

Biotechnologické procesy

Dnes o živočišných buňkách, potažmo pak o skupině živočišných buněk,
kterým říkáme kmenové buňky

Blok IV.

Vladimír Rotrekl @ 2020

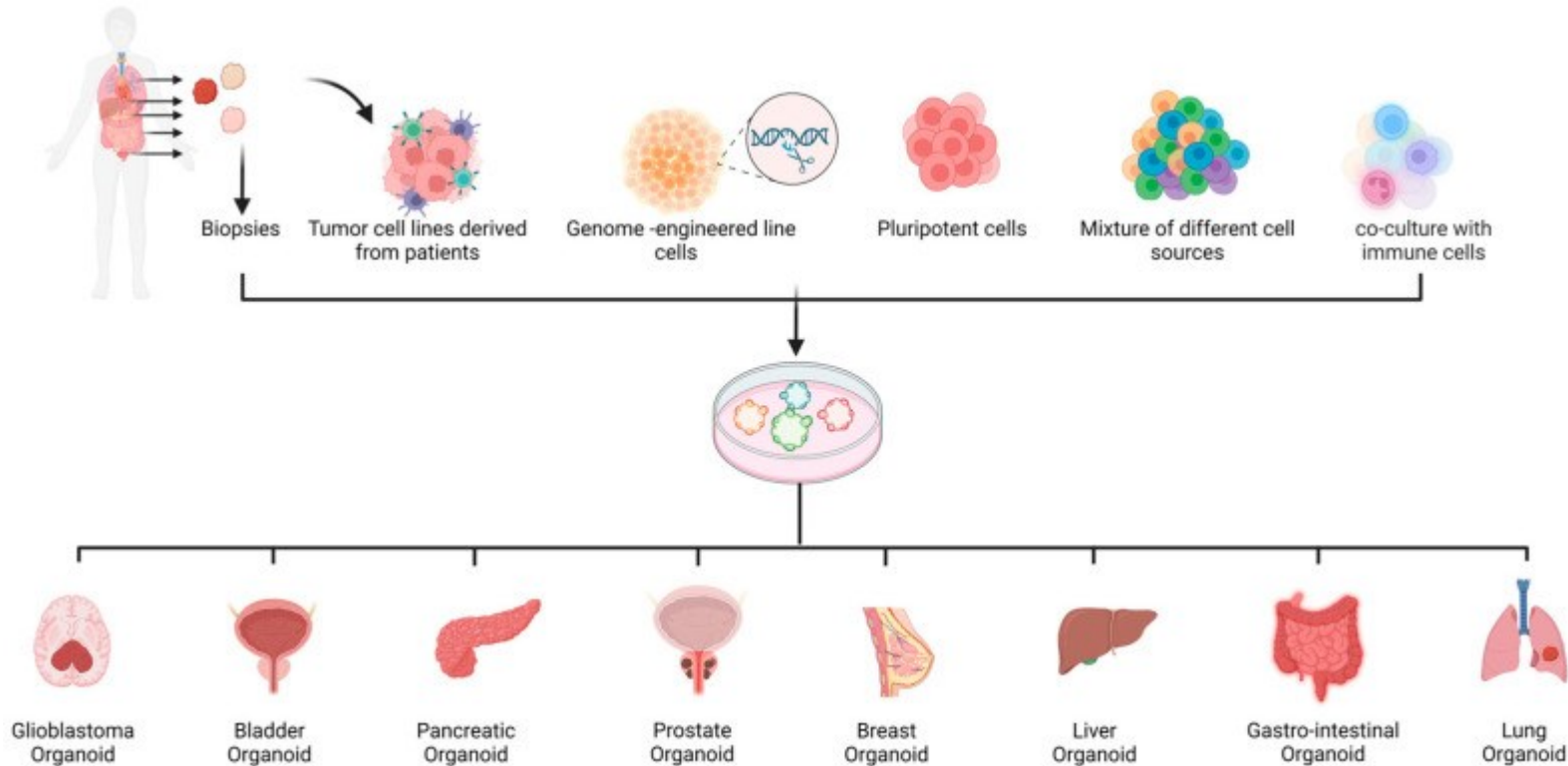
Biotechnologické procesy: Živočišné tkáňové kultury a kmenové buňky:

Sylabus

- 1) Úvod do živočišných buněk a jejich specifik, potence a diferenciacie, Hayflickuv limit, imortalizované linie, kultivace a jejich diferenciacie (včetně large scale, GMP a industry grade)
- 2) Použití živočišných buněk k výrobě léčiv, použití živočišných, potažmo kmenových buněk ve screeningu a výrobě léčiv
- 3) Živočišné buňky a buněčná terapie, kde končí transplantace a začíná biotechnologie, metody, příklady, požadavky SUKL/EMA na jejich výrobu a použití
- 4) Speciální aplikace a výhled do budoucna (3D kultivace, Organoidy, 3D tisk buněk, in vitro tvorba náhražek tkání a orgánů, genová)

Další zdroje buněk pro organoidy: ...Sferoidy a organoidy z nádorových kultur

Primární nádorové buňky nebo nádorové linie ve smíšené kultuře s kmenovými buňkami (pluripotentními/mezenchymálními/tkáňově specifickými):



Výhody:

- zralý fenotyp
- snížená potřeba dodávání ECM a růstových faktorů

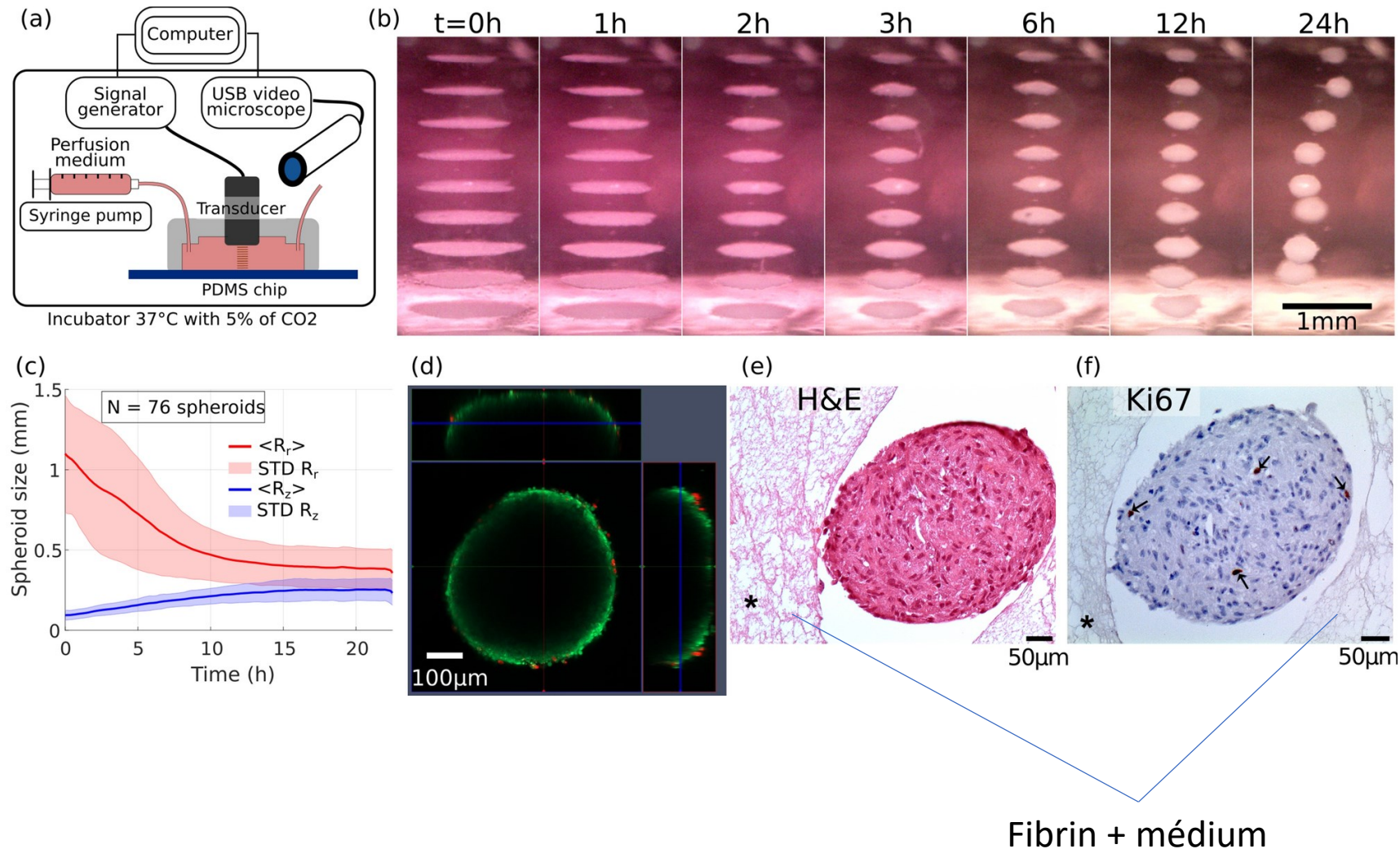
Nevýhody:

- Stejně jako nádorové linie (viz blok I.)

Nádorové buňky nastavují mikroporostředí pro kmenové buňky a někdy umožňují diferenciaci a uspořádání organoidu bez použití růstových faktorů a dodaných proteinů/peptidů extracelulární hmoty (ECM)..

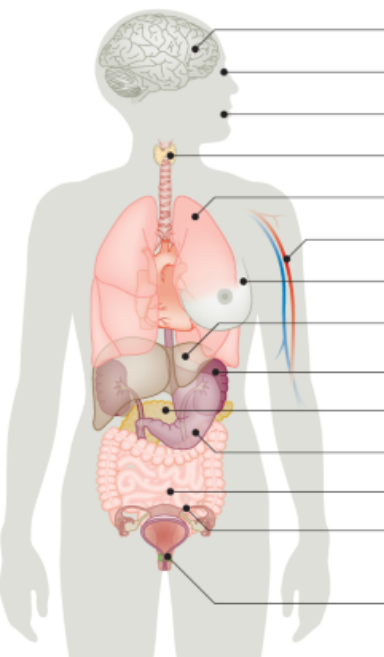
Další zdroje buněk pro organoidy: ...Sferoidy a organoidy z mezenchymálních KB

Sferoidy z mezenchymálních kmenových buněk (MSC) vyrobené akustickou vlnou

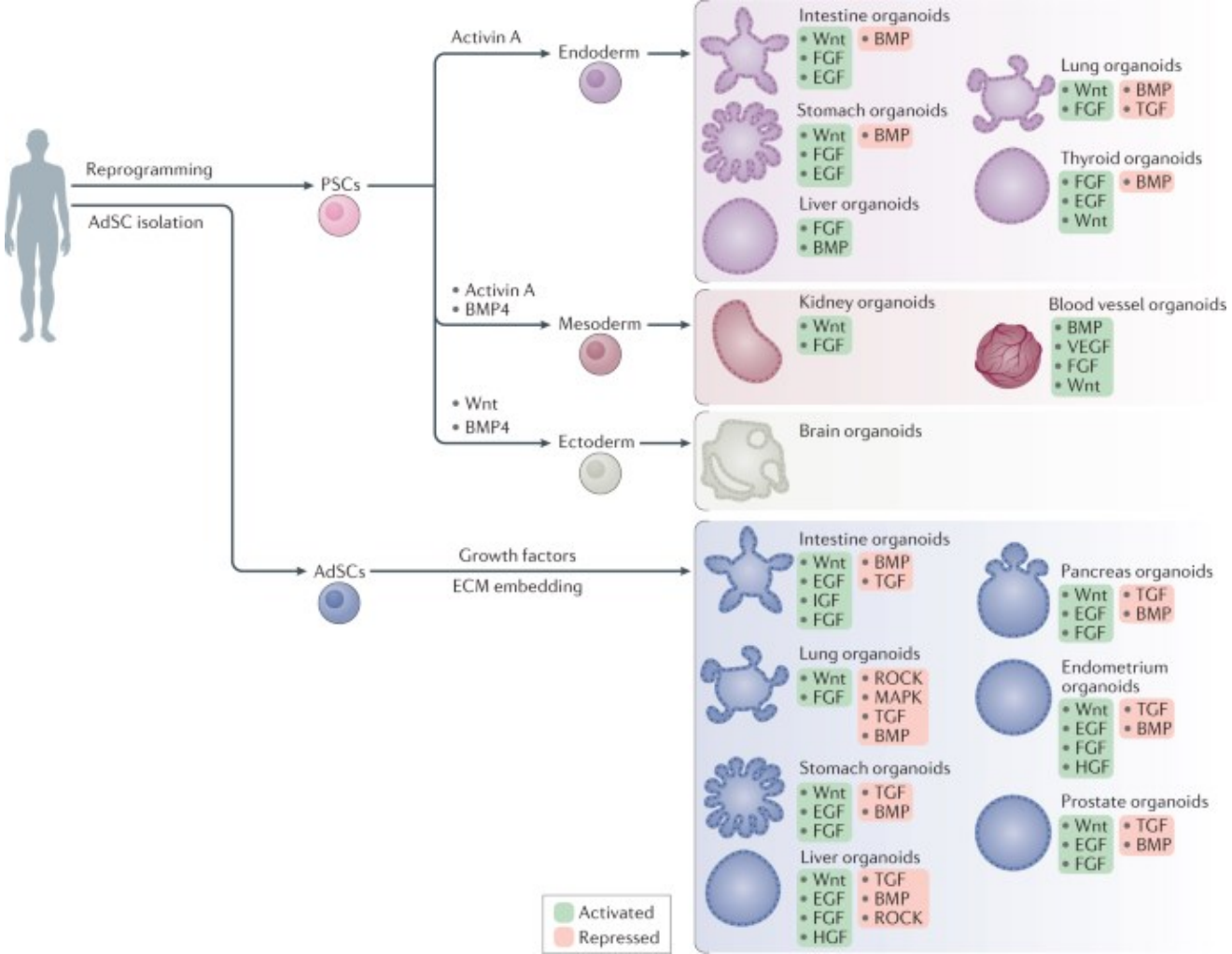


Organoidy – dodatek (z čeho a jak systematicky..)

Mezenchymální kmenové buňky
 Z pluripotentních kmenových buněk
 Banka rakovinných linií



Brain		✓	✓
Optic cup/retina		✓	
Salivary gland	✓	✓	
Thyroid		✓	
Lung	✓	✓	✓
Blood vessel		✓	
Mammary gland	✓	✓	✓
Liver	✓	✓	✓
Kidney	✓	✓	✓
Pancreas	✓	✓	✓
Stomach	✓	✓	✓
Intestine	✓	✓	✓
Fallopian tube, endometrium	✓	✓	✓
Bladder, prostate	✓	✓	✓



<https://doi.org/10.1002%2Fsctm.19-0286>

Organoidy a transplantace

-limit velikosti: vaskularizace

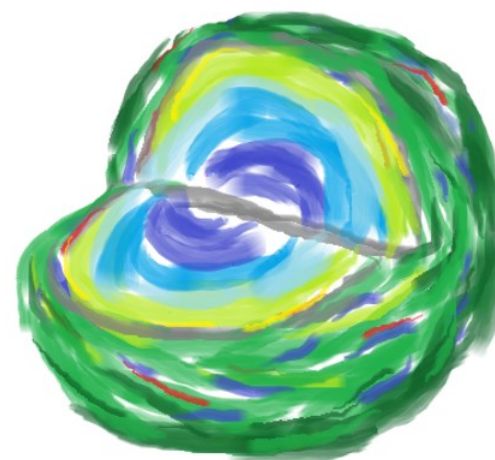
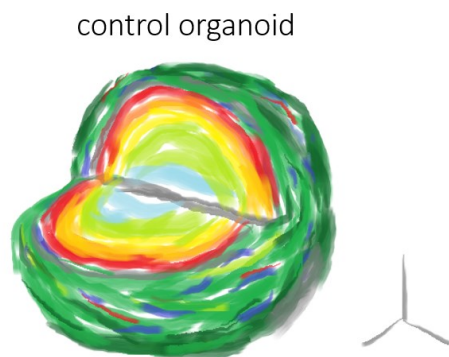
Transplantace zahrnuje většinou 10^6 - 10^8 buněk.... Proto snaha získat velké organoidy

ALE !!!

Velké množství buněk, absence perfuze
+
Masivní vrstva extracelulární hmoty



Nedostatečná pasivní difuze kyslíku



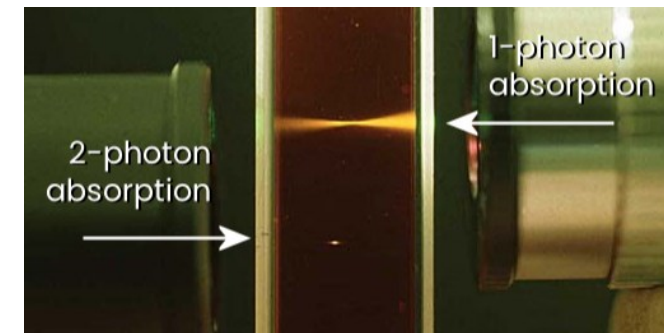
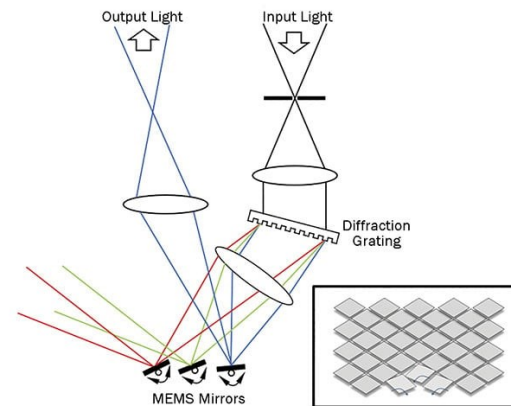
Organoidy a transplantace

-limit velikosti: vaskularizace

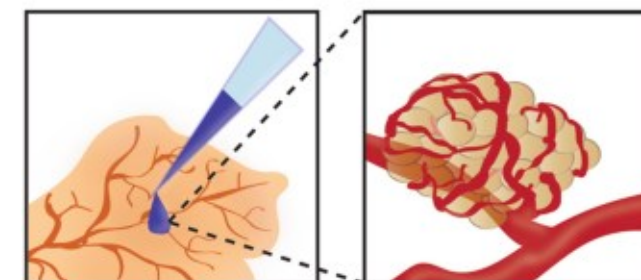
...jinými slovy snažíme se vytvořit „cévní“ systém

Vaskularizace/perfuze organoidů:

- Bioprinting
- Digital micro mirror (DMD) patterning
- Direct 2 foton fabrication
- Sacrificial networks
- Subtractive fabrication by lased ablation
- Tvorba matrice s proangiogenní aktivitou
- Induced angiogenesis in engeneered tissue
- Organoid Vascularization via in vivo Organoid Transplantation

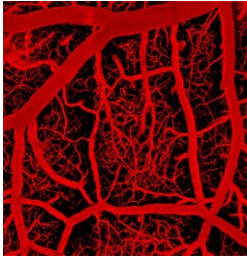


1. Organoid transplantation Remodeling (2-4 weeks)



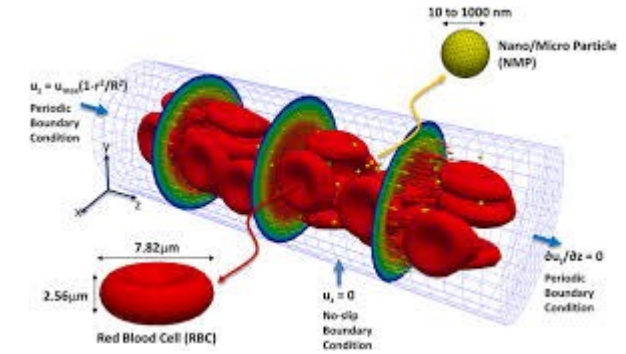
K tomu všemu většinou potřebujeme microfluidiku

Mikrofluidika

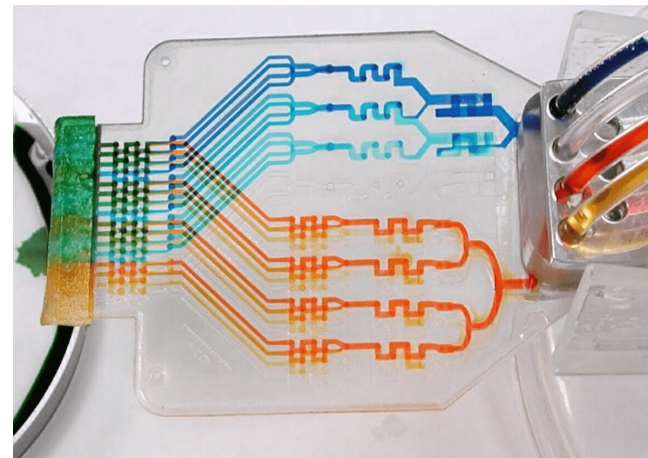
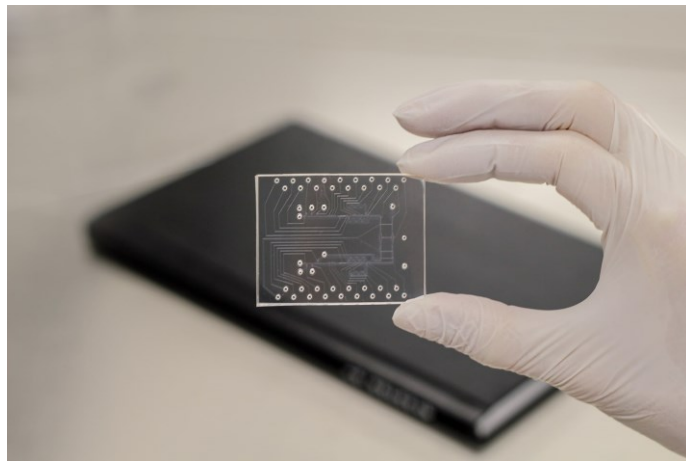


Mimicking the life..

Size matters..

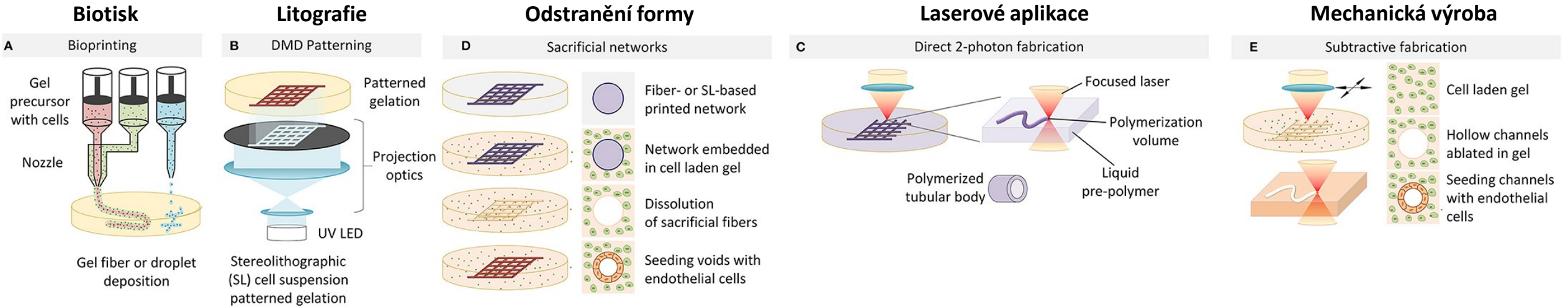


Využití toku živného roztoku, nebo média mikroskopickými kanály (velikostně srovnatelnými s velikostí buněk)

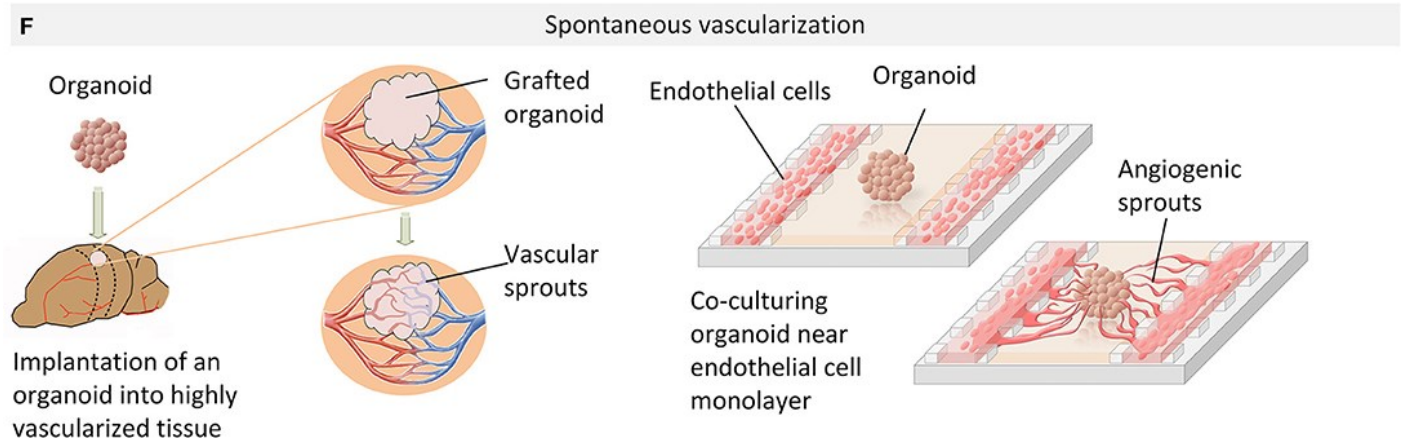


Mikrofluidika

Metody přípravy mikrofluidních systémů:



Spontánní angiogeneze *in vivo* nebo *in vitro*

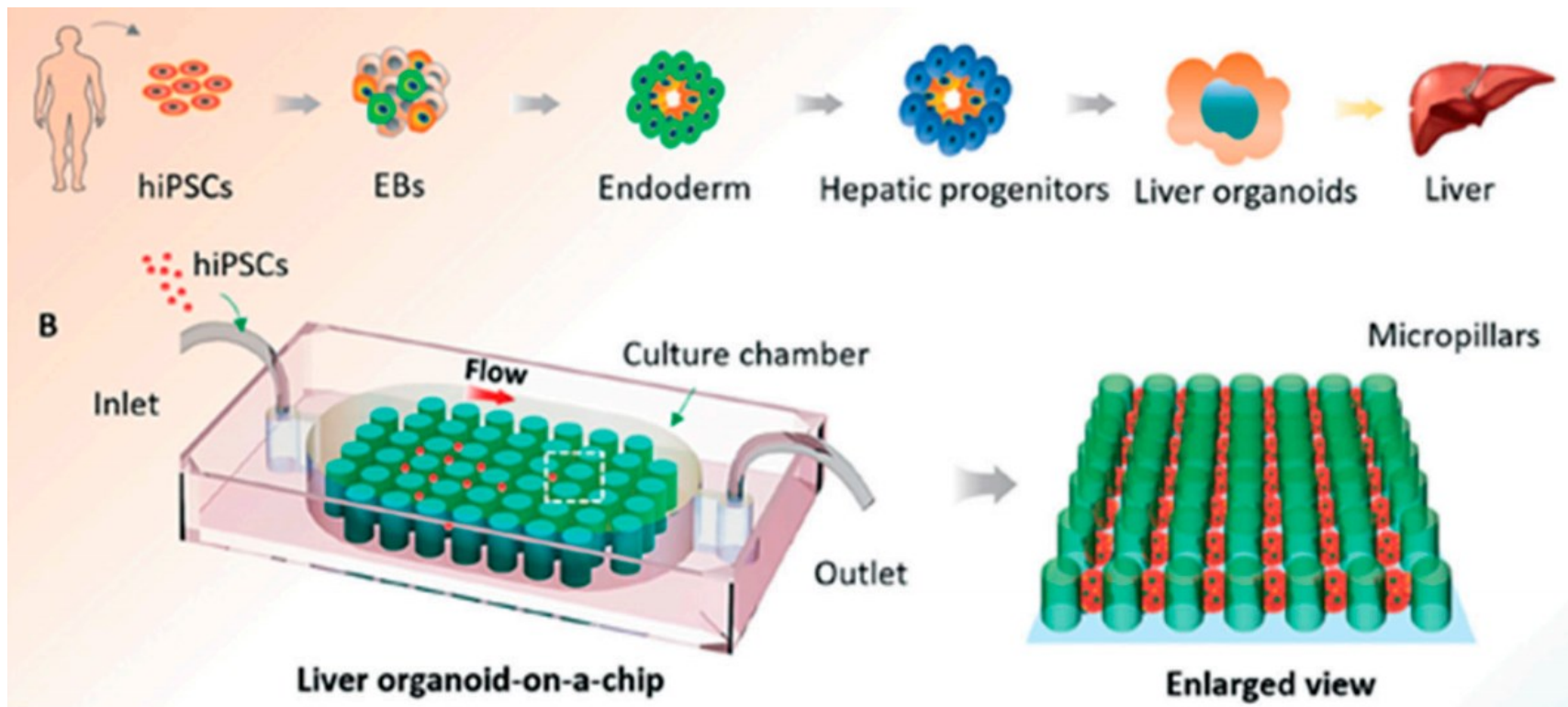


Mikrofluidika

Od mikrofluidních systémů čekáme:

Využití toku živného roztoku, nebo média mikroskopickými kanály (velikostně srovnatelnými s velikostí buněk)

„Primitivní“ mikrofluidní systém zajišťující perfuzi mnoha malých jaterních organoidů (v podstatě srovnatelné s bioreaktory)



Mikrofluidika

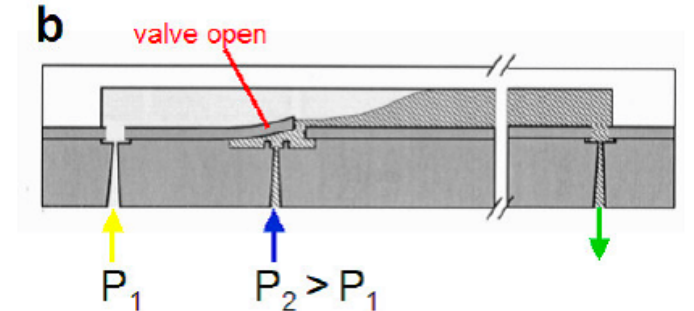
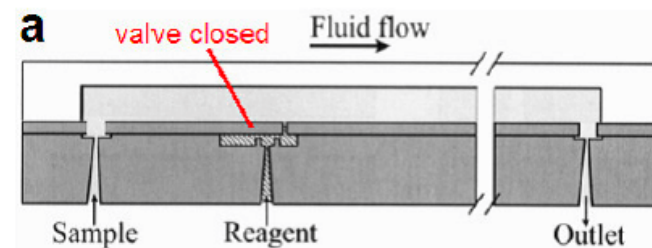
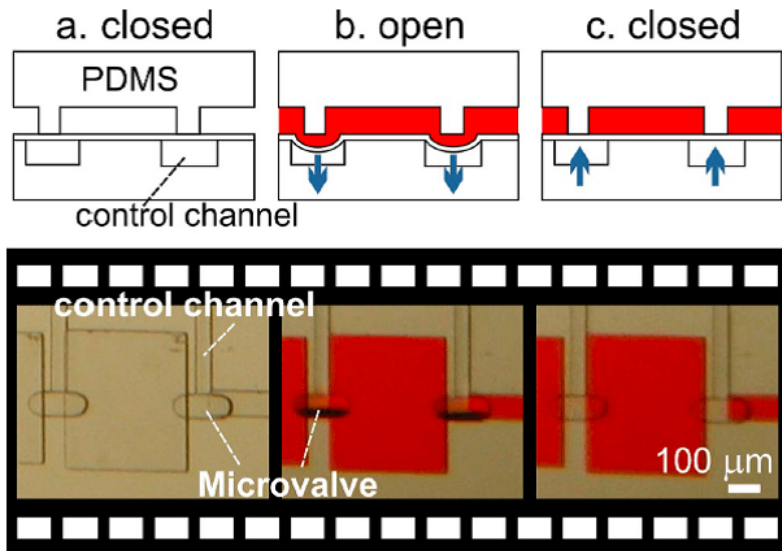
Od mikrofluidních systémů čekáme:

Využití toku živného roztoku, nebo média mikroskopickými kanály (velikostně srovnatelnými s velikostí buněk)

Potřebujeme:

Schopnost regulace toku (jiné požadavky např. pro motorické neurony a střevní epitel)

Řízené ventily používané v mikrofluidních systémech: (často používaný materiál PDMS (Polydimethylsiloxane))



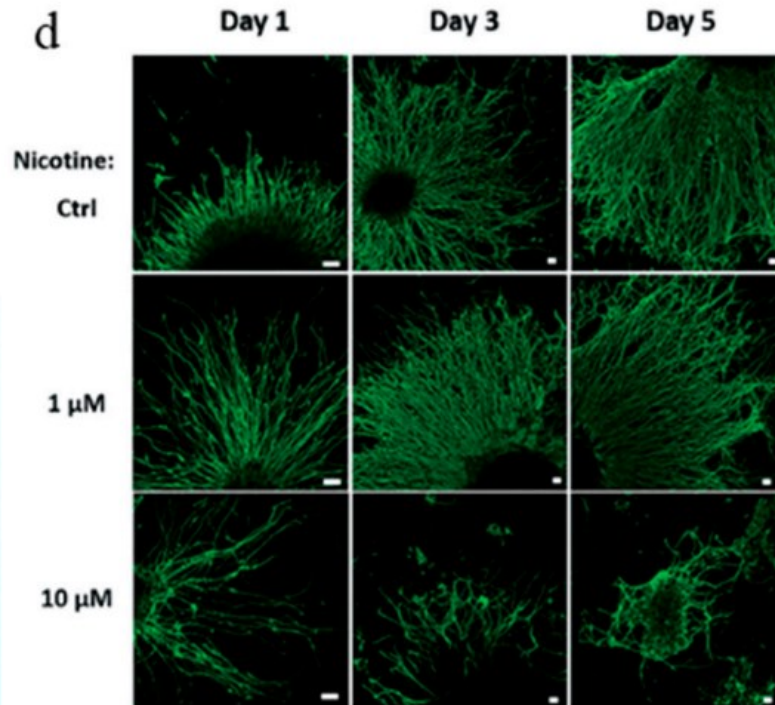
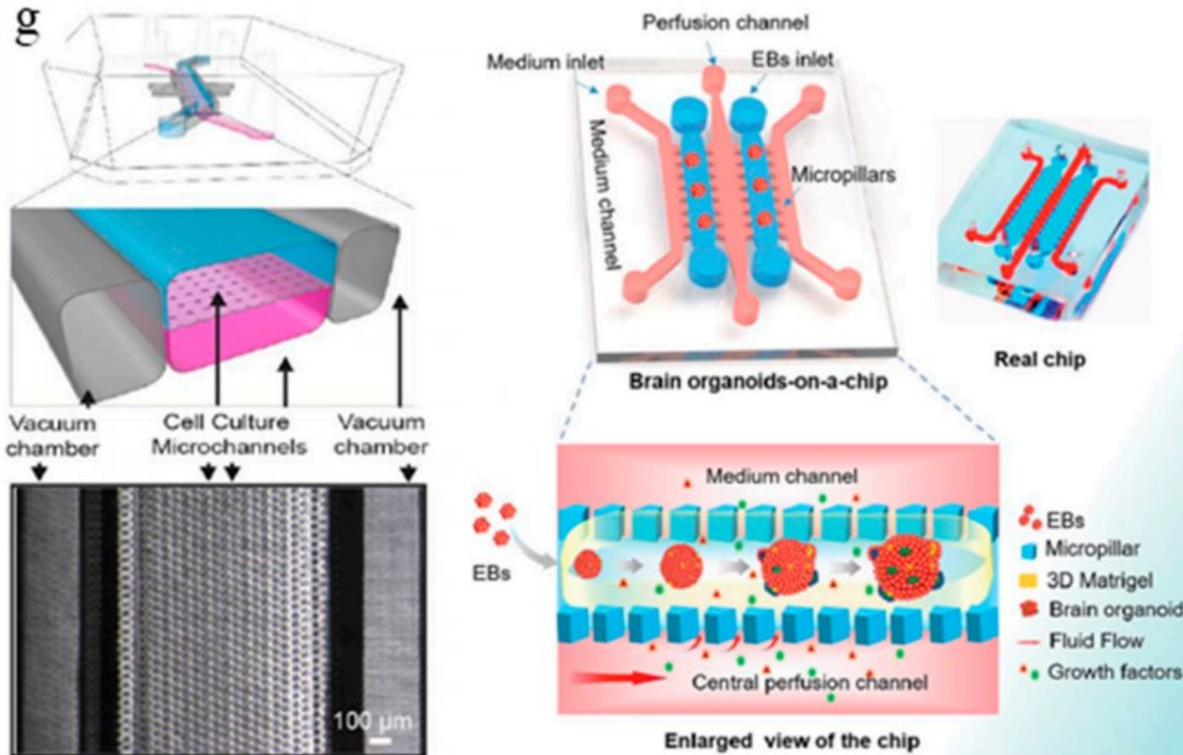
Mikrofluidika: čipy

Od mikrofluidních systémů čekáme:

Využití toku živného roztoku, nebo média mikroskopickými kanály (velikostně srovnatelnými s velikostí buněk)

Potřebujeme:

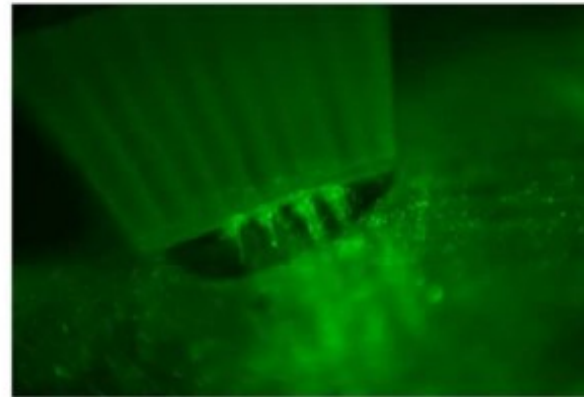
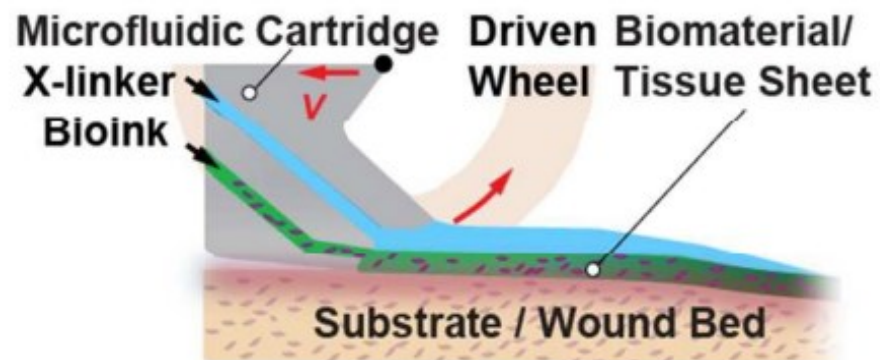
Schopnost regulace toku (jiné požadavky např. pro motorické neurony a střevní epitel)



Př. Nikotin ovlivňuje růst axonů mozkového organoidu

Přenosná 3-D tiskárna „kůže“

- Mikrofluidní tisk vrstvy směsi bioinkoustu (např alginát, fibrin, kolagen, hyaluronát) a kožních buněk (keratinocyty)
- Následuje rychlý kroslinking: krycí vrstva kroslinkeru – trombin při tisku fibrinu, 10mM NaCl pro alginát atd..



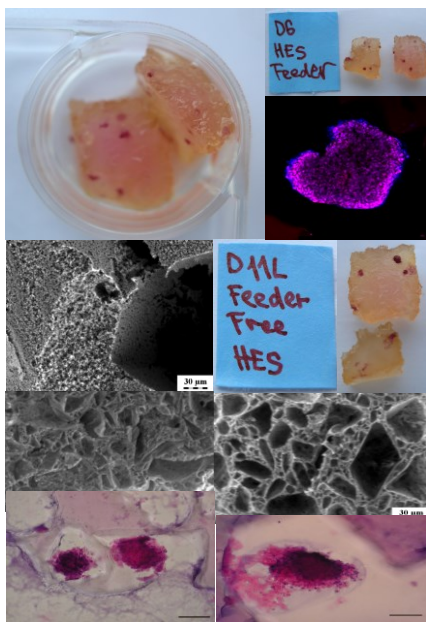
Biokompatibilní nosiče jsou důležité pro funkce buněk v uměle vytvořených orgánech

Umělé (chemické) nosiče a kmenové buňky

- + Neomezené zdroje
- Pouze "jednoduché" aplikace
- Absence bioaktivních molekul a inductivních signálů

Biologické bezbuněčné nosiče a zdravé funkční buňky

- Limitace podobné jako s orgány
- + Klinicky použitelné



Lidské orgány ve zvířatech

- + Perspektivní
- Legislativní a etické bariéry
- Nejasná biologie

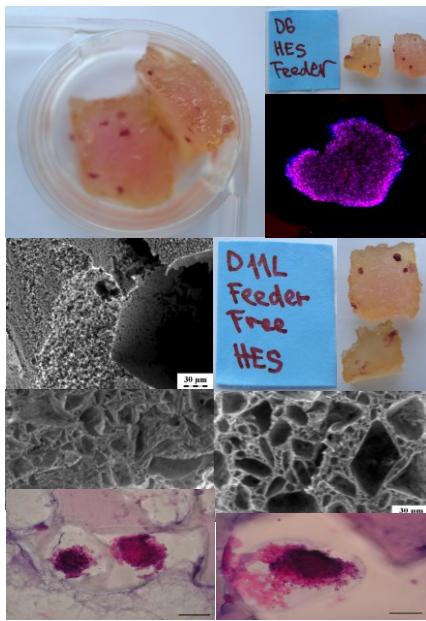
Biokompatibilní nosiče jsou důležité pro funkce buněk v uměle vytvořených orgánech

Umělé (chemické) nosiče a kmenové buňky

- + Neomezené zdroje
- Pouze "jednoduché" aplikace
- Absence bioaktivních molekul a inductivních signálů

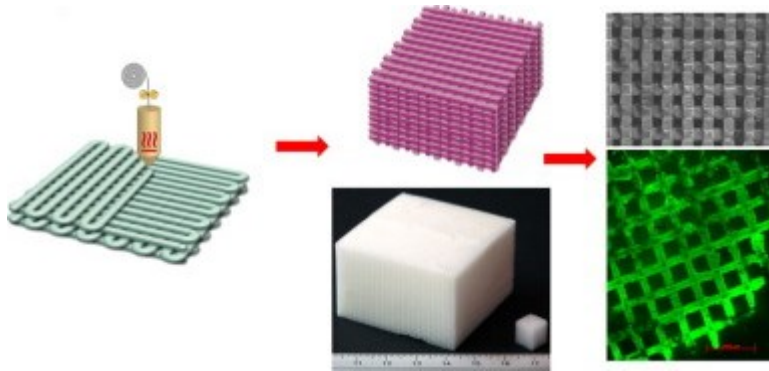
Biologické bezbuněčné nosiče a zdravé funkční buňky

- Limitace podobné jako s orgány
- + Klinicky použitelné



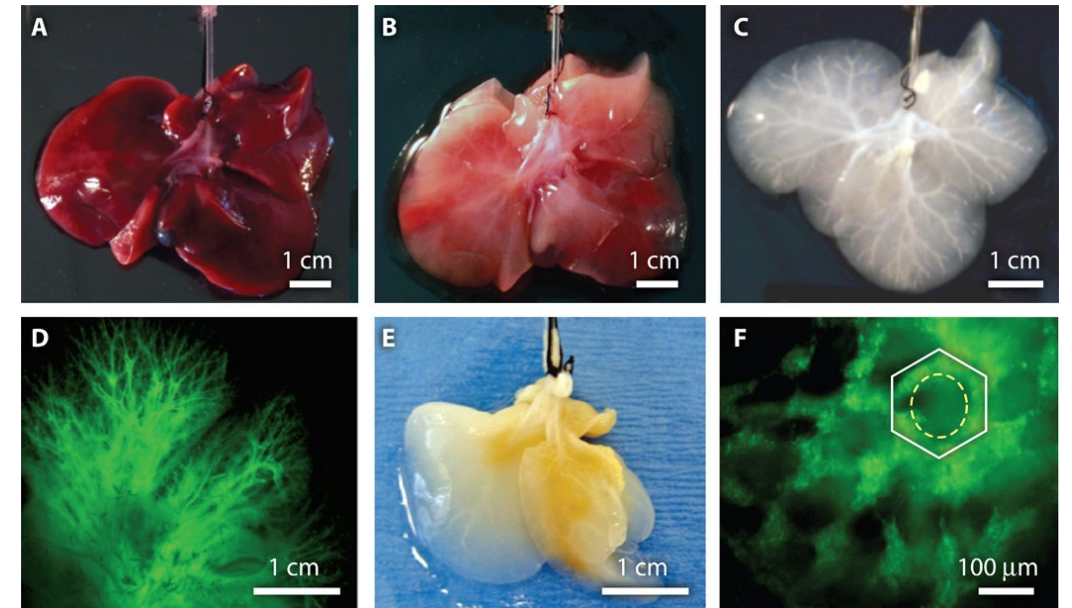
3D kultivace tkáňových kultur: kultivační nosiče (scaffoldy)

3-D tisk:



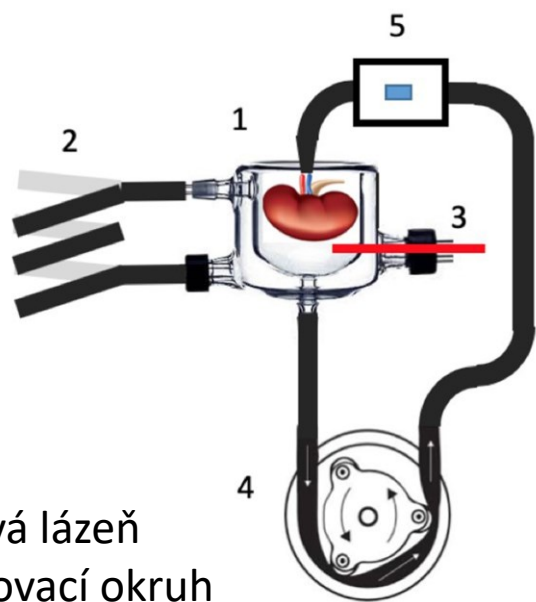
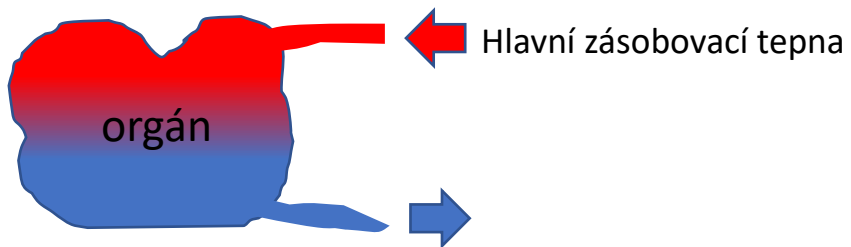
..viz Biotechnologické procesy:
živočišné tkáňové kultury, **blok III**

Decelularizovaná tkáň/orgán:

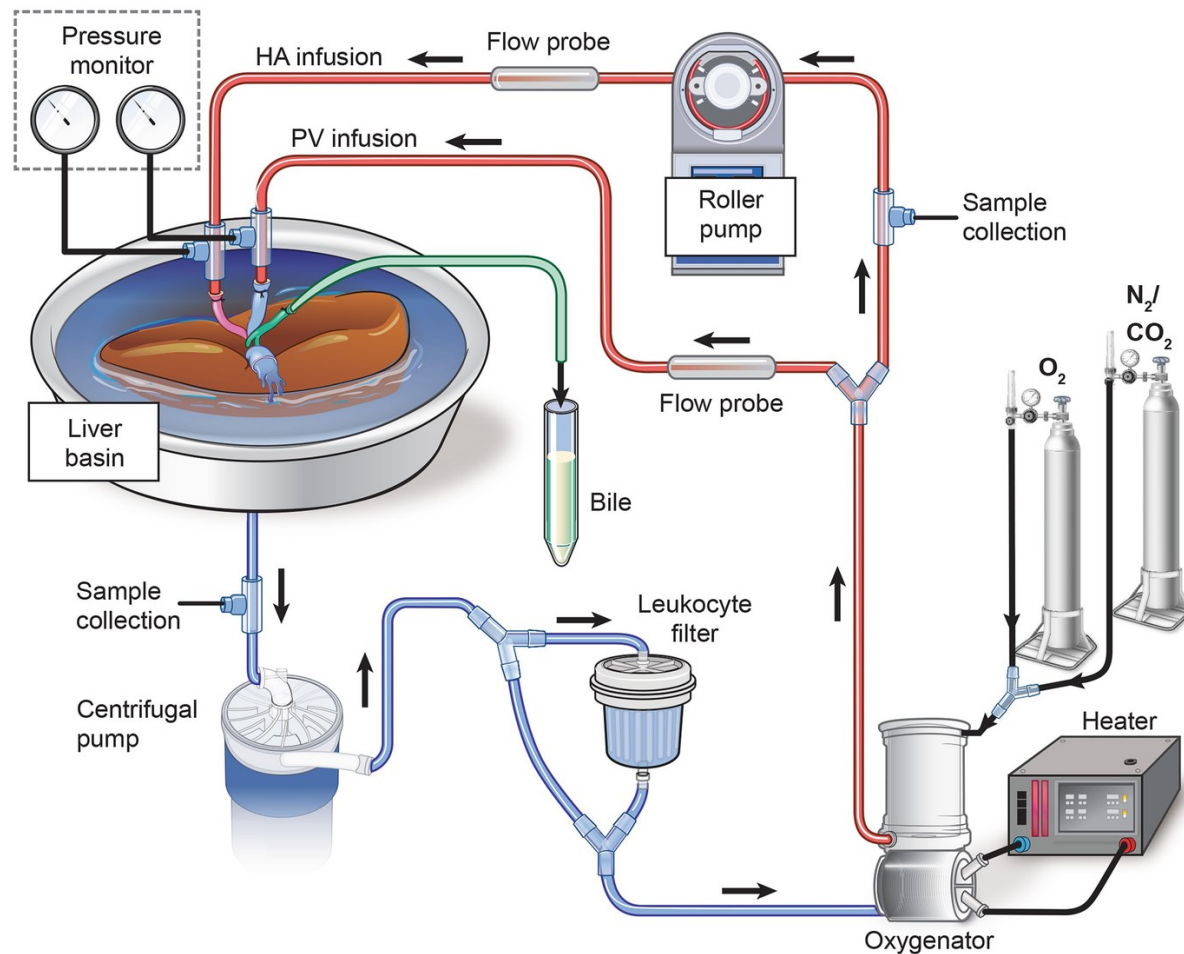


Decelularizace: většinou pufrované roztoky obsahující silné detergenty (např. 1% Triton, 1% SDS)
– rozpustí membrány a perfuze vymyje obsah

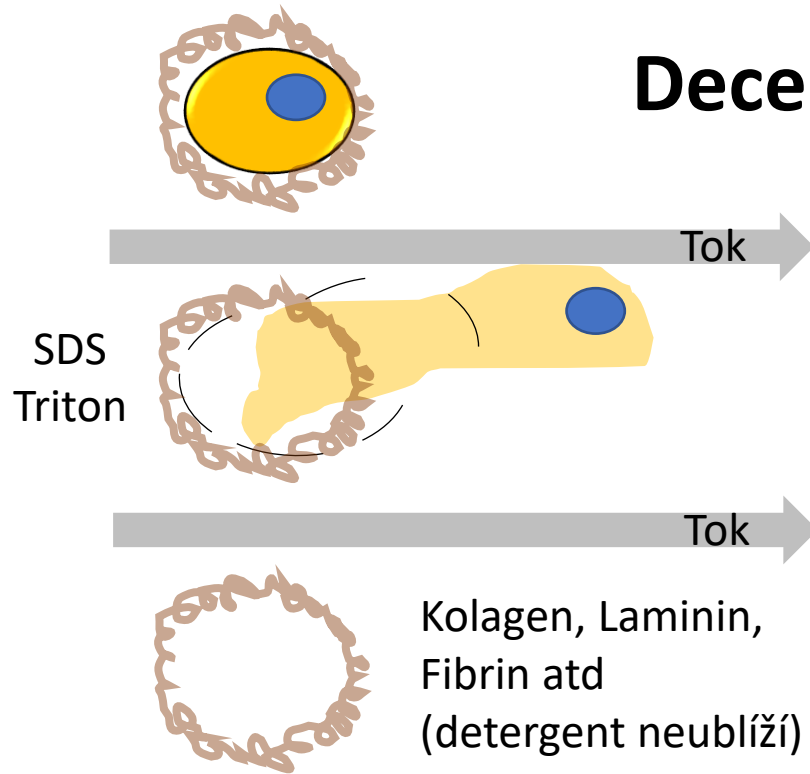
Perfuzi orgánu – základ decelularizace



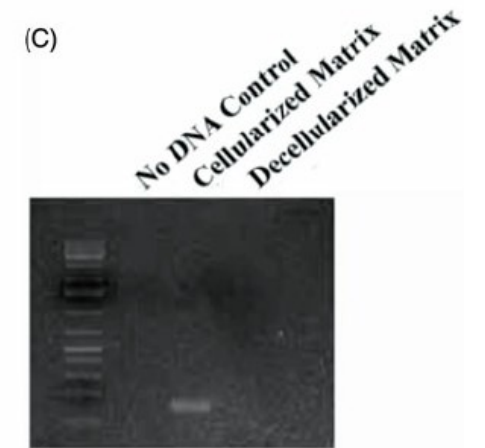
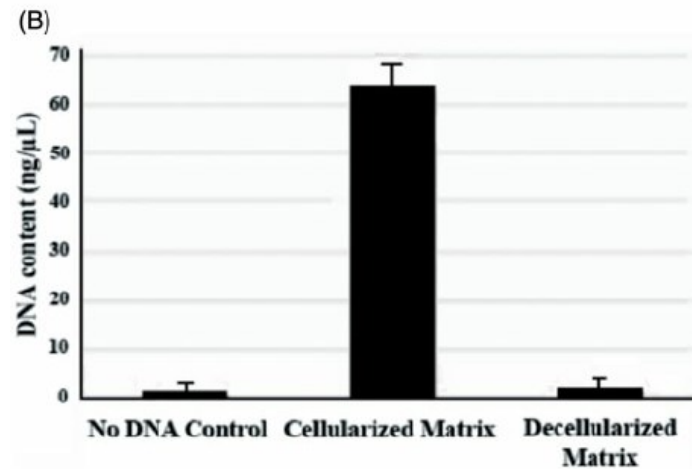
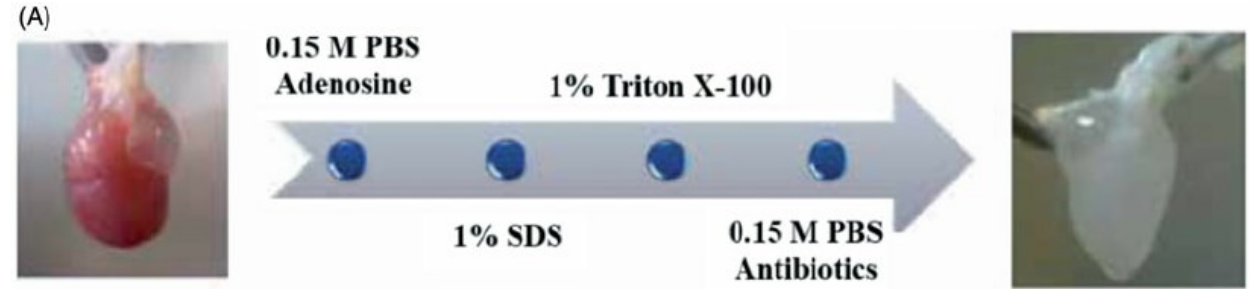
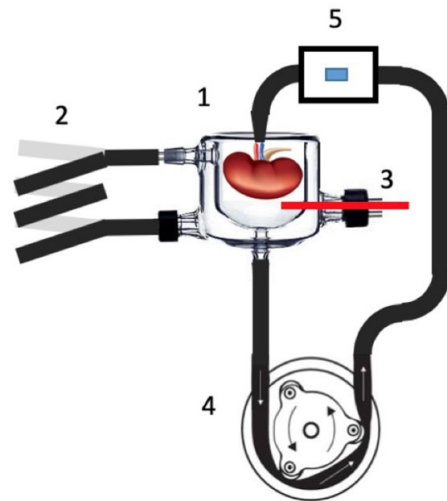
- 1) Orgánová lázeň
- 2) Temperovací okruh
- 3) Teplotní čidlo
- 4) Peristaltická pumpa
- 5) Kontroler tlaku



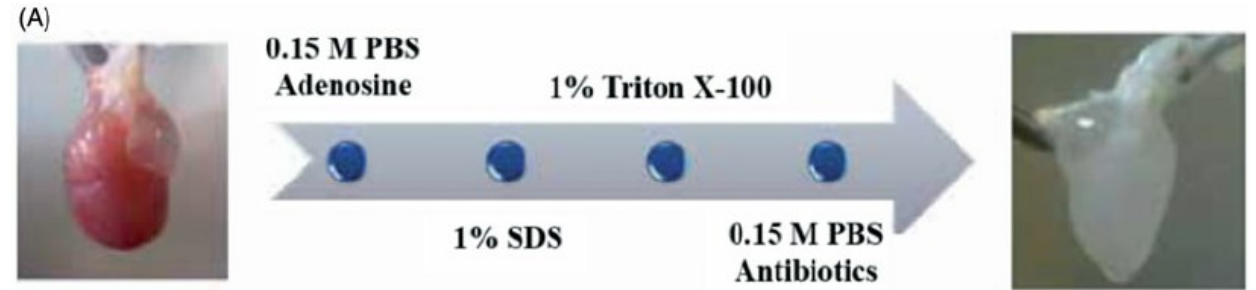
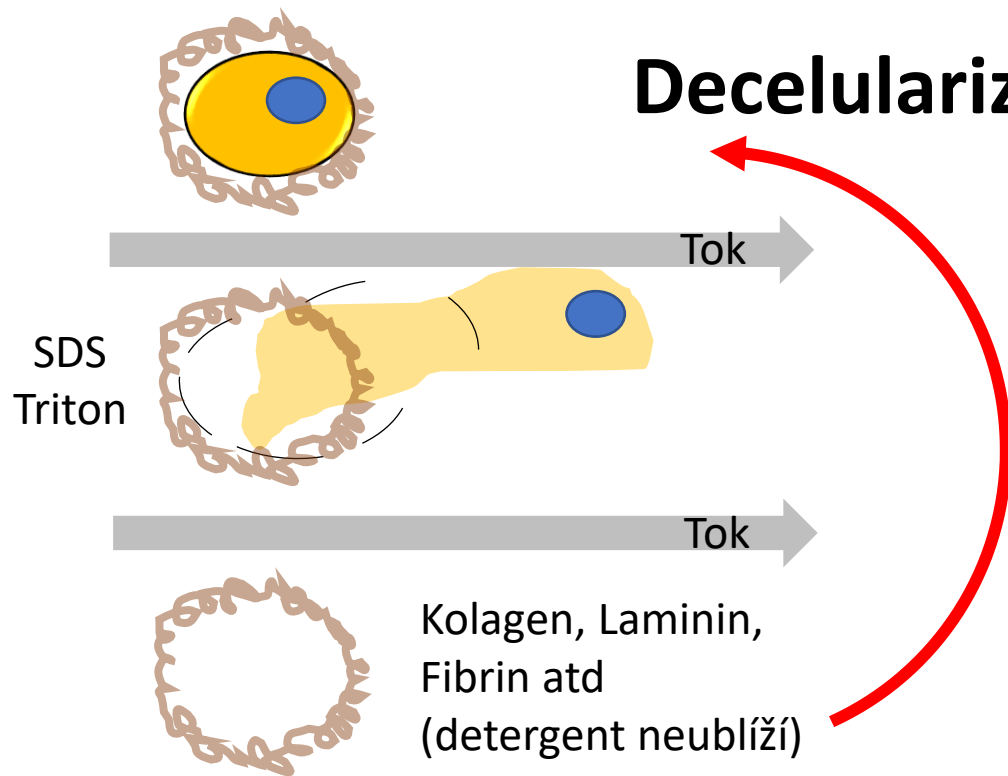
Decelularizace mezibuněčné hmoty



- 1) Orgánová lázeň
- 2) Temperovací okruh
- 3) Teplotní čidlo
- 4) Peristaltická pumpa
- 5) Kontroler tlaku



Decelularizace mezibuněčné hmoty



Repopulace

orgánu s použitím buněk z tkáňové kultury

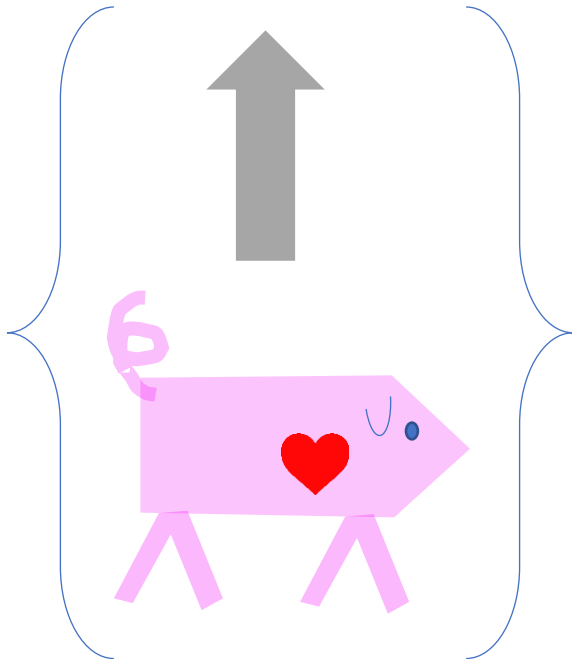
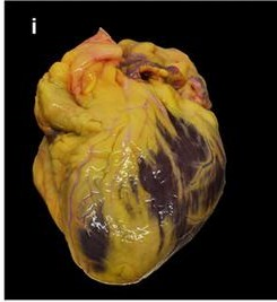
Tvorba lidského srdce z kmenových buněk na scaffold od dárce



Umělé srdce
dočasné řešení před
transplantací

Tvorba lidského srdce z kmenových buněk na scaffold od dárce

Lidské srdce nepoužitelné
k transplantaci



Zvířecí podobné velikosti a funkce



Umělé srdce
dočasné řešení před
transplantací

Tvorba lidského srdce z kmenových buněk na scaffold od dárce

Lidské srdce nepoužitelné
k transplantaci



Decelularizace lidského srdce

Tvorba lidského srdce z kmenových buněk na scaffold od dárce

Lidské srdce nepoužitelné
k transplantaci

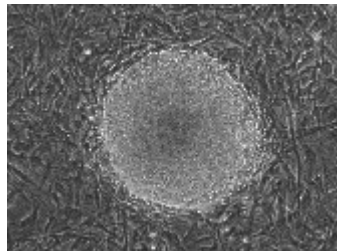


Decelularizace lidského srdce

Repopulace
decelularizovaného
srdce

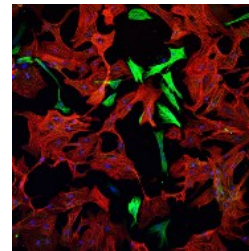
Při elektrické
stimulaci
viditelné
kontrakce

(..až 139mm Hg)

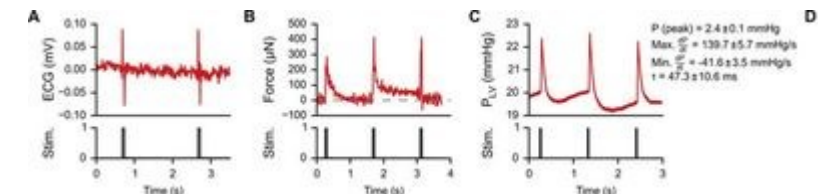


Lidské indukované
pluripotentní buňky

Diferenciace



500 mil. srdečních buněk



“Umělá” plíce za použití kmenových buněk a diferenciacie *in vitro*

...a dočasná podpora dýchání

Management selhání plic:

- Dočasná mimotělní oxygenace
- Transplantace plic



Mimotělní membránový oxygenátor

...nebo vypěstovat nové plíce

“Umělá” plíce za použití kmenových buněk a diferenciacie *in vitro*

...a dočasná podpora dýchání



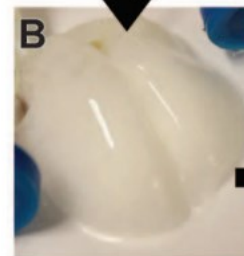
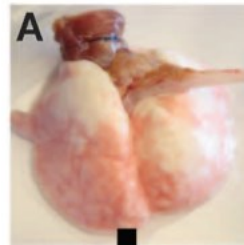
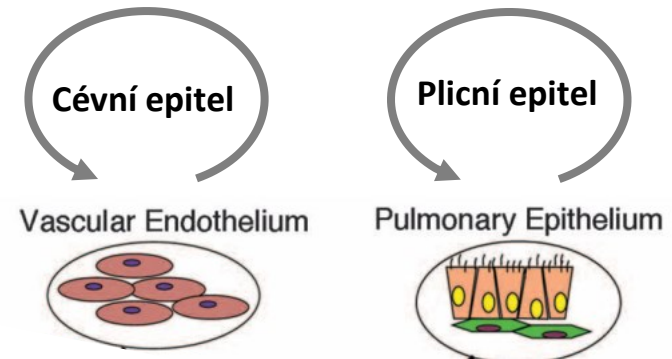
...nebo vypěstovat nové plíce

Repopulace bezbuněčné plicní matrix plicními buňkami a implantace funkčních plic do experimentálního zvířete



...nebo vypěstovat nové plíce

Rozpěstovaná směsná primokultura in vitro

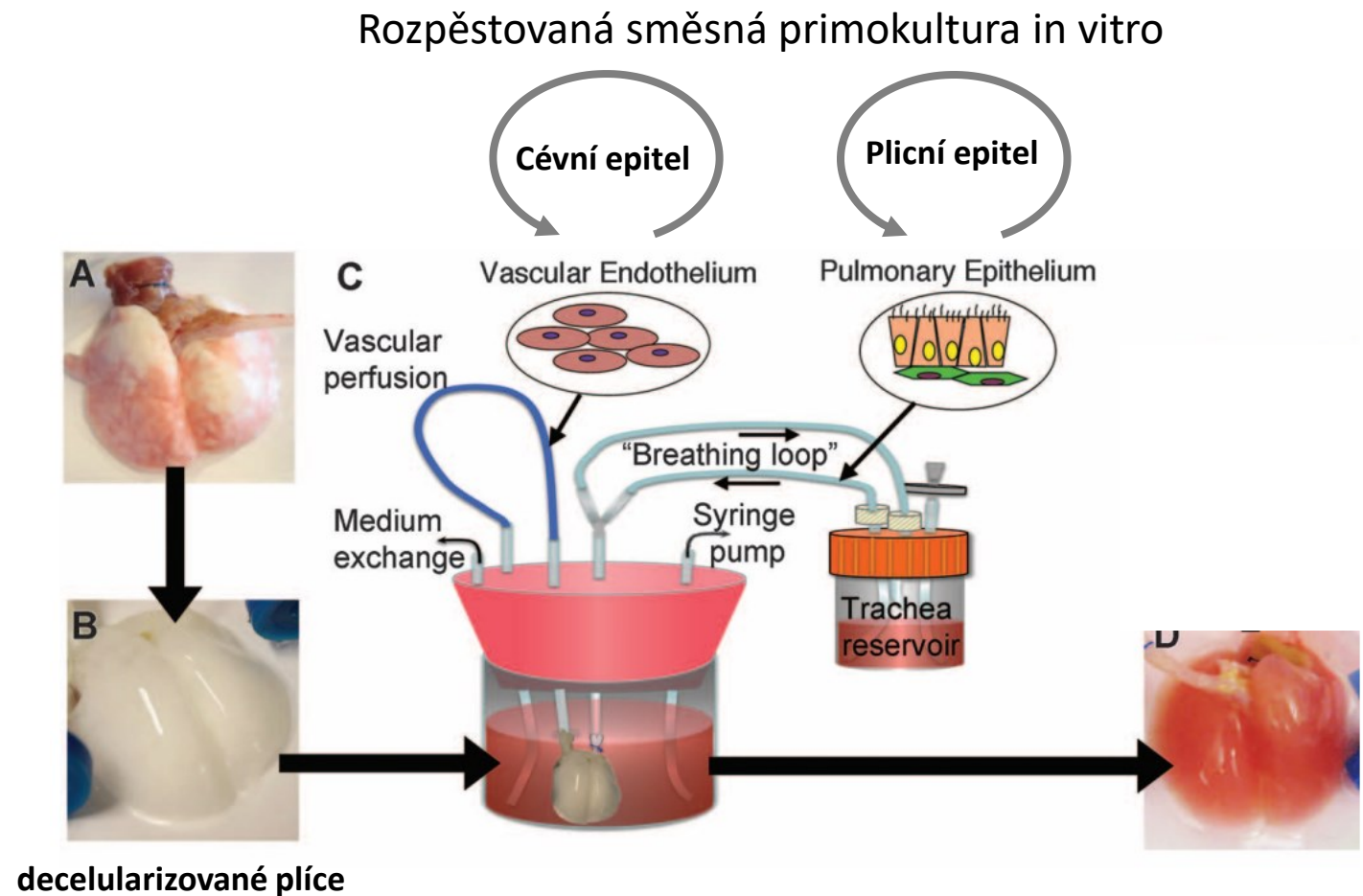


decellularizované plíce

Repopulace bezbuněčné plicní matrix plicními buňkami a implantace funkčních plic do experimentálního zvířete



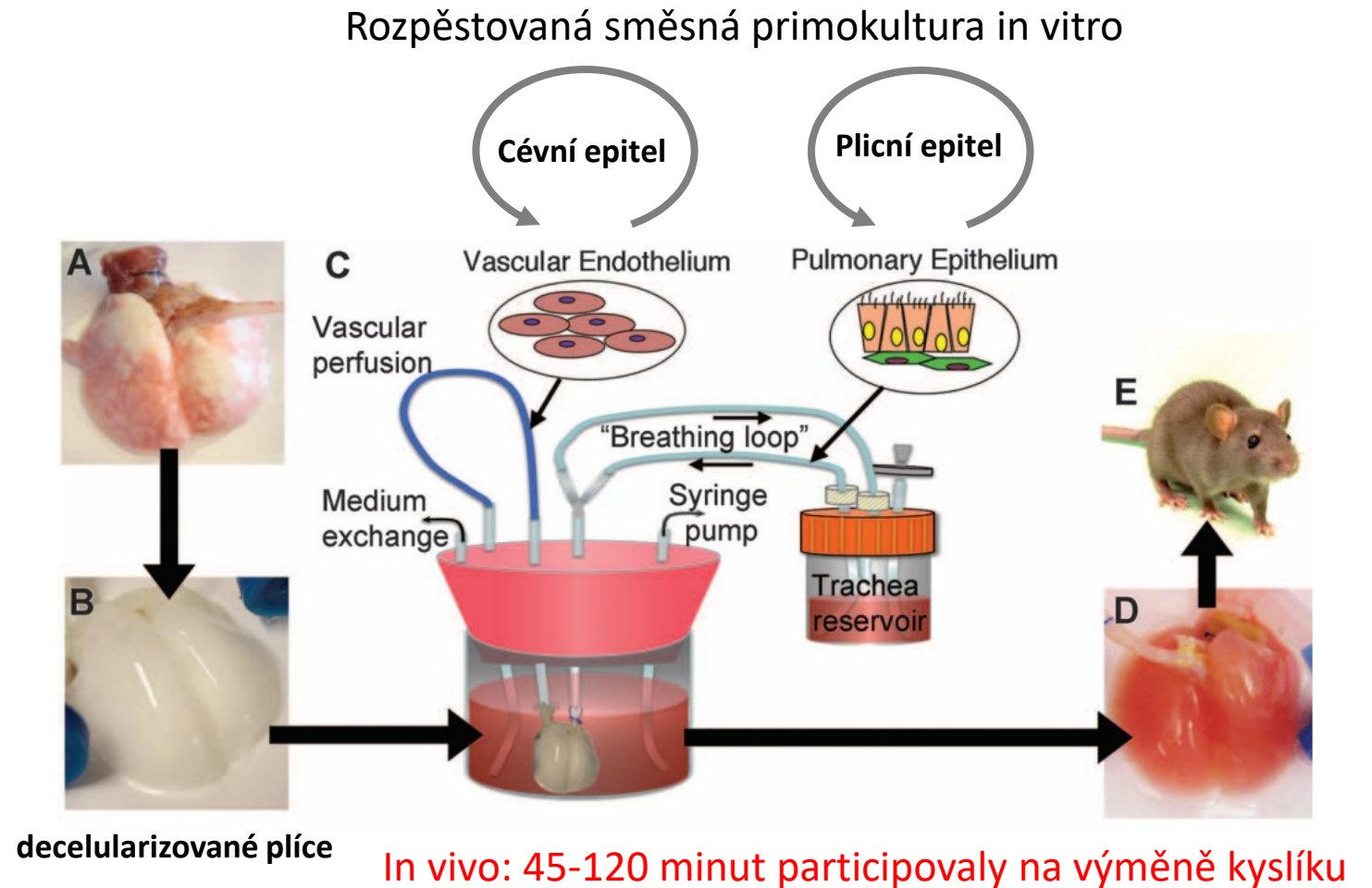
...nebo vypěstovat nové plíce



Repopulace bezbuněčné plicní matrix plicními buňkami a implantace funkčních plic do experimentálního zvířete



...nebo vypěstovat nové plíce

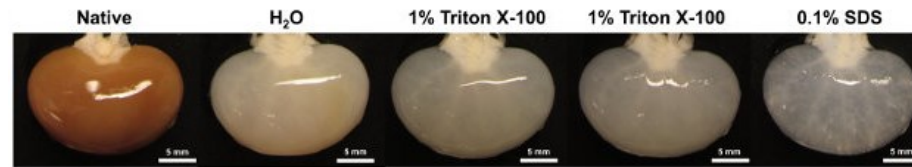


Decelularizované scaffoldy + repopulace: další orgány..

Srdce

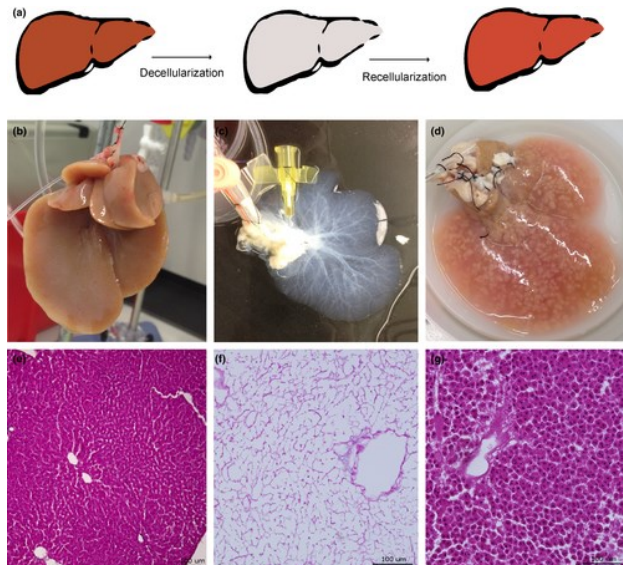


Ledviny (repopulace mESC)

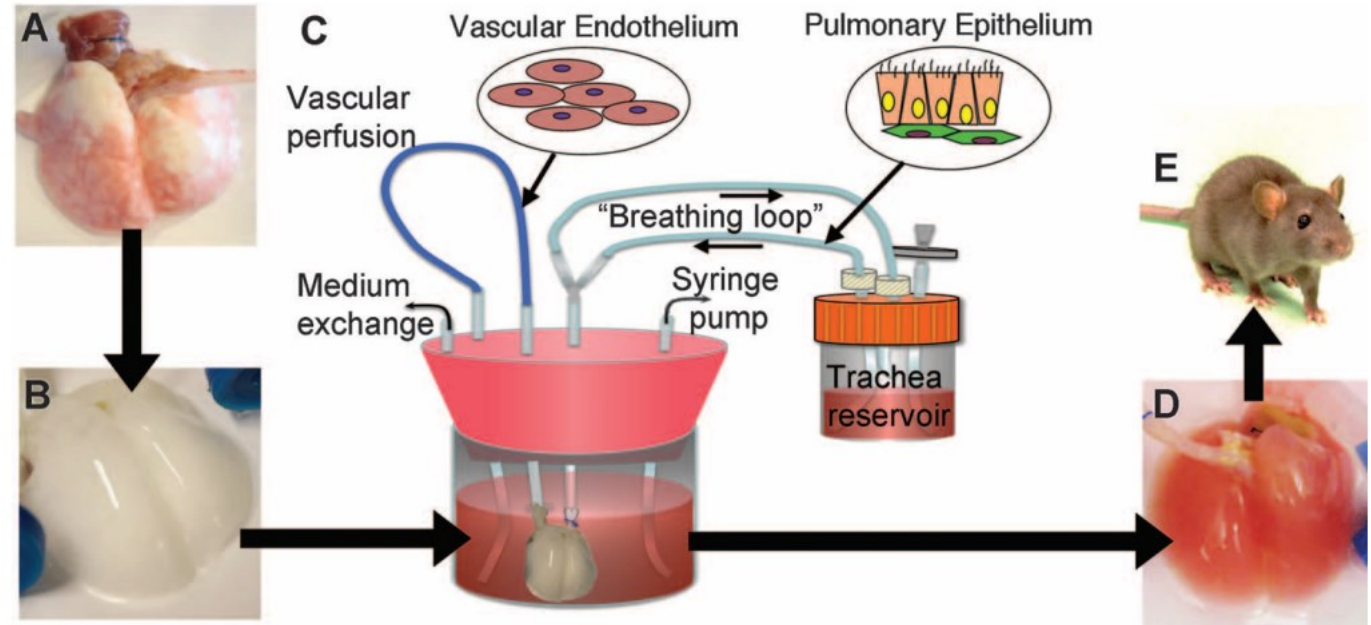


bez funkční odezvy

Játra

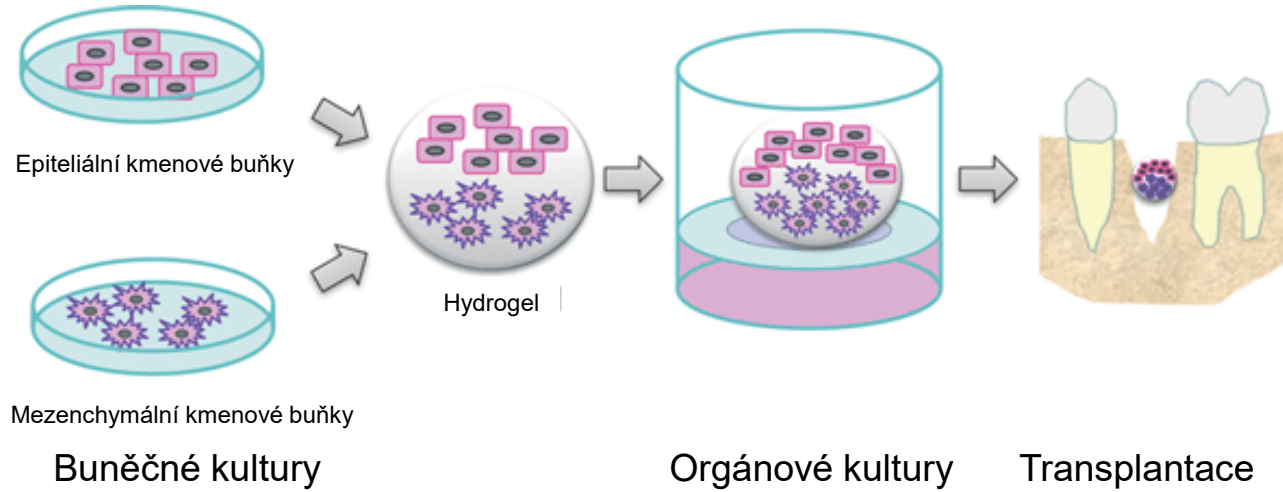


Plíce (repopulace primokulturou z E14 plic)

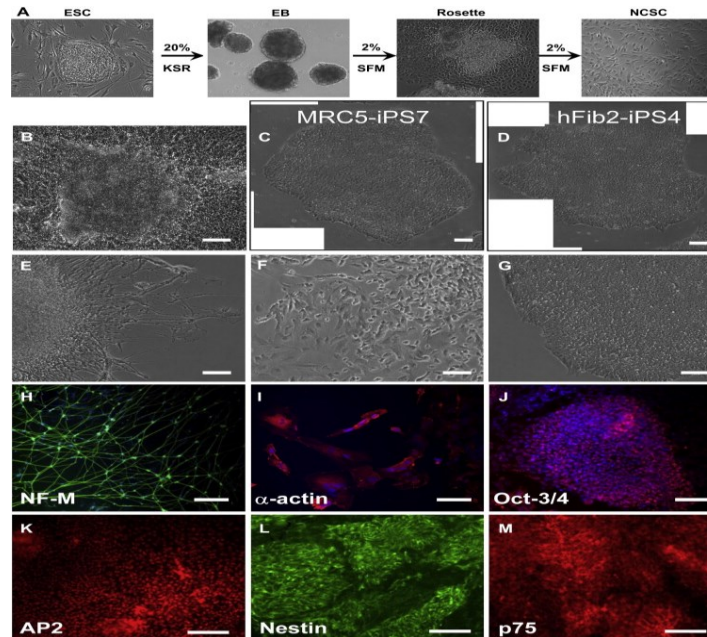


Zubní lékařství příští generace?

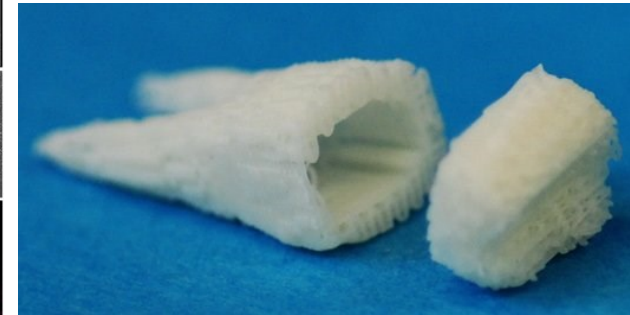
“Dospělé” kmenové buňky
& orgánové kultury



Pluripotentní kmenové buňky
& syntetické nosiče

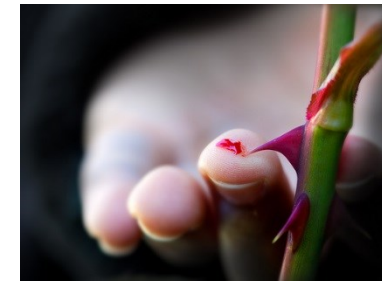


Diferenciace buněk nervové lišty,
odontogenních a osteogenních buněk



Klinické zkoušky buněčných produktů nemají na různých ustláno...

... nebo mají?



Léky/léčebné zákroky obsahující kmenové buňky

Upraveno Evropskou lékařskou agenturou (EMA) evropskou směrnicí [Regulation \(EC\) No 1394/2007](#):

Závazné pro jakýkoliv lék, léčebnou metodu, která zahrnuje:

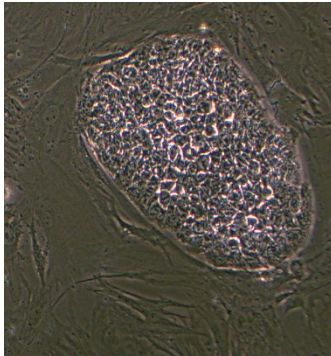
- více, než minimální manipulaci jakéhokoliv buněčného typu určeného ke klinické aplikaci
- Zamýšlené použití buněk se liší od jejich normální funkce v těle

Klinicke zkoušky buněčných produktů nemají na různých ustláno...

... nebo mají?



Geron:



2009 Klinicke zkousky (I. Fáze)
pouze 4 pacienti s poraněním míchy (původně
plánováno 8) 7- 14 dní po poranění

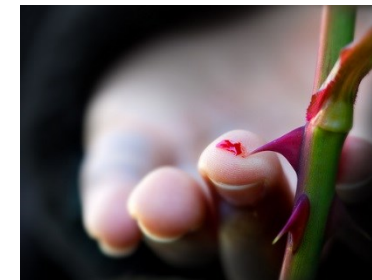
2011 Geron předčasně zkoušky ukončil – výsledek:
„no adverse effect“

2014 Geron restartuje zkoušky (Nature (2014)
510;18:7503)



Klinické zkoušky kmenových buněk nemají na různých ustláno...

... nebo mají?



ClinicalTrials.gov
A service of the U.S. National Institutes of Health

ClinicalTrials.gov is a registry and results database of publicly and privately supported clinical studies of human participants conducted around the world. Learn more [about clinical studies](#) and [about this site](#), including relevant [history](#), [policies](#), and [laws](#).

Find Studies | About Clinical Studies | Submit Studies | Resources | About This Site

ClinicalTrials.gov currently lists **174,156 studies** with locations in all 50 states and in **187 countries**. Text Size ▾

Search for Studies

Example: "Heart attack" AND "Los Angeles"

Search Help

- [How to search](#)
- [How to find results of studies](#)
- [How to read a study record](#)

Locations of Recruiting Studies

Location	Percentage
Non-U.S. Only	51%
U.S. Only	43%
Both U.S. & Non-U.S.	6%

Total N = 33,509 studies
Data as of September 04, 2014

- [See more trends, charts, and maps](#)

For Patients & Families

- [How to find studies](#)
- [See studies by topic](#)
- [Learn about clinical studies](#)
- [Learn more...](#)

For Researchers

- [How to submit studies](#)
- [Download content for analysis](#)
- [About the results database](#)
- [Learn more...](#)

For Study Record Managers

- [Why register?](#)
- [How to register study records](#)
- [FDAAA 801 Requirements](#)
- [Learn more...](#)

Learn More

- [ClinicalTrials.gov Online Training](#)
- [Glossary of common site terms](#)

For the Press

- [Using our RSS Feeds](#)

HOME | RSS FEEDS | SITE MAP | TERMS AND CONDITIONS | DISCLAIMER | CONTACT NLM HELP DESK

Copyright | Privacy | Accessibility | Viewers & Players | Freedom of Information Act | USA.gov
U.S. National Library of Medicine | U.S. National Institutes of Health | U.S. Department of Health & Human Services

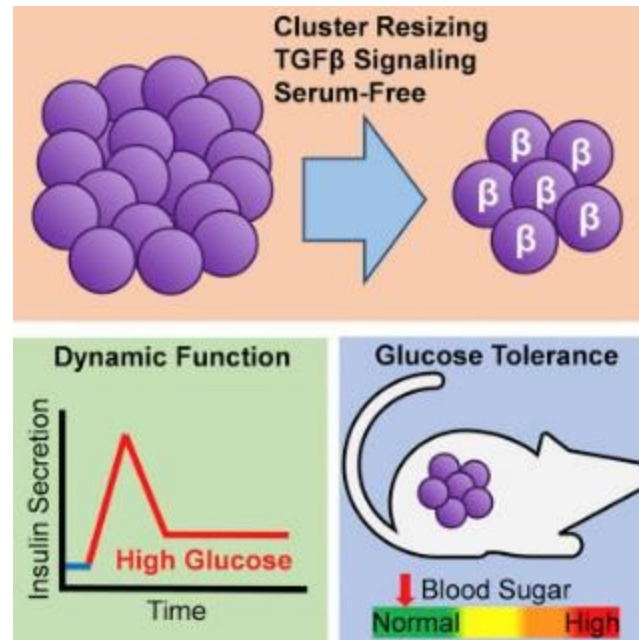
Stav na počátku roku 2024:

Embryonální kmenové buňky: 147 studií
(srdeční selhání, degenerace sítnice, poškození močového měchýře, ALS, suchá forma makulární degenerace, poranění menisku, Parkinsonova choroba, svalová atrofie, intrauterinní adheze, ovarialní nedostatečnost, erektilní dysfunkce, diabetes, artritida)

Indukované pluripotentní KB: 94 studií
(podobné aplikace, jako u embryonálních kmenových buněk+diabetická retinopatie, talasemie)

Mezenchymální KB: 1458 studií
(osteoartritida, anemie, encefalopatie, rekonstrukční svalová chirurgie + podobne jako výše)

Příklad: léčba diabetu – transplantace insulin sekretujících buněk

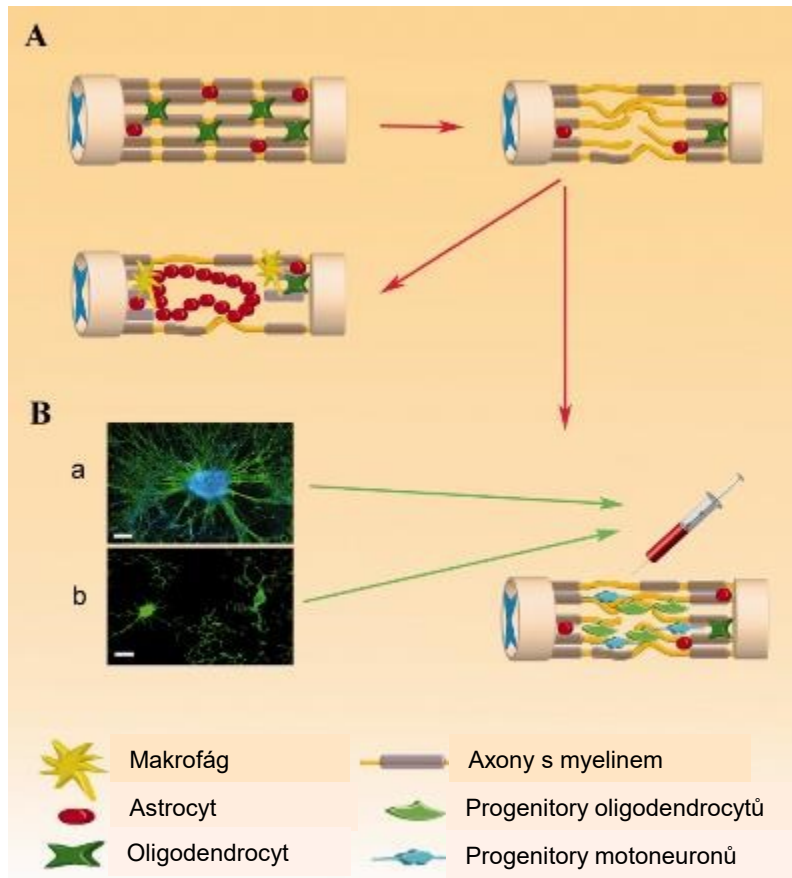


Valasco-Cruz, 2019 Cell

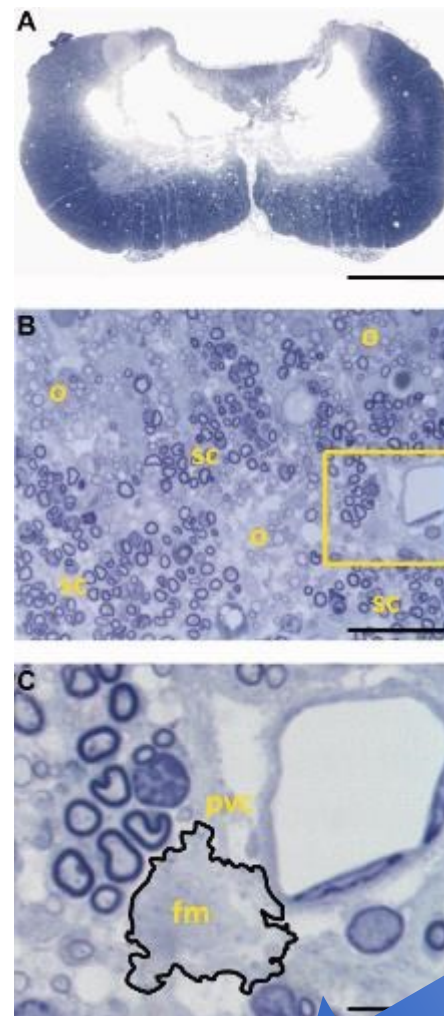
- iPSC and ESC derived pancreatic β -cells are responsive to glucose level
- transplanted cells rapidly restore glucose tolerance in mouse
- on going trial in humans

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

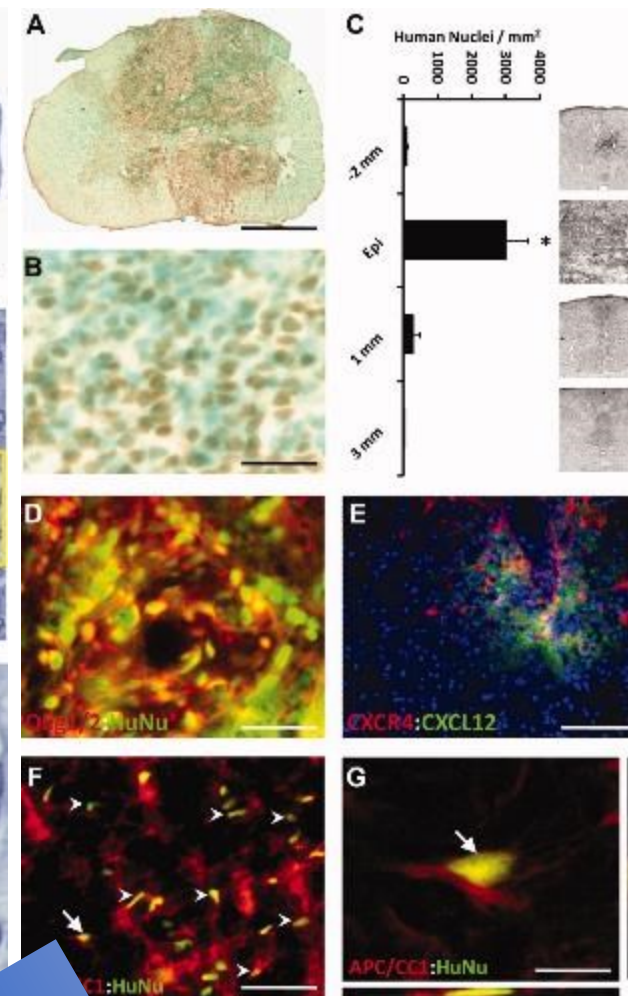
Patofyziologie a strategie léčby KB



Anatomie poškození



Stav po transplantaci



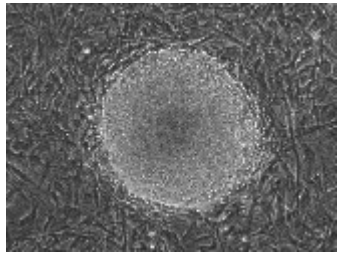
Výsledek: obnovení bílé a šedé hmoty v místě poškození
obnovení funkčnosti motorických neuronů
obnovení pohybových funkcí

Model: laboratorní potkan

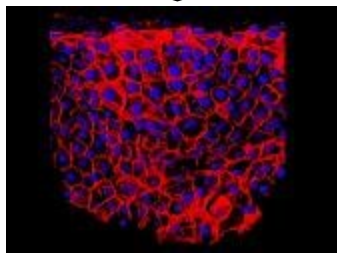
Adaptováno ze Stem Cells, 2010

Úspěchy: Embryonální kmenové buňky

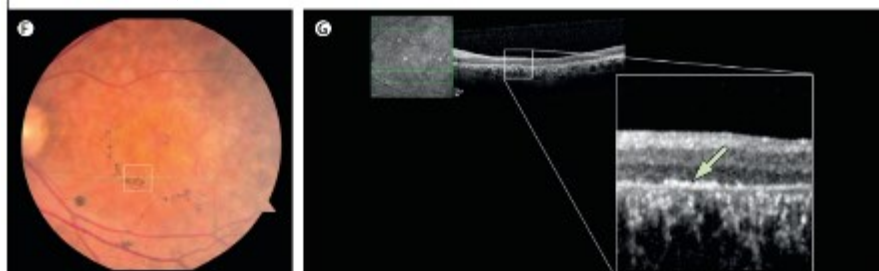
...Regnerace RPE...



Lidské embryonální kmenové buňky



Diferenciace do pigmentového epitelu



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

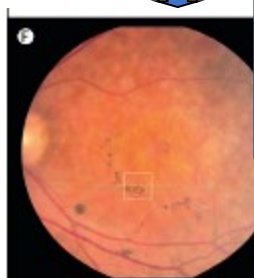
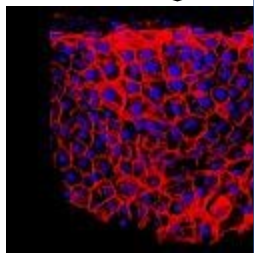
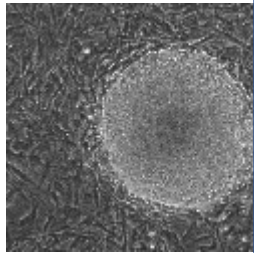


	BCVA	ETDRS (number of letters)
Follow eye		
Baseline	Hand motion	0
1 week	Hand motion	0
2 weeks	Hand motion	0
3 weeks	Hand motion	0
4 weeks	Hand motion	0
6 weeks	Hand motion	0
8 weeks	Hand motion	0
12 weeks	Hand motion	0
Operated eye		
Baseline	Hand motion	0
1 week	Counting fingers	0
2 weeks	Counting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

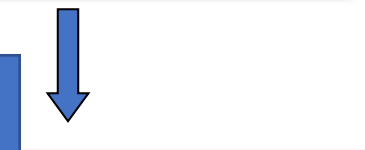
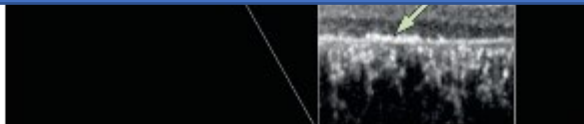
hESC=human embryonic stem cells, RPE=retinal pigment epithelium, BCVA=best corrected visual acuity, ETDRS=Early Treatment Diabetic Retinopathy Study visual

Úspěchy: Embryonální kmenové buňky

...Regenerace RPE...



HOLOCLAR® odebrane limbalni buňky z rohovky rozmnožené v laboratoři a transplantované zpět do oka..

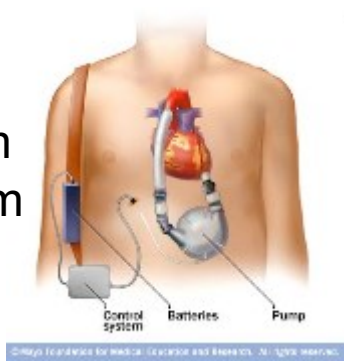


ETDRS (number of letters)	
	0
	0
	0
	0
	0
	0
	0
	0
	1
	3
4 weeks	20/800
6 weeks	20/800
8 weeks	20/800
12 weeks	20/800

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

...Srdeční záplaty

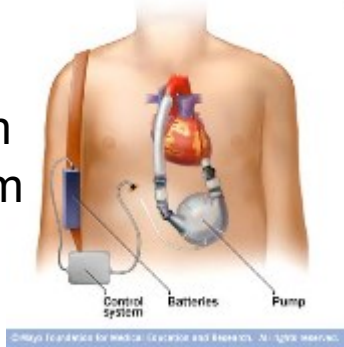
Pacient s akutním srdečním selháním (rozsáhlé jizvy)



- 5% ejekční frakce
- Trvalý pobyt na JIP
- Mimetělní oběh
- Prognóza v týdnech

...Srdeční záplaty

Pacient s akutním srdečním selháním (rozsáhlé jizvy)

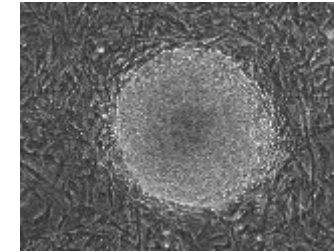


Odběr epitelu nosní sliznice: primokultura

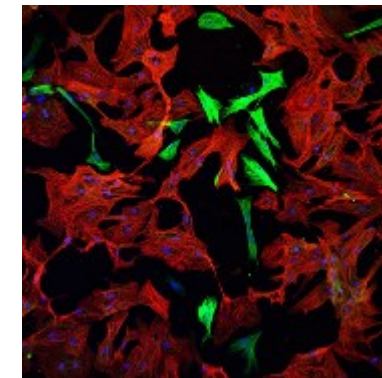


Reprogramace

Indukované pluripotentní kmenové buňky



Diferenciace

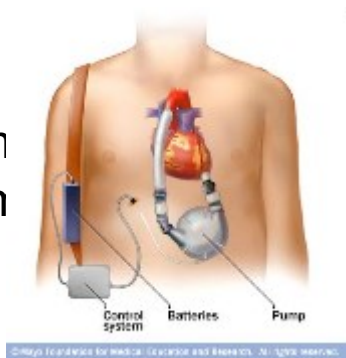


Srdeční buňky

Jak transplantovat tkáňovou kulturu do rozsáhlé jizvy na srdci?

...Srdeční záplaty

Pacient s akutním srdečním selháním (rozsáhlé jizvy)

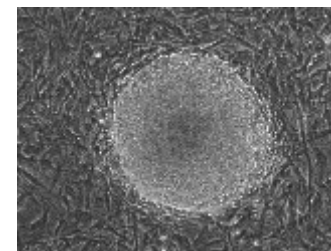


Odběr epitelu nosní sliznice: primokultura

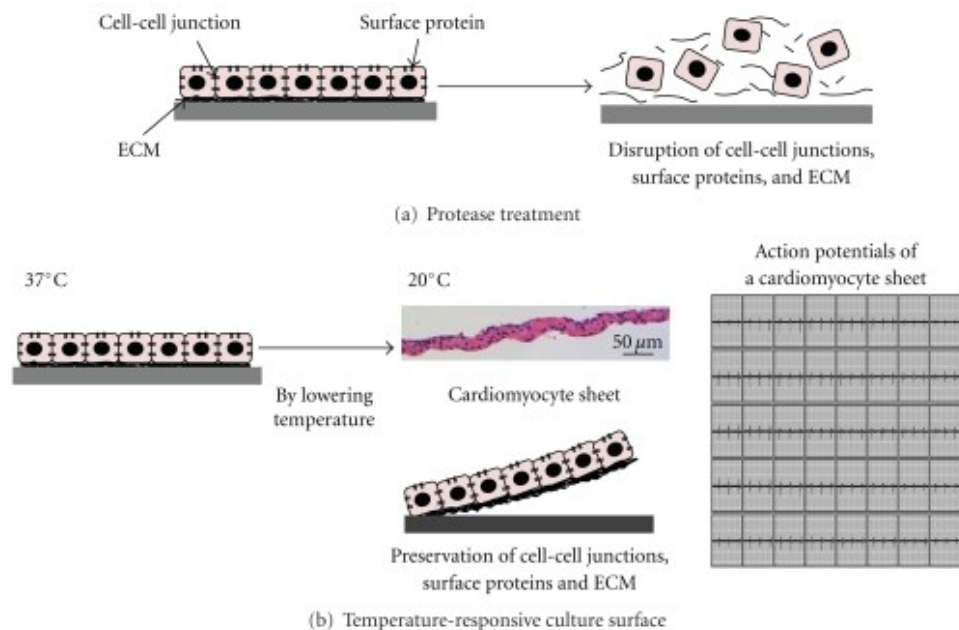


Reprogramace

Indukované pluripotentní kmenové buňky

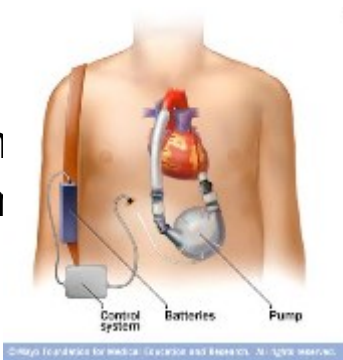


Teplosenzitivní materiál na tvorbu buněčné monovrstvy



...Srdeční záplaty

Pacient s akutním srdečním selháním (rozsáhlé jizvy)

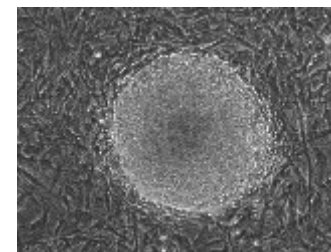


Odběr epitelu nosní sliznice: primokultura



Reprogramace

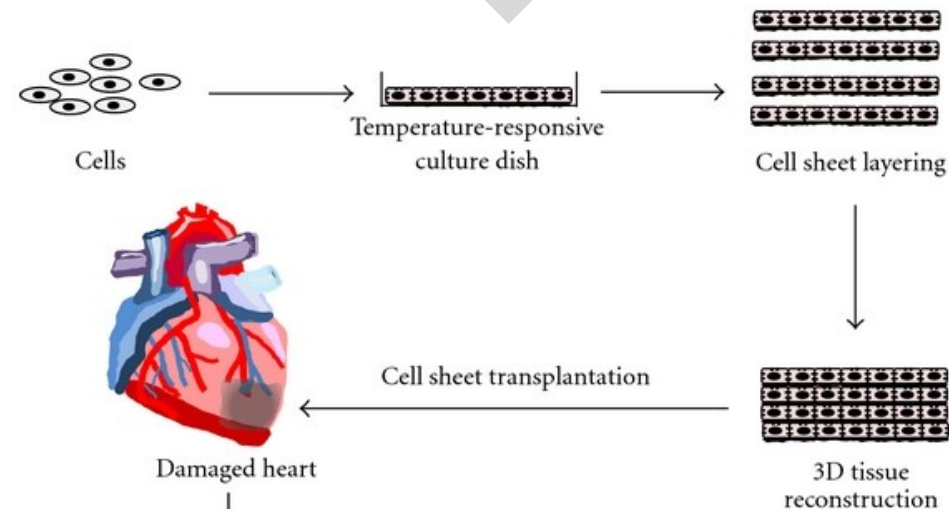
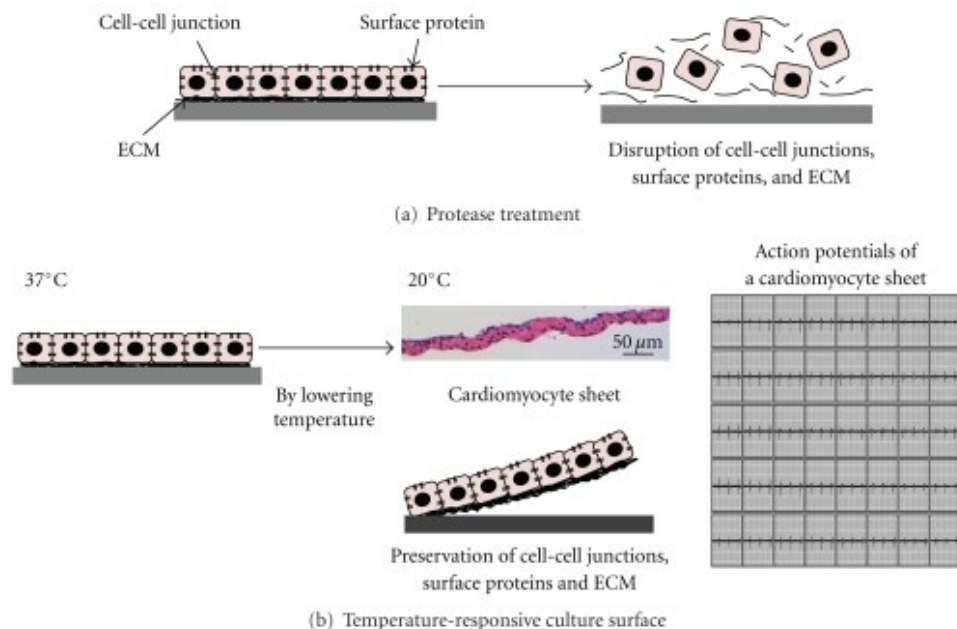
Indukované pluripotentní kmenové buňky



3-D Diferenciace

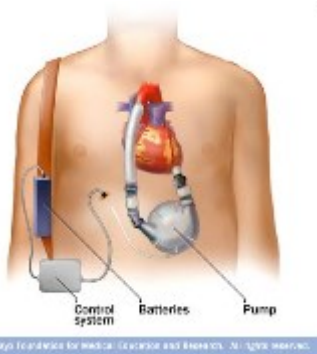


Teplosenzitivní materiál na tvorbu buněčné monovrstvy



...Srdeční záplaty

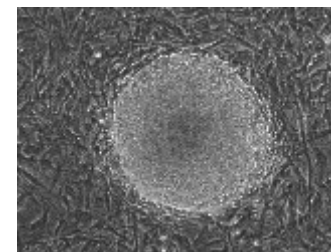
Pacient s akutním srdečním selháním (rozsáhlé jizvy)



Odběr epitelu nosní sliznice: primokultura

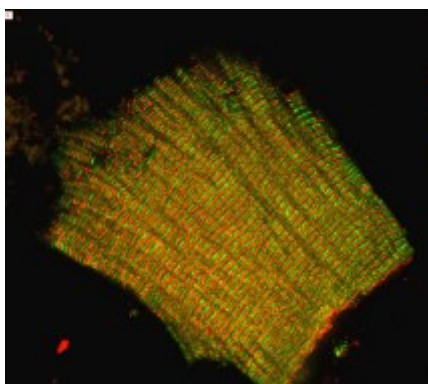
Reprogramace

Indukované pluripotentní kmenové buňky



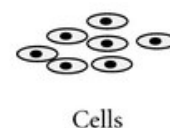
Transplantace na jizvu

**30% ejekční frakce
... pacient odchází z JIP**

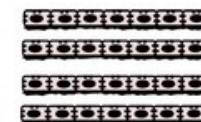


3-D srdeční záplata

3-D Diferenciace



Temperature-responsive culture dish



Cell sheet layering

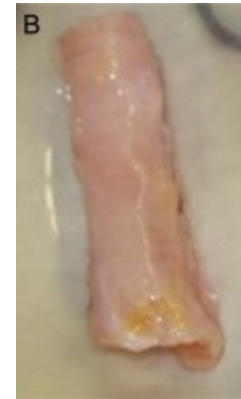
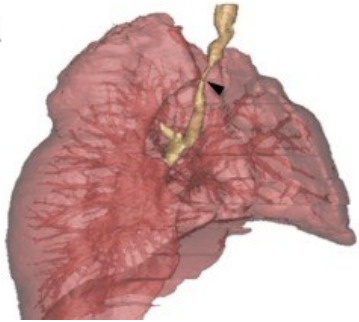


3D tissue reconstruction

Transplantace trachei, vypěstované z vlastních epitelálních buněk pacientce s genetickou stenózou

15-letá dívka s akutní stenózou průdušnice

A

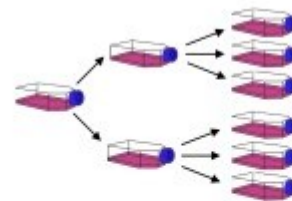


Hybridní transplantace
(autologní buňky + alogenní scaffold)

Odběr epitelových
buněk



Expanze v primokultuře



Repopulace
decelarizovaného
scaffoldu od dárce



Transplantace trachei, vypěstované z vlastních epitelálních buněk pacientce s genetickou stenózou

15-letá dívka s akutní stenózou průdušnice

A



iDNES.cz / MAGAZÍNY Ona Auto Bydlení **Technet** Mobil Cestování Hobby Xman Bonusweb Kvíz Speciály

Technet.cz Technika Věda Vesmír Armáda Testy Internet Audio video Hardware Software Sto objevů Před 100 lety

Ohrozil pacienty na životě? Hvězdný lékař nabízel riskantní operaci

© 18. února 2016 12:00

Dokument švédské televize přitáhl pozornost k praktikám chirurga Paola Macchiariniho, který se proslavil ojedinělými operacemi průdušnice. Podle filmařů i některých lékařů však lékař uváděl pacientům nepravdivé informace.



Reklama

Paolo Macchiarini na fotografii pořízené v době nástupu na prestižní švédskou lékařskou univerzitu Karolinska Institutet v roce 2010. | foto: STAFFAN LARSSON/KAROLINSKA INSTITUTE

[Transplantační výkon roku](#), tímto a dalšími superlativy novináři i lékaři

(autologní b

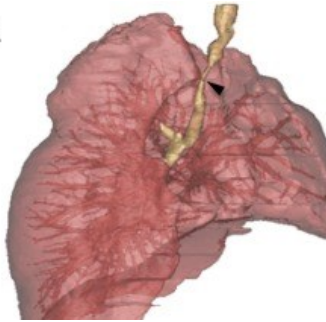
Repopulace
decelularizovaného
scaffoldu od dárce



Transplantace trachei, vypěstované z vlastních epitelálních buněk pacientce s genetickou stenózou

15-letá dívka s akutní stenózou průdušnice

A



Ohrozil pacienty na životě? Hvězdný lékař nabízel riskantní operaci

18. února 2016 12:00

Dokument švédské televize přitáhl pozornost k praktičtému lékaři, který se proslavil ojedinělými operacemi průdušnice. Podle něj však pacientům uváděl nepravdivé informace.

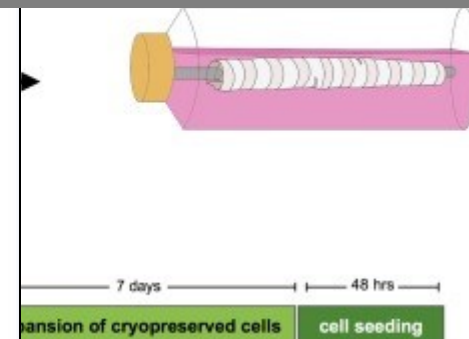
Paolo Macchiarini na fotografii pořízené v době nástupu na prestižní švédskou lékařskou univerzitu Karolinska Institutet v roce 2010. | foto: STAFFAN LARSSON/KAROLINSKA INSTITUTE

[Transplantační výkon roku, tímto a dalšími superlativy novináři i lékaři](#)











(autologní b

V říjnu 2023 odsouzen ke 3 letům

Svédská odborná komise našla důkazy vědeckého podvodu v 6 publikacích, což vedlo ke stažení 11 Macciariniho článků..



Výběr recentních aplikací PSC v klinických studiích

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

2020 (Clinicaltrials.gov):

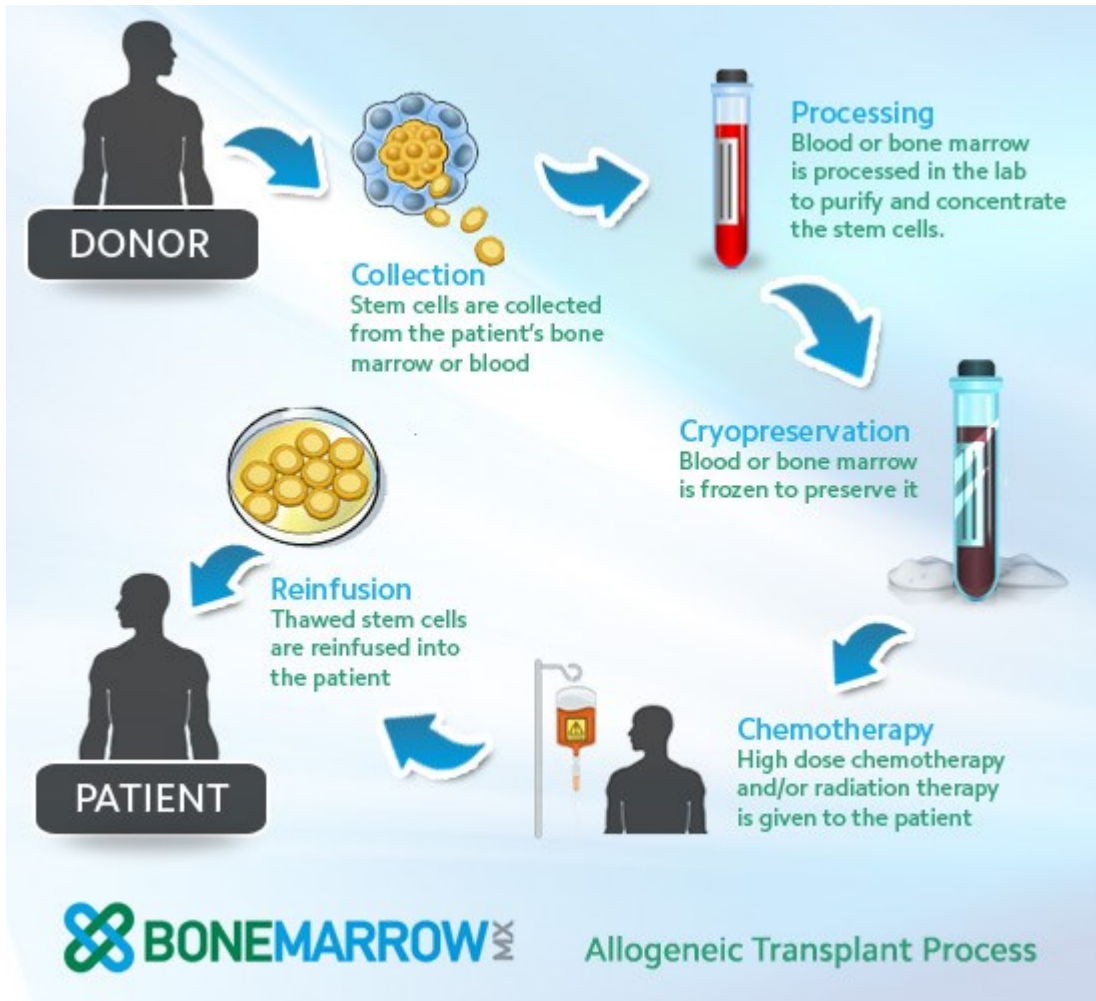
89 studies using hiPSC

(Generation of clinical grade products)

41 studies using hESC

(Heart failure, intrauterine adhesions, Retina, ALS, meniskus, Parkinsons, Diabetes)

Co by se nám hodilo, ale tkáňové kultury jsou na to zatím krátké...

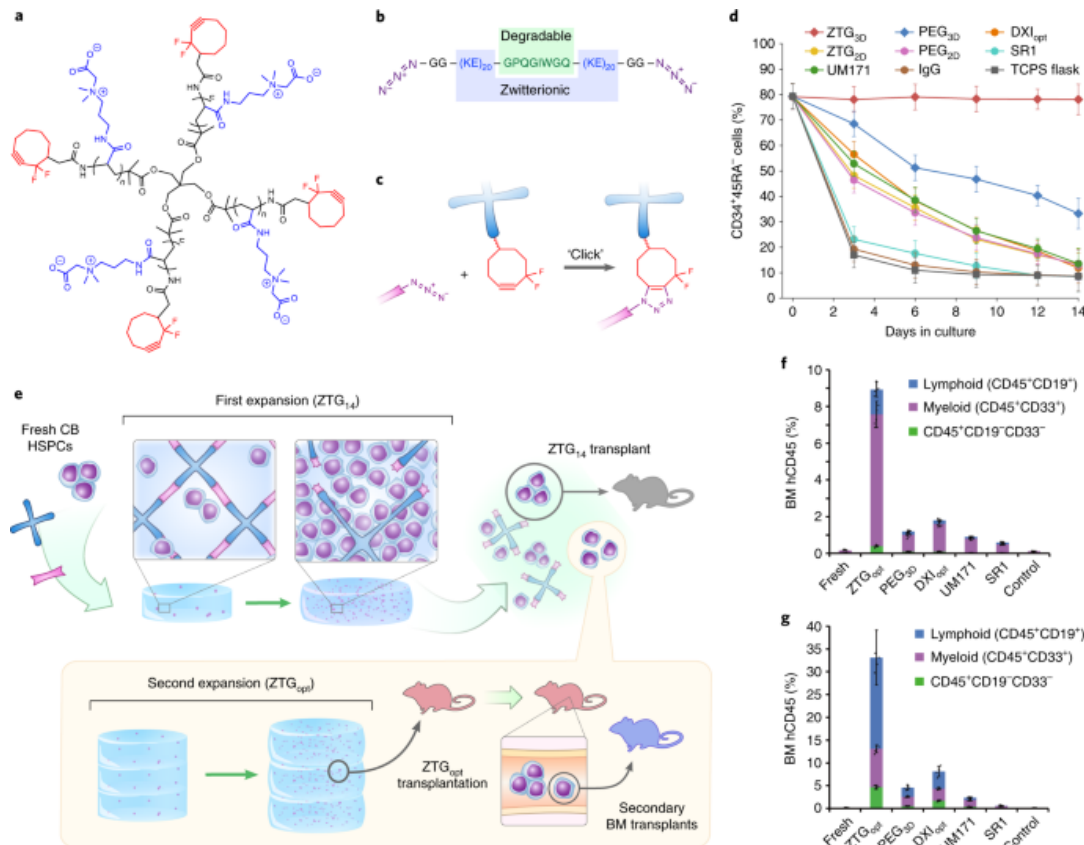


- Cca 1000 pacientů ročně potřebuje transplantaci kostní dřeně
- Trvalý nedostatek dárců (dlouhé čekací lhůty)
- Umíme kultivovat hematopoetické buňky z kostní dřeně?....

Co by se nám hodilo, ale tkáňové kultury jsou na to zatím krátké...

Funkční na myších - zwitteriontový hydrogel – mimikuje scaffold kostní dřeně

Základ: Poly(carboxybetaine acrylamide)

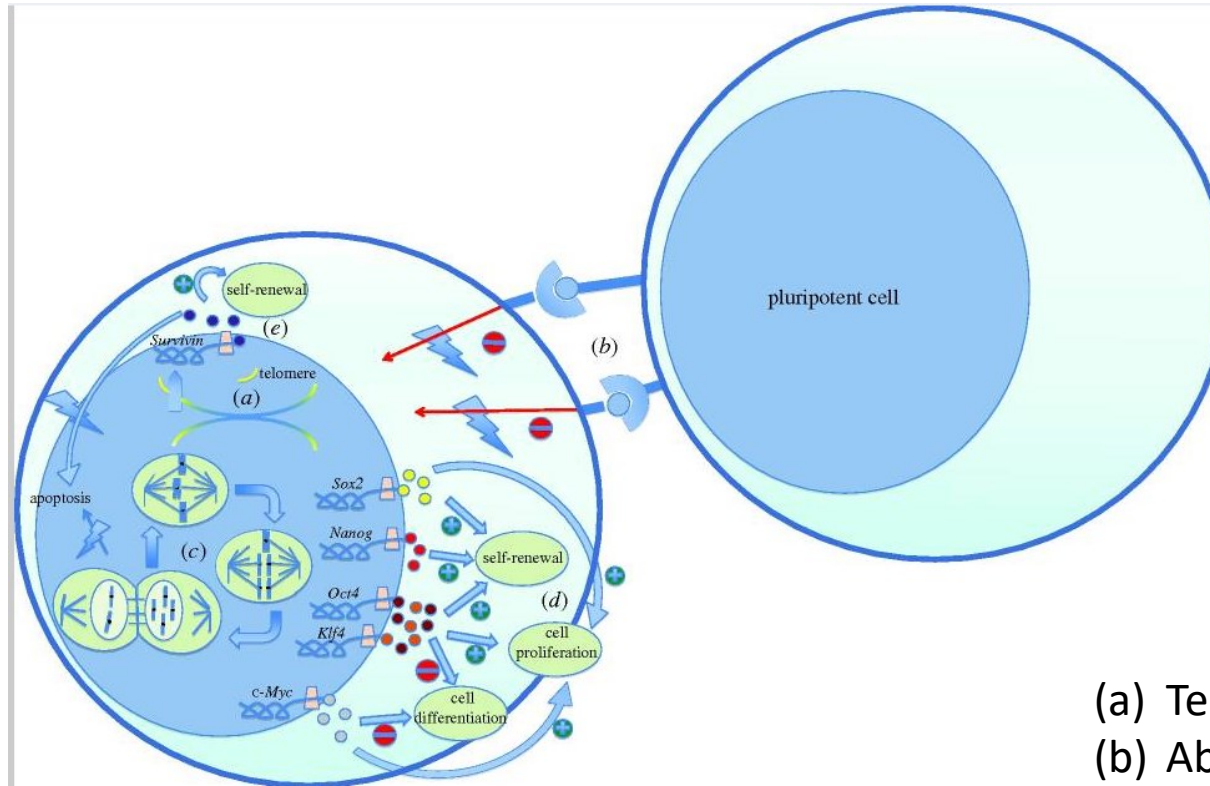


- Cca 1000 pacientů ročně potřebuje transplantaci kostní dřeně
- Trvalý nedostatek dárců
- Umíme kultivovat hematopoetické buňky z kostní dřeně....
.... ale nezachovávají si klonogenní diferenciační potenciál)

Bezpečnost a etika

Jakákoliv aplikace PKB je podmíněna kvantitativní diferenciací do kýžené tkáně

Vztah mezi pluripotencí a tumorigenicitou



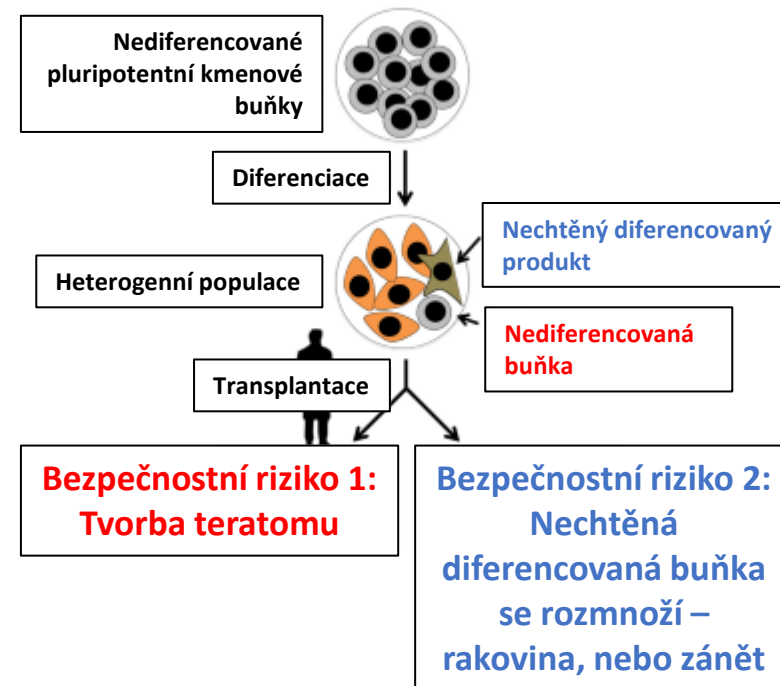
Kooreman, J R Soc Interface. 2010

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

Technologie ke zvýšení bezpečnosti transplantace produktů z pluripotentních kmenových buněk

Bezpečnostní rizika transplantace produktů z kmenových buněk:

1. **Tvorba teratomů a teratokarcinomů z kontaminace pluripotentními buňkami**
2. **Množení nechtěných typů diferencovaných buněk – nebezpečí nádoru, nebo zánětu**



Technologie ke zvýšení bezpečnosti transplantace produktů z pluripotentních kmenových buněk

Bezpečnostní rizika transplantace produktů z kmenových buněk:

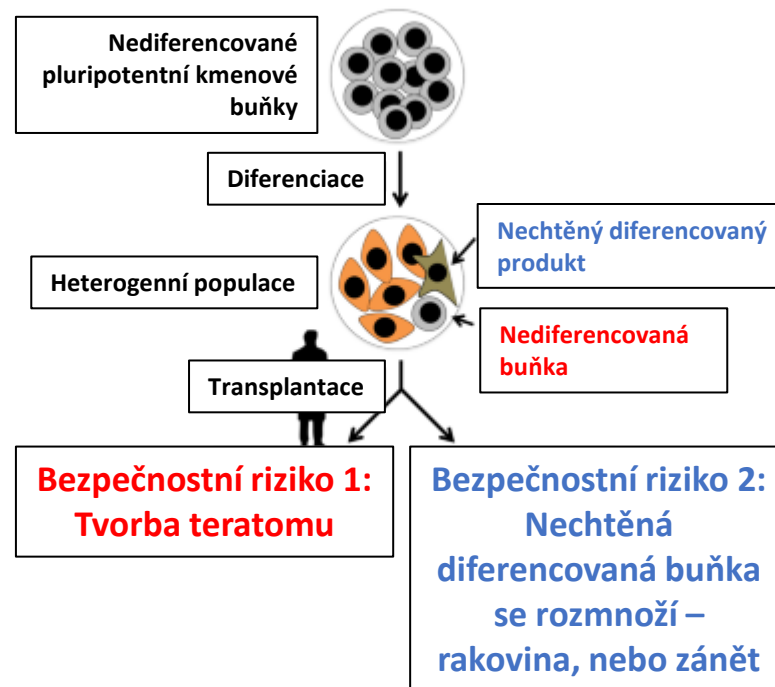
1. **Tvorba teratomů a teratokarcinomů z kontaminace pluripotentními buňkami**
2. **Množení nechtěných typů diferencovaných buněk – nebezpečí nádoru, nebo zánětu**



WHO (World Health Organization)

EMA (European Medical Agency)

SUKL (Státní Ústav pro Kontrolu Léčiv)



Nutné prokázat, že preparát neobsahuje více, než 1 pluripotentní buňku na 1 000 000 buněk..

Technologie ke zvýšení bezpečnosti transplantace produktů z pluripotentních kmenových buněk

Bezpečnostní rizika transplantace produktů z kmenových buněk:

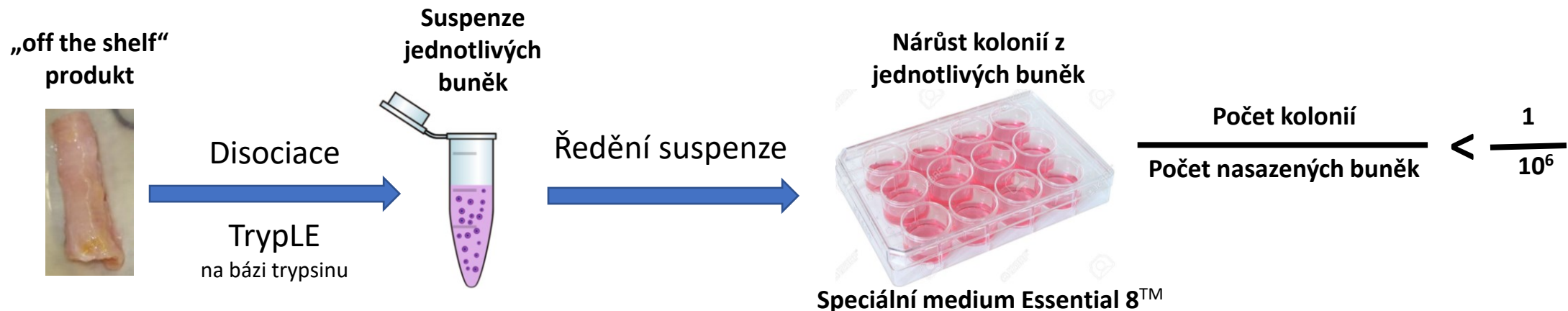
1. **Tvorba teratomů a teratokarcinomů z kontaminace pluripotentními buňkami**
2. **Množení nechtěných typů diferencovaných buněk – nebezpečí nádoru, nebo zánětu**

MEASURE (Japonská obdoba WHO)
(Multisite Evaluation Study on Analytical Methods for Non-Clinical Safety Assessment of Human-Derived Regenerative Medical Products)

Standardizace léčebných přípravků na bázi kmenových buněk:

1:1 000 000 s pomocí HEC analýzy

HEC assay:



Nutné prokázat, že preparát neobsahuje více, než 1 pluripotentní buňku na 1 000 000 buněk..

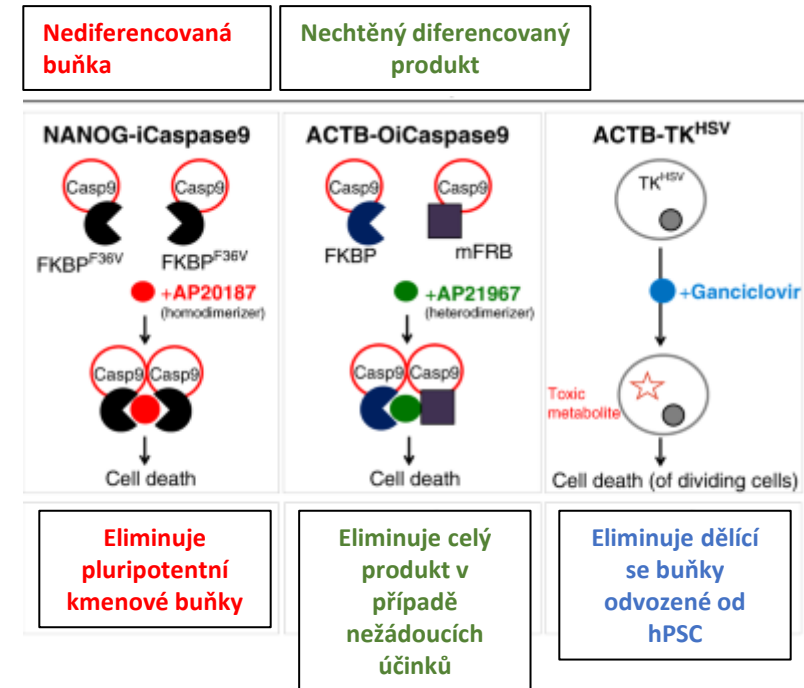
Technologie ke zvýšení bezpečnosti transplantace produktů z pluripotentních kmenových buněk

Bezpečnostní rizika transplantace produktů z kmenových buněk:

1. **Tvorba teratomů a teratokarcinomů z kontaminace pluripotentními buňkami**
2. **Množení nechtěných typů diferencovaných buněk – nebezpečí nádoru, nebo zánětu**

Editace genomu pluripotentních kmenových buněk –

- i) **Vložení genu kaspázy pod promotor NANOGu (NANOG je pluripotenční transkripční faktor)**
- ii) **Vložení dimerizačních sekvencí v přítomnosti speciální molekuly do genu kaspázy 9 – indukuje apoptózu**
- iii) **Vložení genu pro metabolizaci Gancicloviru – toxický produkt pro dělící se buňky**



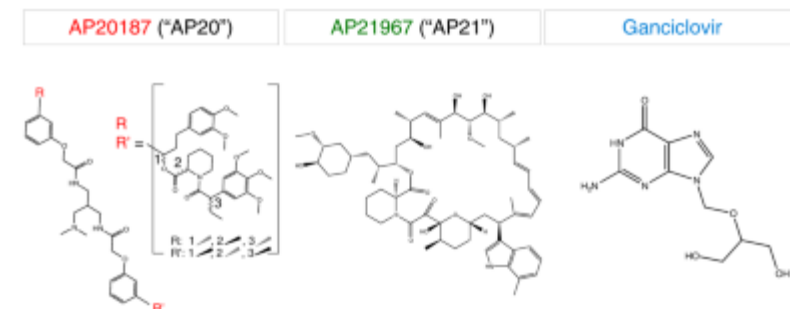
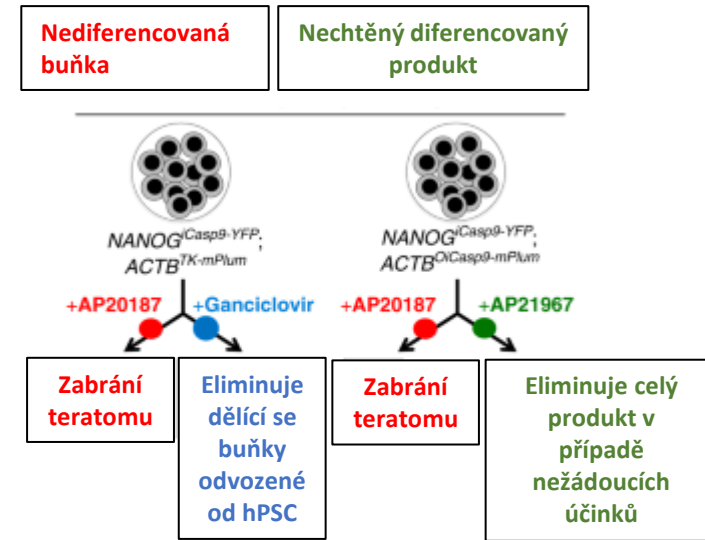
Technologie ke zvýšení bezpečnosti transplantace produktů z pluripotentních kmenových buněk

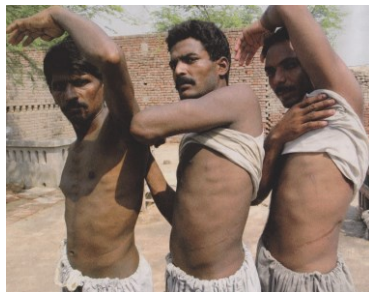
Bezpečnostní rizika transplantace produktů z kmenových buněk:

1. **Tvorba teratomů a teratokarcinomů z kontaminace pluripotentními buňkami**
2. **Množení nechtěných typů diferencovaných buněk – nebezpečí nádoru, nebo zánětu**

Editace genomu pluripotentních kmenových buněk –

- i) **Vložení genu kaspázy pod promotor NANOGu (NANOG je pluripotenční transkripční faktor)**
- ii) **Vložení dimerizačních sekvencí v přítomnosti speciální molekuly do genu kaspázy 9 – indukuje apoptózu**
- iii) **Vložení genu pro metabolizaci Gancicloviru – toxický produkt pro dělicí se buňky**





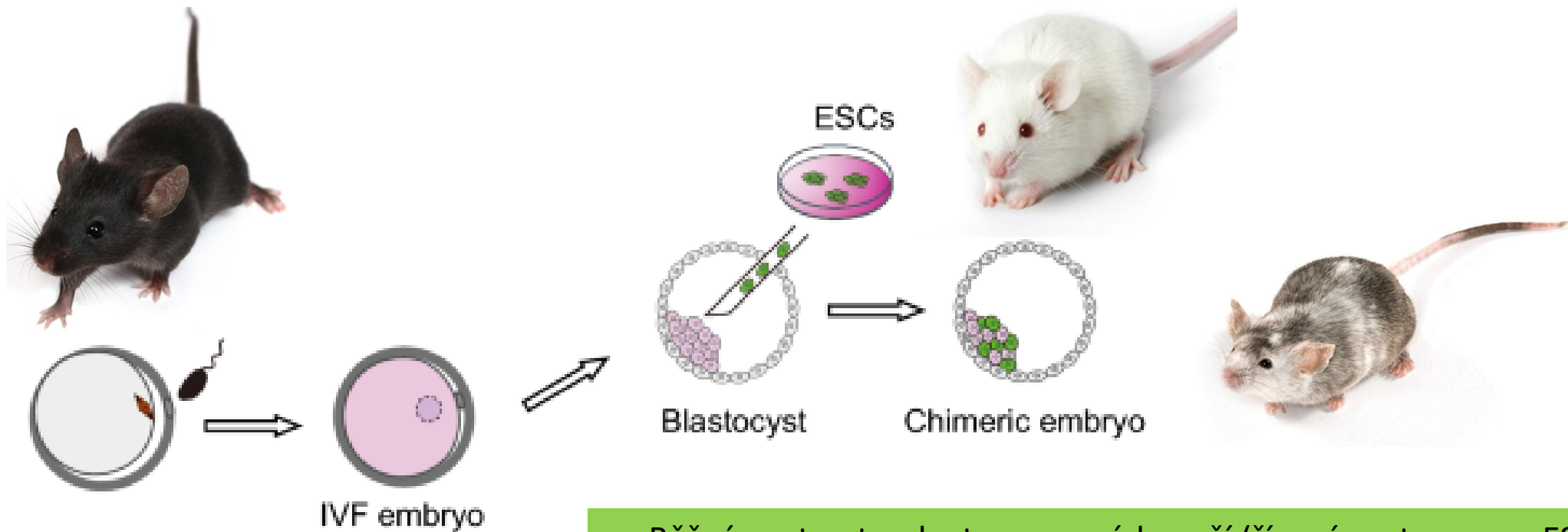
Nad organoidem je už jen celý orgán.. můžeme ho vytvořit?

..aneb je libo jedno kontroverzní téma na závěr..?

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)

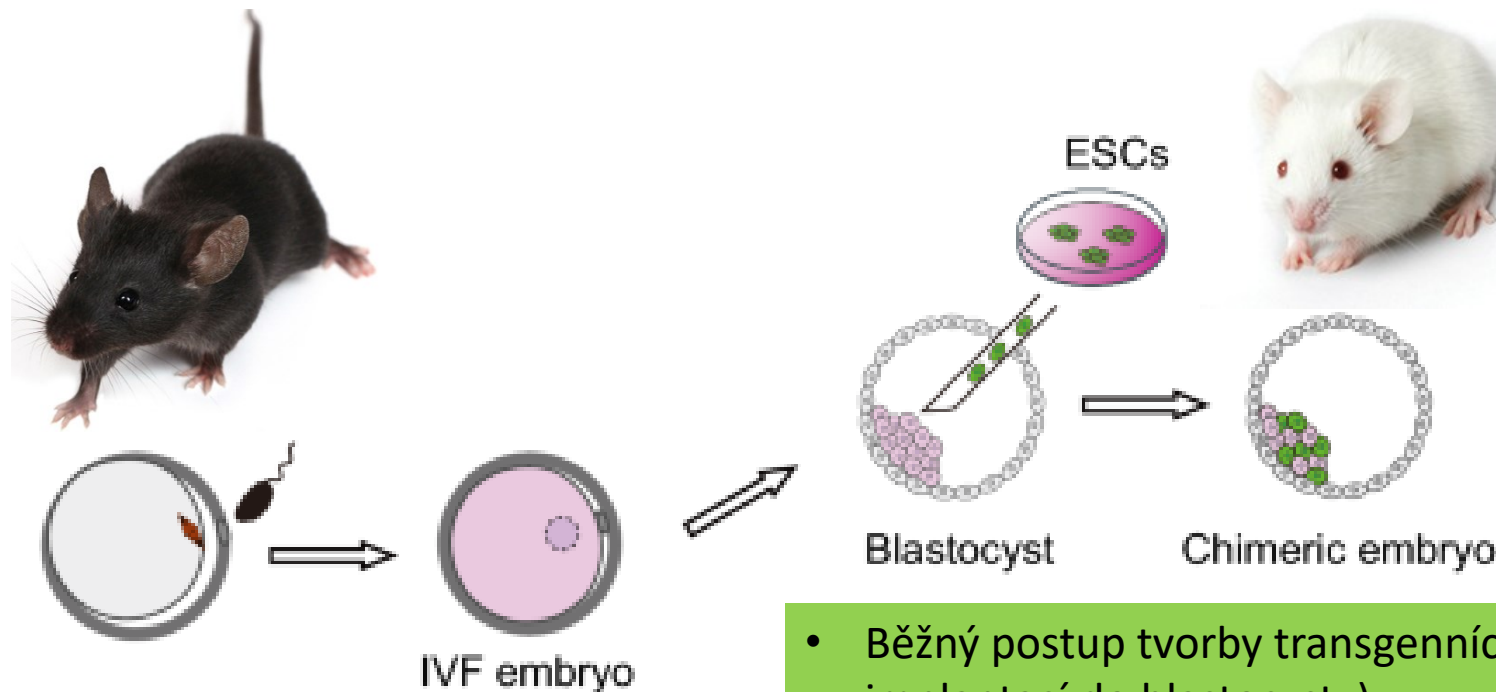


- Běžný postup tvorby transgenních myší (řízená mutageneze ES před implantací do blastocysty)

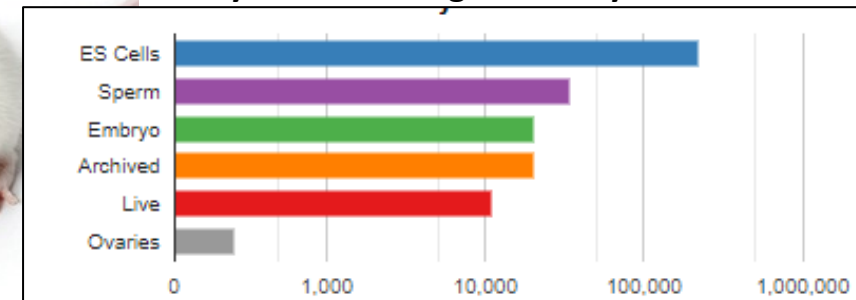
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)



Sbírky kmenů transgenních myší IMSR

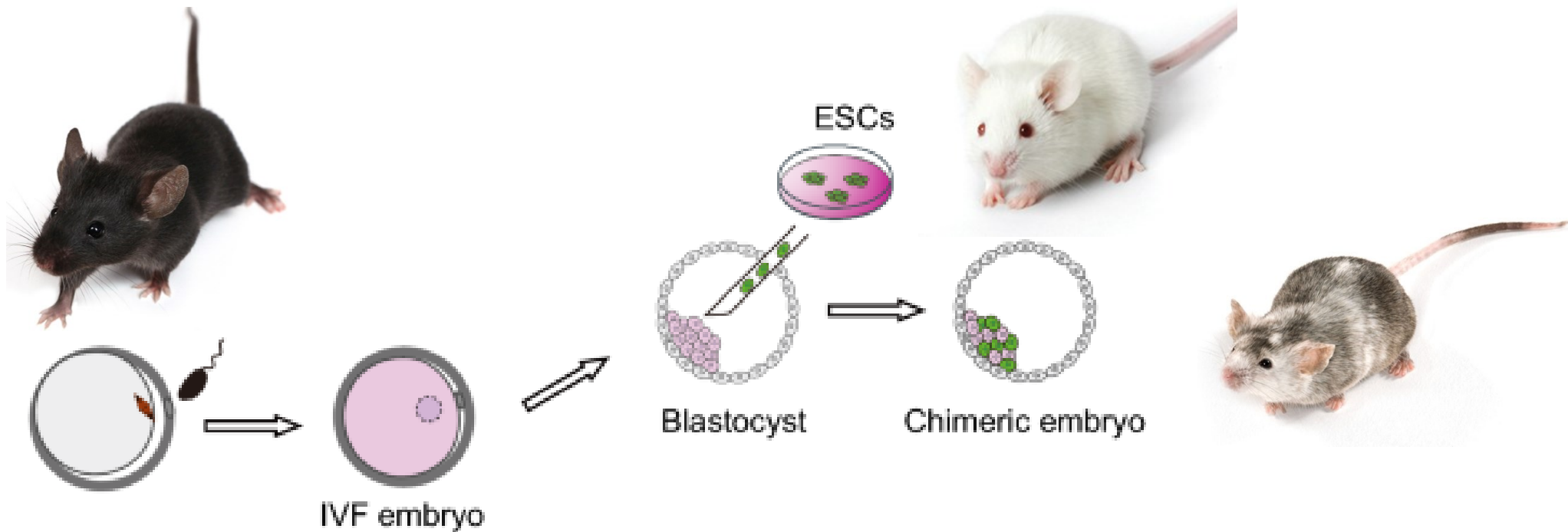


- Běžný postup tvorby transgenních myší (řízená mutageneze ES před implantací do blastocysty)
- Přes 100 tis kmenů transgenních myší po světě

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)



Bavíme se o myších, co takhle mezidruhové chiméry...?

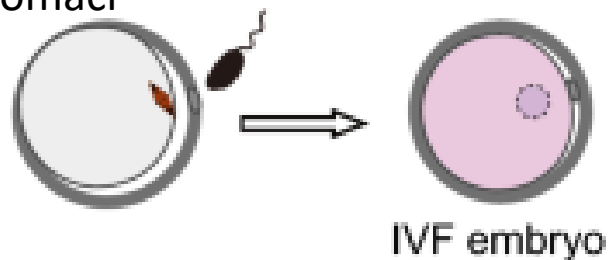
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

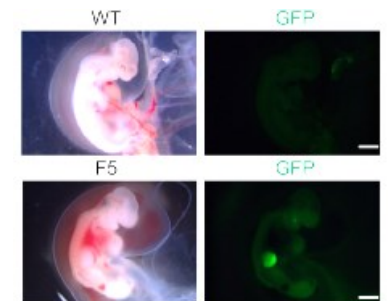
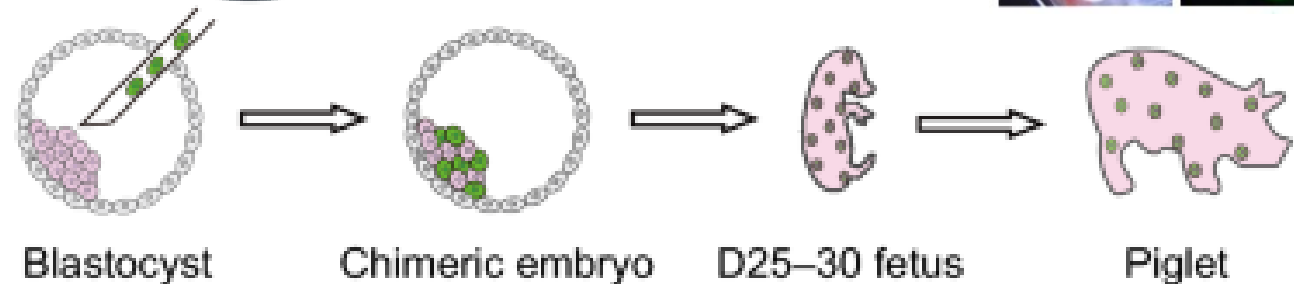
- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)



Prase domácí



Makak jávský - buňky označené **zeleným fluorescenčním proteinem (GFP)**



- 2 narozené chiméry.
- Opičí buňky v srdci, játrech, slzině, plicích a kůži, ale jide ne..

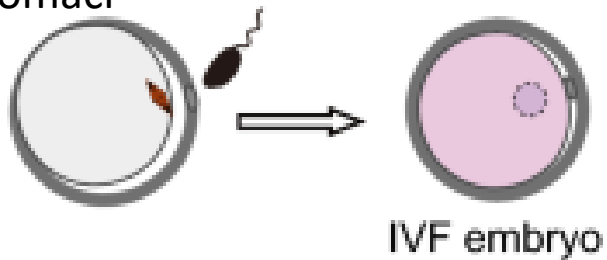
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérodních embryí

Tvorba chimér:

- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)



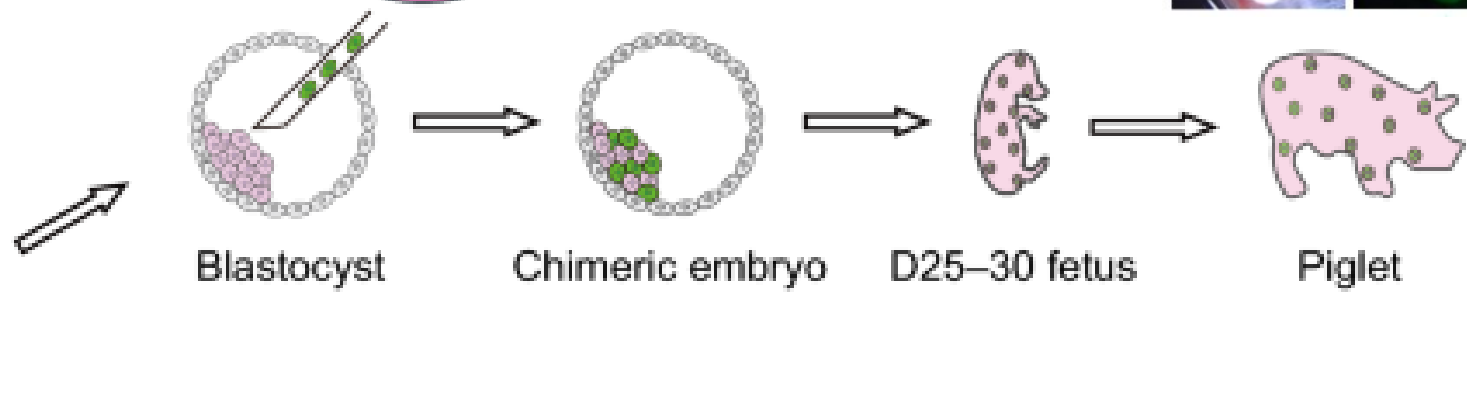
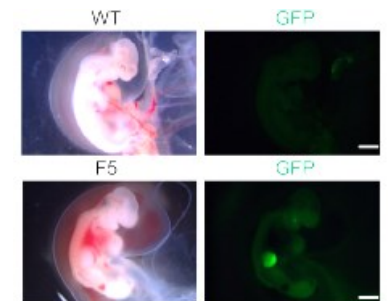
Prase domácí



Makak jávský - buňky označené zeleným fluorescenčním proteinem (GFP)



ESCs



Ale my chceme chiméry s plně vyvinutými orgány jednoho druhu..

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)

Komplementace blastocysty:

MYŠ



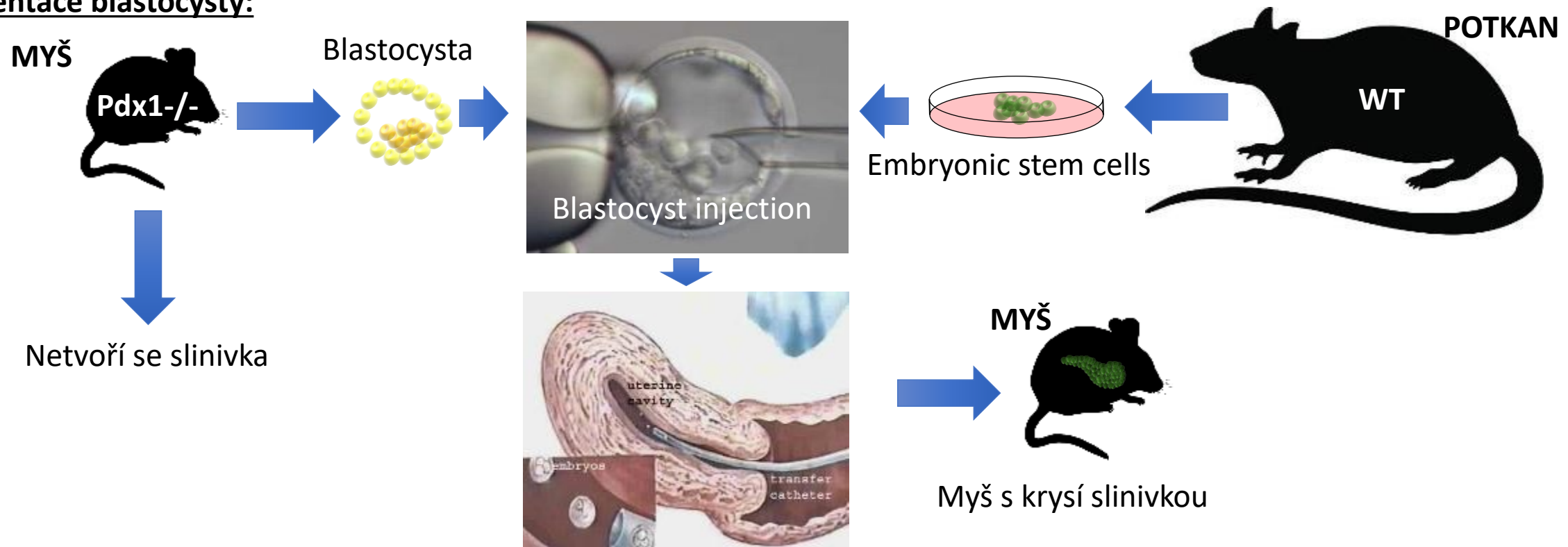
Netvoří se slinivka

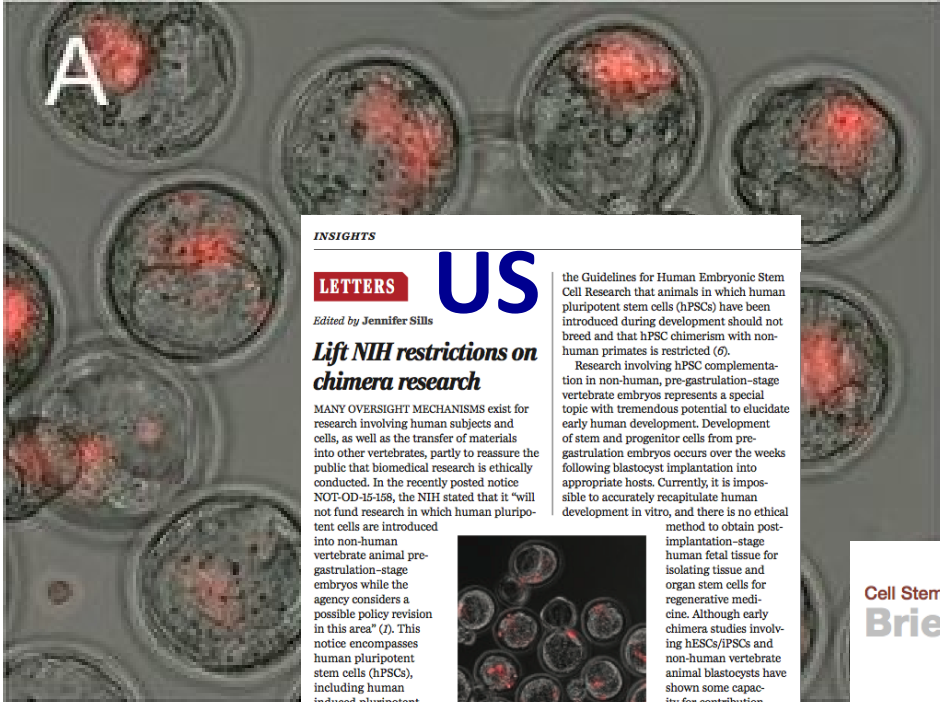
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)

Komplementace blastocysty:





INSIGHTS

LETTERS **US**

Edited by Jennifer Sills

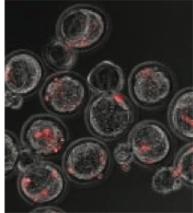
Lift NIH restrictions on chimera research

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

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 hPSC 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 chimerism 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. Pedersen¹

¹The 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>).



Mezidruhové chiméry pro výzkum a transplantační medicínu

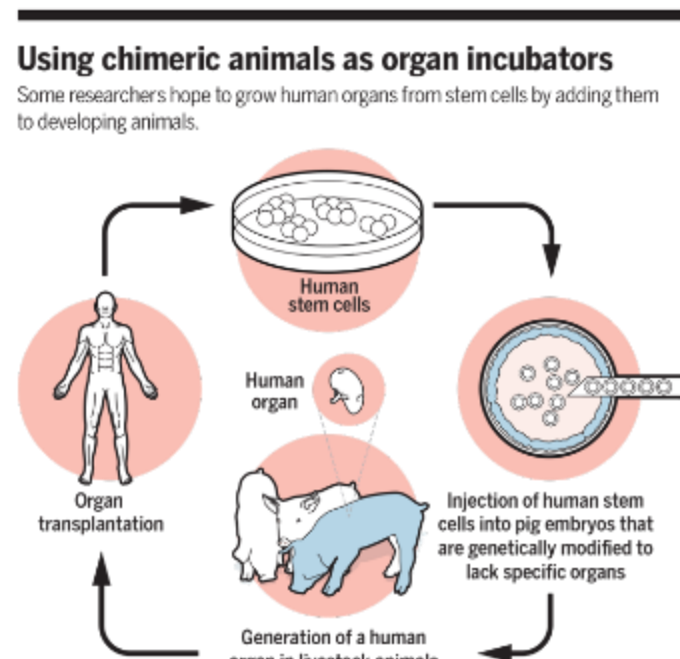
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)



Juan Carlos Izpisua Belmonte



Human – Pig Chimera



[Methods Mol Biol.](#) 2019;2005:101-124.

Korektní vývoj chimér 28 dní (převážné prsecí embrya s lidským podílem 1/10 000 buněk)

Lze v ČR aplikovat zmíněné biotechnologické postupy zahrnující chimerní embrya?

Právní ochrana embrya a plodu.. ..před biotechnologiemi

(lékařský slovník: Od početí až po 9. týden se jedná o embryo, po 9. týdnu až po narození o plod)

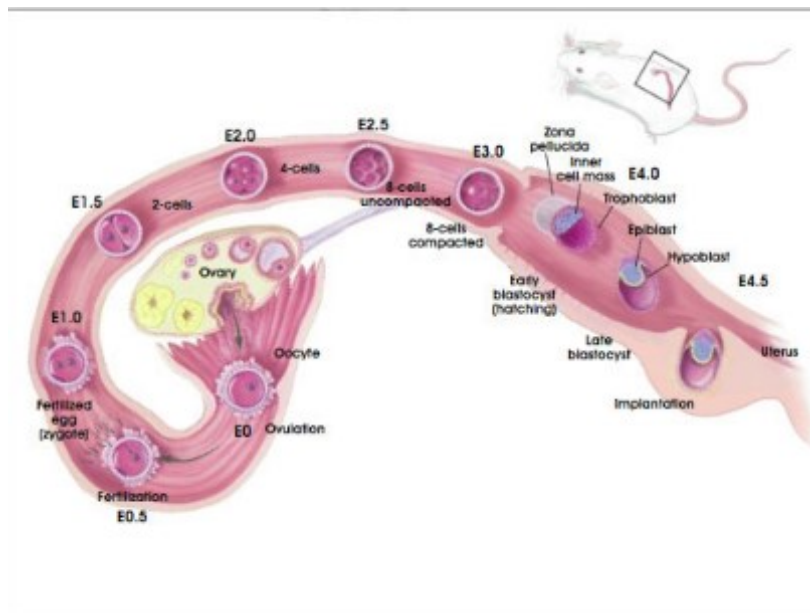
DO 12. TÝDNE: Zničení embrya nebo usmrcení plodu není protiprávní, pokud je provedeno dle:

„Interrupčního zákona“ - zákona č. 66/1986 Sb.

nebo

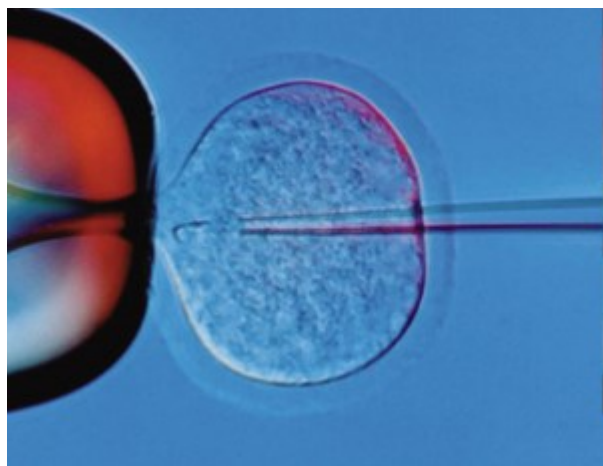
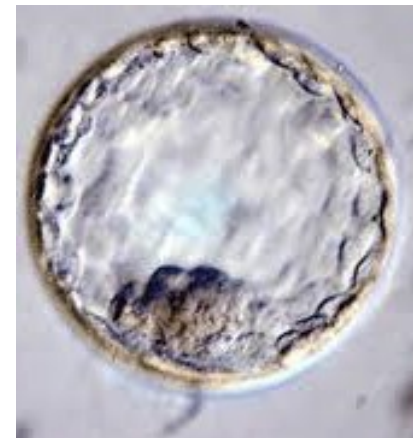
zákona č. 227/2006 Sb (..o kmenových buňkách)

Korektní vývoj chimér 28 dní (převážné prsečí embrya s lidským podílem 1/10 000 buněk)



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

„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.

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

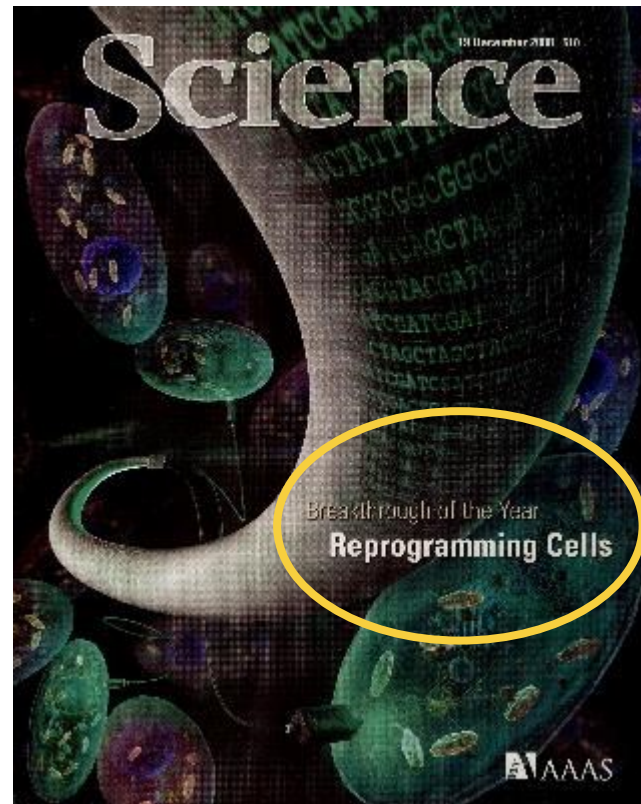
Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

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



Shinya Yamanaka
Kyoto University

Albert Lasker basic medical research award 2009



John Gurdon
University of Cambridge

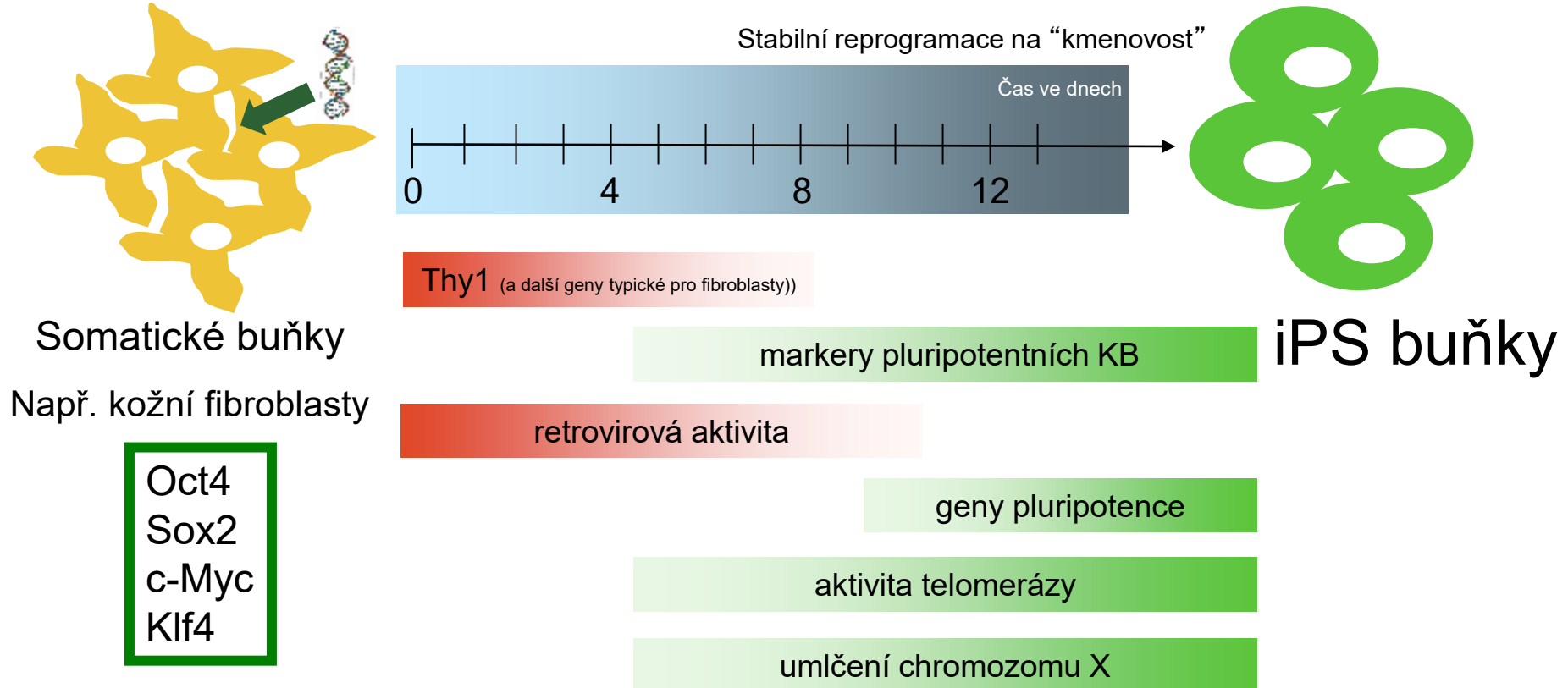


Indukované pluripotentní KB (Yamanaka 2006)

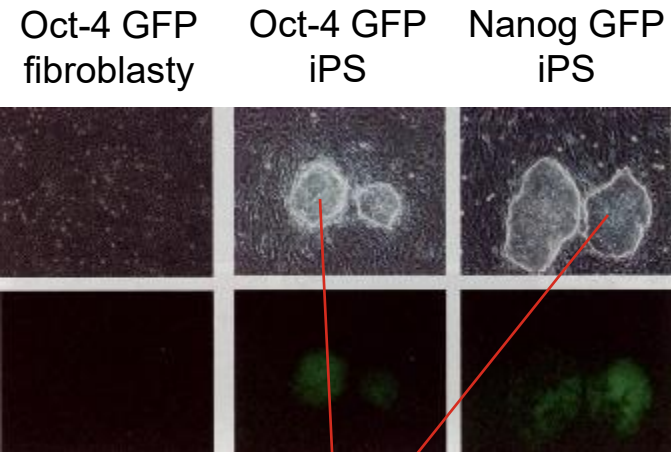
Alternativní zdroj pluripotence - **Indukované pluripotentní KB (iPS cells)**

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

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



iPS jsou schopny vytvořit chimérní organizmus



Injekce chiméry
(bílá a hnědá srst)



Nanog GFP iPS chiméra



Oct-4 GFP iPS chiméra

LIDSKÉ INDUKOVANÉ PLURIPOTENTNÍ KMENOVÉ BUŇKY

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

Zákon upravuje použití iPS pouze jako GMO..

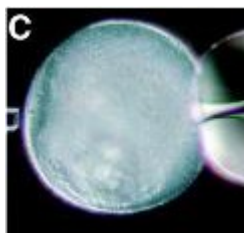
Etický problém s hiPSC?

Zárodečné buňky z pluripotentních

Diferenciace do PGC

Spermatocyt

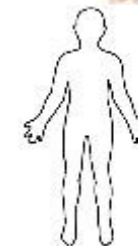
Oocyt



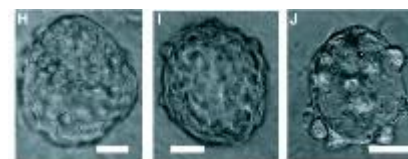
Mezidruhová Chiméra

Partenogeneze

IVF



Preimplantační embryo



Zákon 78/2004 Sb

Zákon č. 78/2004 Sb., o nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty, ve znění pozdějších předpisů

§ 22 odst 1) Ministerstvo vede registr geneticky modifikovaných organismů..

§ 35a odst 12) Za přešupek lze uložit pokutu do

a) 5 000 000 Kč, jde-li o přešupek podle odstavce 1 písm. b), c) nebo f),

Vyhláška č. 209/2004 Sb., o bližších podmínkách nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty



Děkuji za pozornost..

Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz



Děkuji za pozornost..

Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz

Někdo ke mně na PhD?...