

Teoretické základy klinické medicíny (TZKM)

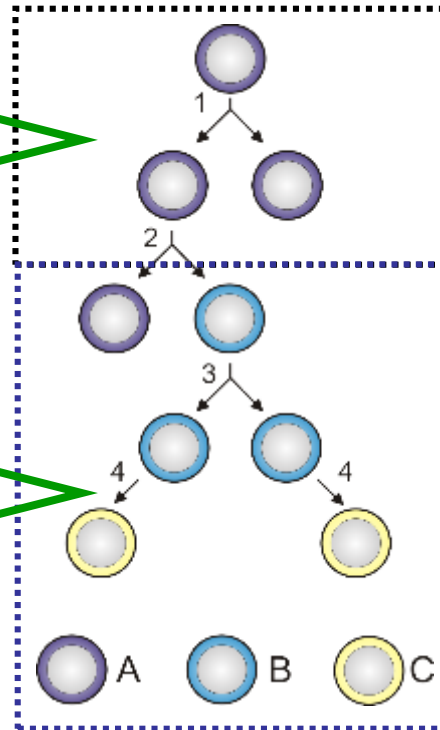
Význam a perspektiva využití kmenových buněk v medicíně I

Vladimír Rotrekl 2017

Kmenové buňky: kriteria a definice

Sebeobnova

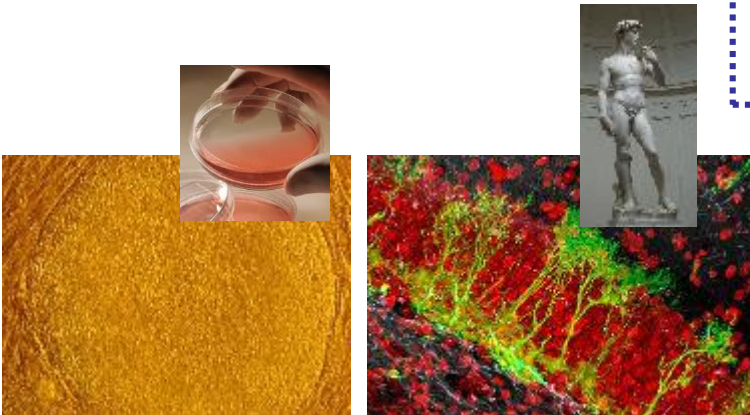
Schopnost vytvářet vlastní kopie



Schopnost měnit vlastnosti a funkčně se specializovat

Klonální kapacita
• Symetrické dělení
• Asymetrické dělení

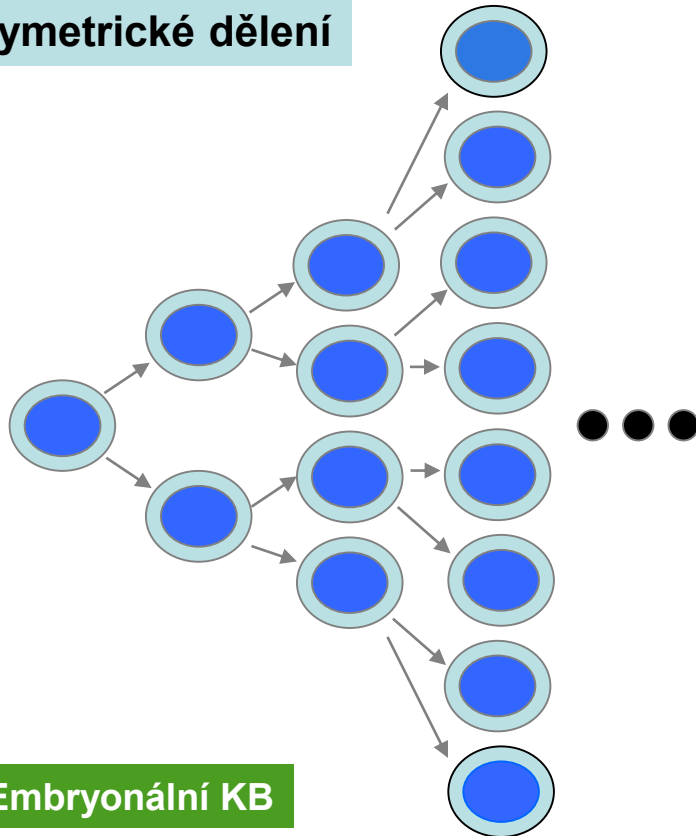
Toti
Pluri
Multi
Oligo
Uni } **potence**



Kmenové buňky se sebeobnovují, množí

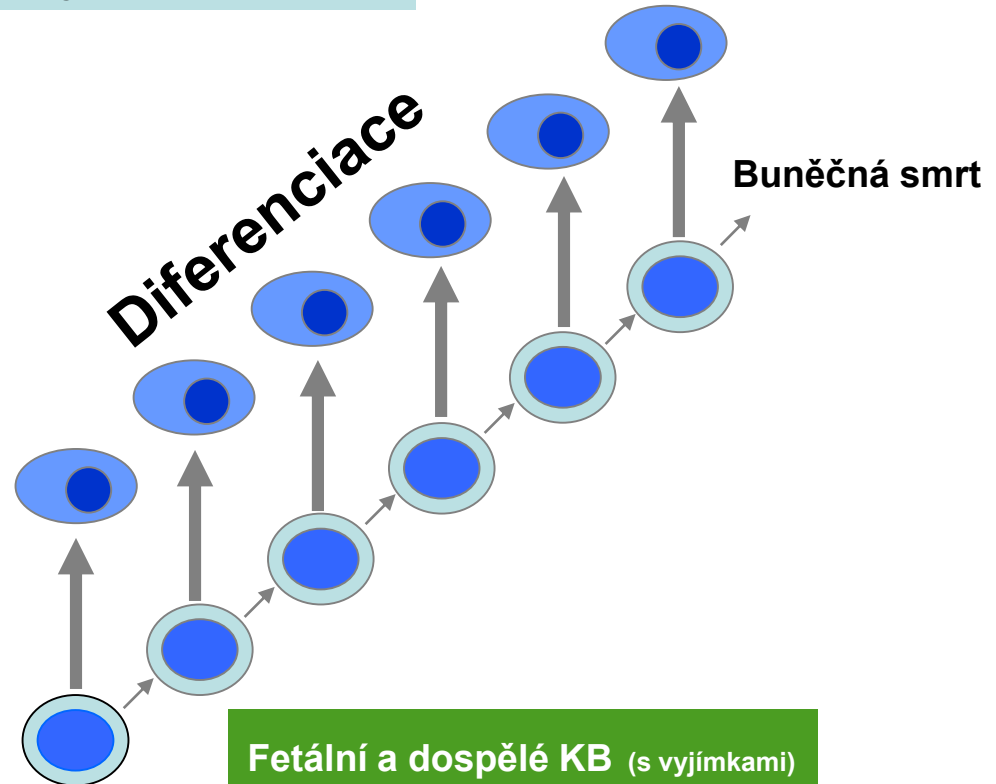
Sebeobnova = tzv. self-renewal; nejdůležitější vlastnost kmenových buněk; schopnost vytvořit identické dceřiné buňky

Symetrické dělení



Embryonální KB

Asymetrické dělení



Fetální a dospělé KB (s výjimkami)

Kombinace obou mechanismů = neurální KB !!!

... a diferencují a regenerují tkáně orgány

totipotence → pluripotence → multipotence → oligopotence → unipotence

zygota

Embryonální KB

Hematopoetické KB

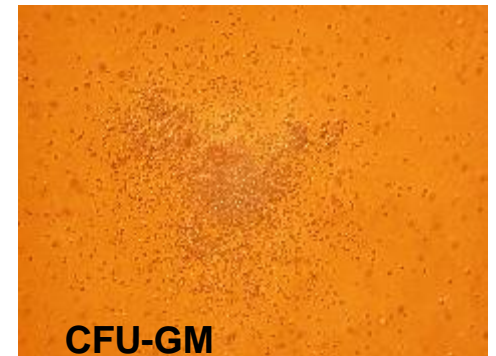
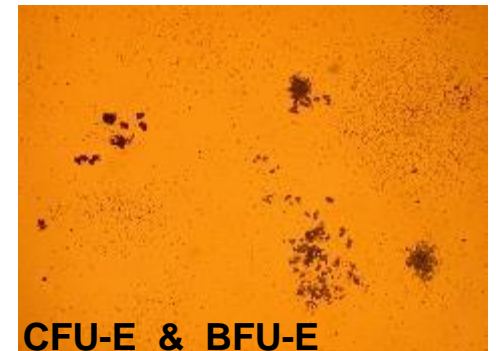
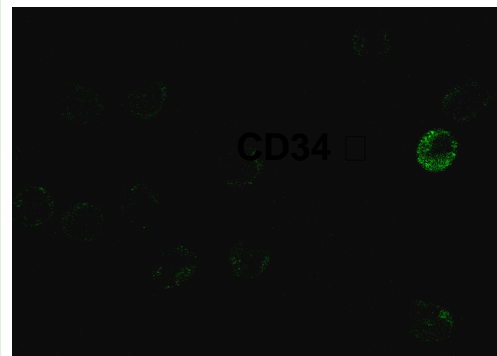
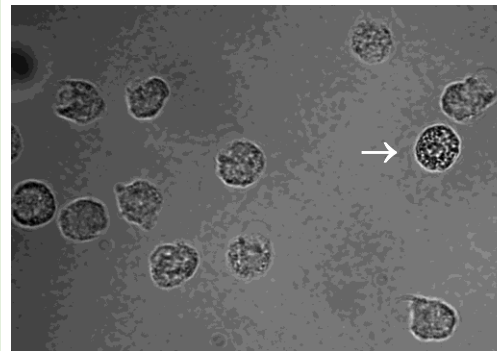
Gastrointestinální KB

KB prostaty

Nediferencované KB

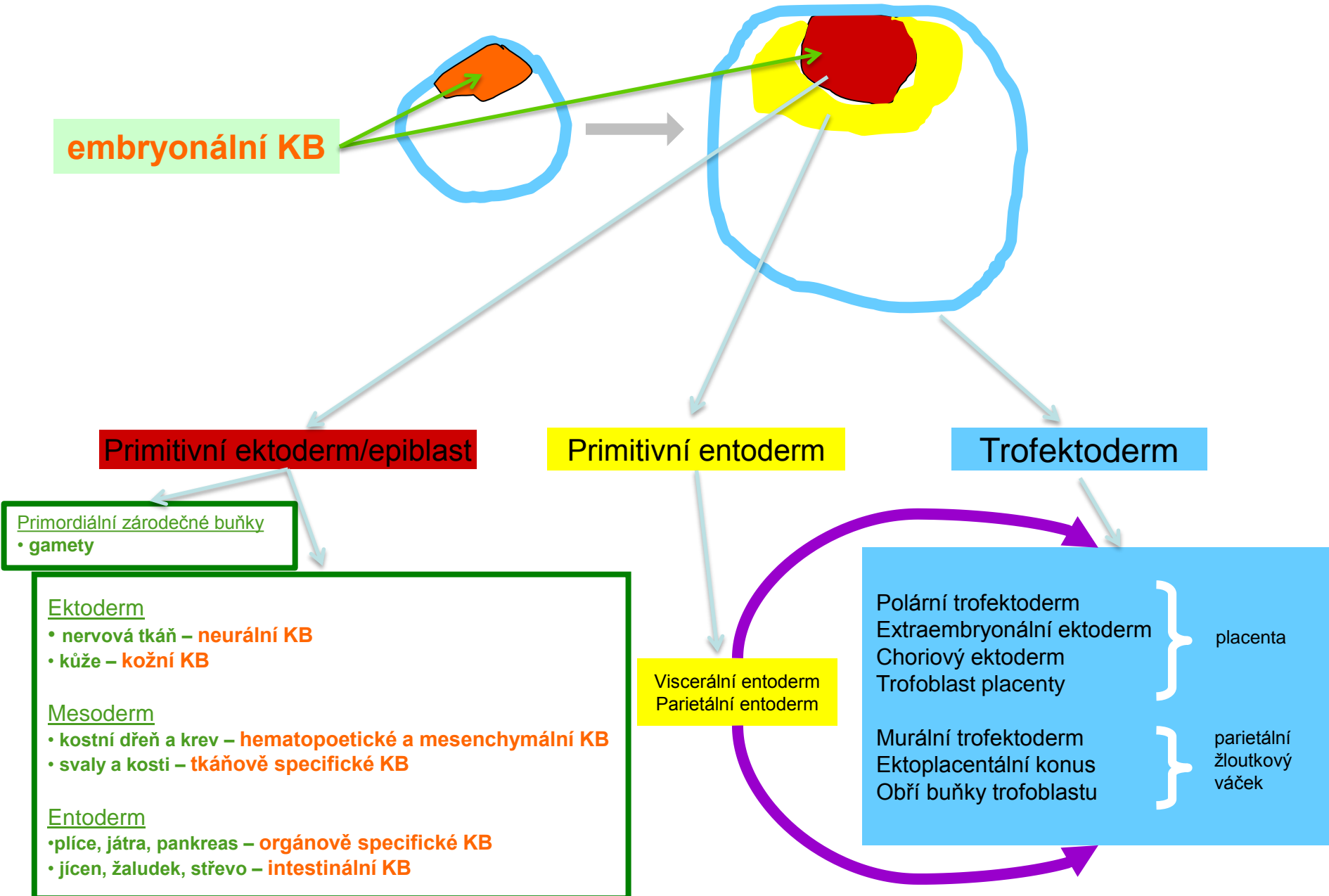
Kolonie mnoha tisíc buněk

Neurony



Příklady

Původ a vývojová ontogeneze kmenových buněk (KB)



Kmenové buňky v medicíně

- Pluripotentní
embryonální a indukované...
- Mezenchymální (Dr. Pešl)
experimentální léčba a turistika za
kmenovými buňkami
- Hematopoeitické (prof. Krejčí)
především hematologické a
imunitní onemocnění

Kmenové buňky v medicíně

- Pluripotentní embryonální a indukované...
- Mezenchymální (Dr. Pešl) experimentální léčba a turistika za kmenovými buňkami
- Hematopoeitické (prof. Krejčí) především hematologické a imunitní onemocnění

Pluripotentní kmenové buňky

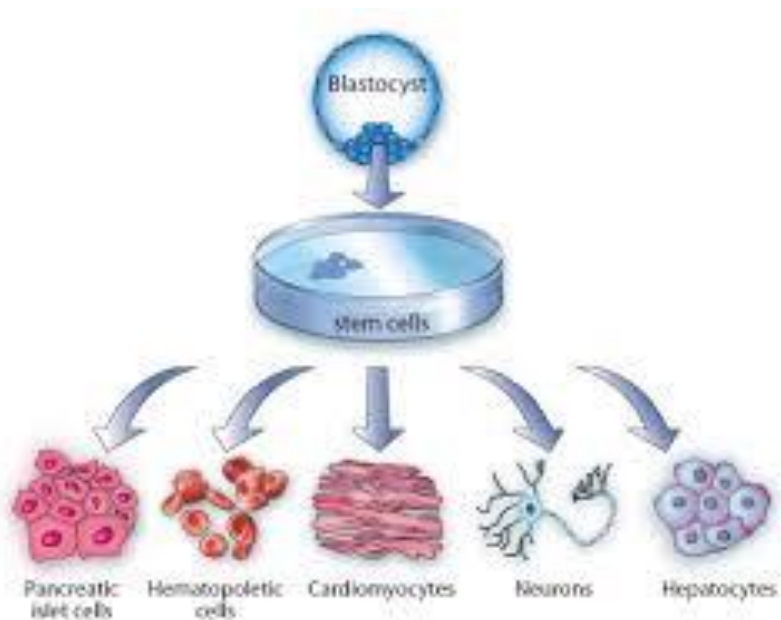


Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.

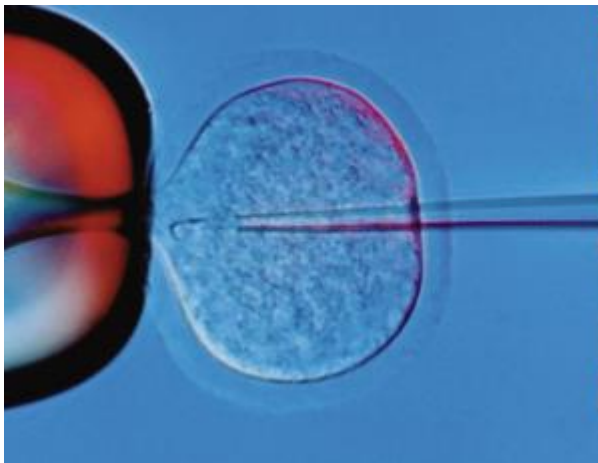
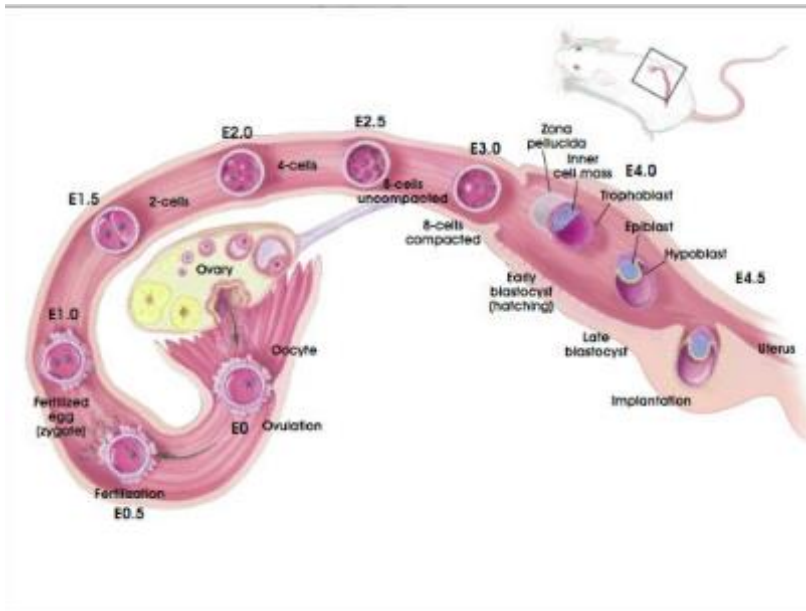
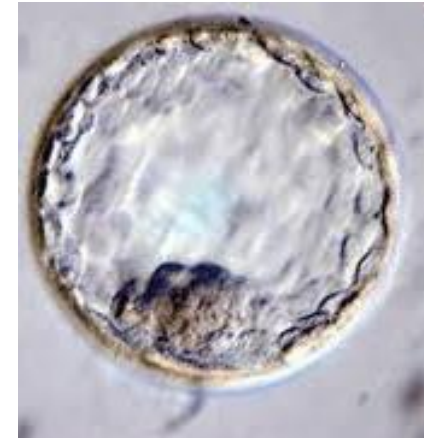


One Ring to Rule Them All...

...nebo to mělo být:
One cell to rise them all...?

Co myslíme EMBRYEM, když mluvíme O kmenových buňkách

- preimplantační stádium
- blastocysta 4 dny stará
- tvoří ji několik desítek buněk
- embryoblast a trofoblast



~9000 embryí implantováno (většinou po třech) ročně v ČR
zbytek >50% zůstane zamražen a ...



Benedict XIV

The destruction of human embryos to harvest stem cells is "not only devoid of the light of God but is also devoid of humanity" and "does not truly serve humanity."

James Thompson

"[T]he bottom line is that there are 400,000 frozen embryos in the United States, and a large percentage of those are going to be thrown out. Regardless of what you think the moral status of those embryos is, it makes sense to me that it's a better moral decision to use them to help people than just to throw them out. It's a very complex issue, but to me it boils down to that one thing."



Zákon 227/2006 Sb

Zákon o výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách a souvisejících činnostech a o změně některých souvisejících zákonů

- Státem provozovaný registr linií lidských embryonálních kmenových buněk
- Výzkum lze provádět výhradně s povolením MŠMT
- Výzkum/činnost nesmí vést k vytvoření jedince (klonování)

Zákon 273/2011 Sb

- Skladování embryí neomezenou dobu (EU většinou 5 let)
- Likvidace embryí po 10 letech, pokud si pár nepřeje jinak

Zákon 227/2006 Sb

Zákon o výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách a souvisejících činnostech a o změně některých souvisejících zákonů

Možná Hlava 22...?

„Zamražená generace“ – cca ½ milionu zmražených embryí v US

ČR: skladování embryí (ČR) ~ 10 000 Kč (jednorázově

v roce 2007 – 3400 asistovaných reprodukcí

§9 odstavec 1: a) je možné udělit, je-li zřejmé, že jde o nadbytečné lidské embryo, a zároveň dříve, než dojde k jeho použití k získání lidských embryonálních kmenových buněk.

Blok I - Diskuze

- Relevance výuky o KB pro studenty medicíny
- Relevance argumentů o lidském jedinci od oplození do smrti a účelovosti argumentů o absenci některých schopností embrya (myslet, cítit bolest)
- (ne)dostatečnost současné legislativy o EKB v ČR

Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

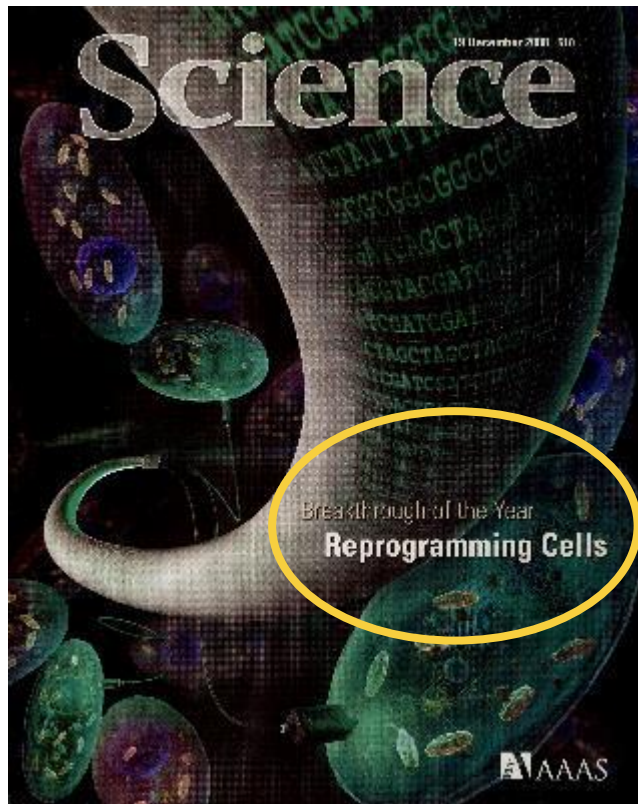
Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

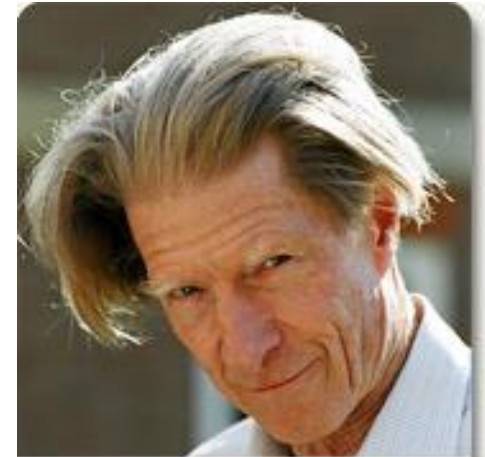
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024



Albert Lasker basic medical research award 2009



John Gurdon

University of Cambridge



Shinya Yamanaka

Kyoto University

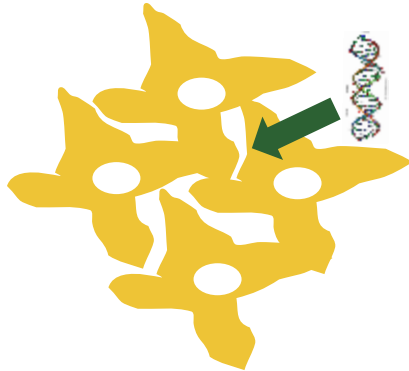


Indukované pluripotentní KB (Yamanaka 2006)

Alternativní zdroj pluripotence - Indukované pluripotentní KB (iPS cells)

- KB vytvořené ze somatických tj. diferencovaných buněk pomocí genetické metody

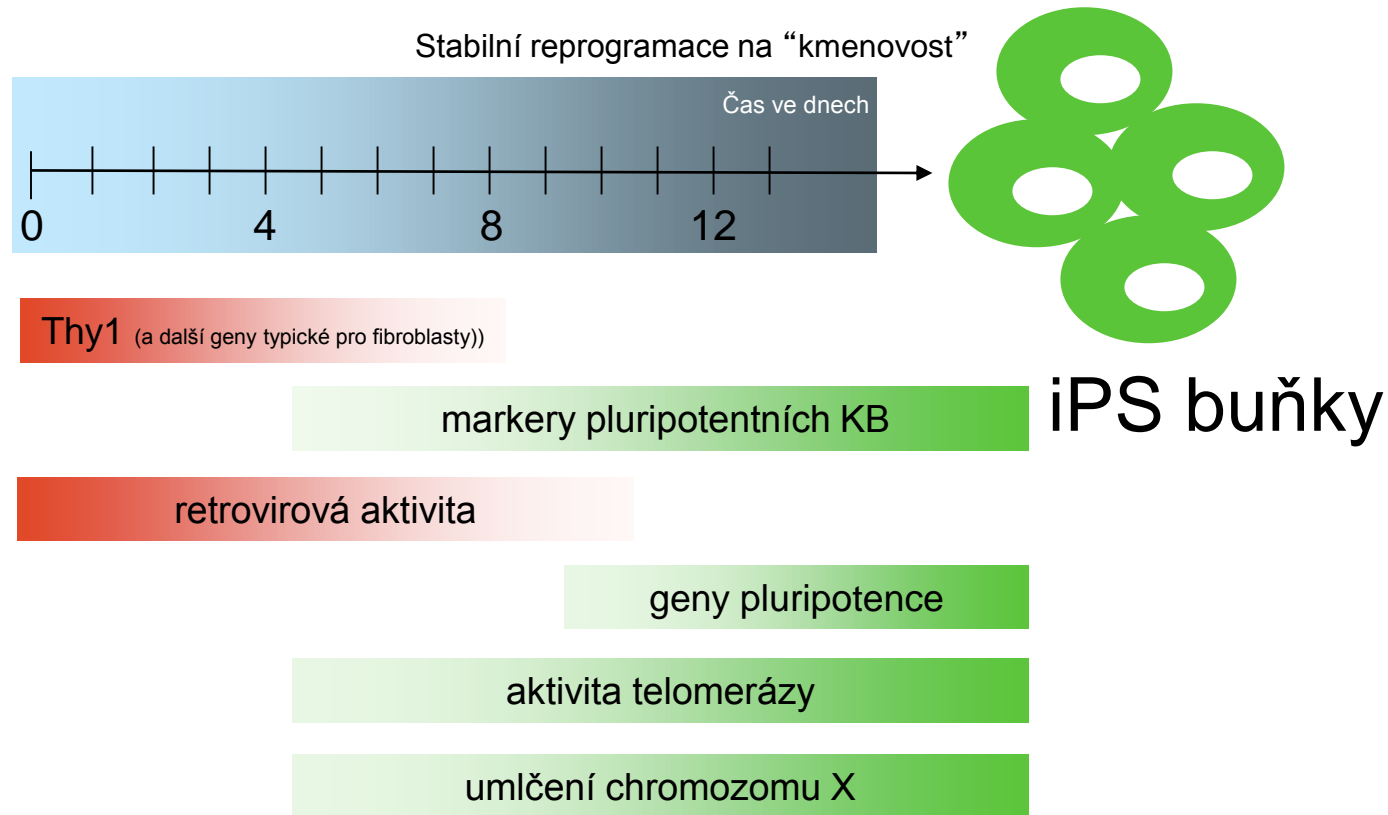
Kinetika reprogramace fibroblastů do pluripotentních KB - *relativně krátká cesta zpět*



Somatické buňky

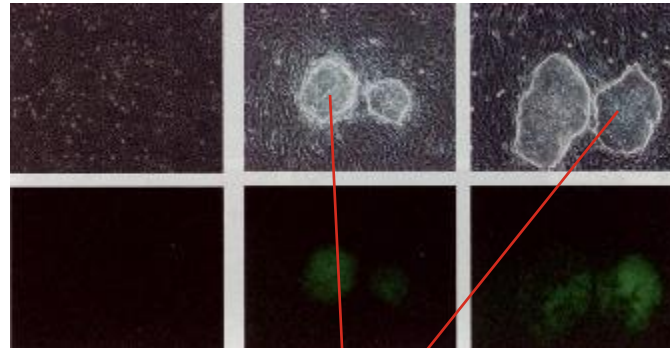
Např. kožní fibroblasty

Oct4
Sox2
c-Myc
Klf4



iPS jsou schopny vytvořit chimérní organizmus

Oct-4 GFP fibroblasty Oct-4 GFP iPS Nanog GFP iPS



Injekce chiméry
(bílá a hnědá srst)



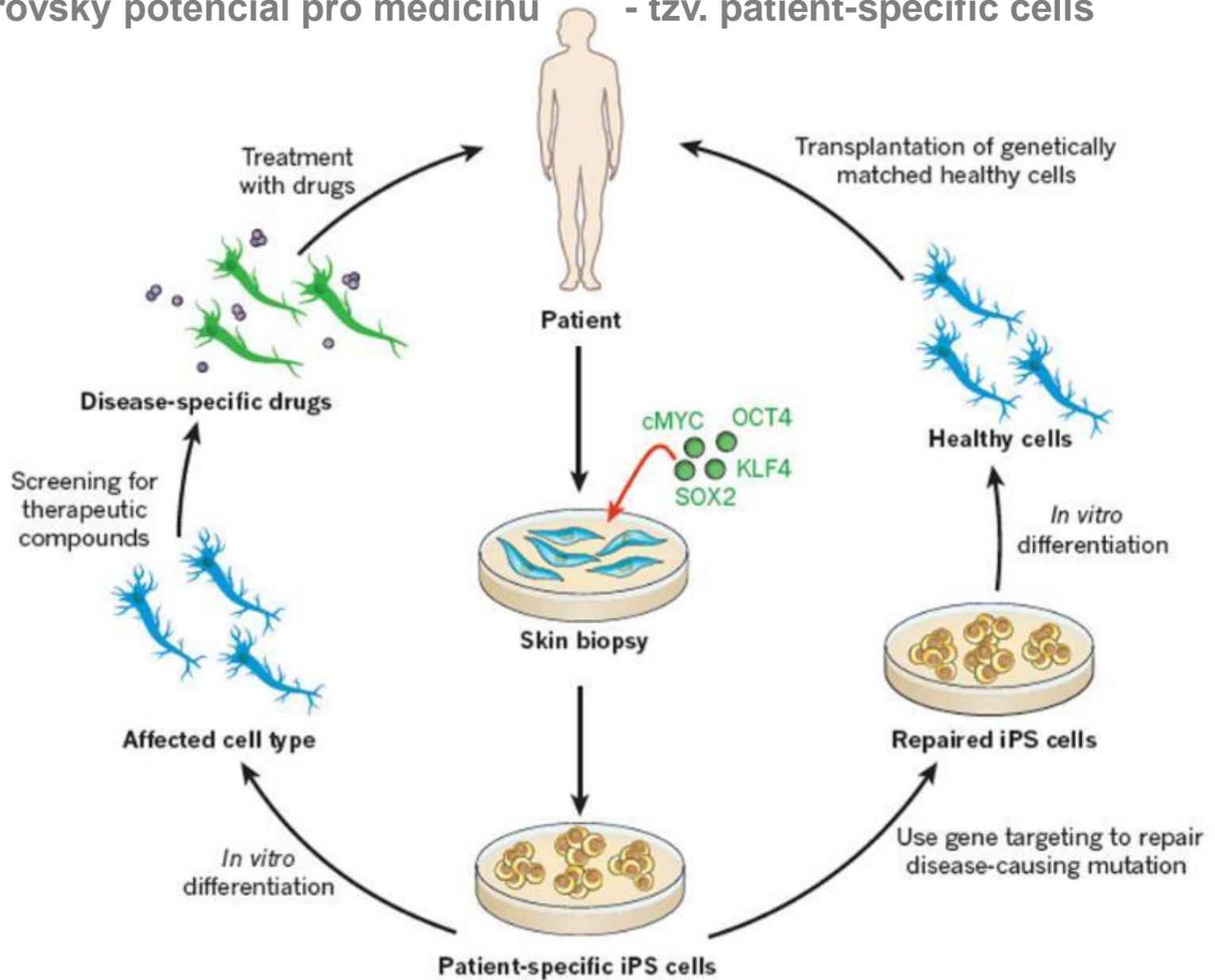
Nanog GFP iPS chiméra



Oct-4 GFP iPS chiméra

Indukované pluripotentní kmenové buňky

mají obrovský potenciál pro medicínu - tzv. patient-specific cells



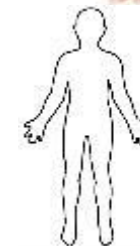
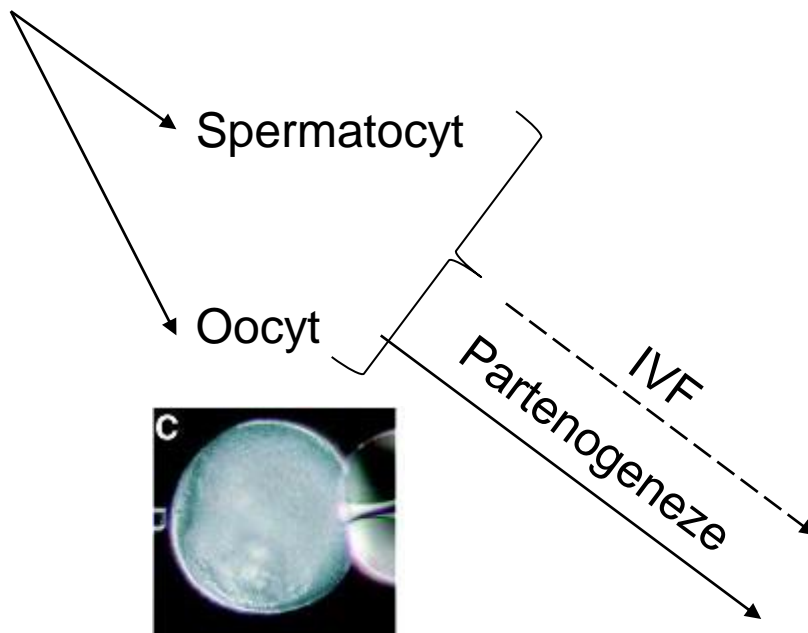
LIDSKÉ INDUKOVANÉ PLURIPOTENTNÍ KMENOVÉ BUŇKY

- není potřeba destrukce embrya
- pro “reprogramaci” lze použít vlastní buňky pacienta a odpadá tak riziko GVH

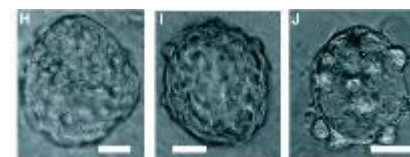
Etický problém s hiPSC?

Zárodečné buňky z pluripotentních

Diferenciace do PGC



Preimplantační embryo



Patients' Attitudes toward the Donation of Biological Materials for the Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells

Ishan Dasgupta,¹ Juli Bollinger,^{1,2} Debra J.H. Mathews,^{1,3} Neil M. Neumann,^{3,4} Abbas Rattani,¹ and Jeremy Sugarman^{1,3,*}

¹Berman Institute of Bioethics, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, 21205 USA

²Genetics and Public Policy Center, Johns Hopkins University, Washington, D.C., 20036 USA

³School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 21205, USA

⁴Medical Scientist Training Program, Johns Hopkins University, Baltimore, MD 212105, USA

*Correspondence: jsugarman@jhu.edu

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.006>

• **Altruistický sentiment a očekávání benefitů**

versus

- **Ochrana soukromí**
- **Ustavení permanentní linie buněk (nesmrtelné; např. HeLa)**
- **Komeracionalizace lidských buněk a tkání**
- **Možnost vytvořit gamety (zárodečné buňky)**
- **Editace genomu před transplantací buněk**

A

B

INSIGHTS

LETTERS

Edited by Jennifer Sills

Lift NIH restrictions on chimera research

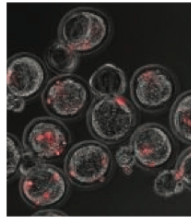
MANY OVERSIGHT MECHANISMS exist for research involving human subjects and cells, as well as the transfer of materials into other vertebrates, partly to reassure the public that biomedical research is ethically conducted. In the recently posted notice NCF-DD-15-158, the NIH stated that it "will not fund research in which human pluripotent cells are introduced into non-human vertebrate animal pre-gastrulation-stage embryos while the agency considers a possible policy revision in this area" (1). This notice encompasses human pluripotent stem cells (hPSCs), including human induced pluripotent stem cell (hiPSC)-based human/non-human chimera studies. We believe that this notice poses a threat to progress in stem cell biology, developmental biology, and regenerative medicine. We hope the guideline recommendations that emerge from the NIH Workshop on 6 November will accelerate the decision to reinstate NIH funding for this research area, which has tremendous promise. We strongly believe that a continued dialogue between scientists and bioethicists regarding human/non-human chimera studies is critical for advancing human health through basic science.

Much of the bioethical concern in regard to human/non-human chimerism arises from the possibility of chimeric animals harboring human neurons and germ cells. Can human neural cells coexist with those from animals and establish "humanized" cerebral anatomy and circuitries? Furthermore, would such chimeras be elevated to a higher metaphysical state and "think" more like us (2)? Current scientific data have not supported such possibilities, despite hundreds of xenotransplant studies introducing human neurons into the mouse brain (3–5). With regard to germline transmission, the National Academy of Medicine and the National Research Council have stated in

US

the Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research that animals in which human pluripotent stem cells (hPSCs) have been introduced during development should not breed and that hiPSC chimerism with non-human primates is restricted (6).

Research involving hPSC complementation in non-human, pre-gastrulation-stage vertebrate embryos represents a special topic with tremendous potential to elucidate early human development. Development of stem and progenitor cells from pre-gastrulation embryos occurs over the weeks following blastocyst implantation into appropriate hosts. Currently, it is impossible to accurately recapitulate human development *in vitro*, and there is no ethical method to obtain post-



Engraftment of hiPSC (red) into mouse blastocyst-stage embryo

implantation-stage human fetal tissue for isolating tissue and organ stem cells for regenerative medicine. Although early chimera studies involving hESCs/iPSCs and non-human vertebrate animal blastocysts have shown some capacity for contribution to host tissues (7–9), much work remains to unravel key differences in early development between humans and other vertebrates. If we

succeed in inducing significant chimerism between hPSCs and pre-gastrulation-stage embryos from non-human vertebrates, tremendous potential exists to develop humanized disease models for studying drug pharmacology. Similarly, implantation of hPSCs derived from patients with heritable diseases could illuminate genetic disease pathogenesis in an appropriate *in vivo* context. It may even be possible to generate an unlimited supply of therapeutic replacement organs using porcine or sheep models, an effort that we (H.N.) have undertaken with support from the California Institute for Regenerative Medicine. By eliminating federal funding for this research, the NIH casts a shadow of negativity towards all chimera studies regardless of whether human cells are involved.

Ultimately, we believe that human/non-human chimera studies in pre-gastrulation embryos hold tremendous potential to improve our understanding of early development, enhance disease modeling, and promote therapeutic discovery. Given that the objective of the NIH is to enable discoveries that advance human health, the restrictions presented

Cell Stem Cell Brief Report

UK

CellPress

Human-Mouse Chimerism Validates Human Stem Cell Pluripotency

Victoria L. Mascetti^{1,*} and Roger A. Pedersen¹¹The Anne McLaren Laboratory, Wellcome Trust-Medical Research Council Cambridge Stem Cell Institute, Department of Surgery and British Heart Foundation Centre of Regenerative Medicine, University of Cambridge, Cambridge, CB2 0SZ, UK

*Correspondence: vlm37@cam.ac.uk

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.017>This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>).

D

Mezidruhové chiméry pro výzkum a transplantační medicínu

Blok II - Diskuze

- Relevance výuky o reprogramaci pro studenty medicíny
- Relevance argumentů o lidském individualitě ve vztahu ke klonování
- (ne)dostatečnost současné legislativy o hiPSC v ČR

Předpoklady racionálního vývoje aplikací pluripotentních kmenových buněk v klinické medicíně

- **Otevřená a pravdivá komunikace s laickou veřejností**
- **Dokonalý informovaný souhlas**
- **Naprostá transparentnost výzkumu a preklinických testů**
- **Důvěra v systém a jednotlivce (vědce a lékaře)**

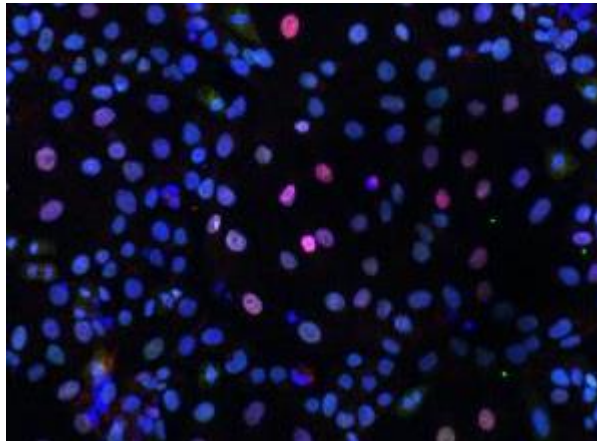
K čemu to vlastně je?

Modelování chorob

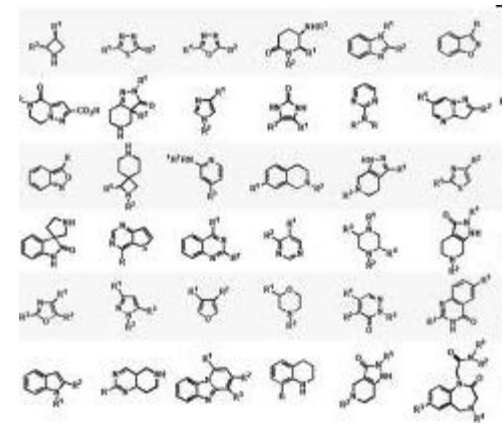
Regenerativní a transplantační
buněčná medicína



Pochopení
patologických procesů



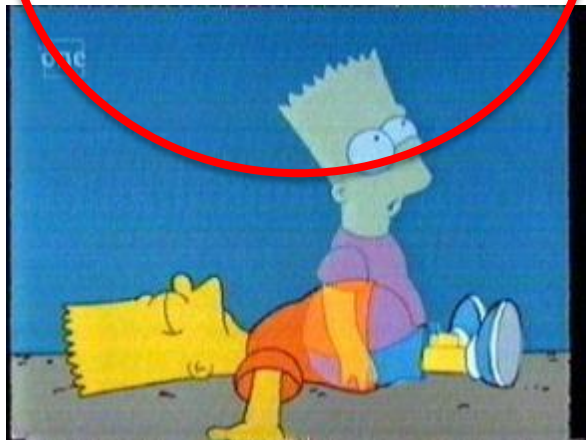
Vývoj léčiv



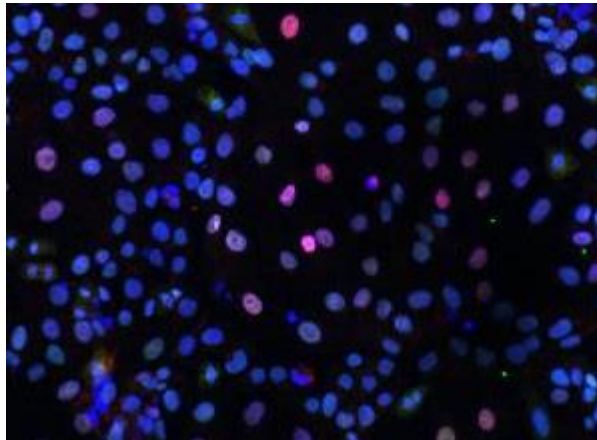
K čemu to vlastně je?

Modelování chorob

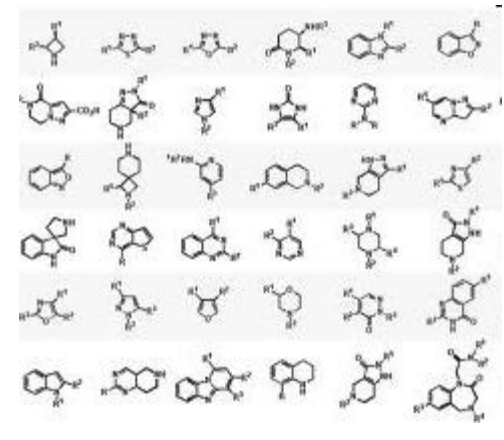
Regenerativní a transplantační
buněčná medicína



Pochopení
patologických procesů

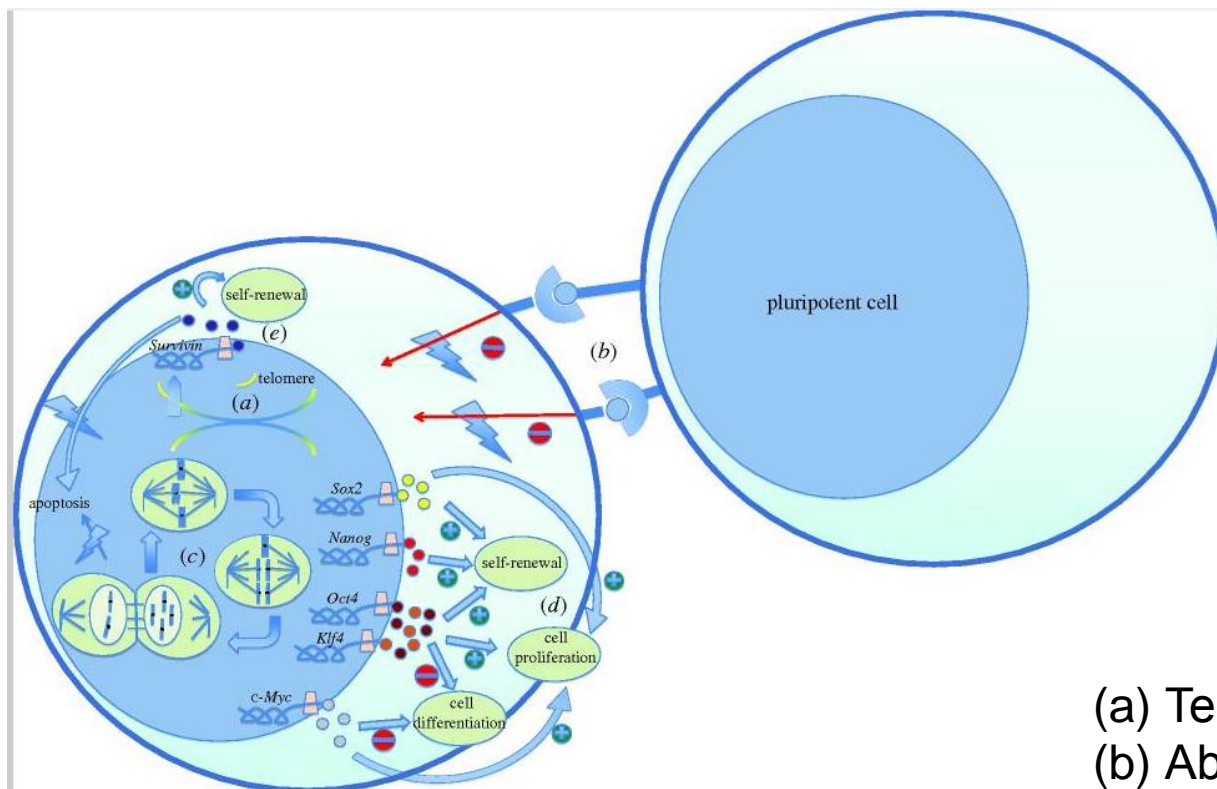


Vývoj léčiv



Jakákoliv aplikace PKB je podmíněna kvantitativní diferenciací do kýžené tkáně

Vztah mezi pluripotencí a tumorigenicitou

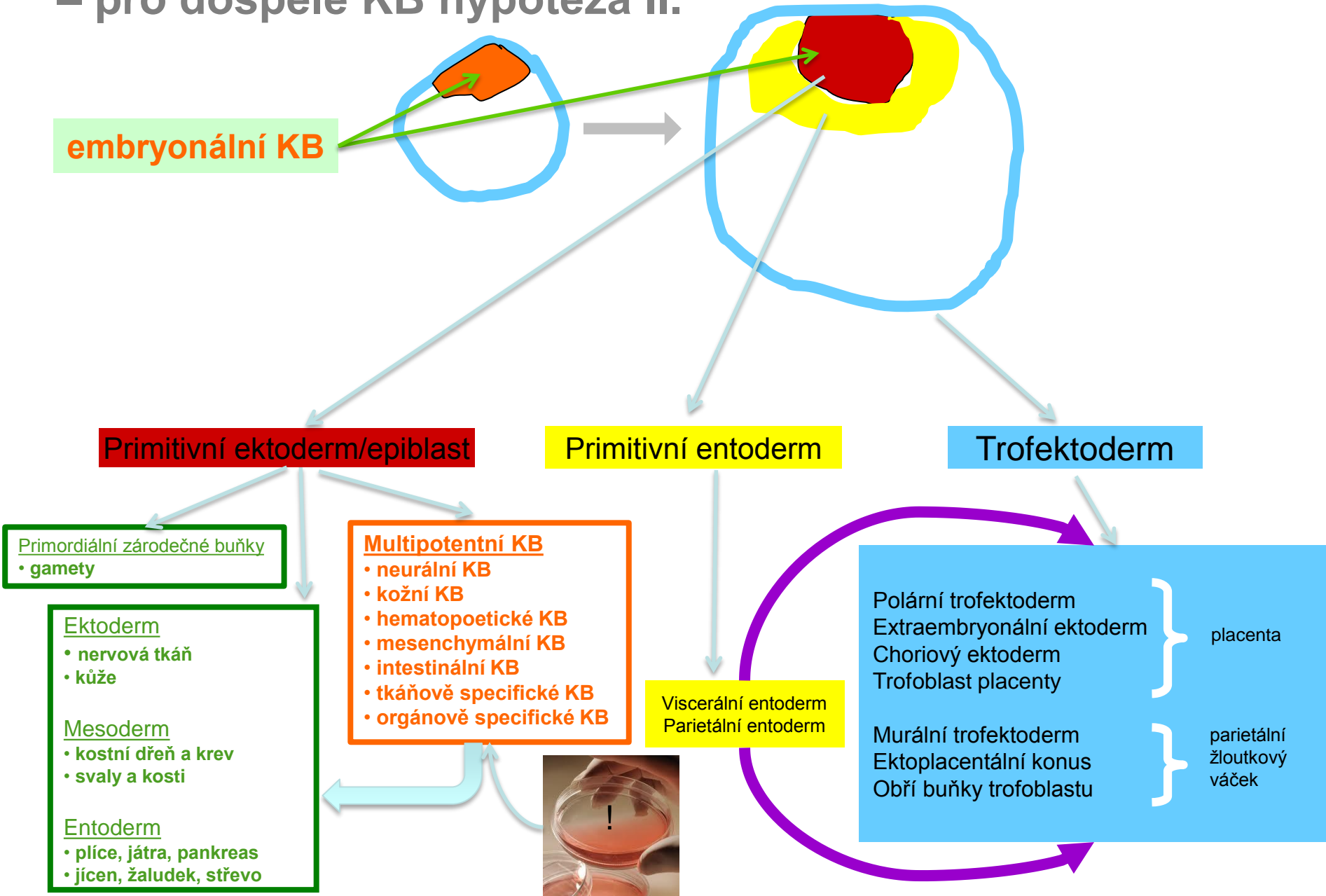


Kooreman, J R Soc Interface. 2010

- (a) Telomeráza
- (b) Absence kontaktní inhibice
- (c) Silný antiapoptotický aparát
- (d) Vysoká proliferační schopnost

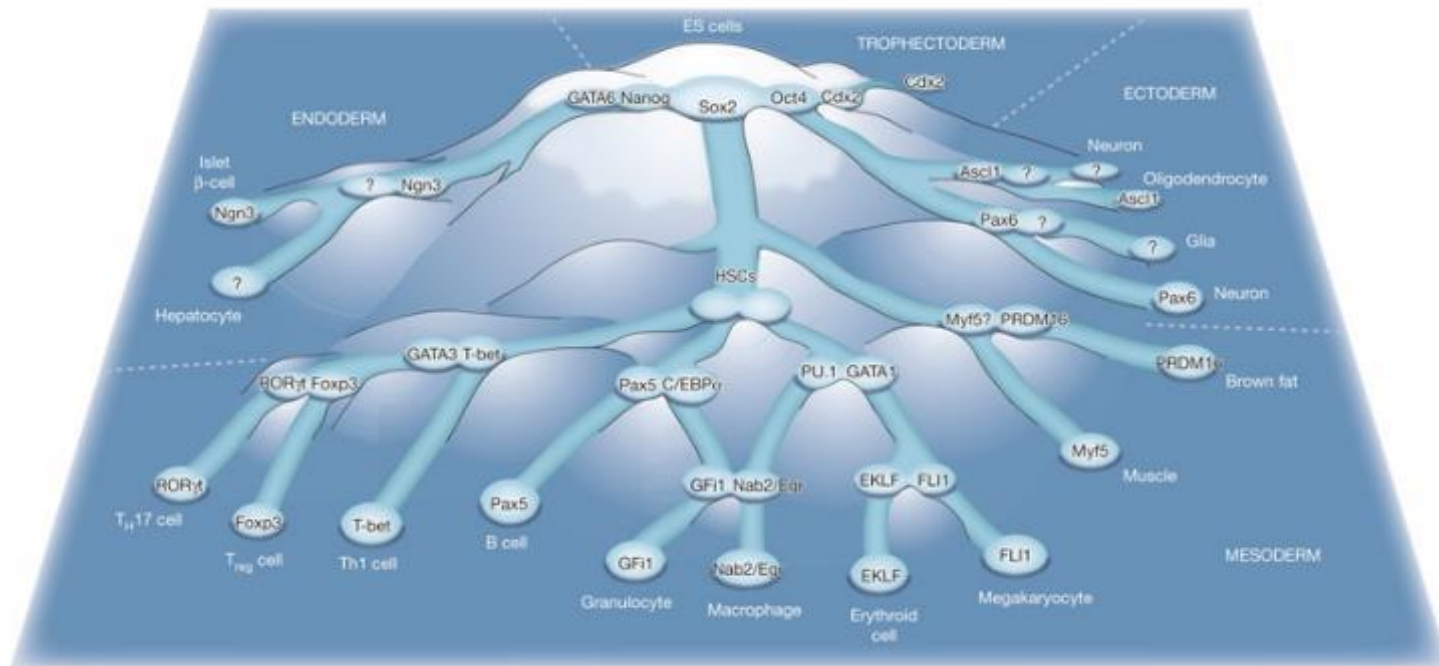
Současný standard pro klinické zkoušky: Maximálně 1 pluripotentní buňka na 10^6 diferencovaných buněk v off-the-shelf produktu!

Původ a vývojová ontogeneze kmenových buněk (KB) – pro dospělé KB hypotéza II.



Co řídí a určuje diferenciaci KB *in vivo* a *in vitro*:

Liniová diferenciacie embryonálních kmenových buněk ve členité krajině vysokých kopců (=NESTABILNÍ STAV BUNĚK), horských údolí (=RELATIVNĚ STABILNÍ ALE REVERZIBILNÍ STAV BUNĚK) a hluboké nížiny (=TERMINÁLNÍ DIFERENCIACE BUNĚK)

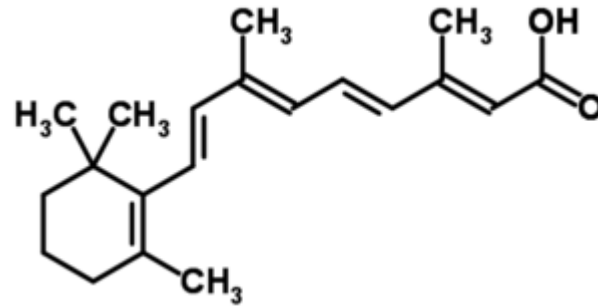


Thomas Graf & Tariq Enver *Nature* **462**, 587-594 (2009) doi:10.1038/nature08533

Transkripční a růstové faktory!

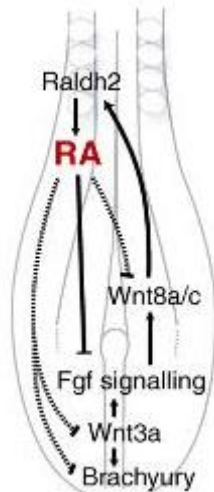
nature

DIFFERENTIATION OF PSC – analogie embryonálního vývoje...



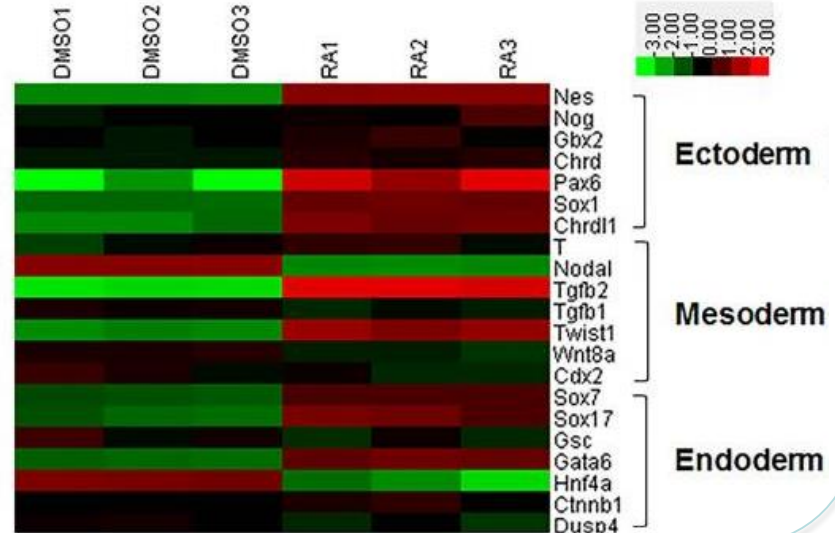
Retinová kyselina

Ustavení AP osy



Ribes, Development 2009

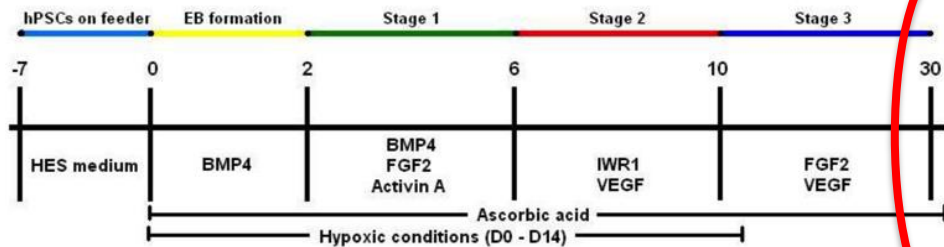
RA indukuje tvorbu ektodermu z PSC



Zhang, PLOS 2015

DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ...

A



Pešl, Heart and Vessels, 2014

BMP4 pomáhá polarizaci embrya při gastrulaci (primitivní mesendoderm)

Hensenův uzel v přítomnosti FGF2 spouští kardiogenezi

Activin A spouští tvorbu mezodermu

IWR inhibuje Wnt signál – zabrání neurodiferenciaci atp.

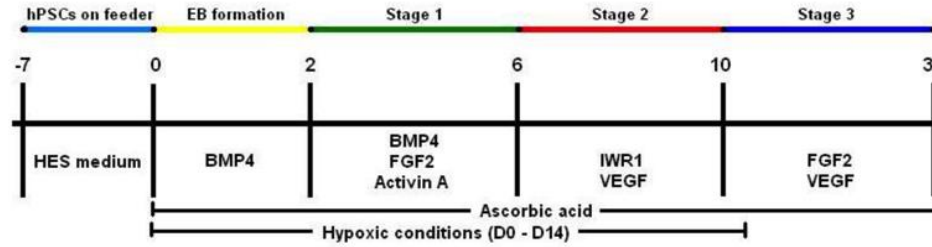
VEGF is je třeba pro pozdní morfogenezi srdce (tvorba komor)

Kardiomyocyty začínají spontánně bít

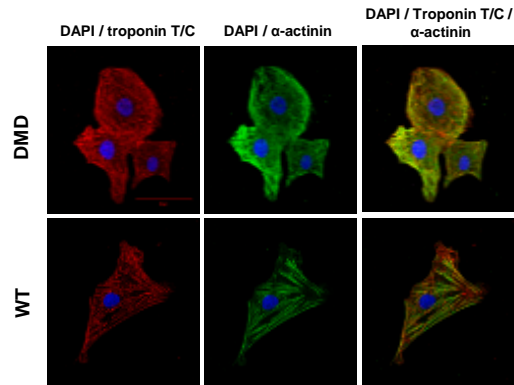


FUNCTIONAL CHARACTERISATION OF PSC DERIVED CARDIOMYOCYTES.

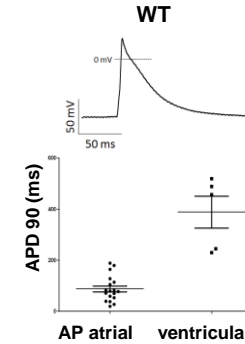
A



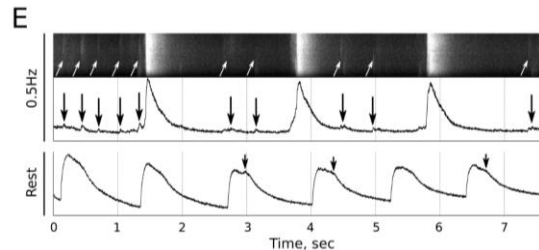
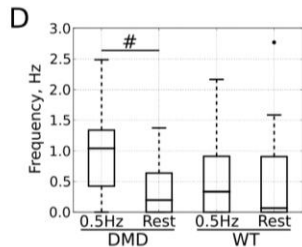
Cardiac Markers & Morphology



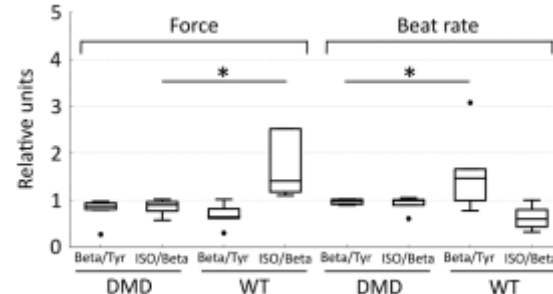
Electrophysiology (Patch Clamp)



Ca²⁺ Transients

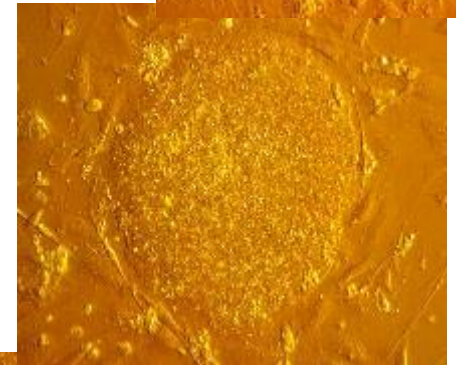
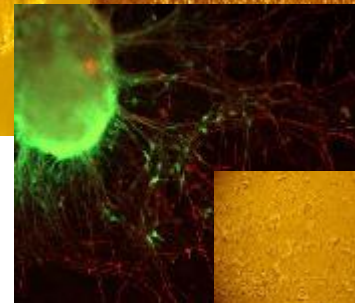
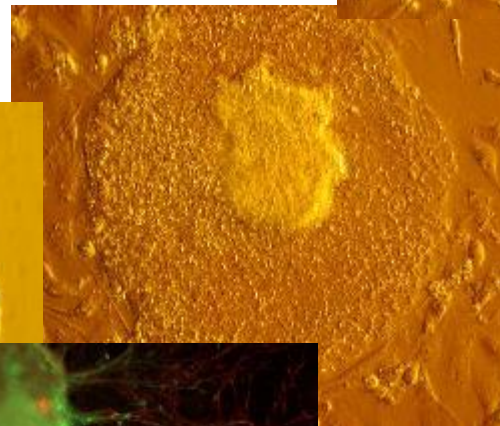
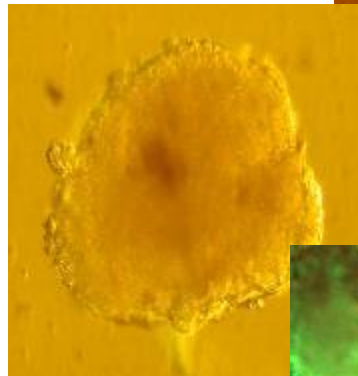


Atomic Force Microscopy



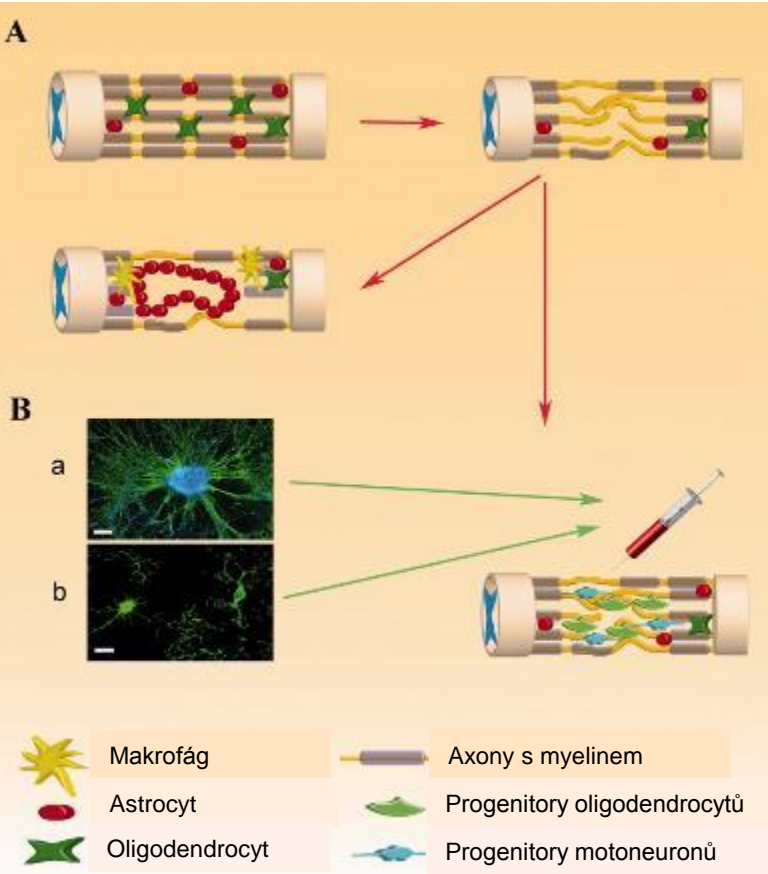
Pokroky v diferenciaci lidských pluripotentních KB - biologické modely a aplikace

- Neurony, astrocyty, oligodendrocyty
- Kardiomyocyty
- Insulin-produkující pankreatické buňky
- Krevní buňky
- Imunokompetentní buňky
- Endoteliální buňky
- Buňky trofoblastu
- Respiratorní buňky
- Osteoblasty
- Hepatocyty
- Melanocyty
- Buňky prostaty
- Zárůdečné buňky

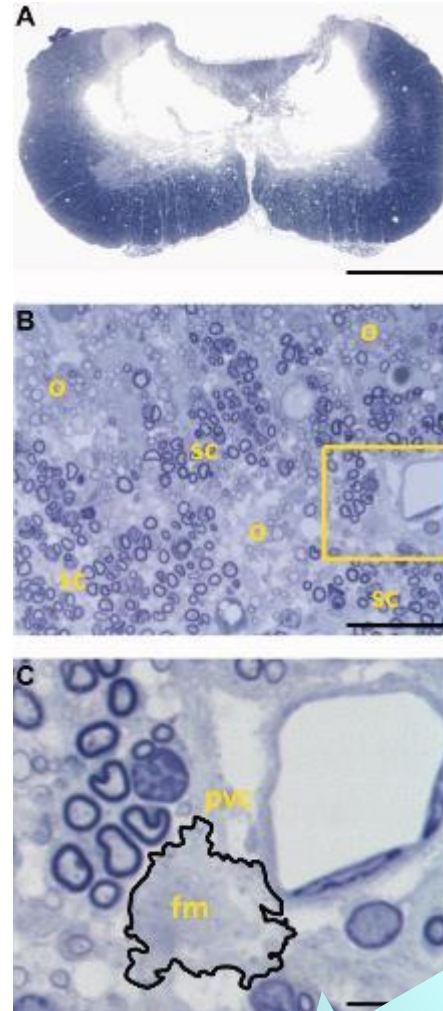


Příklad: traumatické poškození krční míchy, myelopatie a léčba kmenovými buňkami

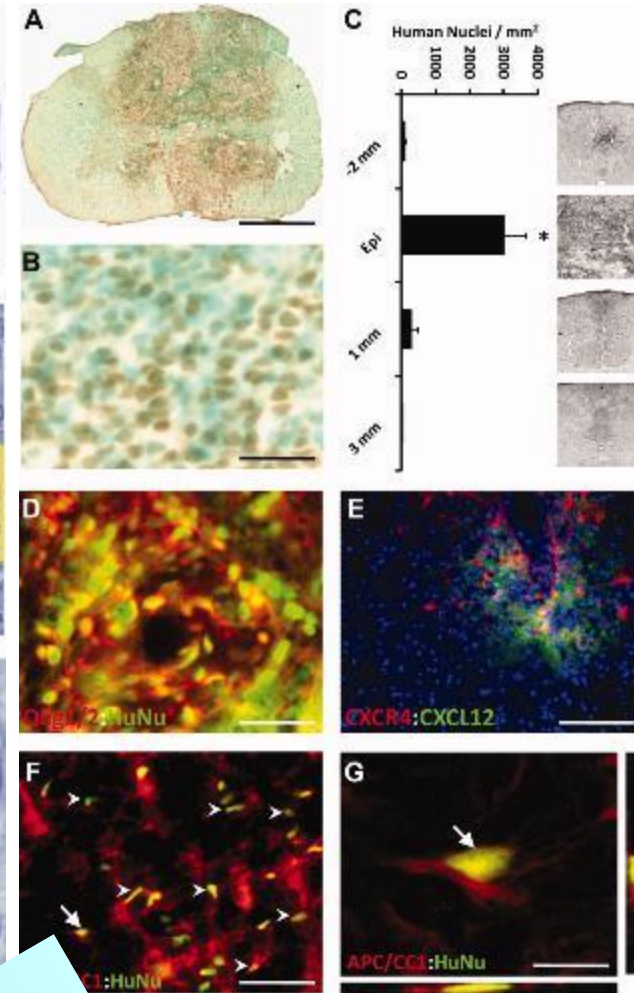
Patofyziologie a strategie léčby KB



Anatomie poškození



Stav po transplantaci



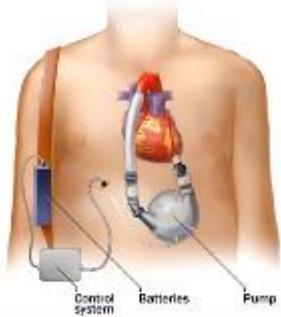
Výsledek: obnovení bílé a šedé hmoty v místě poškození
obnovení funkčnosti motorických neuronů
obnovení pohybových funkcí

Model: laboratorní potkan

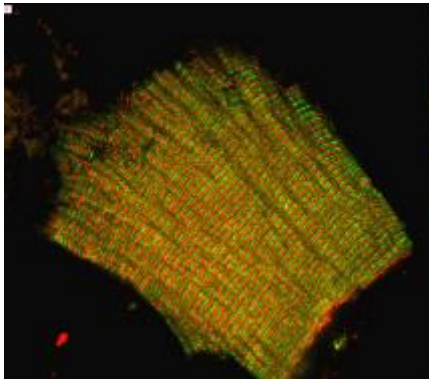
Adaptováno ze *Stem Cells*, 2010

Úspěchy: Indukované pluripotentní KB

...Srdeční záplaty...

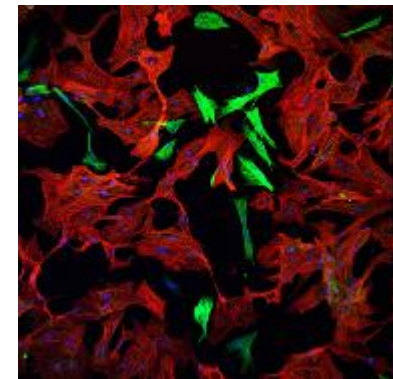
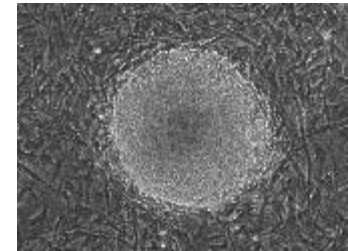


Pacient s akutním srdečním selháním



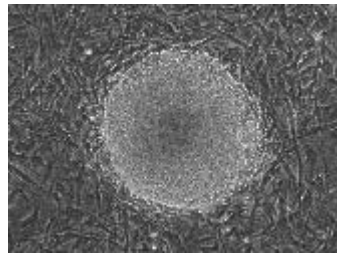
5% ejekční frakce

30% ejekční frakce
... pacient odchází z JIP

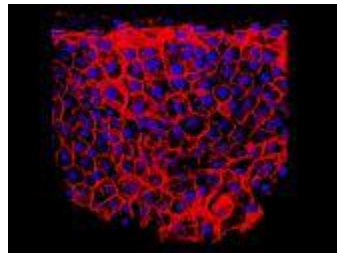


Úspěchy: Embryonální kmenové buňky

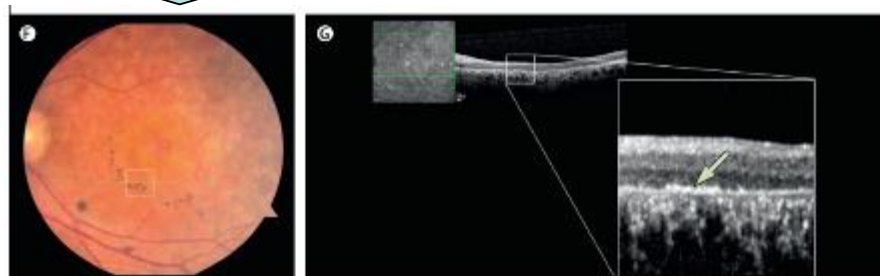
...Regnerace RPE...



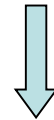
Lidské embryonální kmenové buňky



Diferenciace do pigmentového epitelu



Schwartz a kol. Lancet 2012; 379:713-20













	BCVA	ETDRS (number of letters)
Fellow eye		
Baseline	Hand motion	0
1 week	Hand motion	0
2 weeks	Hand motion	0
3 weeks	Hand motion	0
4 weeks	Hand motion	0
6 weeks	Hand motion	0
8 weeks	Hand motion	0
12 weeks	Hand motion	0
Operated eye		
Baseline	Hand motion	0
1 week	Counting fingers	0
2 weeks	Counting fingers	1
3 weeks	Counting fingers	3
4 weeks	20/800	5
6 weeks	20/800	5
8 weeks	20/800	5
12 weeks	20/800	5

hESC=human embryonic stem cells; RPE=retinal pigment epithelium; BCVA=best corrected visual acuity; ETDRS=Early Treatment Diabetic Retinopathy Study visual acuity chart.

Table: Change in visual acuity after hESC-RPE transplantation in patient with Stargard's macular dystrophy

Výběr recentních aplikací PSC v klinických studiích (další info v části II – Dr. Martin Pešl)

Disease	Age-related macular degeneration	Parkinson disease	Spinal cord injury	Diabetes	Myocardial infarction
iPSCs and/or ES cells					
Robust differentiation	↓	↓	↓	↓	↓
Cell type	Retinal pigment epithelium 	A9 dopaminergic neuron 	Oligodendrocyte progenitor 	Pancreatic islet β -cell progenitor 	Cardiomyocytes 
Current stage	Clinical Phase I and Phase II	Clinical Phase I	Clinical Phase I	Clinical Phase I-II	Clinical Phase I

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Trounson, 2016

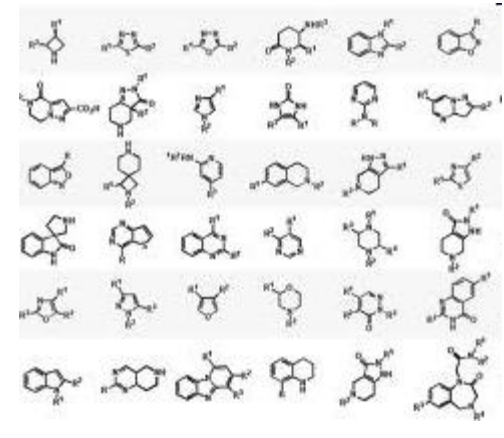
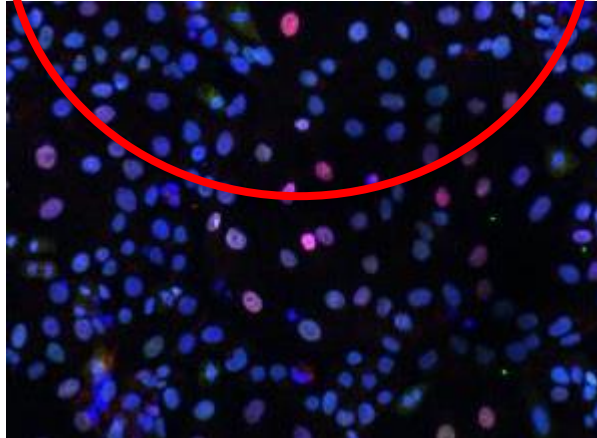
K čemu to vlastně je?

Modelování chorob

Regenerativní a transplantační
buněčná medicína

Pochopení
patologických procesů

Vývoj léčiv



Duchenoova muskulární dystrofie

-Postižené kosterní svalstvo

-Srdeční selhání

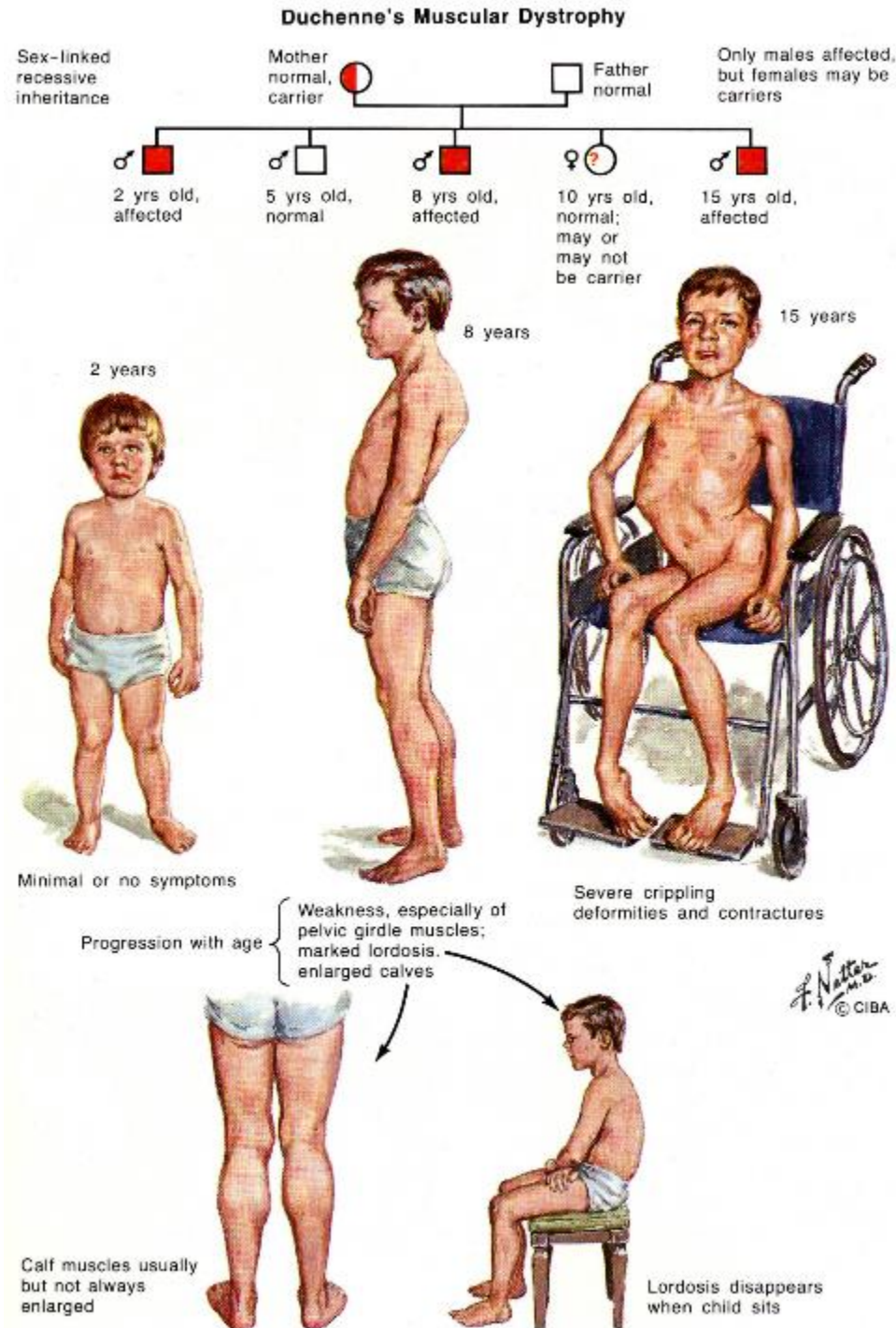
Předpoklad:

-Chybí dystrofin

-Únik kalcia ze sarkoplazmatického retikula

-Pomohly by inhibitory vápníkových kanálů?

Chceme je testovat na srdečních buňkách!!!



Duchenaova muskulární dystrofie

-Postižené kosterní svalstvo

-Srdeční selhání

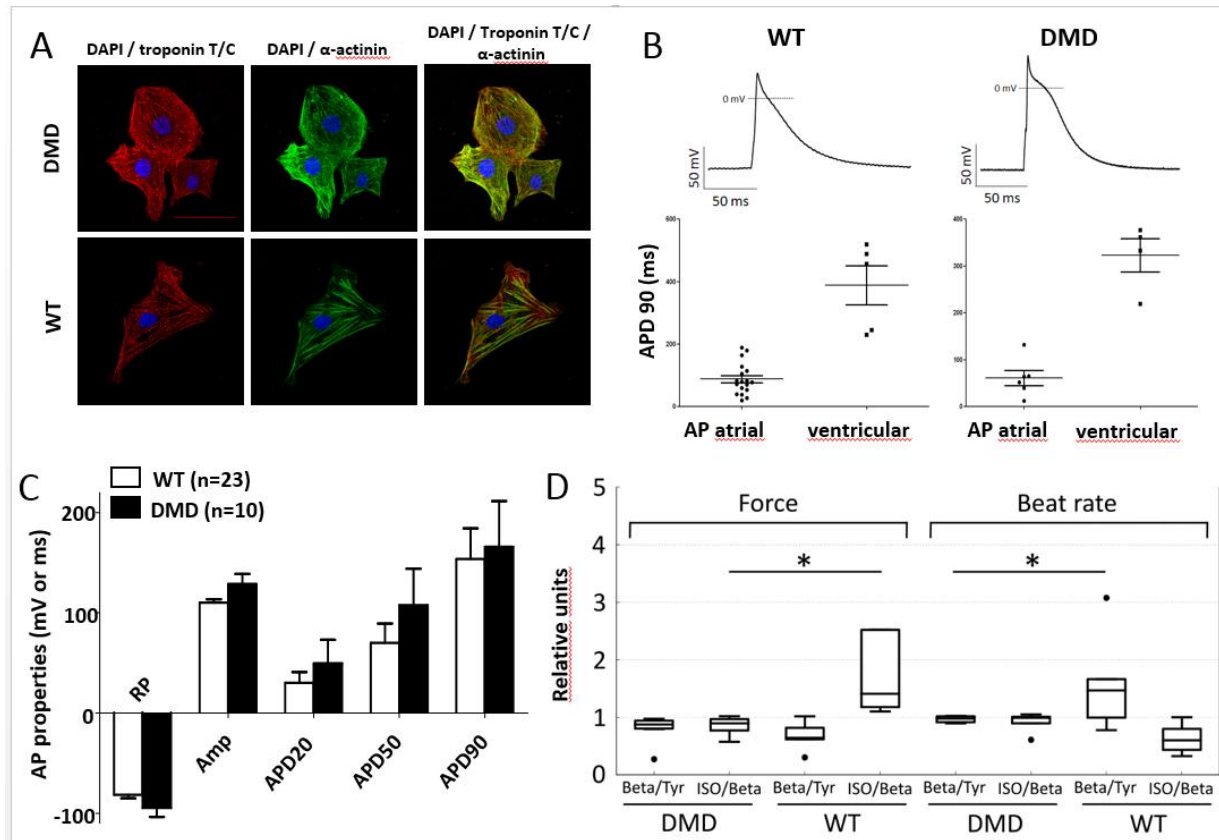
Předpoklad:

-Chybí dystrofin

-Únik kalcia ze sarkoplazmatického retikula

-Pomohly by inhibitory vápníkových kanálů?

Chceme je testovat na srdečních buňkách!!!

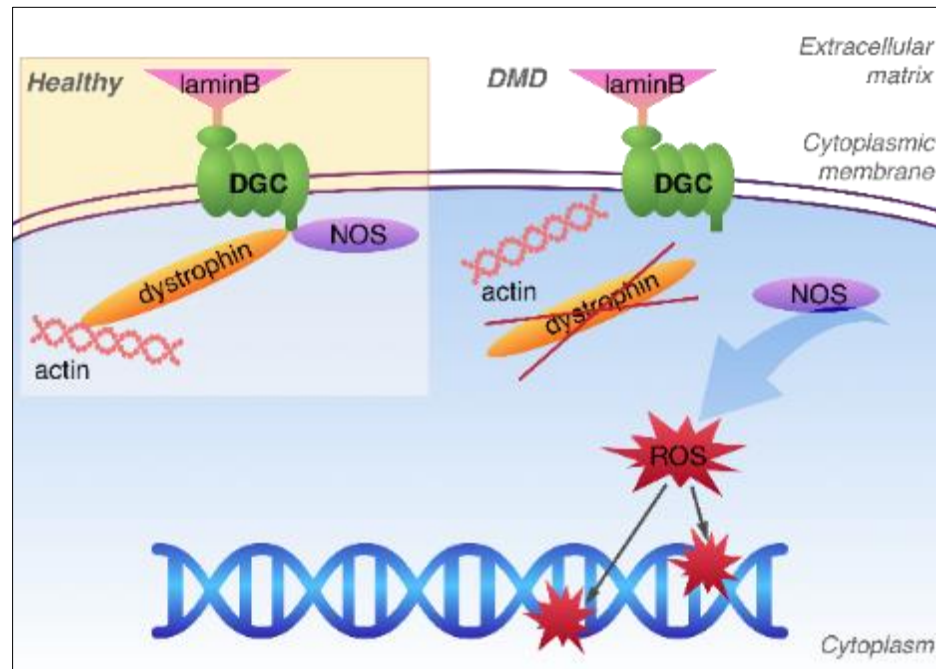


Nalezeny fyziologické rozdíly, ale nic co by ohrozilo přirozenou regeneraci a vysvětlovalo srdeční selhání....

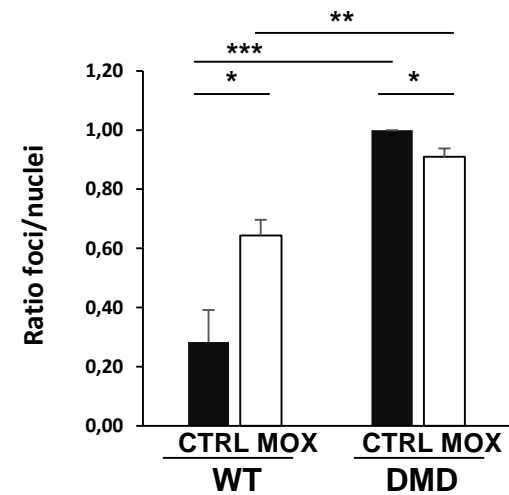
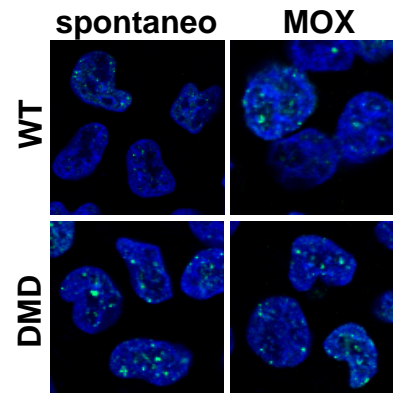
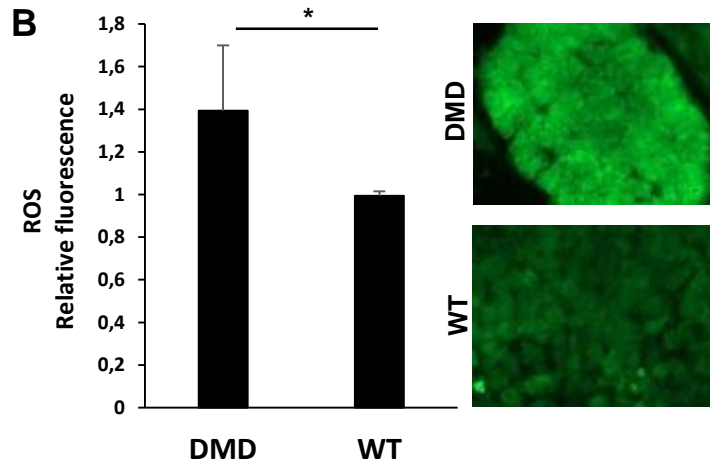
Duchenaova muskulární dystrofie

-Postižené kosterní svalstvo

-Srdeční selhání



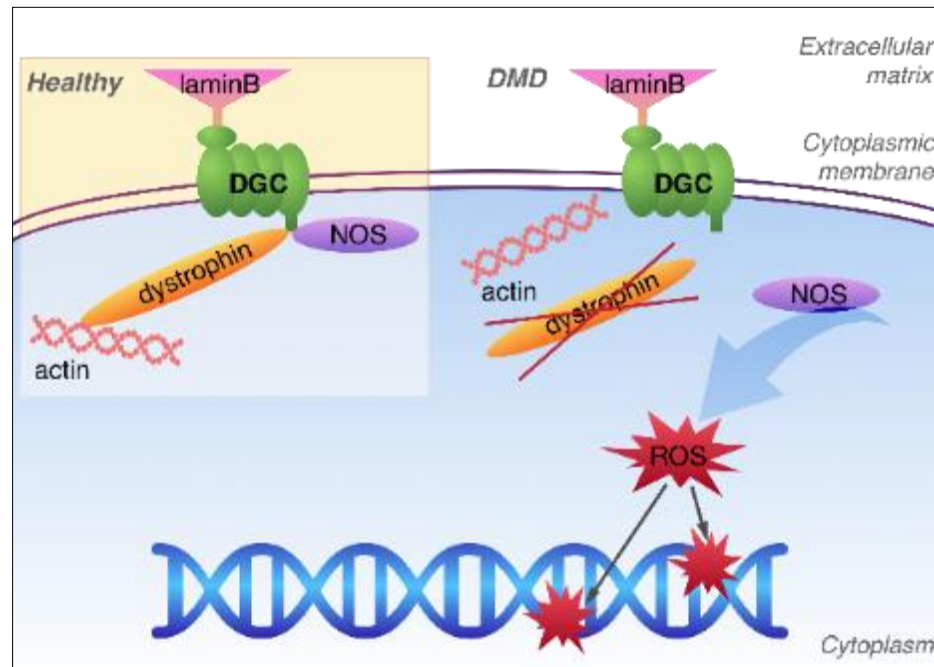
D



Duchenoova muskulární dystrofie

-Postižené kosterní svalstvo

-Srdeční selhání



Závěr: defektní dystrofin způsobuje produkci ROS přes NO syntázu, zvýšenou mutagenezu KB a následnou depleci progenitorů

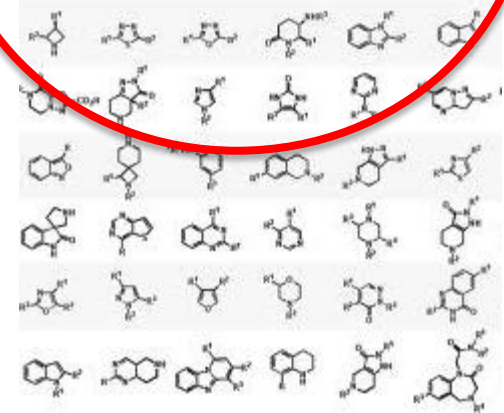
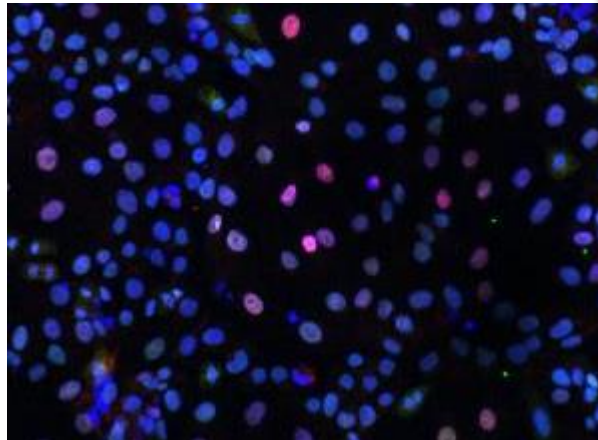
K čemu to vlastně je?

Modelování chorob

Regenerativní a transplantační
buněčná medicína

Pochopení
patologických procesů

Vývoj léčiv

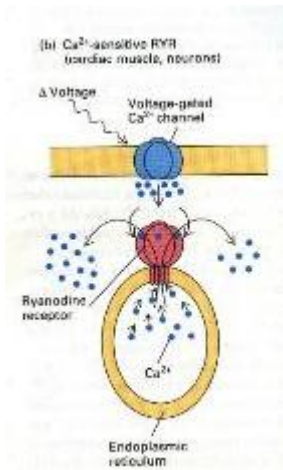


Katecholinergní polymorfní ventrikulární tachykardie (CPVT)

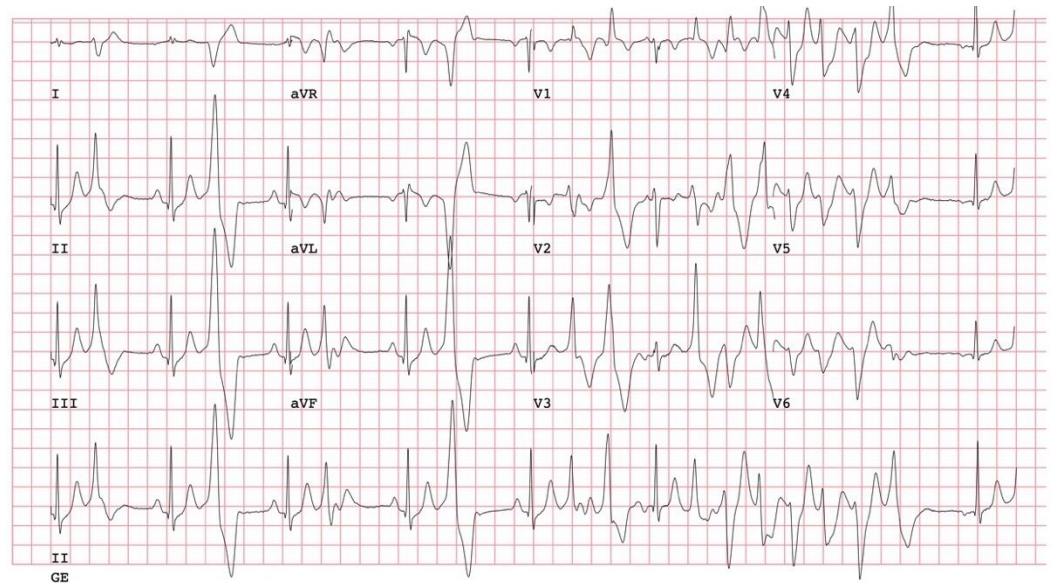
Syndrom náhlé srdeční smrti (často u „zdravých sportovců“)



Marc Vivian Foe



Mutace RyR:
Pomalý únik Ca²⁺

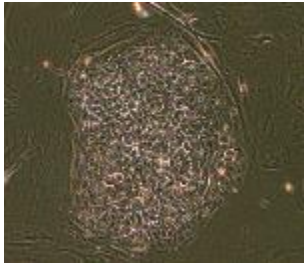


Požadován skrínig inhibitorů kanálů Ca²⁺ - pomohou hiPSC?

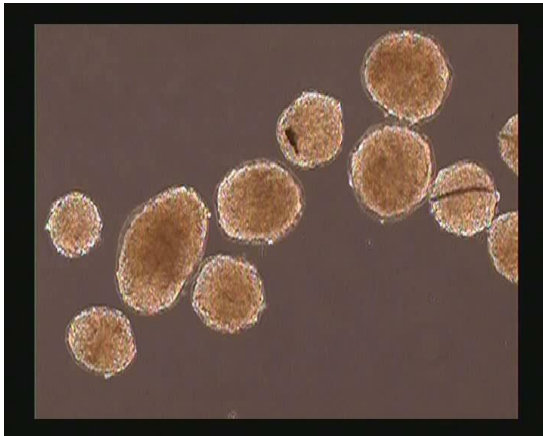
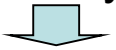
... aneb jak dostat srdeční buňky z pacienta, který nám je dát nemůže..



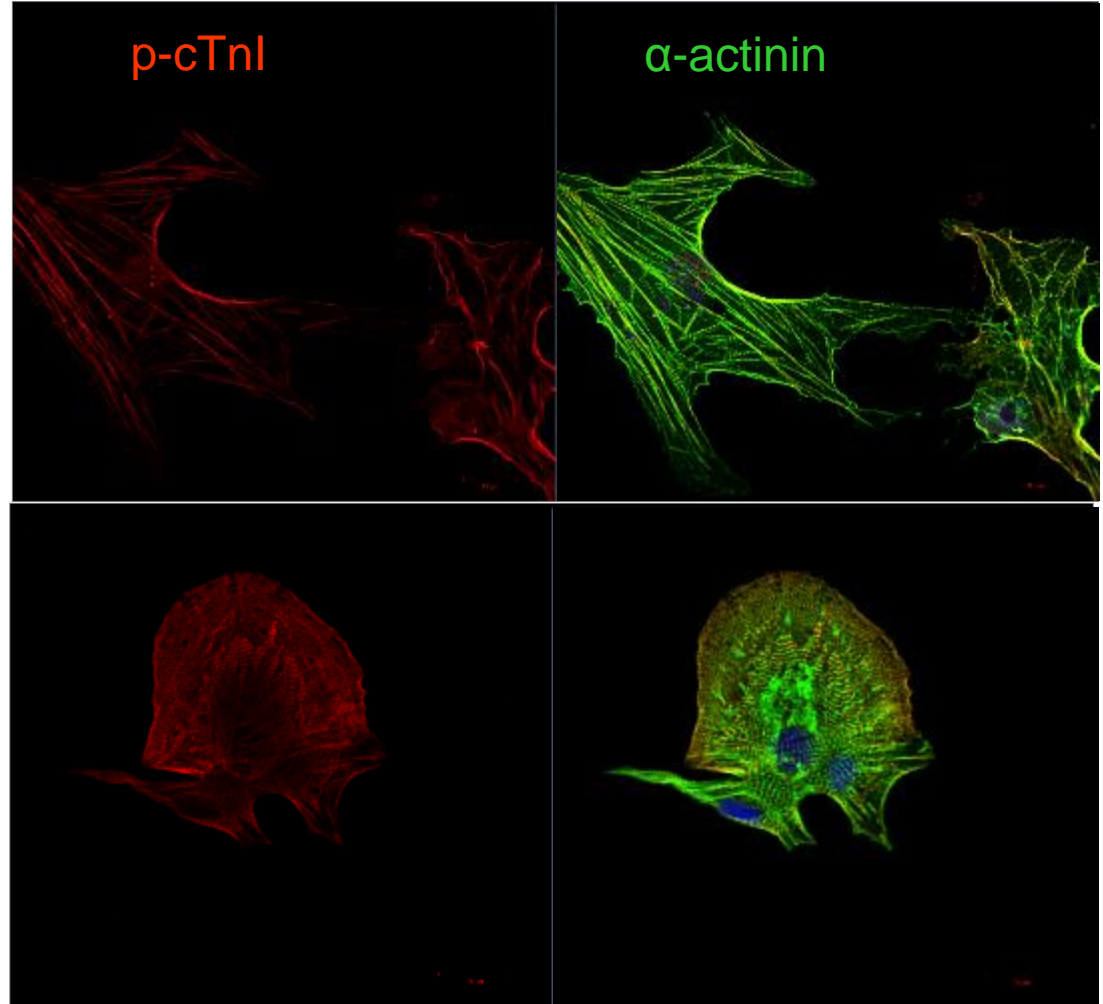
Biopsie kožních buněk



Indukované pluripotentní buňky



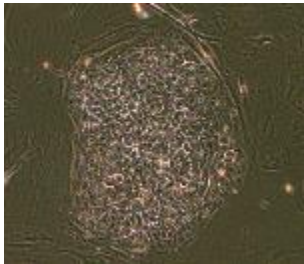
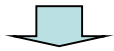
Embryonální tělíska



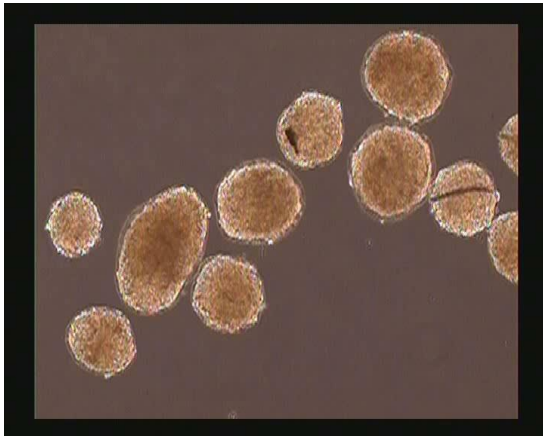
Imunocytochemická analýza CM



Biopsie kožních buněk



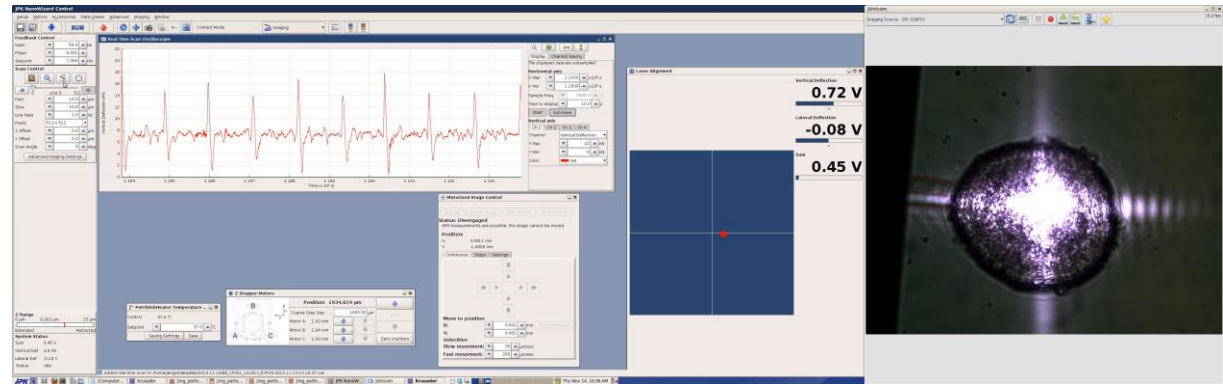
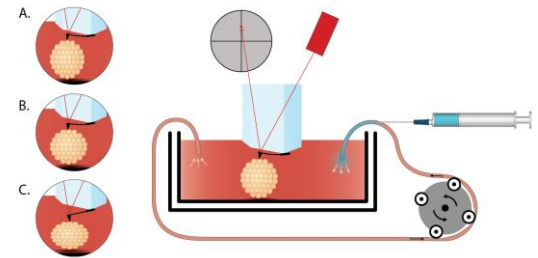
Indukované
pluripotentní
buňky



Embryonální tělíska

... aneb jak dostat srdeční buňky z pacienta, který nám je dát nemůže..

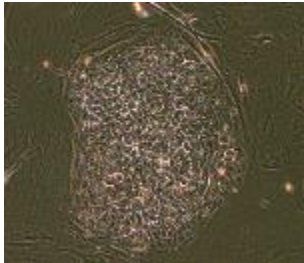
Mechanické vlastnosti:



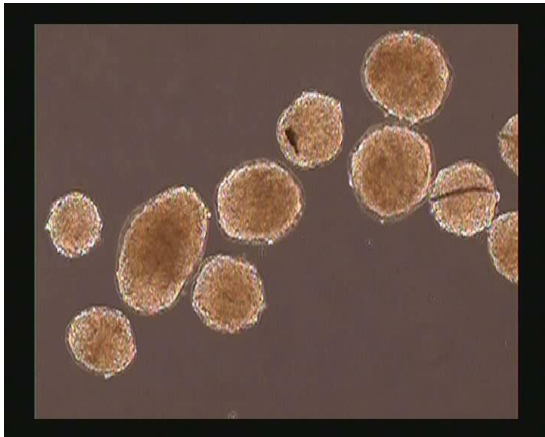
Analýza pomocí mikroskopu atomárních sil



Biopsie kožních buněk



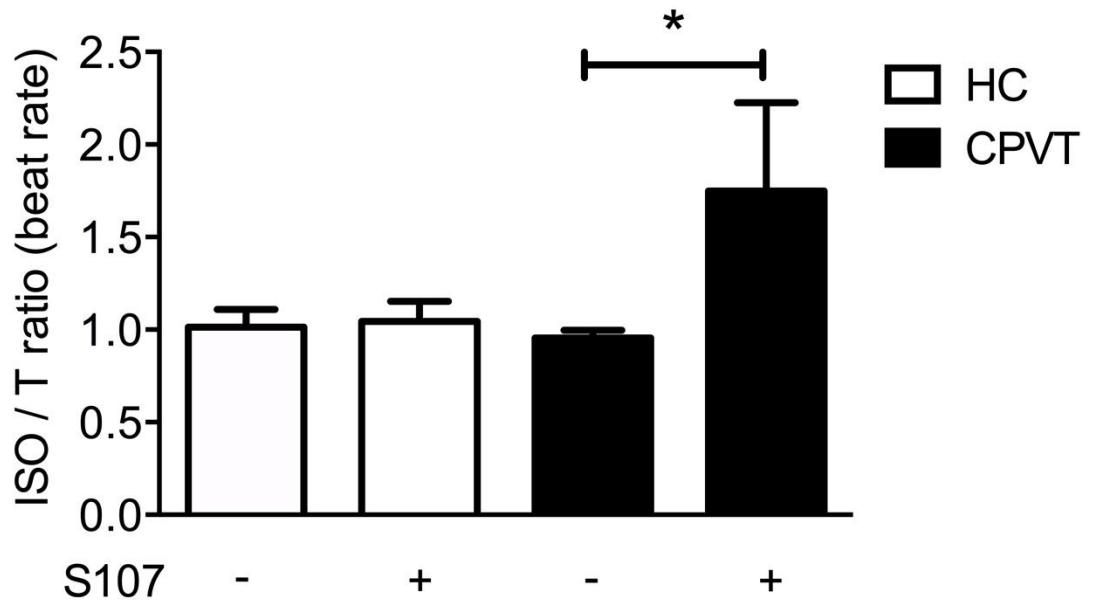
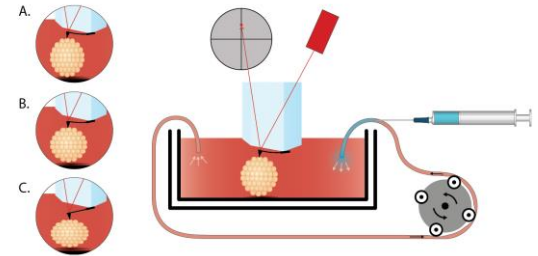
Indukované pluripotentní buňky



Embryonální tělíska

... aneb jak dostat srdeční buňky z pacienta, který nám je dát nemůže..

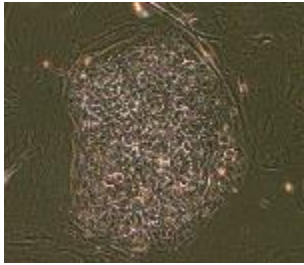
Mechanické vlastnosti:



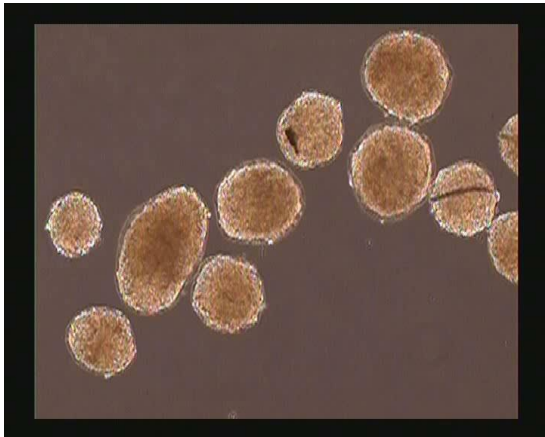
Analýza pomocí mikroskopu atomárních sil



Biopsie kožních buněk



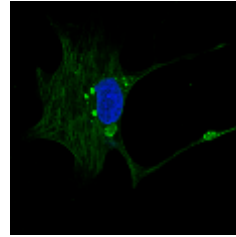
Indukované pluripotentní buňky



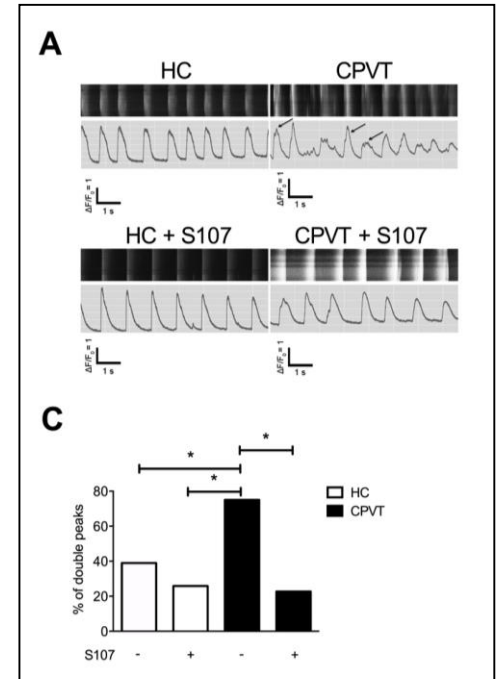
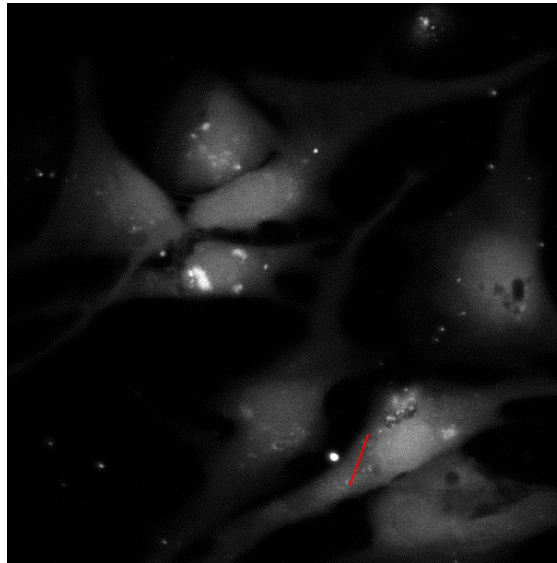
Embryonální tělíska



... aneb jak dostat srdeční buňky z pacienta, který nám je dát nemůže..



Fluorescenční mikroskopie



Acimovic, Rotrekl a kol.

Konečná diskuse – část I (pluripotentní buňky)

- Stárnutí PKB v kultuře a adaptace na in vitro podmínky-hrozí nebezpečné změny?
- Genetický reprogramming – představuje riziko buněčné terapie?
- Problém “bezpečnosti” buněčných transplantátů derivovaných z pluripotentních KB
- Problémy rejekce KB imunitním systémem a omezené genetické diverzity linií?
- Nedostatečné/korektní/přemrštěné legislativní a etické překážky?