

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biologických a lékařských věd

Využití kmenových buněk

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Petra Fikrová, Ph.D

HRADEC KRÁLOVÉ, 2017

Marcela Kadlecová

Poděkování

Děkuji paní PharmDr. Petře Fikrové, Ph.D. za její cenné rady a připomínky při sestavování této bakalářské práce.

Dále děkuji své rodině za její podporu a pomoc v průběhu celého mého studia na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, a svému manželovi za pomoc s úpravou této práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne:

podpis:

Abstrakt

Cílem práce je shrnutí základních informací o kmenových buňkách a nastínění jejich možného využití v medicíně.

Úvodní část práce je věnována základnímu popisu kmenových buněk, jejich třídění, popisu jejich vlastností a jejich získávání.

Stěžejním tématem této práce je zaměření na využití kmenových buněk v současné medicíně. Využití mezenchymálních buněk a jejich transplantace a jejich využití v léčbě artrózy a v plastické chirurgii. Využití hematopoetických, embryonálních a kmenových buněk z pupečnickové krve, které lze využít u nemocí, jako jsou například akutní leukémie, které je možné léčit alogenní pupečnickovou krví. Dále také na využití při léčbě nemocí, která jsou potencionálně léčitelné buněčnou terapií, a jejich léčba je zatím ve fázi výzkumů, jako je diabetes mellitus a Parkinsonova choroba, nebo využití kmenových buněk u předčasně narozených dětí.

Abstract

The aim of the thesis is to summarize the basic information about the stem cells and outline their possible use in medicine.

The beginning of this thesis is focused on basic description of the stem cells, their properties, classification and method of acquisition. In next part of the thesis we are focused on typology of each of these cells and cell dividing.

Our focus is at utilization of stem cells in current medicine that is pivotal theme in mine thesis, use of mesenchymal cells, their transplantation and use in the treatment of arthrosis and in plastic surgery. The thesis is further focused on the use of hematopoietic, embryonic and stem cells from the umbilical cord blood – here are described diseases which can be treated with allogeneic umbilical cord blood, and also for their use in the treatment of diseases that can be treatable by cell therapy but which are still being researched such as diabetes mellitus and Parkinson's disease or the use of stem cells in preterm infants.

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1.0 Úvod	9
2.0 Zadání bakalářské práce – cíl práce	10
3.0 Kmenové buňky	11
3.1 Třídění kmenových buněk	11
3.1.1 Totipotentní kmenové buňky	12
3.1.2 Pluripotentní kmenové buňky	13
3.1.3 Multipotentní kmenové buňky	14
3.2 Získávání kmenových buněk	14
3.2.1 Odběr pupečnickové krve	14
3.2.2 In vitro fertilizace (IVF)	15
3.2.2.1 Získávání embryonálních kmenových buněk	16
3.2.3 Terapeutické klonování	16
3.2.4 Odběr žádané tkáně	18
3.2.4.1 Mezenchymální kmenové buňky (MSC)	18
3.3 Typy lidských kmenových buněk	19
3.3.1 Embryonální kmenové buňky	19
3.3.2 Dospělé kmenové buňky (Somatické)	20
3.3.2.1 ASC v kostní dřeni	21
3.3.2.2 ASC kosterního svalu	21
3.3.2.3 ASC Centrálního nervového systému	22
3.3.2.4 ASC Tukové tkáně	22
3.3.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)	22
4.0 Buněčné dělení kmenové buňky	24
4.1 Asymetrické dělení kmenové buňky	24
4.2 Symetrické dělení buněk	25
4.3 Diferenciace kmenových buněk	26
4.3.1 Vznik krvinek	26
4.3.2 Vývoj neuronů a gliových buněk	26
5.0 Využití kmenových buněk	28
5.1 Mezenchymální kmenové buňky-transplantace	28
5.1.1 Využití mezenchymálních buněk v léčbě artrózy	29

5.1.2 Využití SVF buněk v plastické chirurgii.....	29
5.2 Hematopoetické kmenové buňky- transplantace.....	30
5.2.1 Odběr krvetvorných buněk.....	31
5.3 Embryonální kmenové buňky	32
5.3.1 Etika ve využití embryonálních buněk	33
5.4 Využití kmenových buněk z pupečnickové krve	33
5.4.1 Nemoci, které je možné léčit alogenní pupečnickovou krví	34
5.4.2 Léčba v klinických studiích.....	36
5.5 Onemocnění potencionálně léčitelné buněčnou terapií	38
5.5.1 Diabetes mellitus 1. typu	38
5.5.1.1 Využití Embryonálních kmenových buněk (ESC):	38
5.5.1.2 Využití kmenových buněk z pupečnickové krve:	39
5.5.2 Parkinsonova choroba	39
5.5.2.1 Využití mezenchymálních kmenových buněk (MSC).....	40
5.5.2.2 Využití Embryonálních kmenových buněk	40
5.5.3 Využití kmenových buněk u předčasně narozených dětí.....	41
6.0 Závěr.....	42
7.0 Seznam použité literatury	43
8.0 Přílohy	48
8.1 Seznam obrázků	48
8.2 Seznam tabulek	48

Seznam použitých zkratek

ALL	Akutní lymfoblastická leukemie
AML	Akutní myeloidní leukemie
ASC	Adult stem cells (Dospělé kmenové buňky)
CBU	Cord Blood Unit (jednotka pupečnickové krve)
CLL	Chronická lymfocytární leukemie
CML	Chronická myeloidní leukemie
CMML	Chronická myelomonocytární leukémie
CMV	Cytomegalovirus
DM	Diabetes mellitus
DMO	Dětská mozková obrna
EEG	Elektroencefalogram
ESC	Embryonic stem cell (embryonální kmenové buňky)
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor (růstový faktor)
GVHD	Graft versus host disease (reakce štěpu proti hostiteli)
HIE	Hypoxická ischemická encefalopatie
HLA	Human Leukocyte Antigen (antigeny obsažené v plazmatické membráně buněk)
HSCs	Hematopoietic stem cell (hematopoetická kmenová buňka)
ICCTI	Mezinárodní konsorcium pro buněčnou terapii a imunoterapii
IPSC	Induced pluripotent stem cells (Indukovaná pluripotentní kmenová buňka)
IVF	In vitro fertilizace
JCML	Juvenilní chronická myeloidní leukemie
JMML	Juvenilní myelomonocytární leukemie
MSCs	Mezenchymal stem cell (mezenchymová kmenová buňka)
PRP	Plazma bohatá na destičky
QOL	Quality of life (kvalita života)
RPE	Retinální pigmentový epitel
SOP	Standardní operační postup
SVF	Stromální vaskulární frakce
WJ	Wharton 's jelly-WJ (Whartonův rosol)

1.0 Úvod

Kmenové buňky jsou buňky schopné sebe-obnovy a diferenciaci. Tvoří základy tkání a orgánů a jsou schopné asymetrického dělení.

Rozlišujeme kmenové buňky totipotentní, pluripotentní a multipotentní. Dále buňky embryonální, dospělé a indukované pluripotentní kmenové buňky.

Současná medicína řeší otázku možné využitelnosti těchto buněk u závažných patologických stavů. V současnosti probíhá spousta studií zaměřených na využití kmenových buněk a terapie kmenovými buňkami je velkým příslibem pro léčbu degenerativních onemocnění jako je například Parkinsonova choroba.

2.0 Zadání bakalářské práce – cíl práce

Cílem mé práce je shrnout základní informace o kmenových buňkách a nastínit jejich možné využití v medicíně.

3.0 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou primární buňky, společné všem mnohobuněčným organismům. Jsou to nesespecializované (nediferencované) buňky, které mají schopnost sebe-obnovy a schopnost produkovat diferencované buňky, což znamená, že mají schopnost diferenciací.¹ Kmenové buňky také tvoří základy jednotlivých tkání a orgánů, udržují jejich strukturu a funkci. Tyto buňky vznikají již na úplném začátku ontogeneze neboli zrození a zůstávají ve tkáních i v dospělosti.² Další vlastností kmenových buněk je také schopnost obnovovat poškozené a opotřebované části organismu a udržování homeostázy.³ Jsou také schopny asymetrického dělení.³

3.1 Třídění kmenových buněk

Z hlediska diferenciačního potenciálu dělíme kmenové buňky na buňky:

- 1) totipotentní
- 2) pluripotentní
- 3) multipotentní²

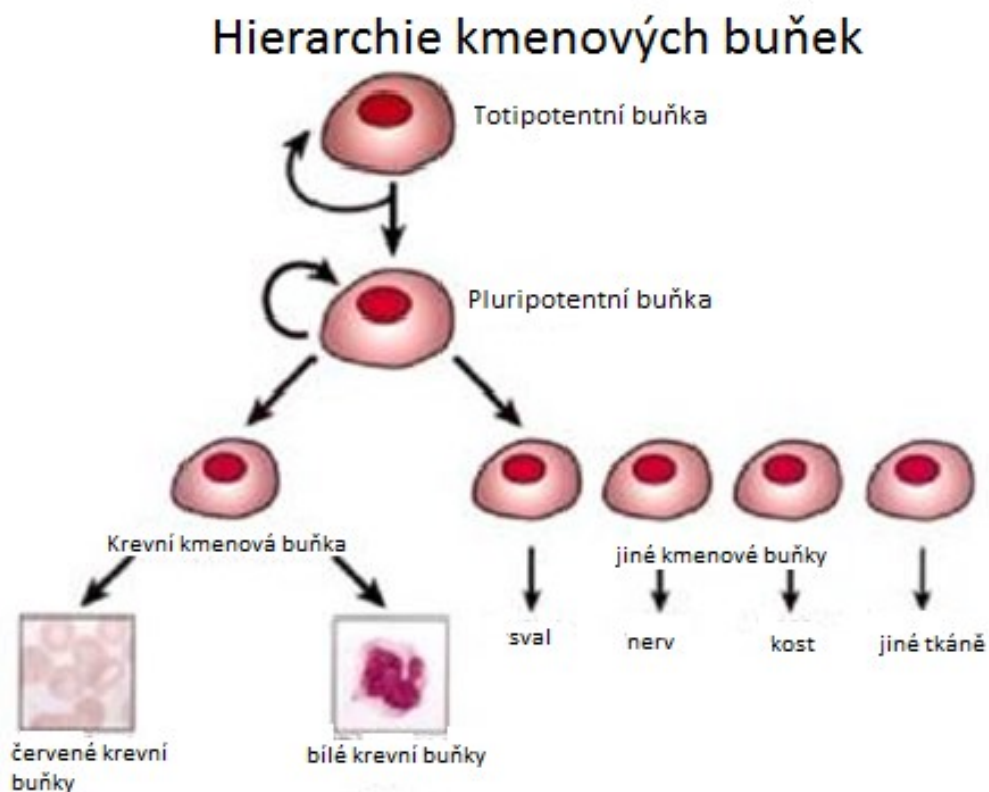
Dále rozlišujeme 3 typy lidských kmenových buněk:

- 1) embryonální kmenové buňky
- 2) dospělé kmenové buňky
- 3) indukované kmenové buňky¹

3.1.1 Totipotentní kmenové buňky

Totipotentní buňky jsou buňky, které mají schopnost vytvořit jakýkoliv typ buněk, který se vyskytuje v organismu člověka (obrázek č. 1).

Vznikají splynutím vajíčka a spermie, čímž vzniká oplodněné vajíčko. Jsou schopné vytvořit nového jedince, jak embryoblast, tak i trofoblast z kterého pak vznikají plodové obaly a placenta. Každá totipotentní buňka obsahuje kompletní genetickou informaci celého organismu. ³ Celý organismus potom vzniká z jedné totipotentní buňky-zygoty, která vzniká dělením oplozeného vajíčka. Zygota ovšem nemá schopnost se obnovovat (nemá schopnost sebe obnovy). Buňky vzniklé prvním dělením zygoty jsou také totipotentní. ²



Obrázek č. 1

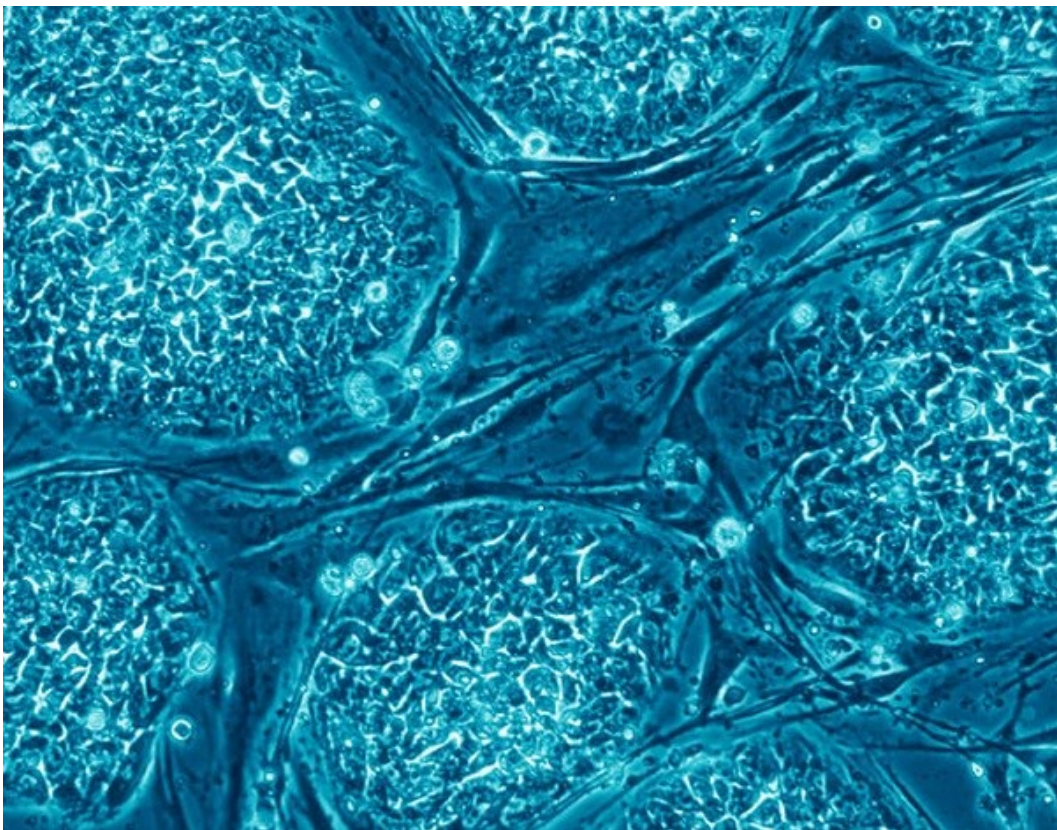
Hierarchie kmenových buněk

převzato a upraveno z: <http://arizonapain.com/stemcell/treatments/stem-cell-therapy/>

(20. 7. 2017)

3.1.2 Pluripotentní kmenové buňky

Pluripotentní buňky jsou schopné se diferencovat do všech buněčných typů. Tato schopnost je označována jako pluripotence.⁴ (Jsou generovány z totipotentních buněk).⁴ Jsou to rané buňky ve stadiu blastocysty (rané embryonální stádium savců), takzvané embryonální kmenové buňky.⁵ Tyto buňky jsou schopné generovat širokou škálu tkání. A právě z těchto buněk se v embryu v průběhu organogeneze vytvářejí základy orgánů.² Patří sem například embryonální kmenová buňka (obrázek č. 2).



Obrázek č. 2

Kolonie lidských embryonálních kmenových buněk.

Zdroj: Russo E.: Follow the Money—The Politics of Embryonic Stem Cell Research, PLoS Biology, 2005, 3(7): 234, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030234>

3.1.3 Multipotentní kmenové buňky

Multipotentní buňka na rozdíl od pluripotentní kmenové buňky, může vytvářet jen určité tělové buňky a tkáně. ⁶ Může se diferencovat pouze na buňky v rámci daného typu tkáně nebo orgánu (tkáňově specifické kmenové buňky). Tyto buňky se v základech orgánů udržují po celý život organismu. ² Patří sem například mezenchymové buňky MSCs (Mezenchymal stem cell), to jsou buňky schopné obnovovat mezenchymální a krevtovorné tkáně a také hematopoetická kmenová buňka HSCs (Hematopoetic stem cell), z které vznikají červené krvinky, bílé krvinky a krevní destičky. ⁷

3.2 Získávání kmenových buněk

Kmenové buňky je možné získat různými způsoby:

- 1) Odběrem pupečnickové krve
- 2) In vitro fertilizací
- 3) Terapeutickým klonováním
- 4) Odběrem žádané tkáně ²

3.2.1 Odběr pupečnickové krve

Pupečnicková krev je krev novorozence, která zůstává v placentě po přerušení pupečnicku. Krevní oběh novorozence obsahuje miliony kmenových buněk, které po narození zůstávají v pupečnicku a v placentě a pupečnicková krev je tedy zdrojem různých typů progenitorových buněk. ⁸

Odběr pupečnickové krve není nebezpečný ani pro matku ani pro dítě, není bolestivý a matku ani dítě nijak neobtěžuje. Je také eticky přijatelný, protože když není pupečnicková krev zpracována, není nijak využita a je po porodu zlikvidována spolu s placentou jako biologický odpad. ⁸

Odběr pupečnickové krve je bezbolestný. Provádí se bezprostředně po porodu, hned po odstrižení pupečnicku, ještě před porodem placenty. Odběr probíhá tak, že pupeční žíla se

napíchne jehlou a krev sama odtéká do speciálního vaku, který je dodán firmou, která poskytuje službu zpracování a uskladnění pupečnickové krve. Velkou výhodou při použití buněk z autologní pupečnickové krve (krev odebraná od téhož jedince) je perfektní shoda a tyto buňky lze využít i při léčbě příbuzných. Další výhodou je, že krev je připravena k okamžitému použití.⁸ Po odběru je krev dopravena do laboratoře a nejpozději do 48 hodin od porodu je zpracována podle platných SOP (standardních operačních postupů), které jsou v laboratořích přísně dodržovány. Krev je zpracovávána v uzavřeném systému – v boxu s laminárním prouděním vzduchu Biohazard II, v prostoru se samostatnou vzduchotechnikou a s filtrací vzduchu. Z krve jsou odebrány vzorky pro vyšetření viability buněk a pro vyšetření sterility krve. Bezprostředně po zpracování prochází pupečnicková krev naprogramovaným a kontrolovaným procesem postupné kryokonzervace ve zmrazovacím přístroji. Po dosažení teploty -180 °C je zmrazená pupečnicková krev připravená k uskladnění v tekutém dusíku při teplotě -196 °C.⁸

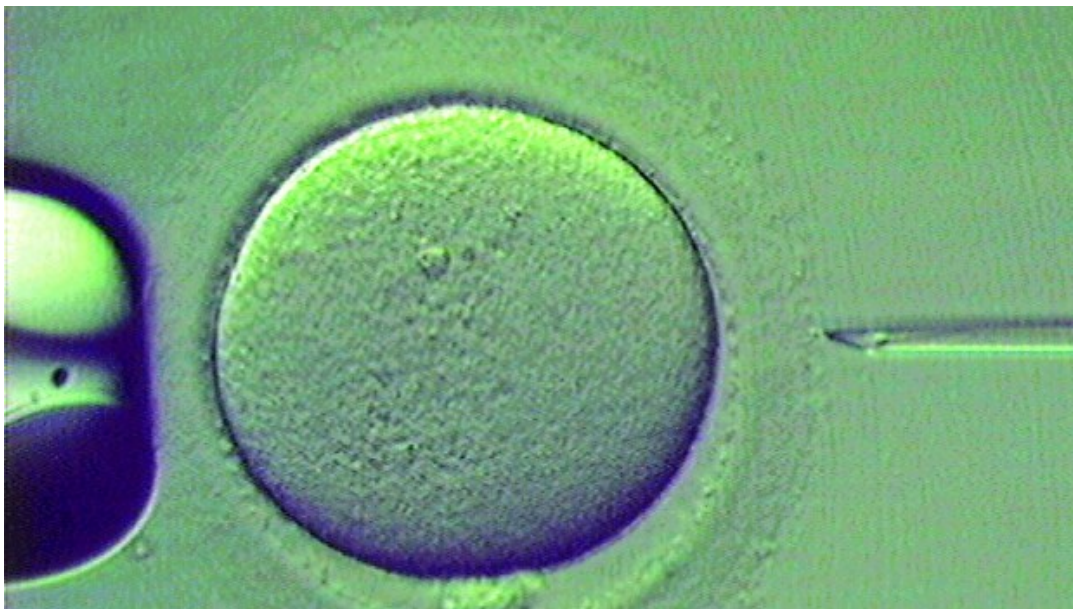
Kromě pupečnickové krve se dají využít i buňky pupečnicku. Pupečník je orgán tvořený dvěma arteriemi a jednou žílou. Tyto cévy jsou obklopeny mukózní tkání, která se nazývá Whartonův rosol (Whartons jelly-WJ), který obsahuje velké množství kmenových buněk. Pupečník je nejdostupnějším zdrojem kmenových buněk.⁹

3.2.2 In vitro fertilizace (IVF)

IVF neboli umělé mimotělní oplodnění vajíčka je metoda používaná při poruchách, které brání spojení vajíčka a spermie v rozmnožovacím ústrojí ženy. Vajíčka jsou laparoskopicky odebrána z vaječníku a jsou oplodněna spermiemi partnera. Poté jsou kultivována na médiu až do stadia blastocysty. Toto oplodnění je prováděno mimo tělo matky většinou v Petriho misce.¹⁰ Poté dochází k dělení buněk. Dělením zygoty vznikají první dvě buňky budoucího organismu a následně vzniká několika buněčný zárodek – embryo.¹¹ Embryo dále může být kultivováno následující 2 až 3 dny až se vyvine do stadia blastocysty. Poté dochází k transferu embryí pomocí katetru do dutiny děložní.¹²

3.2.2.1 Získávání embryonálních kmenových buněk.

Embryonální kmenové buňky se získávají ze zárodků, které nebyly využity k umělému oplodnění, jsou nadbytečné a určené k likvidaci v klinikách pro umělé oplodnění.¹³ Kmenové buňky časného embrya mají potenciál vytvářet jakýkoli buněčný typ. Protože embryonální kmenové buňky mají schopnost se bez omezení proliferovat a diferencovat, mohli by potenciálně zajišťovat neomezený zdroj tkání pro transplantace u lidí.²



Obrázek č. 3

Mimotělní oplodnění (IVF)

dostupné na: <http://www.porodnice.cz/tehotenstvi-a-z/mimotelni-oplodneni-ivf-et>

(1. 2. 2017)

3.2.3 Terapeutické klonování

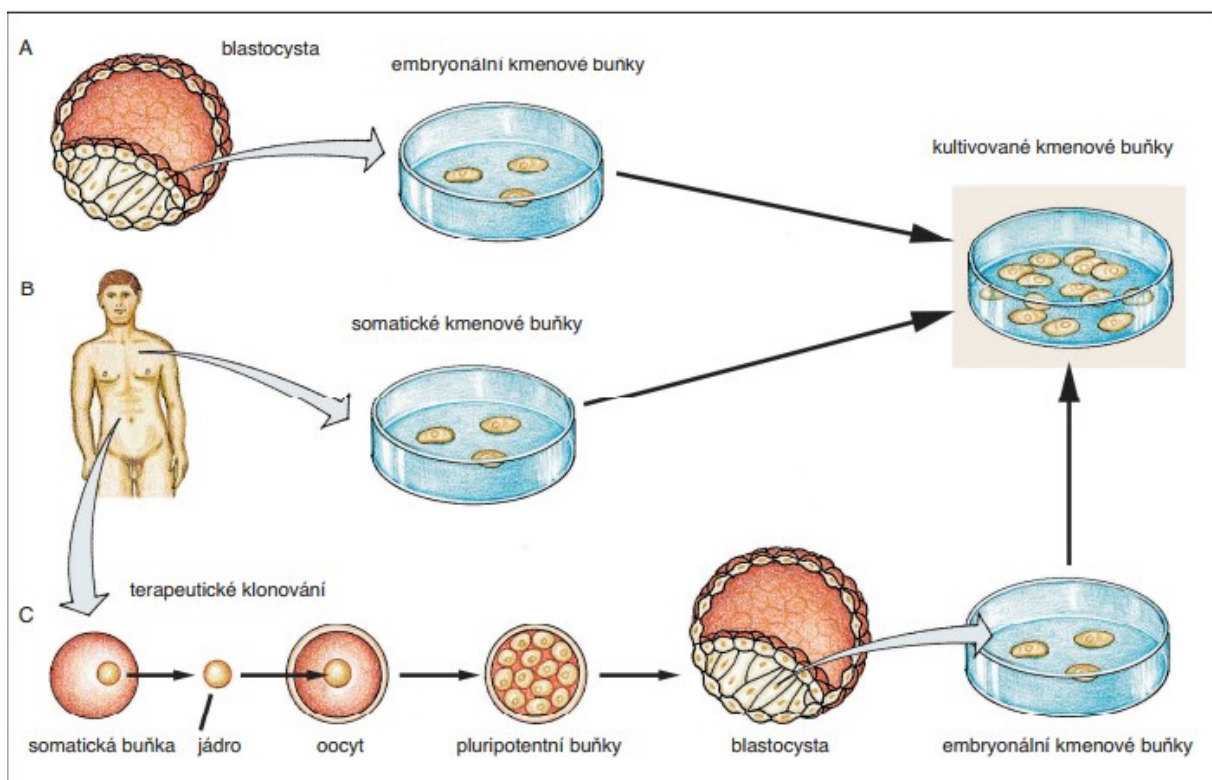
Podstatou terapeutického klonování je vytvoření embrya ze somatické buňky lidského těla.³

Vývoj klonovaného embrya probíhá tak, že pacientovi se odeberou specializované somatické buňky (například buňky ústní sliznice nebo kůže) a jejich jádro se vpraví do enukleovaného

lidského oocytu. ³ Vložení jádra do oocytu se provádí elektrickými pulsy. Elektrické pulsy destabilizují buněčnou membránu, dovolí buňkám splynout a aktivují oocyt, který se začne vyvíjet. Vznikající zárodek je využit k produkci ESC embryonálních kmenových buněk. ³ (obrázek č. 4). Embryo po odběru buněk po několika hodinách či dnech zaniká. ²

Výhodou tohoto postupu je genetická totožnost pacienta a ESC, takže léčebné buňky jsou imunitním systémem příjemce bez problémů přijaty. Protože jsou linie ESC nesmrtelné a pluripotentní, poskytují teoreticky obnovitelný zdroj jakýchkoli lidských buněk. To by mohlo být využito k regeneraci některých chorob, jejichž podstatou je buněčná degenerace a u kterých neexistuje vyhovující terapie, jako je diabetes mellitus, Parkinsonova choroba, infarkt myokardu a další. ³

Úspěchy provedených experimentů jsou povzbudivé, ale existuje ještě mnoho problémů, které brání zavedení buněčné terapie do praxe. ³



Obrázek č. 4

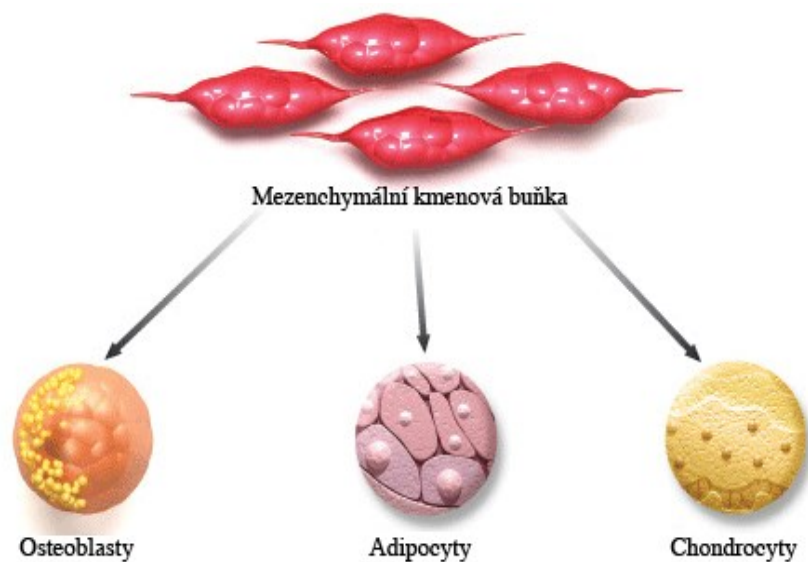
Josef Fulka, Klonování savčího embrya, Dostupné z: <http://ziva.avcr.cz/2005-6/klonovani-savciho-embrya-3-predcasne-starnuti-potomstva.html> (1. 8. 2017)

3.2.4 Odběr žádané tkáně

3.2.4.1 Mezenchymální kmenové buňky (MSC).

Základním zdrojem mezenchymálních kmenových buněk je kostní dřeň, která umožňuje odběr kmenových buněk v dostatečném množství. Druhým zdrojem je tuková tkáň. Odběr je jednoduchý, navíc zdrojem těchto kmenových buněk může být „odpadní“ tuková tkáň při liposukcích. Dalším zdrojem MSC může být také pupeční šňůra, Whartonův rosol, kmenové buňky pupečnickové krve a mezenchymální buňky z pupečníku nebo z placenty.¹⁴

Mezenchymální kmenová buňka je schopná se diferencovat na mnoho typů buněk jako je chondrocyt, adipocyt, osteocyt nebo myocyt (obrázek č. 5). Mezenchymální buňky jsou proto vhodné pro použití v regenerativní medicíně.¹⁵



Obrázek č. 5

Mezenchymální kmenové buňky

<http://cellmagel.cz/cs/uvodni-stranka/moznosti-lecby-kmenovymi-bunkami> (1. 8. 2017)

3.3 Typy lidských kmenových buněk

Rozlišujeme tři typy lidských kmenových buněk:

- 1) Embryonální kmenové buňky
- 2) Dospělé kmenové buňky
- 3) Indukované kmenové buňky³

3.3.1 Embryonální kmenové buňky

Vývoj embrya začíná oplozením vajíčka, kdy se z vajíčka stává zygota. Poté dochází k rychlému buněčnému dělení oplodněného vajíčka takzvanému rýhování a postupně se vytváří morula, což je útvar z šestnácti buněk. Morula se poté mění na dutý útvar vyplněný tekutinou takzvanou blastocystu.¹⁶ V tomto stádiu je možné získat z embrya embryonální kmenové buňky.²

Embryonální kmenové buňky ESC (Embryonic stem cell) jsou pluripotentní kmenové buňky, které se nachází v raném stádiu embrya v blastocystě. Buňky časného embrya mají schopnost vytvářet diferencované potomstvo všech tří zárodečných listů a tvorbu extraembryonálních tkání, které jsou nezbytné pro správný vývoj. V embryu, ve stádiu blastocysty, se kmenové buňky rychle diferencují a vzniká primitivní ektoderm, který se diferencuje do tří zárodečných vrstev. Jsou-li buňky vyjmuty ze svého prostředí, a kultivovány ve vhodných podmínkách, buňky embryoblastu umožní vznik buněk, které proliferují a nahrazují sami sebe. Velkým příslibem pro účinnou léčbu různých onemocnění je transplantační terapie ESC buněk. Ale tato metoda má ještě mnoho překážek. Například, že lidské buňky jako jednotlivé lze jenom obtížně pasážovat, protože jejich klonovací efektivita je poměrně nízká.²

3.3.2 Dospělé kmenové buňky (Somatické)

Dospělé kmenové buňky ASC (Adult stem cells) se nachází v některých tkáních a orgánech. Tyto buňky jsou pluripotentní a dokáží se diferencovat do zralých typů buněk se specializovanou funkcí. Mají také schopnost sebe-obnovy. Primární funkcí ASC je udržování homeostázy a nahrazování buněk ve tkáni, které odumírají buďto v důsledku fyziologického opotřebování, nebo po poranění.¹⁷

ASC nacházíme v:

- kostní dřeni
- periferní krvi
- mozku
- míše
- zubní pulpě
- krevních cévách
- kosterních svalech
- epitelu kůže a trávicího traktu
- rohovce
- játrech
- pankreatu¹⁷

Somatické kmenové buňky jsou definované jako buňky odvozené od dospělých a mají dva charakteristické znaky: schopnost podrobit se diferenciaci a schopnost sebe-obnovy (regenerace) po celou dobu života. Tyto kmenové buňky jsou přizpůsobivé. Za normálních podmínek mají standardní funkci, ale při poruchách, jako je stimulace zraněním, mohou plnit různé funkce.¹⁸

3.3.2.1 ASC v kostní dřeni

V kostní dřeni se nachází hematopoetické a mezenchymové kmenové buňky. Tyto buňky se mohou diferencovat do všech typů krevních buněk.² Toho se využívá při dárčovství kostní dřeně u různých onemocnění, kdy se nahradí pacientova nemocná krvetvorná tkáň zdravou kostní dřenou od dárce.

Odběr kostní dřeně od dárce se získává dvěma způsoby.¹⁹

1) Odběr kostní dřeně: Provádí se v celkové narkóze na operačním sále. Odebírá se dřeňová krev z lopat kostí kyčelních punkcí (odsátím) tenkými jehlami přes kůži. Celkem se odebírá i více než 1 litru dřeňové krve.¹⁹

2) Odběr krvetvorných buněk z periferní krve: V dnešní době je tato metoda preferovanější. Buňky se získávají ze žilní krve dárce procesem, kterému se říká separace neboli aferéza. V tomto případě je potřeba buňky namnožit a vyplavit z kostní dřeně, kde se za normálních okolností nachází, do periferní krve pomocí růstového faktoru G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor). Poté se odebere krev a buňky se oddělí pomocí přístroje, kterému se říká separátor a který se běžně používá při odběrech krevní plazmy.¹⁹

Pacientovi se takto připravené buňky podávají do žíly jako běžná transfuze. Kmenové buňky se poté usadí v kostech, postupně se namnoží a obnoví normální krvetvorbu.¹⁹

3.3.2.2 ASC kosterního svalu

V kosterních svalech se také nacházejí buňky, které regenerují a obnovují poškozené svaly. Jsou nazývány satelitní. Satelitní buňky se nachází na povrchu zralé svalové buňky myofibrily. Tyto buňky jsou schopné vytvořit odlišné typy tkání.²⁰ U dospělých savců tyto buňky zprostředkovávají růst svalu. Mohou být podníceny k proliferaci například poškozením, zraněním, nebo cvičením.¹⁷

3.3.2.3 ASC Centrálního nervového systému

Kmenové buňky v nervovém systému se vyskytují v oblasti hipokampu v zóně gyrus dentatus v blízkosti krevních cév.¹⁷

Dospělé neurony nemají schopnost dělení, v mozku dospělého člověka byly ale objeveny kmenové buňky, které mohou být zdrojem nových nervových buněk v mozku. To, že i v mozku dospělého člověka mohou vznikat nové neurony, představuje optimistickou vyhlídku do budoucna na léčbu řady onemocnění mozku. Limitující je, že propojení neuronů vzniklých v dospělosti nikdy nebude odpovídat tomu, které vzniká nitroděložně.²¹

3.3.2.4 ASC Tukové tkáně

Tuková tkáň je mnohem vydatnější zdroj kmenových buněk. Gram tuku obsahuje asi milion somatických kmenových buněk. Odebírá se liposukcí, pro pacienta minimálně invazivní a méně traumatické než odběr kostní dřeně. Kmenové buňky z tuku mají podobné biologické vlastnosti jako buňky z kostní dřeně.²²

3.3.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

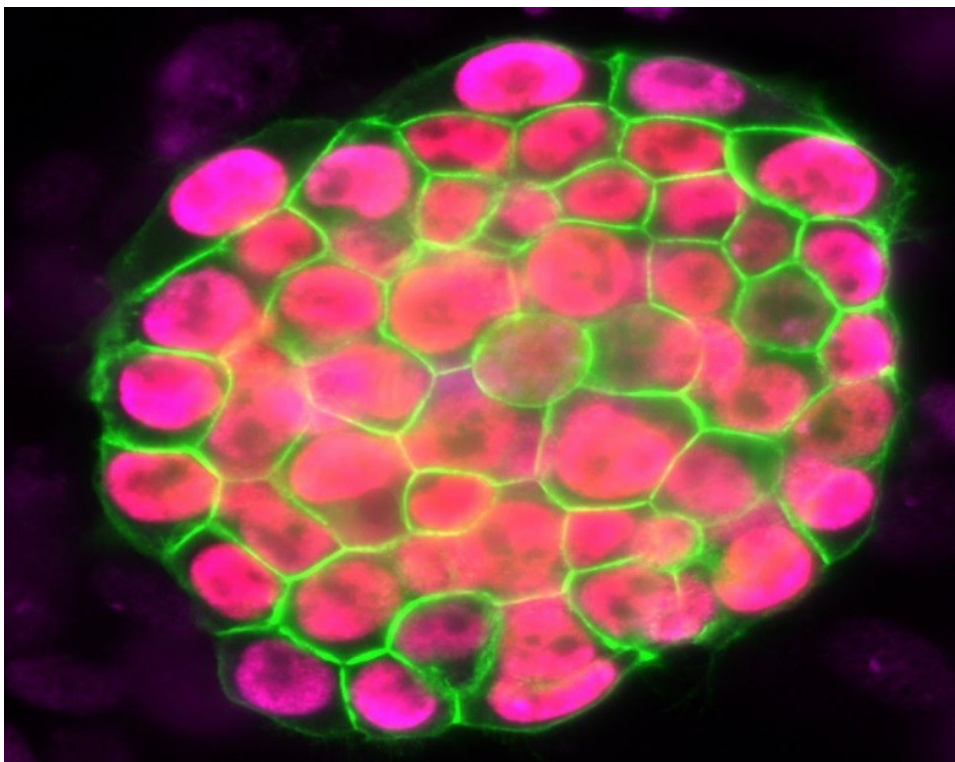
Indukovaná pluripotentní kmenová buňka je uměle připravená kmenová buňka, která je vytvořená ze zcela obyčejné buňky získané z těla dospělého člověka.¹⁵

iPSC mají všechny vlastnosti embryonálních kmenových buněk. Výhodou je, že se nepotýkají s takovými etickými problémy jako používání embryonálních kmenových buněk. Tyto buňky by mohly v budoucnu poskytnout autologní (dárce je sám pacient) transplantaci pro reparaci tkání bez odmítnutí, protože by byly připraveny každému pacientovi na míru z jeho vlastních buněk.¹⁵

Mezi výhody při využití indukovaných buněk patří mimo jiné to, že iPSC buňky nemají žádné etické problémy, protože nejsou izolované z lidského embrya a je možné je vypěstovat

z jiných buněk těla např. z buněk kůže. Případnou léčbu by nekomplikovaly nežádoucí reakce imunitního systému jako například odmítnutí štěpu (viz výše).²³

Bylo objeveno, že zavedení a ektopická exprese několika genů indukuje pluripotenci v somatických buňkách. Tyto buňky (iPSC) jsou ve svých vlastnostech podobné Embryonálním kmenovým buňkám (ESC) z hlediska markerové exprese, transkripční aktivity a schopnosti diferencovat se v různé typy buněk. Relativní jednoduchost, s jakou lze generovat buňky iPSC, činí tuto techniku atraktivní pro studium principů jaderného přeprogramování a také pro hodnocení jeho potenciálu pro klinické aplikace. Tento postup má však v současné době vážná omezení, protože reprogramování buněk může vést k rozvoji nádorů.²⁴



Obrázek č. 6

Kolonie indukovaných pluripotentních kmenových buněk.

Zdroj: UCLA Broad Stem Cell Research Center/Plath Lab (1. 8. 2017)

4.0 Buněčné dělení kmenové buňky

Při množení kmenových buněk se uplatňují tři způsoby dělení:

- Asymetrické dělení
- Symetrické dělení
- Diferenciace kmenových buněk

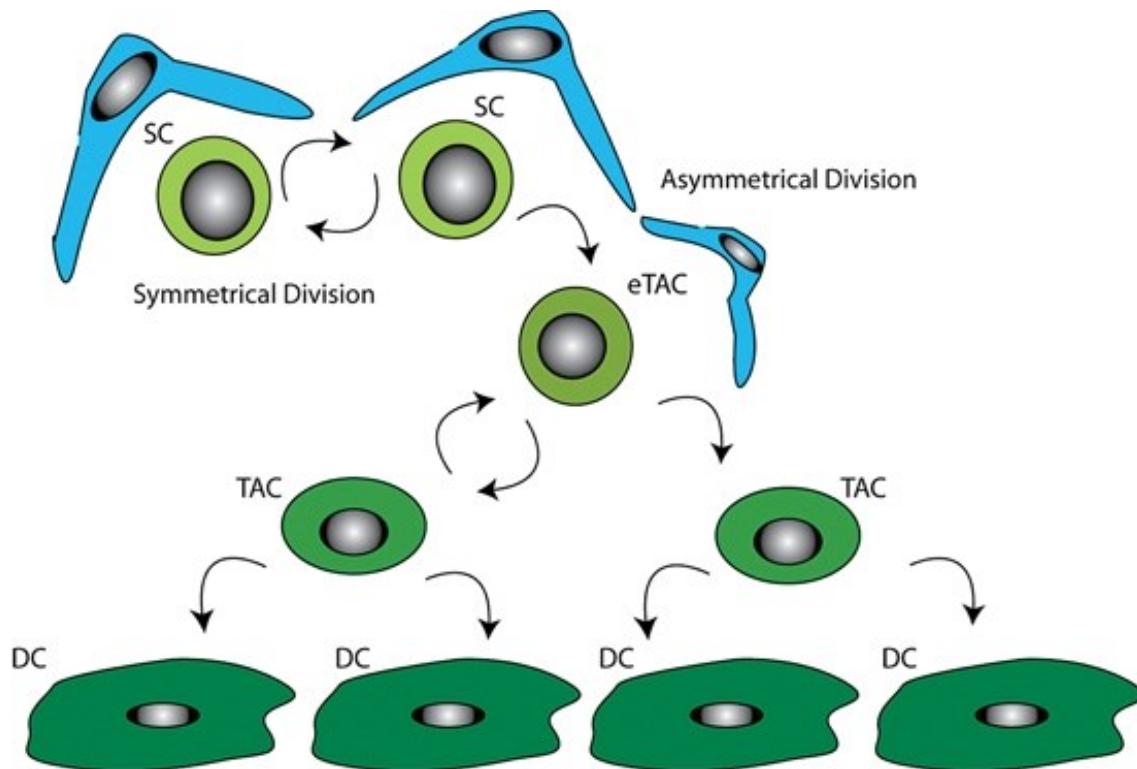
4.1 Asymetrické dělení kmenové buňky

Úkolem dospělé kmenové buňky je obnovovat opotřebované tkáně organismu a zároveň udržovat stálou zásobu sama sebe. K tomu slouží asymetrické dělení kmenových buněk. Toto dělení je používáno kmenovými buňkami v různých tkáních např. kůže (průběžné nahrazování vrstev kůže). Asymetrické dělení je klíčovým mechanismem pro zajištění tkáňové homeostázy.²⁵

Asymetrické dělení je takové dělení buněk, kde vznikají dvě dceřiné buňky, které mají různé buněčné osudy (jsou odlišné). Asymetrického dělení může být dosaženo buď vnitřními mechanismy (vnitřní asymetrické dělení) nebo vnějšími mechanismy (vnější asymetrické dělení).²⁶ Vnější asymetrické dělení je založeno na rozdělení buněčných komponent, které určují buněčný osud, zahrnuje asymetrické umístění dceřiných buněk. Při tomto dělení vzniká jedna dceřiná buňka, která zachovává identitu kmenové buňky (je stejná jako mateřská buňka) a druhá dceřiná buňka, která může jakkoli diferencovat.²⁷ Protože jedna z dceřiných buněk je vždy totožná s mateřskou buňkou, tak se při tomto dělení nemění počet mateřských kmenových buněk a zásoba kmenových buněk pro tvorbu a regeneraci tkání je nevyčerpatelná. Asymetrické dělení je předpokladem pro neomezenou schopnost sebe obnovy kmenových buněk² (obrázek č. 7).

Symetrické a asymetrické dělení je možné nejnázne identifikovat pomocí morfologického vyšetření bazálních vrstev víceřadých krycích epitelů podle charakteristické orientace dělicího vřeténka. V určitých fázích vývoje je možné vedle sebe zastihnout mitózy symetrických i asymetrických dělení. To naznačuje, že povaha buněčného dělení je určována

vnitřními faktory nebo je zprostředkována mezibuněčnými kontakty. Poloha vřeténka v metafázi předurčuje osud novotvořených dceřiných buněk.²



Obrázek č. 7

Asymetrické dělení kmenových buněk; kmenové buňky (SC) se dělí a část jejich potomků postupně dozrává na přechodné zesilovací buňky (TAC) a poté na diferencované buňky (DC)

Autor: Secker, G.A., and Daniels, J.T., Limbal epithelial stem cells of the cornea (June 30, 2009), převzato z : https://cs.wikipedia.org/wiki/Asymetrické_buněčné_dělení

4.2 Symetrické dělení buněk

Symetrickým dělením buněk vznikají dvě identické buňky, z nichž každá má vlastnosti, které jsou nerozlišitelné od mateřské buňky.²⁸ Symetrické dělení zvyšuje počet kmenových buněk, je časté při hojení ran a regeneraci. Symetricky dělící se buňky jsou běžné u rozvíjejících se tkání, ale mohou být pozorovány i u dospělých. Některé buňky mají schopnost symetricky se dělit a obnovit počet kmenových buněk vyčerpaných zraněním,

nebo onemocnění. Například když je hematopoetický systém ničen chemoterapií, hematopoetické kmenové buňky se rozdělují a rozšiřují až desetinásobně.²⁷

4.3 Diferenciace kmenových buněk

Diferenciace je proces, při kterém z totipotentní buňky (např. embryonální) vzniká buňka specializovaná. Tato buňka je strukturálně a funkčně specializovaná.²⁹

Diferenciace je určovaná vztahem genetické výbavy a prostředí, ve kterém se buňka nachází. Všechny tkáně a orgány v lidském organismu vznikají opakovaným dělením, zygoty. Tkáně, které se při vyvíjení organismu diferencují, jsou klony buněk, které se specializovaly. Tato specializace je výsledkem uskutečňování genetické informace a výsledkem interakcí, do kterých při tvorbě tkáně buňky vstupují. Diferenciace je výsledkem postupné a kontrolované exprese řady genů.²⁹

4.3.1 Vznik krvetvorby

Příkladem diferenciace je hematopoéza. Veškeré krvinky jsou odvozeny z jedné populace multipotentních kmenových buněk nacházejících se v kostní dřeni. Tyto buňky nejsou diferencované. Ale jejich dceřiné buňky tvoří různé diferencované buněčné linie. Tyto linie se dále opakovaně člení až do zralého typu krevní buňky.³⁰

4.3.2 Vývoj neuronů a gliových buněk

Neurony a gliové buňky se vyvíjejí z neurální trubice. Další diferenciací buněk dojde ke vzniku multipotentních kmenových buněk a dále pak bipotentních prekurzorových buněk. Z těchto prekurzorových buněk se diferencují neurální a gliové prekurzorové buňky prekurzorů gliové linie dochází diferenciací ke vzniku dalších prekurzorů tzv. O-2A , 1A a prekurzorů radiální glie. Z O-2A prekurzorů se vyvíjejí oligodendrocyty a astrocyty 2. typu.

Z prekursoru 1A se vyvíjejí astrocyty typu 1 a z prekursorů radiální glie se vyvíjí řada gliových buněk.³¹

Velký problém nastává, když se buňky vymknou kontrole a dojde k poškození diferenciace, proliferace a apoptózy. Buňky pak postrádají kód programované buněčné smrti, získávají nesmrtelnost a stávají se z nich maligní buňky.³

5.0 Využití kmenových buněk

Základem využití kmenových buněk v medicíně je myšlenka nahradit poškozené buňky různých orgánů a tkání lidského těla (krev, myokard, ledviny, játra, mícha, mozek) kmenovými buňkami, které se diferencují ve specializované buňky příslušného orgánu či tkáně. V praxi se v medicíně rutinně využívá transplantace hematopoetických kmenových buněk.³²

Ukazuje se, že kmenové buňky mohou být velkým přínosem v oblasti regenerativní medicíny, ukazuje se, že pomocí kmenových buněk by bylo možné léčit řadu onemocnění jako je:

- Diabetes mellitus
- Parkinsonova choroba
- Míšní poranění
- Selhání jater
- Duchennova muskulární dystrofie²

5.1 Mezenchymální kmenové buňky-transplantace

V regenerativní medicíně a buněčné terapii se primárně využívají mezenchymální kmenové buňky, což jsou buňky vlastního těla izolované ze stromatu perivaskulární tkáně. Nacházející se téměř ve všech tkáních lidského těla (v kostní dřeni, pupečnickové krvi nebo v tukové tkáni). Tyto buňky mohou pomoci procesům hojení a udržují buněčnou homeostázu. Jsou, však jen jednou složkou ze skupiny buněk takzvané stromální vaskulární frakce (SVF).³³

SVF lze získat z pojivové a tukové tkáně. Buňky stromální vaskulární frakce zahrnují heterogenní směs buněk získanou rozkladem kapilár, malých cév a mezibuněčné hmoty, která je bezprostředně obklopuje.³⁴

5.1.1 Využití mezenchymálních buněk v léčbě artrózy

Osteoartróza je častá chronická muskuloskeletální porucha kloubů, která postihuje chrupavku, vazy, a okolní kosti. Je způsobena postupným zhoršováním integrity struktur kloubů a je spojena se zánětem podpurných chrupavkových struktur uvnitř kloubního pouzdra a ztuhlostí, bolestí a snížením pohyblivosti a normální funkce. Známé rizikové faktory jsou věk, pohlaví, obezita, nadměrná kloubní zátěž, poranění kloubů, metabolická dysfunkce a genetické faktory. Dosud neexistují žádné spolehlivé nebo účinné léčebné postupy, které by mohly zabránit vzniku osteoartrózy nebo zastavit progresi onemocnění.³⁵

Studie: Byla připravena jednorázová dávka čerstvě připravených, nekultivovaných buněk SVF z vlastní tukové tkáně pacienta a injektována spolu s 3 ml autologního PRP (plazma bohatá na destičky) do osteoartritického kolena. Pacienti z této studie také dostávali měsíční injekce PRP po dobu 4 měsíců po počáteční injekci, po které následovala příležitostná injekce PRP. Tři nebo šest měsíců po léčbě byli pacienti zařazováni do mírného cvičebního programu celkem 4 měsíce. Bylo měřeno pět samostatně zaznamenaných podskupin nebo klinických stavů, které zahrnují bolest, symptomy, činnosti každodenního života, funkce ve sportu a rekreaci a QOL (kvalita života) související s kolenem. Funkční hodnocení bylo prováděno měsíčně po dobu 12 měsíců.³⁴ Studie byla provedena u čtyř pacientů. U tří pacientů byla ošetřena obě kolena a u jednoho pacienta jen jedno. Vzhledem k tomu, že v současné době neexistují žádné léky na léčbu osteoartrózy, je léčba založena na zmírnění symptomů a zlepšování funkce. Všichni pacienti projevili zlepšení kvality života související s kolenem. Šest kloubů se zlepšilo na téměř normální ve skupině bolesti a symptomů. Z toho tři klouby se zlepšily na normální ve všech pěti podskupinách.³⁵

5.1.2 Využití SVF buněk v plastické chirurgii.

Lipoinjekce je slibná léčba, ale v současné době je omezena nepředvídatelnými výsledky a nízkou mírou přežití štěpu v důsledku částečné nekrózy. K řešení těchto problémů byla vyvinuta nová strategie, při které se používá stromální vaskulární frakce (SVF) obsahující

ASC se izoluje z poloviny vzorku aspirovaného tuku a rekombinuje se zbývající polovinou aspirace vzorku tuku. Tento proces přeměňuje poměrně progenitorový chudý aspirovaný tuk na bohatý progenitorový tuk. Ukázalo se, že transplantací ASC-obohacené tukové tkáně pooperační atrofie transplantovaných tukových štěpů byla minimální a uspokojivé klinické výsledky byly obecně dosaženy bez závažnějších komplikací, což naznačuje, že suplementace ASC je účinná i bezpečná. Další studie s delším sledováním jsou nezbytné pro stanovení hodnoty této techniky. Pokračující vylepšení v této technice by mohla v budoucnu přinést autologní přenos tkáně jako první volbu pro zvětšení prsou.³⁶

5.2 Hematopoetické kmenové buňky- transplantace

Transplantace krvetvorných kmenových buněk je v mnoha případech jedinou nadějí pro nemocného. Hematopoetické kmenové buňky jsou významnou součástí transplantátů kostní dřeně používaných k léčbě leukémií.³⁷ Hematopoetická kmenová buňka je dokonale přizpůsobená k produkci krevních elementů. Může produkovat všechny linie krevních buněk, což umožňuje léčit širokou škálu hematopoetických poruch.²

Indikace pro transplantaci kmenových buněk krvetvorby:

- Akutní myeloidní leukémie
- Akutní lymfoblastická leukémie
- Myelodysplastický syndrom
- Hodgkinova nemoc
- Mnohočetný myelom³⁸

Dále u karcinomu prsu a varlat a u dětských onkologických onemocnění.³⁸

Transplantace podle dárce můžeme rozlišit na:

- Autologní - dárce je sám pacient
- Alogenní - dárce je jiný člověk
- Sourozenská - dárce je HLA kompatibilní sourozenec

- Příbuzenská - dárce je HLA kompatibilní příbuzný
- Syngenní - sourozenecká transplantace, kdy jde o transplantaci mezi jednovaječnými dvojčaty.³⁹

5.2.1 Odběr krvetvorných buněk

Krvetvorné buňky je možné získat klasickým odběrem kostní dřeně, nebo odběrem z periferní krve.¹⁹

Odběr kostní dřeně se provádí v celkové anestezii na operačním sále. Z různých míst lopat kosti kyčelní se nasává dřevná krev speciálními jehlami. Celkem se odebírá 1 litr této krve. Na rozdíl od toho odběr z periferní krve je metoda mladší, ale v současné době preferovanější. Dárce je několik dní před odběrem aplikován růstový faktor krvetvorby. Ten způsobí, že se z kostní dřeně do krve uvolní množství bílých krvinek, mezi nimiž se nachází i kmenové buňky. Ty se oddělí od ostatních buněk pomocí separátoru. Tento postup nevyžaduje anestezii.¹⁹

Samotná transplantace krvetvorných buněk nemocnému se poté provádí poměrně jednoduše. Krevní buňky mu jsou podány do žíly jako transfuze. Kmenové buňky si sami najdou místo v kostní dřeni, kde se usadí. Před transplantací musí pacient podstoupit chemoterapii nebo celkové ozařování aby se zničila nemocná kostní dřeň a nové buňky se měly kde usadit.¹⁹

Po autologní a syngenní transplantaci dochází k plnohodnotné produkci krvetvorných buněk přibližně za 14 dní až tři týdny od jejich podání. Jelikož při těchto transplantacích jde o buňky pacienta, nebo o buňky zcela shodné s pacientovými, nemusí nemocný brát žádné léky, které potlačují imunitu dárcovských buněk.¹⁹

Po alogenní transplantaci dojde také k přihojení krvetvorby dárce většinou za 14 dní až 3 týdny po jejich podání, ale nemocní musí dostávat již nejpozději ode dne transplantace imunosupresiva (léky potlačující nežádoucí imunitu dárce), která brání rozvoji imunitních reakcí vzniklých rozdíly mezi buňkami dárce a příjemce.¹⁹

5.3 Embryonální kmenové buňky

Embryonální kmenové buňky je možné získat z lidského embrya ve stadiu blastocysty nebo moruly. Pro tyto účely se využívají nadbytečná embrya, která vznikla při asistovaném oplodnění. Někdy při umělém oplození vzniká více embryí, které potom nejsou využity a rodiče je mohou darovat na vědecké účely.⁴⁰

Tyto buňky mají dvě základní vlastnosti. Neomezeně se množí a dokáží se přeměnit na jakýkoli druh lidské buňky.⁴¹

V Los Angeles proběhly ověřovací testy experimentální léčby závažné oční choroby zvané makulární degenerace. Makulární degenerace je hlavní příčina slepoty ve vyspělém světě. Lidé postižení touto nemocí postupně ztrácí zrak, protože jim v oční sítnici odumírají světločivé buňky, nebo do sítnice prorůstá hustá síť cév.⁴²

Výzkum vedl tým vedený Robertem Lanzou z Univerzity of California. Cílem studie bylo posoudit bezpečnost a snášenlivost buněk retinálního pigmentového epitelu (RPE) odvozených od embryonálních buněk, včetně tvorby teratomů, hyperproliferace buněk a imunitní reakce. Byly vybrány dvě pacientky - jedna pacientka s takzvanou suchou makulární degenerací a jedna s takzvaným Stargardtovým typem makulární degenerace. Byly vypěstovány náhradní RPE, které byly pacientkám vpíchnuty do subretinálního prostoru oka. Transplantované buňky se v oku uchytily a množily se. Bylo zaznamenáno funkční vizuální zlepšení obou pacientek. Ukázalo se to například při čtení různě velkých písmen na zkušebním testu. Pacientka trpící tzv. suchou makulární degenerací dokázala před léčbou přečíst 20 typů písmen, po léčbě se jí zvýšila ostrost zraku tak, že přečetla až 33 typů písmen. U pacientky trpící tzv. Stargardtovým typem makulární degenerace došlo také ke zlepšení. Před léčbou dokázala rozpoznat jen pohyby rukou. Po léčbě byla zraková ostrost tak, že byla schopna spočítat jednotlivé prsty.⁴²

5.3.1 Etika ve využití embryonálních buněk

Ve využití kmenových buněk je velký potenciál a ukazuje se, že by se tyto buňky mohly používat k léčbě mnoha nemocí, jako jsou leukémie, poruchy imunitního systému, diabetu a dalších. Velkým problémem je ale etika. Získávání embryonálních kmenových buněk je možné pouze za cenu zničení raných embryí. Získané buňky jsou pěstovány v kultuře, která obsahuje látky zamezující jejich spontánní diferenciaci. Tato praxe je eticky vysoce kontroverzní a vyvolává mezi experty i v rámci širší veřejnosti vážné spory. Tradičním etickým problémem je morální status embrya. Diskuse se vedou o tom, zda je amorální zničit zárodek života kvůli získání kmenových buněk. Jejich výzkum může být pro mnoho lidí mnohem kontroverznější než ten, při němž se využívají kmenové buňky uměle vytvořené z dospělých buněk těla.⁴³

5.4 Využití kmenových buněk z pupečnickové krve

Kmenové buňky z pupečnickové krve mají velký potenciál. Pupečnicková krev je zdrojem mezenchymálních kmenových buněk, které lze diferencovat na buňky různých pojivových tkání, jako jsou kosti, chrupavka a tuk. Tyto buňky jsou také schopné se diferencovat do buněk podobných gliovým buňkám a hepatocytům. Tyto buňky mají širší oblast diferenciaci než kostní dřeň.⁴⁴

Imunologická nezralost kmenových buněk pupečnickové krve umožňuje lépe překonávat imunologické bariéry dárce a příjemce a není nutná naprostá HLA - shoda, což zvyšuje šanci na nalezení dárce. Navíc je zde nižší možnost reakce štěpu proti hostiteli (graft versus host disease – GVHD). Vzhledem k původu kmenových buněk je minimální riziko kontaminace štěpu cytomegalovirovou infekcí (CMV), která výrazně ovlivňuje úspěšnost transplantace. Na druhé straně malé množství kmenových buněk ve vzorku pupečnickové krve a nemožnost využití dárce znovu výrazně limituje širší praktické použití. Příjemce štěpu získaného z pupečnickové krve dostává ve srovnání s příjemcem štěpu z kostní dřeně asi jen 10 % CD34+ kmenových buněk a selhání štěpu po transplantaci představuje 10–20 %.

Snížená imunokompetence může být naopak příčinou vyššího procenta recidiv hematologických malignit ve srovnání se štěpy získanými z kostní dřeně. Navíc vzhledem k relativně vysokému podílu genetického faktoru u většiny hematologických malignit převažuje vzhledem k riziku návratu onemocnění preference nepříbuzenského dárce bez genetické predispozice (alogenní pupečnickové krve).³²

5.4.1 Nemoci, které je možné léčit alogenní pupečnickovou krví

Transplantace krve a kostní dřeně je často používaným prostředkem terapie různých onemocnění. Pupečnicková krev je vynikající alternativa ke kostní dřeni. Pro onemocnění uvedená níže je transplantace krvetvorných buněk standardní léčbou. U některých nemocí je k léčbě přistoupeno pouze tehdy, kdy primární léčba selhala.⁴⁵

Leukemie je rakovina krevního imunitního systému, jehož buňky nazýváme leukocyty nebo také bílé krvinky.

Rozdělení leukémií

- Akutní lymfoblastická leukemie (ALL)
- Akutní myeloidní leukemie (AML)
- Akutní bifenotypická leukemie
- Akutní nediferencovaná leukemie
- Chronická lymfocytární leukemie (CLL)
- Chronická myeloidní leukemie (CML)
- Juvenilní chronická myeloidní leukemie (JCML)
- Juvenilní myelomonocytární leukemie (JMML)
- Diserytropaetická anémie
- Hodgkinův Lymfom⁴⁵

Jiné druhy rakoviny

- Neuroblastom
- Mozkové nádory
- Rakovina vaječníků⁴⁵

Poruchy krve

- Beta- talasemie major
- Akutní myelofibróza
- Amyloidóza
- Refrakterní anémie s nadbytkem blastů v transformaci
- Chronická myelomonocytární leukémie (CMML) ⁴⁵

Také probíhá spousta studií zabývajících se využití pupečnickové krve v léčbě různých onemocnění. Například u dětské mozkové obrny. Poranění mozku při zástavě srdce u dětí je důsledkem globální cerebrální ischemie. Výsledek se liší podle délky resuscitace. Bohužel, u těch, kteří přežijí srdeční zástavu, může poškození mozku vést k celoživotním následkům, například k mozkové obrně, pro které v současné době neexistuje lék. Nedávno byly předloženy experimentální důkazy, které ukazují, že systémová transplantace lidských mononukleárních kmenových buněk v krvi - zabraňuje vzniku spastické parézy v modelu perinatální ischemie u hlodavců. Tyto slibné účinky vedly k autologní transplantaci mononukleárních buněk z pupečnickové krve u dítěte s těžkou mozkovou obrnou, které se nacházelo v trvalém vegetativním stavu. K této transplantaci došlo v roce 2009 v Ruhr-Universitaet - Bochum, v Německu. ⁴⁶

Jednotka pupečnickové krve (CBU) obsahovala 91,7 ml krve, s mononukleárními buňkami bez erytroblastů. Po transplantaci byly zaznamenány mírné nežádoucí účinky (přechodná hemoglobinurie, nauzea a hypertenze) a sledování pokračovalo po dobu 36 hodin. Pacient byl propuštěn do rehabilitačního centra, kde byla každodenně zajištěna fyzioterapie a ergoterapie. Následné sledování bylo naplánováno po 2, 5, 12, 24, 30 a 40 měsících. ⁴⁶

Po léčbě pupečnickovou krví došlo k pozoruhodným změnám v psychomotorickém vývoji. Po čtyřech týdnech byla spasticita mírně snížena. Po dvou měsících se zlepšila motorická kontrola hlavy a zrak se částečně zotavil, stejně jako EEG. Pacient mohl uchopit, držet, ukousnout, žvýkat a polknout sušenku, vyvinul sociální úsměv, smál se při hraní. Dokázal sedět v rehabilitačním kočáře. Pacient však stále vykazoval závažný neurologický zbytkový syndrom. Po pěti měsících byl EEG normální. Pacient prokázal krátký oční kontakt a

fixaci, sledoval předměty a dokázal tleskat rukama, bez třesu, věděl a ukázal své orgány (ucho, nos, břicho). Po 1 roce došlo ke zlepšení sociální interakce, podávání a jemné motorické ovládání obou rukou. Mohl uchopit a jíst arašídý. Seděl bez podpory, s oporou stál (problém s vyvážením), a poprvé s podporou chodil. Po 40 měsících došlo k dalšímu zlepšení jak vnímavé, tak i expresivní řečové (čtyři slovní věty, 200 slov) a chůze.⁴⁶

5.4.2 Léčba v klinických studiích

Klinická studie je test na pacientech pro nové léčebné postupy, které nebyly ještě přijaty jako standardní léčba. Vědci vyvíjející léky, biologické prostředky a zdravotnické prostředky musí zajistit bezpečnost výrobků a prokázat lékařské výhody u lidí. Pre-klinický vývoj začíná před klinickými zkouškami a hlavními cíli je určit bezpečnost a účinnost těchto postupů. Výzkum může zahrnovat farmakodynamiku, farmakokinetiku, absorpční, distribuční, metabolické a exkreční studie a testování toxicity.⁴⁷

V tabulce č. 1 jsou uvedeny probíhající studie za využití autologní a alogenní pupečnickové krve a fáze klinického hodnocení, které v současnosti probíhají.⁴⁷

Fáze klinického hodnocení jsou kroky ve výzkumu, kde se zjišťuje, zda je lék prospěšný nebo škodlivý. U lidí zahrnují klinické studie fáze I, II, III, IV. Jednotlivé fáze definovány a děleny takto:

- 1. Fáze 1:** Hodnotí nejlepší způsob podávání léku, jeho frekvenci a dávku, maximální tolerovanou dávku a vedlejší účinky. Vyhodnocuje se tolerance, farmakokinetika a farmakodynamika. Tyto studie určují, zda je léčba bezpečná. Studie obvykle zahrnuje 20 až 100 pacientů a je monitorována klinickým výzkumným pracovníkem.
- 2. Fáze 2:** Tyto studie se provádějí na větších skupinách (100 až 300 jedinců) a jsou prováděny proto, aby bylo možné posoudit, jak dobře funguje lék a pokračuje se v hodnocení bezpečnosti terapeutické dávky, která byla stanovena během fáze I, a pacienti jsou sledováni klinickým výzkumným pracovníkem.

- 3. Fáze 3:** Studie fáze III jsou vyhodnocením léčby v plném rozsahu a jsou navrženy tak, aby porovnalý účinnost nové léčby se standardním ošetřením. Jedná se o nejpřísnější a nejrozsáhlejší typ vědeckého klinického výzkumu nové léčby. Toto je fáze před uvedením na trh. Jsou to časově náročné pokusy. Provádí se na velkých skupinách lidí (100 až 3000). Pacienti jsou sledováni klinickým výzkumným pracovníkem a osobním lékařem.
- 4. Fáze 4:** Fáze IV zahrnují všechny studie prováděné po schválení léčivého přípravku. Jsou to post-marketingové sledovací studie. Ústředním bodem studií je, jak léky pracují v reálném světě. Zjišťuje se účinnost a detekce vzácných nebo dlouhodobých nežádoucích účinků u mnohem větší populace pacientů. Vyhodnocuje se delší časové období, stanoví se náklady na zdravotní péči. Mohou být stanoveny nové klinické indikace pro léčivo.⁴⁷

Neurologické poruchy

Diagnóza	Alogenní	Autologní
Autismus		Fáze 2 Fáze 1
Dětská mozková obrna	Fáze 2	Fáze 2 Fáze 2 Fáze 1 Fáze 2
Ztráta sluchu (získaná percepční)		Fáze 2
Hypoxická ischemická encefalopatie (HIE)		Fáze 1
Poranění míchy	Fáze 2	

Tabulka č. 1

Převzato z: <https://parentsguidecordblood.org/cz/lecitelna-onemocneni#standardni>

5.5 Onemocnění potencionálně léčitelné buněčnou terapií

Terapie kmenovými buňkami je definována jako terapie, při které je pacientovi injektován buněčný materiál. Transplantace lidských buněk od dárce k pacientovi má silné vyhlídky do budoucna. Terapeutické aplikace zahrnují terapii nervových kmenových buněk, terapii mezenchymálních kmenových buněk a další, jako je transplantace hematopoetických kmenových buněk. Buněčná terapie může být provedena s mnohem menším rizikem pro pacienta a může být aplikován také na pacienty, kteří jsou vážně nemocní a nebudou schopni tolerovat transplantaci orgánů.⁴⁸

5.5.1 Diabetes mellitus 1. typu

Jedná se o autoimunitní onemocnění, které vzniká při nedostatku inzulínu. Inzulín je produkován beta buňkami Langerhansových ostrůvků v pankreatu, které jsou poškozeny imunitním systémem pacienta. Inzulín řídí vstup glukózy téměř do všech buněk organismu i využití glukózy v orgánech. Při nedostatku inzulínu není glukóza spotřebována a vzniká hyperglykémie (zvýšená hladina cukru v krvi), která pacienta ohrožuje na životě. Dochází k vážnému narušení vnitřního prostředí a může dojít až k selhání metabolismu a ke smrti.⁴⁹

5.5.1.1 Využití Embryonálních kmenových buněk (ESC):

Vytváření funkčních ostrůvků pankreatu bylo cílem biologů už od počátku roku 2000. Embryonální kmenové buňky představují slibný zdroj pro tvorbu endodermu slinivky břišní. Mnohé studie uvádějí úspěšnou tvorbu pankreatických beta-buněk, které reagují na glukózu.⁵⁰

5.5.1.2 Využití kmenových buněk z pupečnickové krve:

Stále roste zájem o terapeutický potenciál léčby pupečnickové krve k modulaci autoimunitních onemocnění. Ve výzkumném centru na Floridské univerzitě byla provedena otevřená studie fáze I s použitím autologní infuze pupečnickové krve s cílem zlepšit diabetes 1. typu.⁵¹

Patnáct pacientů s diagnózou diabetu 1. typu, u kterých byla skladována autologní pupečnicková krev, podstoupila jednorázovou intravenózní infúzi autologních buněk. Pro optimalizaci glykemické kontroly byly použity intenzivní režimy inzulínu. Metabolická a imunologická vyšetření byla provedena před infúzí a po stanovených časových intervalech.⁵¹

Autologní transfúze pupečnickové krve u dětí s diabetem typu 1 je bezpečná, ale dosud neprokázala účinnost při zachování C-peptidu. 2 leté následné sledování je potřebné k určení toho, zda mohou být autologní přístupy založené na pupečnickové krvi použity ke zpomalení poklesu endogenní produkce inzulínu u dětí s diabetem 1. typu.⁵¹

Potenciál pupečnickové krve k účasti v budoucnosti léčby diabetu typu 1 existuje. Přesto je zapotřebí prozkoumat několik léčebných postupů a pravděpodobně je třeba kombinovat několik způsobů, jak dosáhnout snu o bezpečném trvalém zvrácení nemoci, nebo prevenci diabetu 1. typu. Budoucí úsilí o použití autologní pupečnickové krve při léčbě diabetes mellitus 1. typu bude pokračovat s důrazem na mechanické studie, stanovení komparativních skupin vhodných pro věk a přidání více bezpečných terapií.⁵¹

5.5.2 Parkinsonova choroba

Parkinsonova choroba je multisystémové neurodegenerativní onemocnění. Postihuje centrální nervovou soustavu. Jeho příčinou dochází k úbytku nervových buněk v mozku v oblasti substantia nigra (černá substance) a locus caeruleus. V této části mozku se vytváří dopamin, což je neurotransmitter (přenašeč) signálů mezi nervovými buňkami (neurony). U nemoci se rozvine demence a porucha motorických funkcí.⁵²

Příznaky nemoci jsou:

- Rigidita
- Ztráta mimiky obličeje
- Sehnutá postava
- Pomalý pohyb
- Šoupavá chůze
- Třes nejvíce patrný v klidu ⁵²

5.5.2.1 Využití mezenchymálních kmenových buněk (MSC)

MSC jsou schopné za určitých podmínek diferencovat na různé typy buněk, jako jsou osteoblasty, adipocyty a chondrocyty. Také se mohou diferencovat do nervových linií. Měly by být schopné vyvinout se v neurony produkující dopamin. ⁵³ Neurony odvozené od kmenových buněk jsou cenným zdrojem pro substituční buněčné terapie u Parkinsonovy choroby. ⁵⁴

5.5.2.2 Využití Embryonálních kmenových buněk

Embryonální kmenové buňky lze v laboratorních podmínkách přeměnit v kterýkoliv typ lidské buňky. Vědcům se podařilo přeměnit lidské embryonální buňky na neurony potřebných vlastností. Když neurony transplantovali do mozku potkanů s příznaky Parkinsonovy choroby, stav zvířat se zlepšil. Přestala ztrácet rovnováhu a vrátila se jim koordinace pohybu. Problémem bylo, že se objevily nežádoucí vedlejší efekty v podobě nekontrolovatelného množení buněk (nádorové bujení). Z tohoto důvodu tuto léčbu není možné používat. ⁵⁵

5.5.3 Využití kmenových buněk u předčasně narozených dětí

Vědci sledovali účinky podávání kmenových mezenchymálních buněk 9 předčasně narozeným dětem. U takto narozených dětí je často přítomné nedovyvinutí některých orgánů, hlavně plic. Kmenové buňky byly podány průdušnicí, sledování probíhalo 2 roky. Sledovaly se nežádoucí účinky podání kmenových buněk, růst dětí a vývoj dýchací a nervové soustavy. Výsledky byly porovnány s dětmi, které touto terapií neprošli. U dětí se nevyskytly žádné nežádoucí účinky spojené s léčbou. Žádné z dětí nepotřebovalo dodávat kyslík v domácím prostředí po propuštění z nemocnice, jak tomu bylo u 22 % dětí, které kmenové buňky nedostaly. Děti s kmenovými buňkami lépe přibíraly na váze, žádné nemělo mozkovou obrnu, slepotu, nebo vývojové opoždění. Naproti tomu v kontrolní skupině mělo 1 dítě mozkovou obrnu a 1 bylo vývojově opožděné.⁵⁶

6.0 Závěr

Zadáním této bakalářské práce je rešerše odborné literatury a informačních zdrojů, které se zaměřují na využití kmenových buněk.

Kmenové buňky představují velkou naději zejména pro obory tkáňového inženýrství a regenerativní medicíny. Výzkum kmenových buněk je rychle se rozvíjející obor a předpokládá se, že kmenové buňky budou v relativně krátké době rutině používány v klinické praxi. Do budoucna jsou jednou z možností buněčné terapie. Kmenové buňky bude možné použít v testování nových léčiv nebo nových terapeutických metod v oblasti genetiky. V současné době se věda setkává s úspěchy v léčbě přerušené míchy a nervů a dalších poranění. Probíhají také výzkumy v léčbě degenerativních onemocnění, jako je Parkinsonova choroba. Dále u onemocnění jako diabetes mellitus, nebo možnosti využití kmenových buněk u předčasně narozených dětí.

7.0 Seznam použité literatury

- 1 Avasthi S., Srivastava R. N., Singh A., Srivastava M.: Stem Cell: Past, Present and Future- A Review Article, 2008, Internet Journal of Medical Update, 3: 22-31
- 2 Filip S., Mokřý J., Hruška I.: Kmenové buňky – biologie, medicína, filozofie, Galén, 2006, ISBN 80-7262-401-6
- 3 Novotná B., Mareš J.: Vývojová biologie pro mediky. 1. Vydání, Praha Karolinum, 2005, ISBN 80-246-1023-X
- 4 Ohnuki M, Takahashi K.: Present and future challenges of induced pluripotent stem cells, Philosophical Transaction Royal Society B, 2015, 370 (1680): 20140367
- 5 Masopust J., Průša R.: Patobiochemie buňky. 1. Vydání, Praha: Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, 2003, ISBN 80-239-1011-0.
- 6 Hülswitt T., Brinzanik R.: Budeme žít věčně?, Kniha Zlín, 2012, ISBN 978-80-87497-37-1
- 7 Oreffo R. O. C., Cooper C., Mason C.: Stem Cell Reviews and reports, Springer 2005, ISSN: 1550-8943
- 8 Najvirtová M., Kučerová L., Kubeš M., Hamid Z.: Pupečnicková krev: slibný zdroj krvetvorných buněk pro transplantace, Praktická Gynekologie, 2006, 10(2): 82-85
- 9 Jendelová P.: Materiály pro buněčnou a tkáňovou transplantaci. Dostupné z: http://www2.ikem.cz/vyzkum/files/vyuka/mr/2016_Jendelova_materialy.pdf
13. 1. 2017
- 10 DiCara V., Vidovičová H., Česká asociace sester.: Výkladový ošetrovatelský slovník, Grada Publishing a.s., 2007, ISBN 978-80-247-2240-5
- 11 Dylevský I.: Funkční anatomie, Grada Publishing a.s., 2011, ISBN 978-80-247-3240-4
- 12 Dar S., Lazer T., Shah P. S., Librach C. L.: Neonatal outcomes among singleton births after blastocyst versus cleavage stage embryo transfer: a systematic review and meta-analysis, Human Reproduction Update, 2014, 20 (3): 439-448.
- 13 Hruška I., Filip S.: Kmenové buňky, buněčná terapie a etické problémy medicíny, Časopis lékařů českých, 2007, 146 (5): 440-443

- 14 Hejčl A., Jendelová P., Sameš M., Syková E.: Experimentální a klinické aplikace mezenchymálních kmenových buněk u míšního poranění, Česká a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie, 2014, 110 (5): 560-567
- 15 Gholamrezanezhad A.: Stem Cells in Clinic and Research, InTech Open, 2011, Dostupné online, ISBN 978-953-307-797-0
- 16 Slezáková L., Andréssová M., Foukalová B., Roučová M.: Ošetřovatelství v gynekologii a porodnictví, Grada Publishing a.s., 2011, ISBN 978-80-247-3373-9
- 17 Klabusay M., Dvořák P., Mayer J.: Kmenové buňky: nový příslib v medicíně. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?id=vl_05_02_13.pdf 10. 3. 2017
- 18 Goodell M. A., Nguyen H., Shroyer N.: Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015, 16(5): 299–309.
- 19 Doubek M.: Příprava a postup při transplantaci. Dostupné z: <https://www.linkos.cz/transplantace-krvetvornych-bunek/priprava-a-postup-pri-transplantaci/> 30. 6. 2017
- 20 Jackson K. A., Mi T., Goodell, M. A.: Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle, Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A., 1999, 96, 14482-14486.
- 21 Miroslav O.: Nervové buňky a jejich svět, Grada Publishing a.s., 2015, ISBN 978-80-247-5070-5
- 22 Guasti L., Prasongchean W., Kleftouris G., Mukherjee S., Thrasher A. J., Bulstrode N. W., Ferretti P.: High Plasticity of Pediatric Adipose Tissue-Derived Stem Cells: Too Much for Selective Skeletogenic Differentiation, Stem Cells Translational Medicine, 2012, 1(5): 384–395
- 23 Cyranoski D.: Stem cells: 5 things to know before jumping on the iPS bandwagon, Nature, 2008, 452 (7186): 406-8
- 24 Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming, Advances in biochemical engineering biotechnology, 2009, 114:185-199.
- 25 Gómez-López S., Lerner R. G., Petritsch C.: Asymmetric cell division of stem and progenitor cells during homeostasis and cancer, Cellular and Molecular Life Sciences, 2014, 71(4): 575-597

- 26 Hawkins N., Garriga G.: Asymmetric cell division: from A to Z, *Genes Development*, 1998, 12 (23): 3625-38
- 27 Morrison S. J., Kimble J.: Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer, *Nature*, 2006, 441, 1068-74
- 28 Berika M., Elgayyar M. E., El-Hashash A. H. K.: Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2014, 2: 33
- 29 Dylevský I.: *Obecná kineziologie*, Grada Publishing, 2007, ISBN 978-80-247-1649-7
- 30 Lüllmann-Rauch R.: *Histologie*, Grada Publishing, 2012, ISBN 978-80-247-3729-4
- 31 Chvátal A., Syková E.: Membránové vlastnosti neuronů, gliových a kmenových buněk v centrálním nervovém systému, *Bulletin HPB*. Dostupné z: <http://www.hpb.cz/cz/cas/sup01/index.html>
- 32 Huser M., Petrenko M.: Kmenové buňky v gynekologii a porodnictví, *Praktická gynekologie*, 2004 3: 15-18
- 33 Ren G., Chen X., Dong F.: Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues, *Stem Cells Translational Medicine*, 2012, 51-58
- 34 Zimmerlin L., Donnenberg V. S., Pfeifer M. E.: Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue, *Cytometry A.*, 2010, 77, 22-30.
- 35 Gibbs N., Diamond R., Sekyere E. O., Thomas W. D.: Management of knee osteoarthritis by combined stromal vascular fraction cell therapy, platelet-rich plasma, and musculoskeletal exercises: a case series, *Journal of Pain Research*, 2015, 8:799-806
- 36 Shiffman M. A.: *Autologous Fat Transfer*, Springer, 2010, ISBN: 978-3-642-00472-8,
- 37 Osawa M., Hanada K., Hamada H., Nakauchi, H.: Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell, *Science*, 1996, 273: 242-245
- 38 Vaňásek J., Starý j., Kavan P., Vaňásek J. jr.: *Transplantace kostní dřeně*, Galén, 1996, ISBN 8085824353
- 39 Klener P.: *Vnitřní lékařství 2. Doplněné vydání*, Galén, 2001, ISBN 80-246-0273-3

- 40 Hansen M., Bower C., Milne E.: Assisted reproductive technologies and the risk of birth defect a systematic review, *Human Reproduction*, 2004, 26: 127-133
- 41 Henningson C. T., Stanislaus M. A, Gewirtz A. M.: Embryonic and adult stem cell therapy, 2003, *The journal of allergy and clinical immunology*, 2003, 2: 745–753
- 42 Schwartz S. D., Hubschman J. P., Heilwell G., Franco-Cardenas V., Pan C. K., Ostrick R. M., Mickunas E., Gay R., Klimanskaya I., t Lanza R.: Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report, *The lancet*, 2012, 379, 9817: 713–720
- 43 Doležal A., Černý D., Doležal T.: Kmenové buňky. Etické a právní aspekty výzkumu, Ústav státu a práva AV ČR, 2013, ISBN 978-80-8743-913-5
- 44 Lee O. K., Kuo T. K., Wei-Ming C., Lee K. D., Hsieh S. L., Chen T. H.: Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood, *Blood*, 2004, 103: 1669-1675.
- 45 Appasani K., Appasani R. K.: Stem Cells & Regenerative Medicine From Molecular Embryology to Tissue Engineering, Springer Science+Business Media, 2011, ISBN 978-1-60761-859-1
- 46 Jensen A., Hamelmann E.: First Autologous Cell Therapy of Cerebral Palsy Caused by Hypoxic-Ischemic Brain Damage in a Child after Cardiac Arrest—Individual Treatment with Cord Blood, *Case Reports in Transplantation* ,2013, ID 951827
- 47 Mahan V. L.: Clinical Trial Phases, *International Journal of Clinical Medicine*, 2014, 5: 1374-1383
- 48 Jain A., Bansal R.: Applications of regenerative medicine in organ transplantation, *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2015,7(3):188-194
- 49 Stříteský J.: Patologie, Epava Olomouc s.r.o., 2001, ISBN 978-80-86297-06-4
- 50 Baetge E. E.: Production of β -cells from human embryonic stem cells *Diabetes, obesity and metabolism*, 2008, 10(4): 189-194, Online ISSN: 1463-1326
- 51 Haller M. J., Wasserfall C. H., McGrail K. M., Cintron M., Brusko T. M., Wingard J. R., Kelly S. S., Shuster J. J, Atkinson M. A., Schatz D. A.: Autologous Umbilical Cord Blood Transfusion in Very Young Children With Type 1 Diabetes, *Diabetes Care*, 2009,32(11): 2041-2046
- 52 Mačák J., Mačáková J.: Patologie, Grada, 2004, ISBN 80-247-0785-3

- 53 Dezawa M., Kanno H., Hoshino M., Cho H., Matsumoto N., Itokazu Y., Tajima N., Yamada H., Sawada H., Ishikawa H., Mimura T., Kitada M., Suzuki Y., Ide C. I.: Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation, 2004, *Invest.* 113: 1701-1710.
- 54 Trzaska K. A., Kuzhikandathil E. V., Rameshwar P.: Specification of a dopaminergic phenotype from adult human mesenchymal stem cells, 2007, *Stem Cells.* 25: 2797-2808.
- 55 Carson T. Ch., Aigner S, Gage H. F.: Stem cells: the good, bad and barely in control, 2006, *Nature Medicine* 12, 1259–1268
- 56 Ahn S. Y., Chang Y. S., Kim J. H., Sung S. I., Park W. S.: Two-Year Follow-Up Outcomes of Premature Infants Enrolled in the Phase I Trial of Mesenchymal Stem Cells Transplantation for Bronchopulmonary Dysplasia, 2017, *The Journal of Pediatrics*, 185: 49–54.

8.0 Přílohy

8.1 Seznam obrázků

Obrázek č. 1, str. 12 – Hierarchie kmenových buněk

Obrázek č. 2, str. 13 – Lidské embryonální kmenové buňky

Obrázek č. 3, str. 16 – Mimetělní oplodnění (IVF)

Obrázek č. 4, str. 17 – Postup klonování

Obrázek č. 5, str. 18 – Mezenchymální kmenové buňky

Obrázek č. 6, str. 23 – Kolonie indukovaných pluripotentních kmenových buněk

Obrázek č. 7, str. 25 – Asymetrické dělení kmenových buněk

8.2 Seznam tabulek

Tabulka č. 1, str. 37 – Léčba v klinických studiích