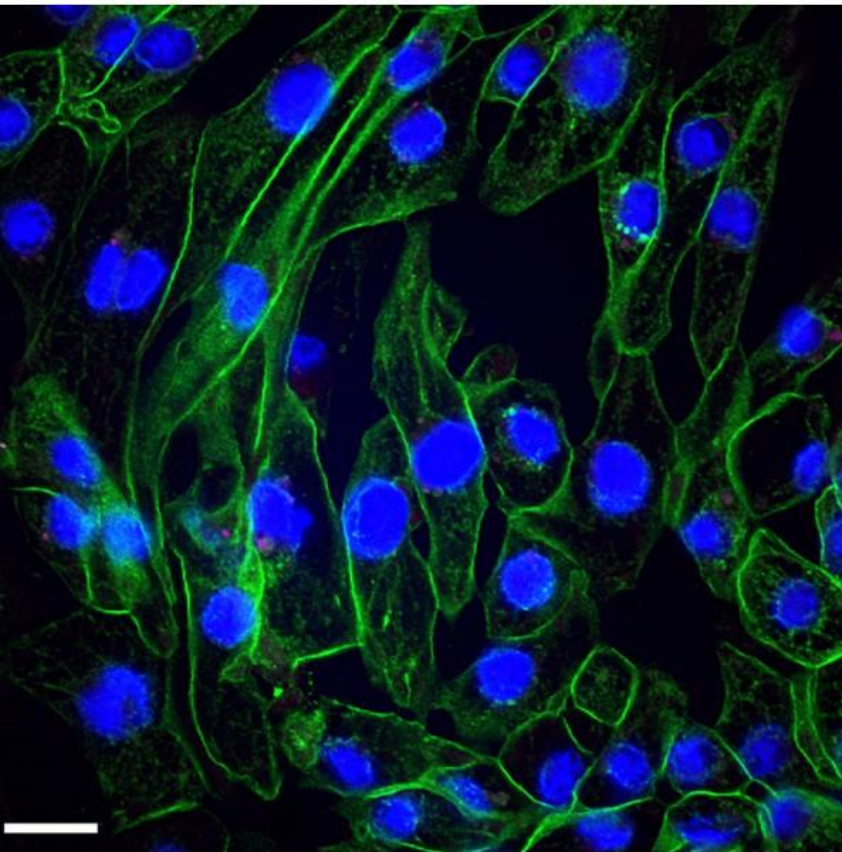
Genetické a funkční testy

Vliv látek – hodnocení kardiotoxických účinků

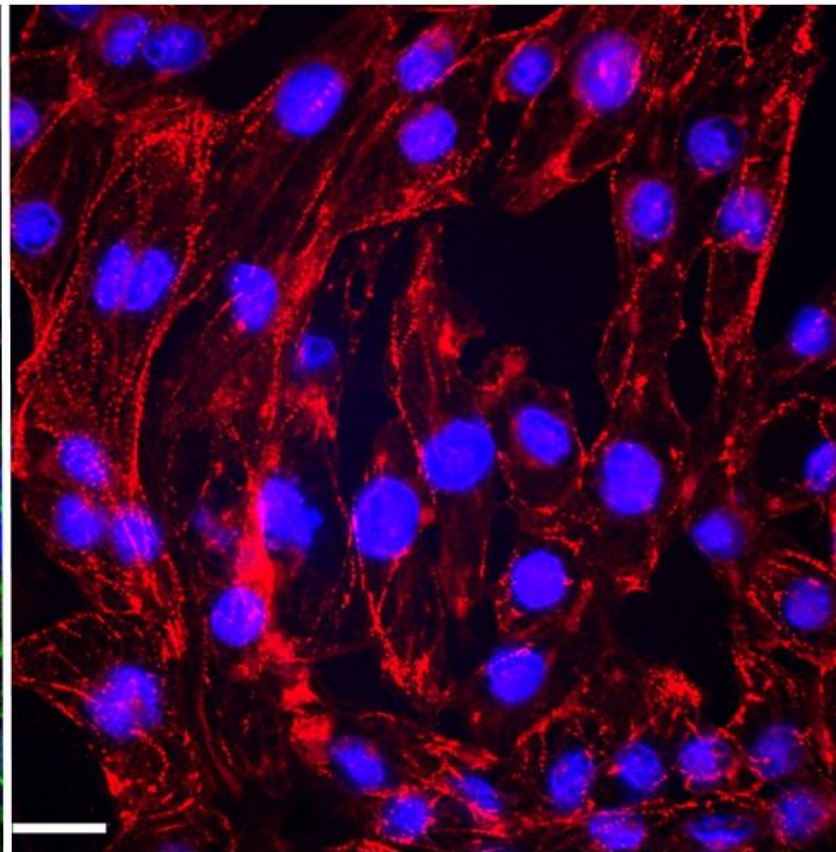
Srovnání se zavedenými modely – neonatální primární potkaní kardiomyocyty, H9c2, transfekovaná linie exprimující hERG kanál, nebuněčné modely hERG



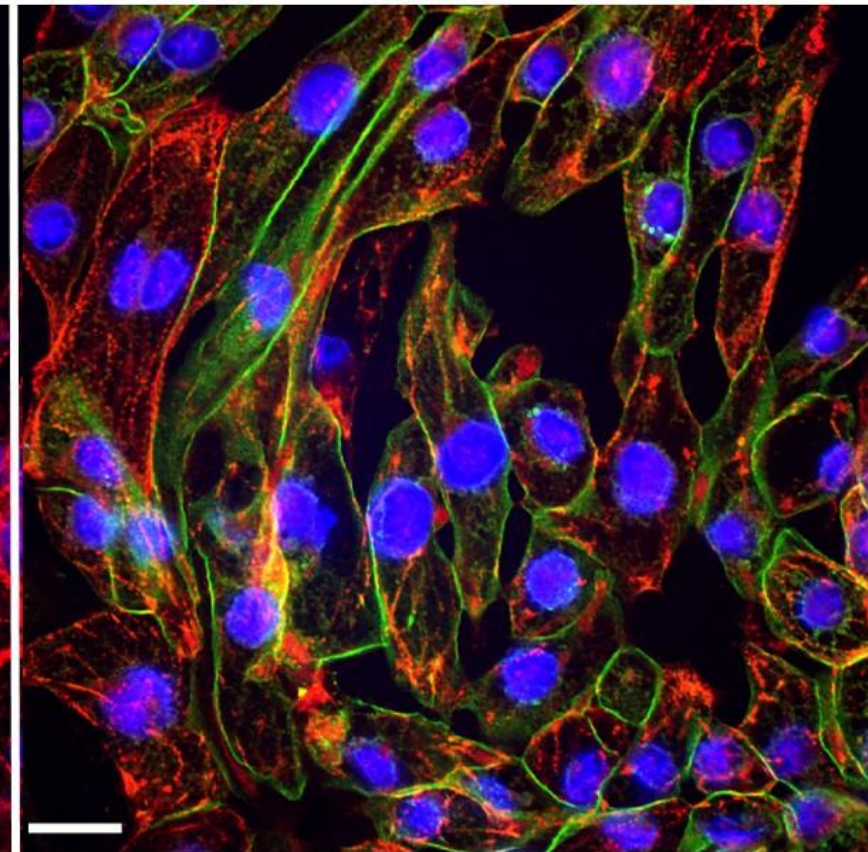
cTNT | DNA



S α Act | DNA



Merge

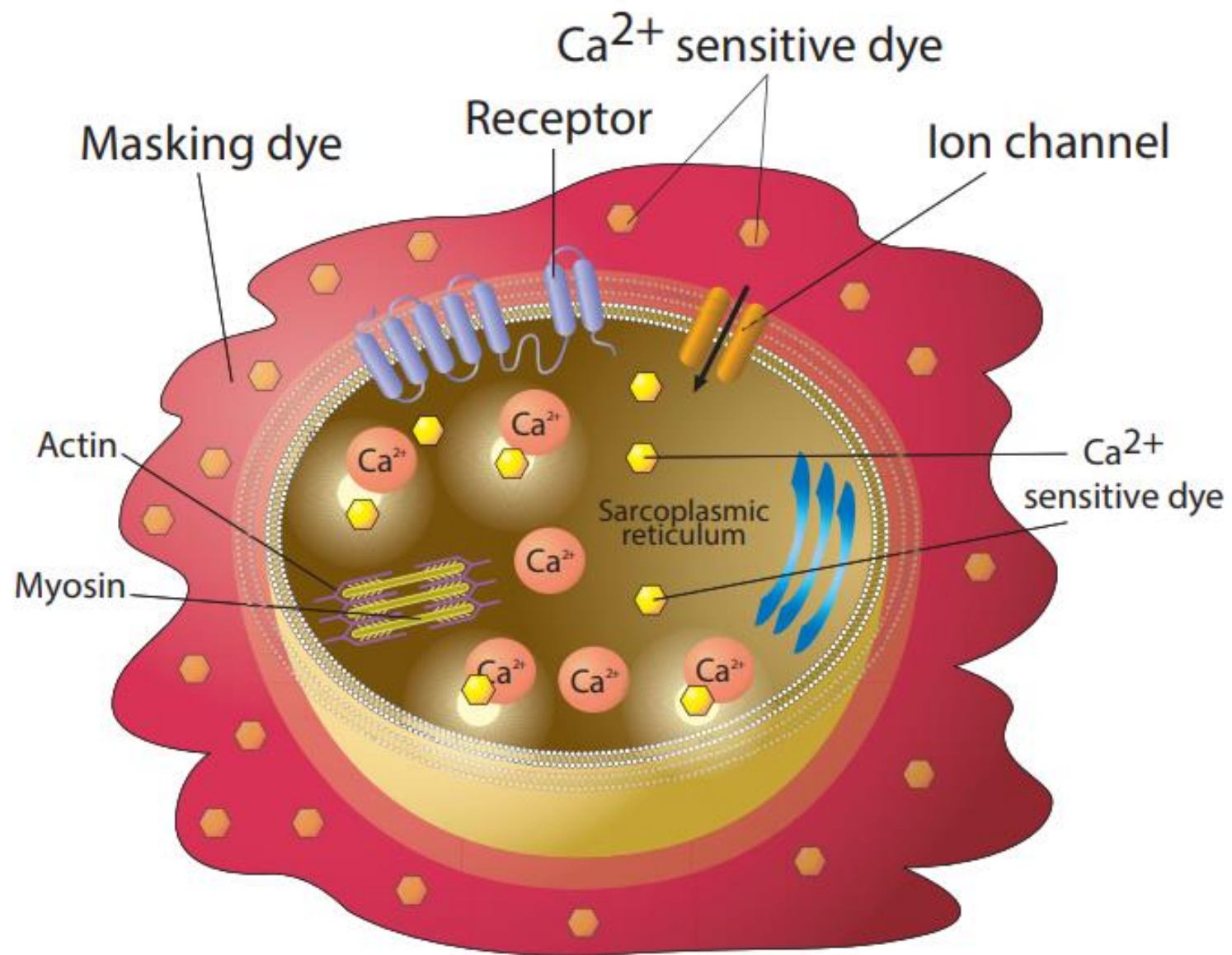


Metody

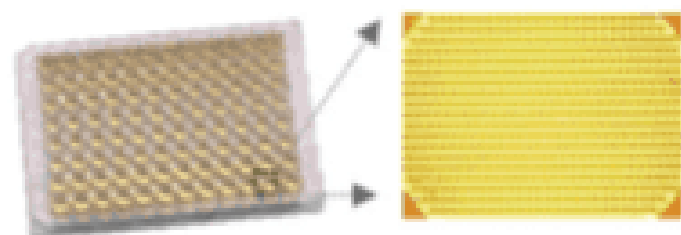
Intracelulární vápenaté ionty

Impedance

Patch clamp – akční potenciály

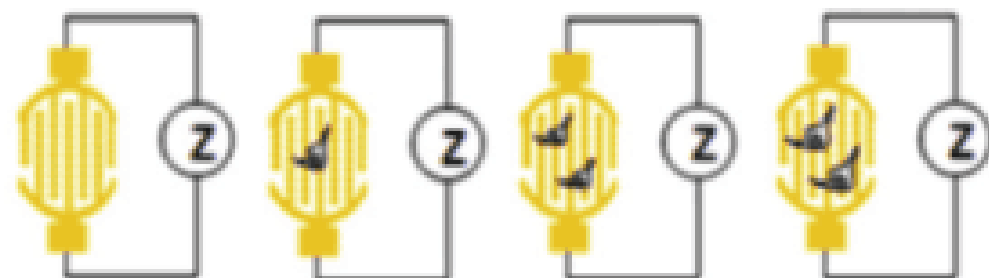


A



E-Plate Cardio 96

One well



Z=

Medium background

Less cells

More cells

Fully attached

B



Medium only
Cell Index=0

Attached cell No. A
Cell Index A

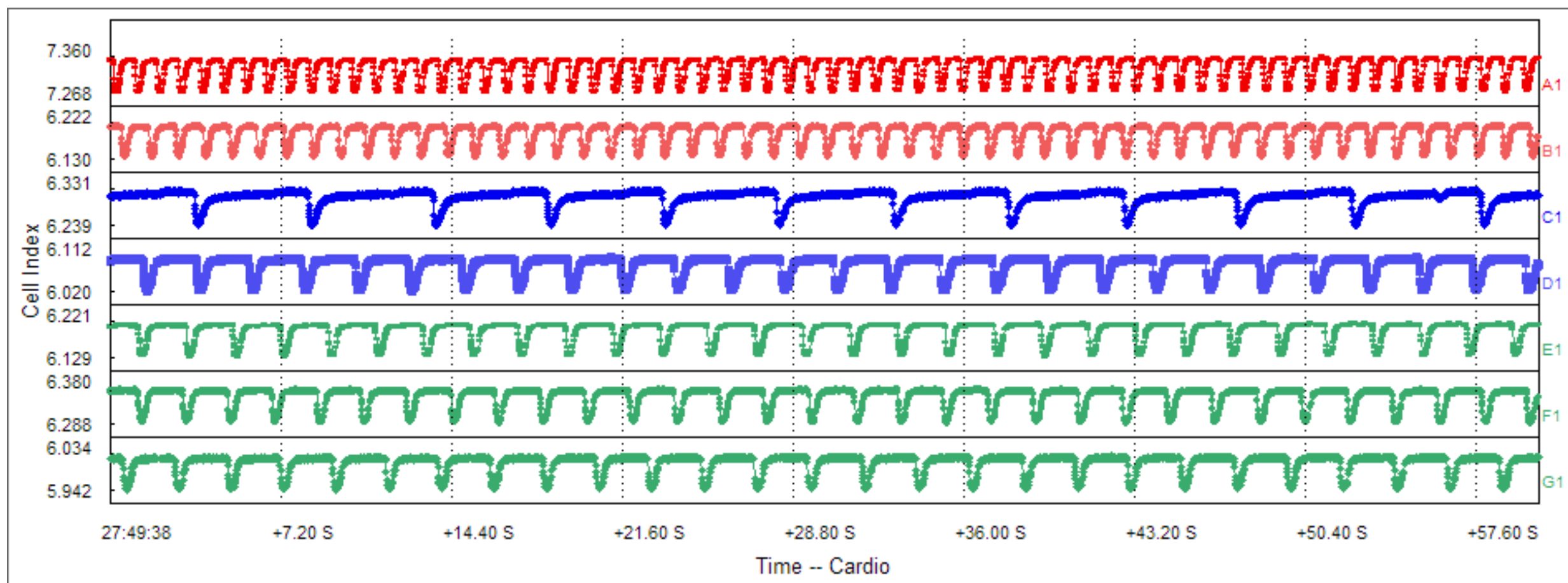
Attached cell No. B
Cell Index b1

Attached cell No. B
Cell Index b2

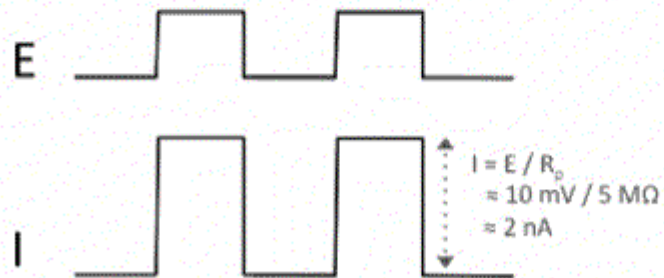
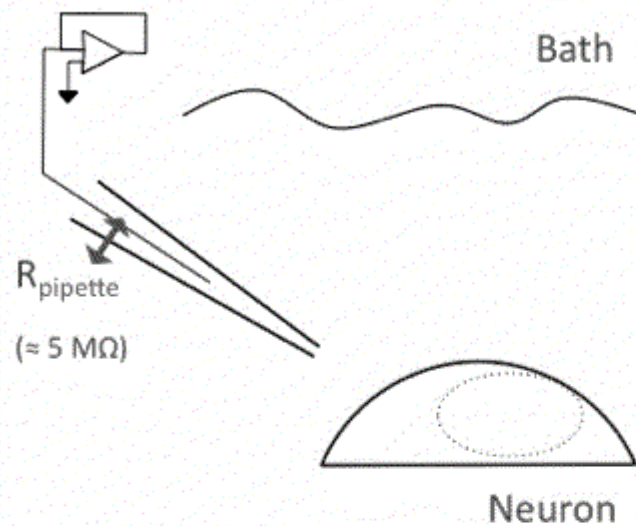
Morphology 1,
i.e. Contraction

Morphology 2,
i.e. Relaxation

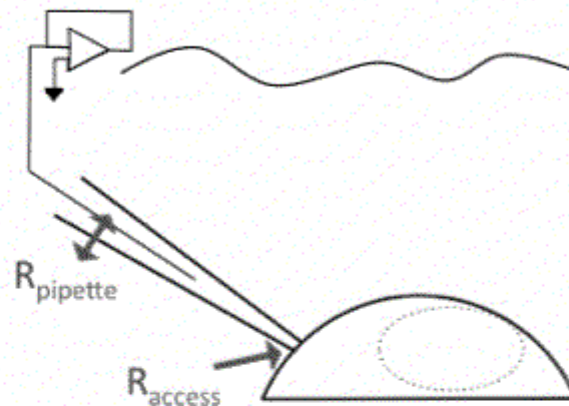
C



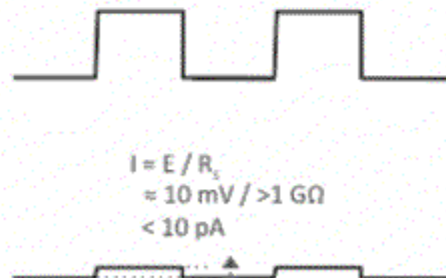
Pipette offset in bath



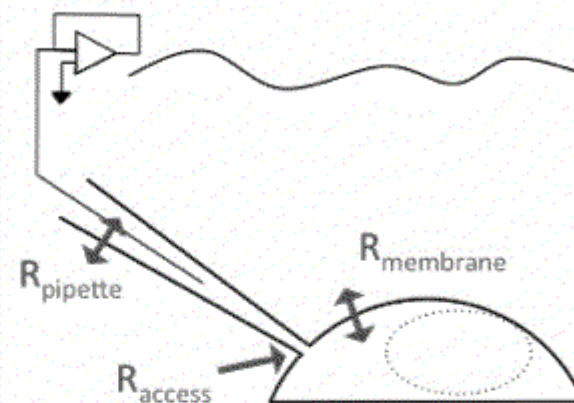
Cell-attached GΩ seal



$$R_{\text{pipette}} + R_{\text{access}} = R_{\text{series}} (> 1 \text{ G}\Omega)$$

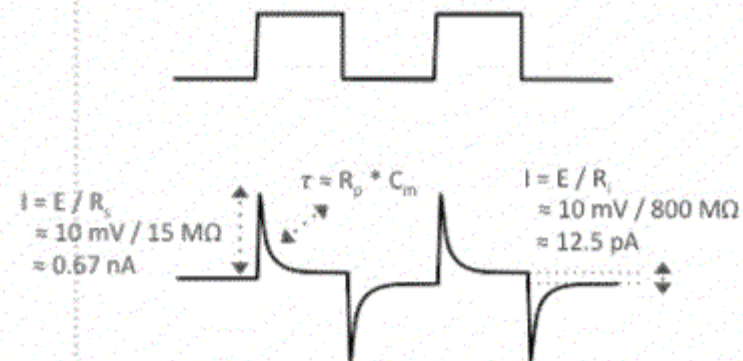


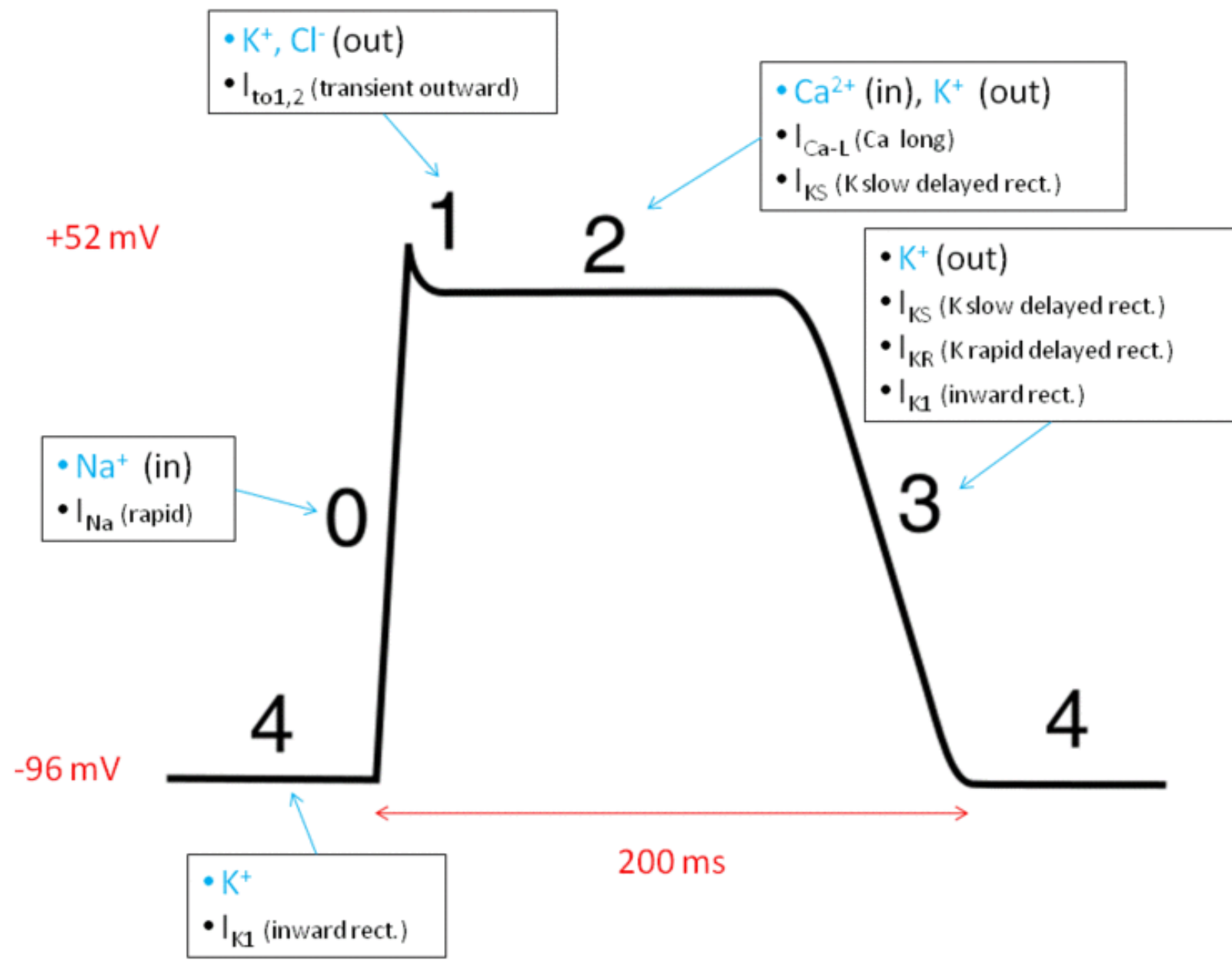
Whole-cell patch clamp

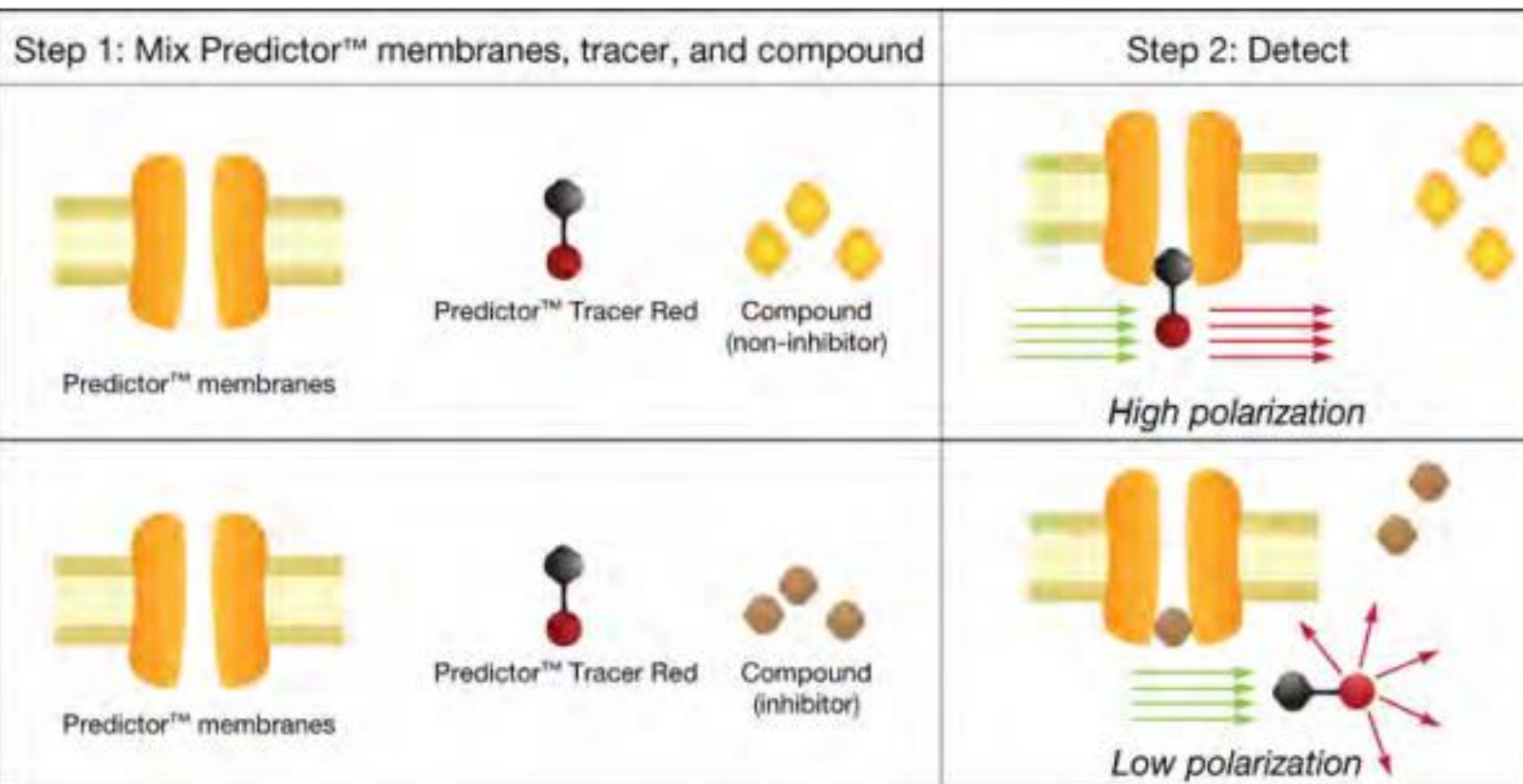


$$R_{\text{pipette}} + R_{\text{access}} = R_{\text{series}} (\approx 15 \text{ M}\Omega)$$

$$R_{\text{series}} + R_{\text{membrane}} = R_{\text{input}} (\approx 800 \text{ M}\Omega)$$







Zdroje

Fischbach, G.D. and R.L. Fischbach, *Stem cells: science, policy, and ethics*. J Clin Invest, 2004. **114**(10): p. 1364-70.

Biehl, J.K. and B. Russell, *Introduction to stem cell therapy*. J Cardiovasc Nurs, 2009. **24**(2): p. 98-103; quiz 104-5.

Watt, F.M. and R.R. Driskell, *The therapeutic potential of stem cells*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2010. **365**(1537): p. 155-63.

Mahla, R.S., *Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics*. Int J Cell Biol, 2016. **2016**: p. 6940283.

<https://www.nature.com/subjects/stem-cells>

https://www.sciencemag.org/topic/stem-cells?r3f_986

Díky za pozornost