

Biotechnologické procesy

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

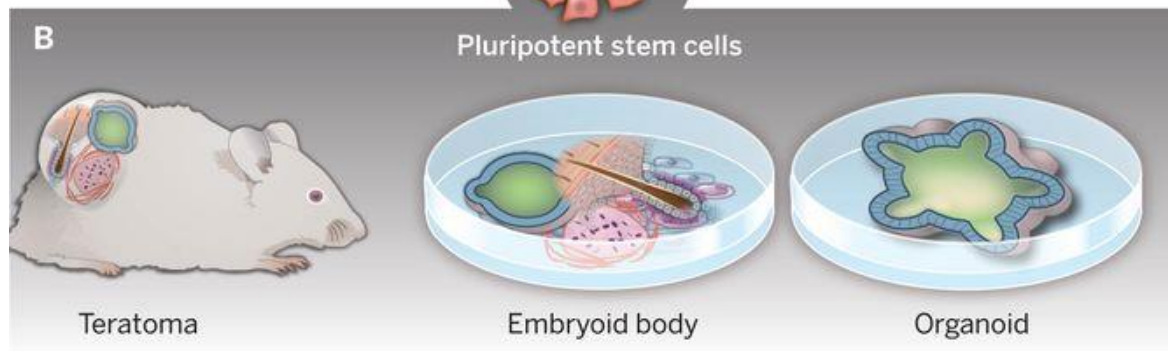
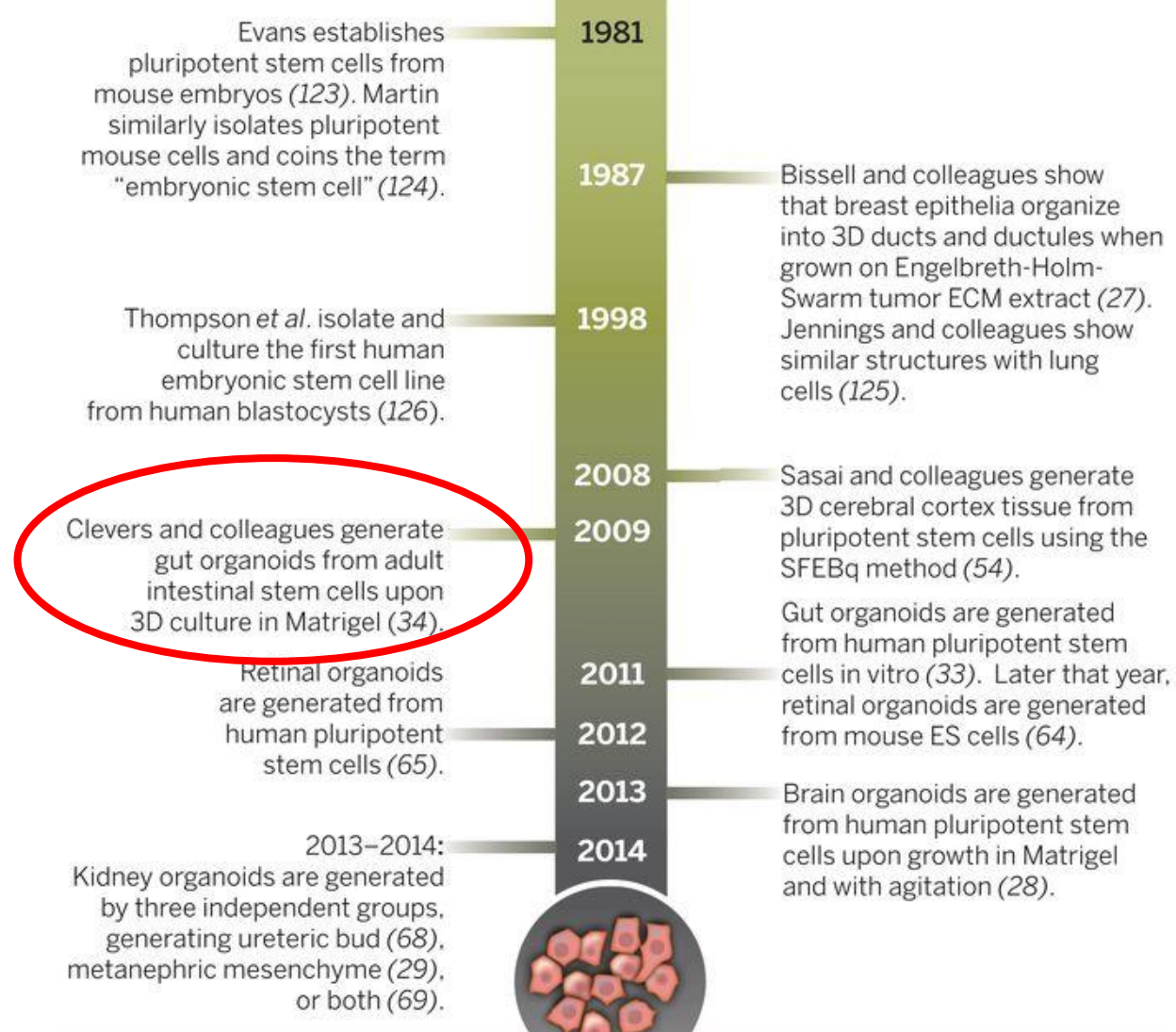
Blok III.

Vladimír Rotrekl @ 2020

Biotechnologické procesy: Živočišné tkáňové kultury a kmenové buňky:

Sylabus

- 1) Úvod do živočišných buněk a jejich specifík, potence a diferenciací, Hayflickuv limit, imortalizované linie, kultivace a jejich diferenciací (včetně large scale, GMP a industry grade)
- 2) Použití živočišných buněk k výrobě léčiv, použití živočišných, potažmo kmenových buněk ve screeningu a výrobě léčiv, využití živočišných kultur v toxikologii
- 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)



Stále tady mluví o organoidech!

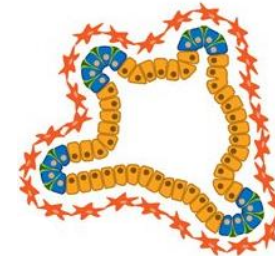
...nechtěl by už třeba vysvětlit, co to ten organoid je?

Co nazýváme organiodem

- **3D struktura odvozená z kmenových buněk**
- Vykazuje schopnost „samorganizace“ na základě stejných principů, jako modelovaný orgán
- Obsahuje více buněčných typů (stejných jako modelovaný orgán)
- Struktura získá a uchovává (alespoň některé) specializované funkce modelovaného orgánu



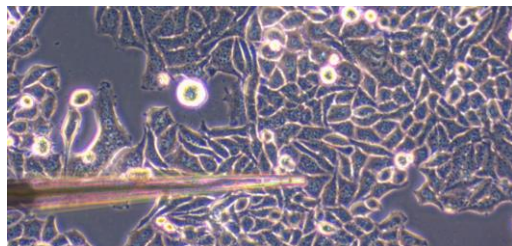
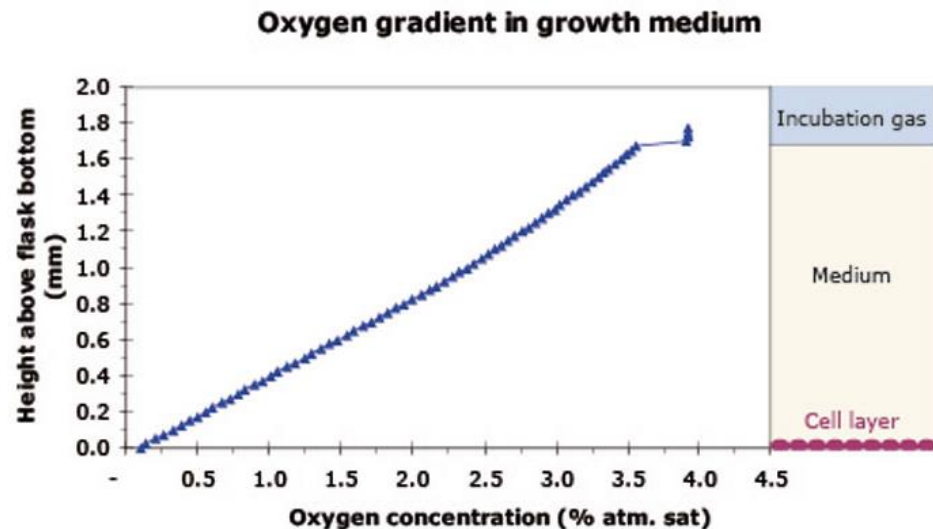
(Směs buněk obsahující)
Kmenové buňky



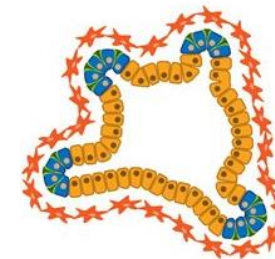
Organoidy

Co nazýváme organiodem

- 3D struktura odvozená z kmenových buněk
- Vykazuje schopnost „samorganizace“ na základě stejných principů, jako modelovaný orgán
- Obsahuje více buněčných typů (stejných jako modelovaný orgán)
- Struktura získá a uchovává (alespoň některé) specializované funkce modelovaného orgánu



Zdroj: Unisense

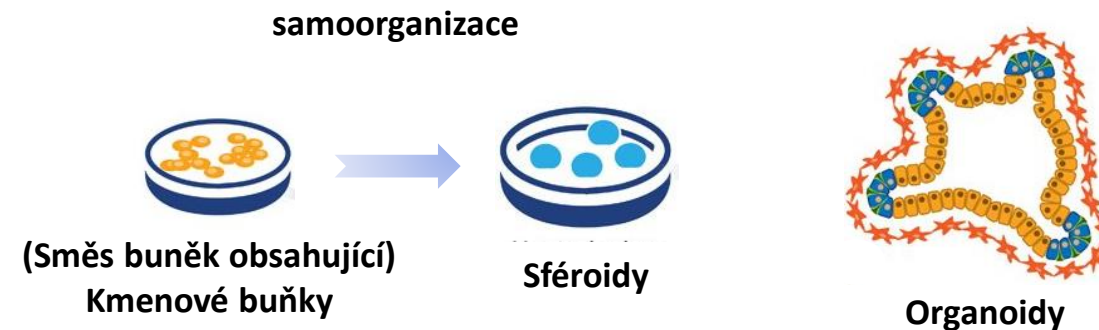


Organoidy

Velikost organoidů je omezena difuzí kyslíku
~ desetiny až jednotky milimetrů

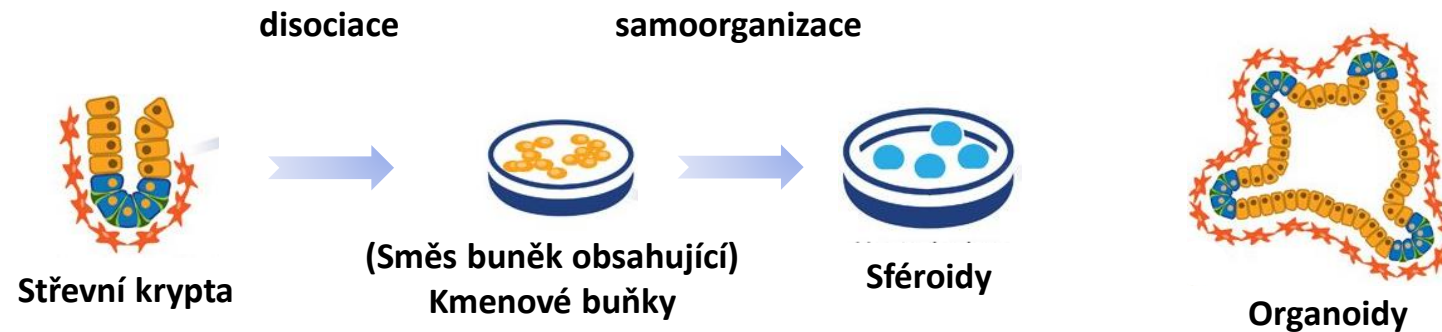
Co nazýváme organiodem

- 3D struktura odvozená z kmenových buněk
- **Vykazuje schopnost „samoorganizace“ na základě stejných principů, jako modelovaný orgán**
- Obsahuje více buněčných typů (stejných jako modelovaný orgán)
- Struktura získá a uchovává (alespoň některé) specializované funkce modelovaného orgánu



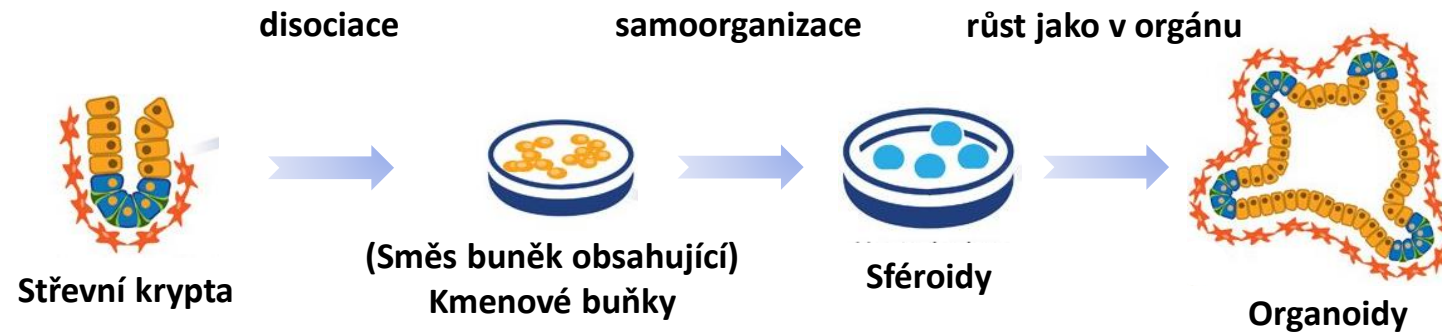
Co nazýváme organiodem

- 3D struktura odvozená z kmenových buněk
- Vykazuje schopnost „samoorganizace“ na základě stejných principů, jako modelovaný orgán
- **Obsahuje více buněčných typů (stejných jako modelovaný orgán)**
- Struktura získá a uchovává (alespoň některé) specializované funkce modelovaného orgánu



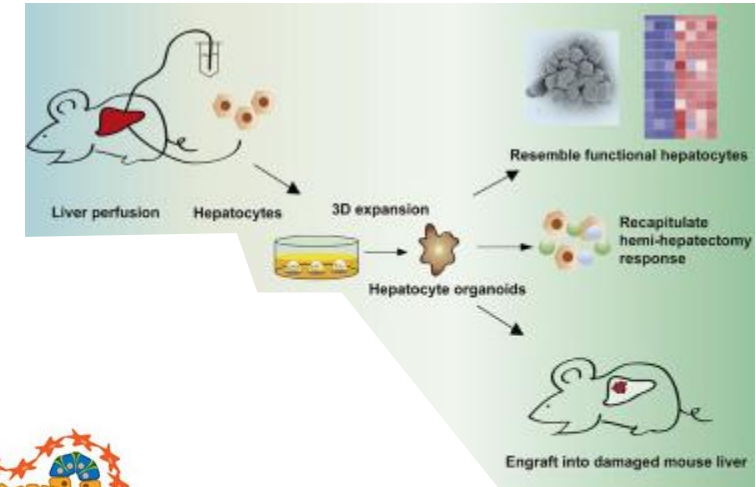
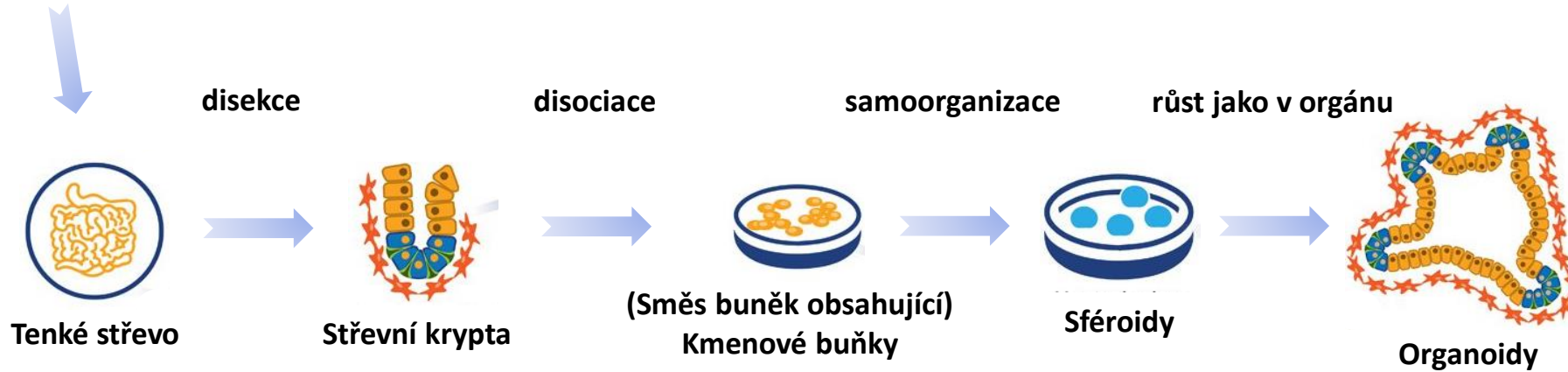
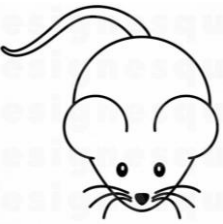
Co nazýváme organiodem

- 3D struktura odvozená z kmenových buněk
- Vykazuje schopnost „samoorganizace“ na základě stejných principů, jako modelovaný orgán
- Obsahuje více buněčných typů (stejných jako modelovaný orgán)
- **Struktura získá a uchovává (alespoň některé) specializované funkce modelovaného orgánu**



Výroba organiodů

- Ze směsi primárních buněk, obsahujících buňky kmenové (dospělé)
- Z pluripotentních kmenových buněk diferenciací
- Z rakovinných buněk odvozených z rakoviny modelovaného orgánu

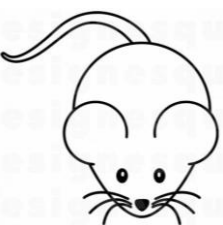


Hu, Cell, 2018

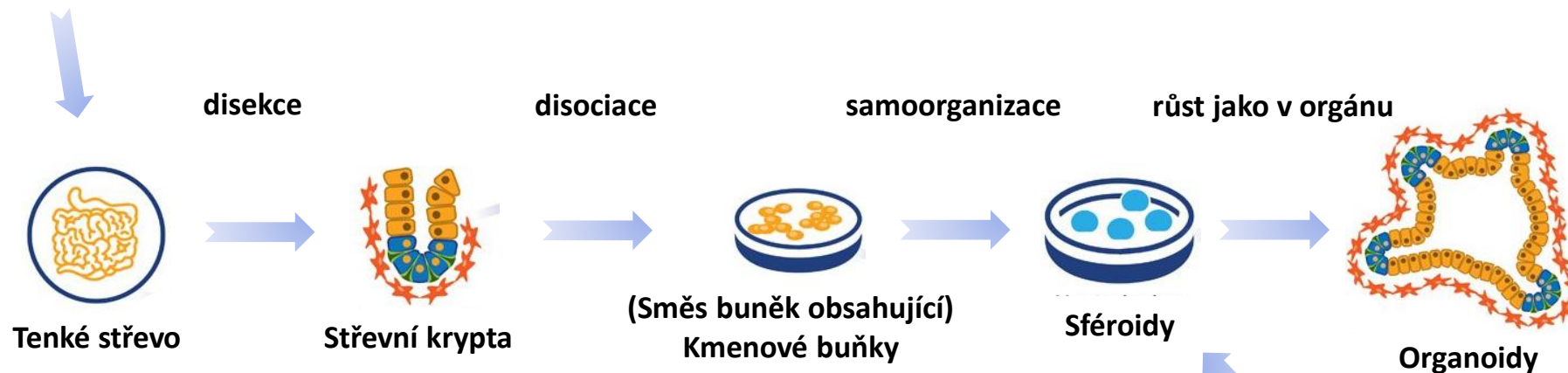
Omezené možnosti zisku explantátu z člověka – většinou zvířecí organoidy..

Výroba organiodů

- Jsme technologicky omezení, co dokážeme diferencovat z kmenových buněk *in vitro*..



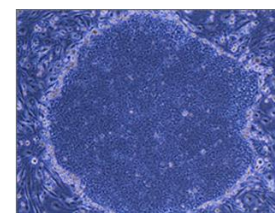
- Ze směsi primárních buněk, obsahujících buňky kmenové (dospělé)
- Z pluripotentních kmenových buněk diferenciací
- Z rakovinných buněk odvozených z rakoviny modelovaného orgánu



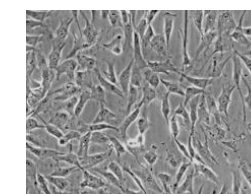
Biopsie např. kůže



Časná blastocysta



Pluripotentní kmenové buňky

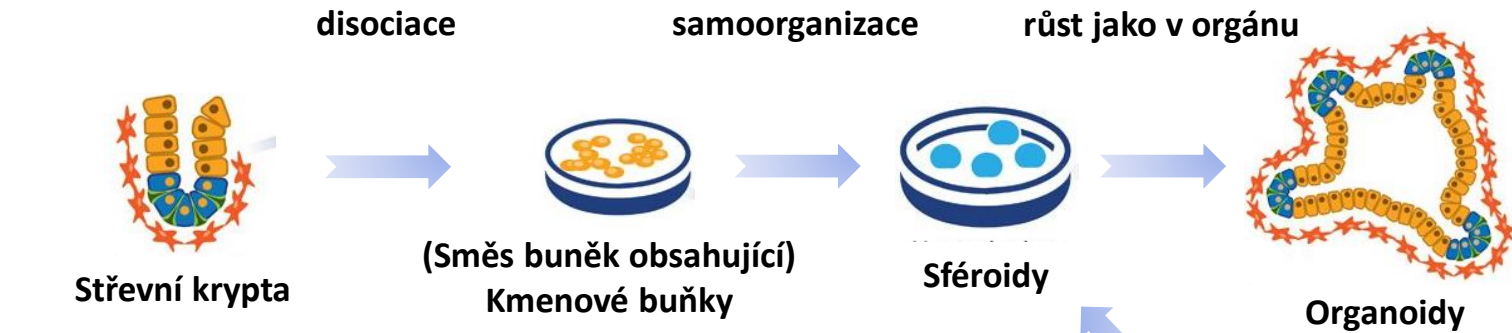
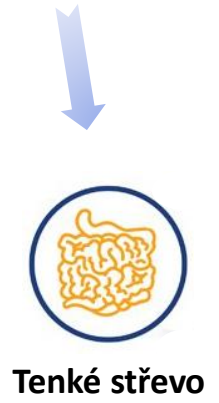
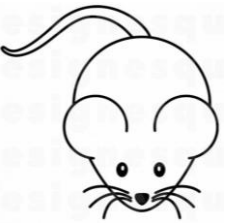


Primokultura fibroblastů

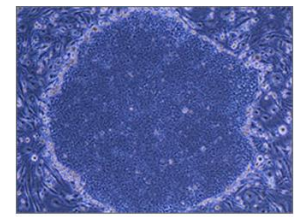


Výroba organoidů

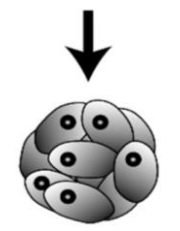
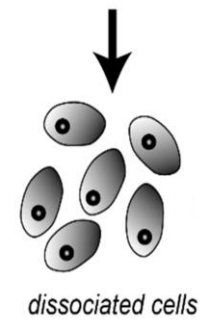
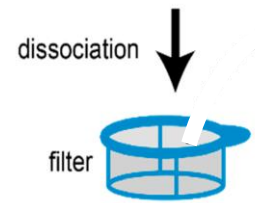
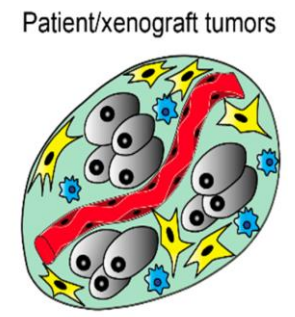
- Ze směsi primárních buněk, obsahujících buňky kmenové (dospělé)
- Z pluripotentních kmenových buněk diferenciací
- **Z rakovinných buněk odvozených z rakoviny modelovaného orgánu**



Střevní kryptakolorektální karcinom/adenom



Pluripotentní kmenové buňky



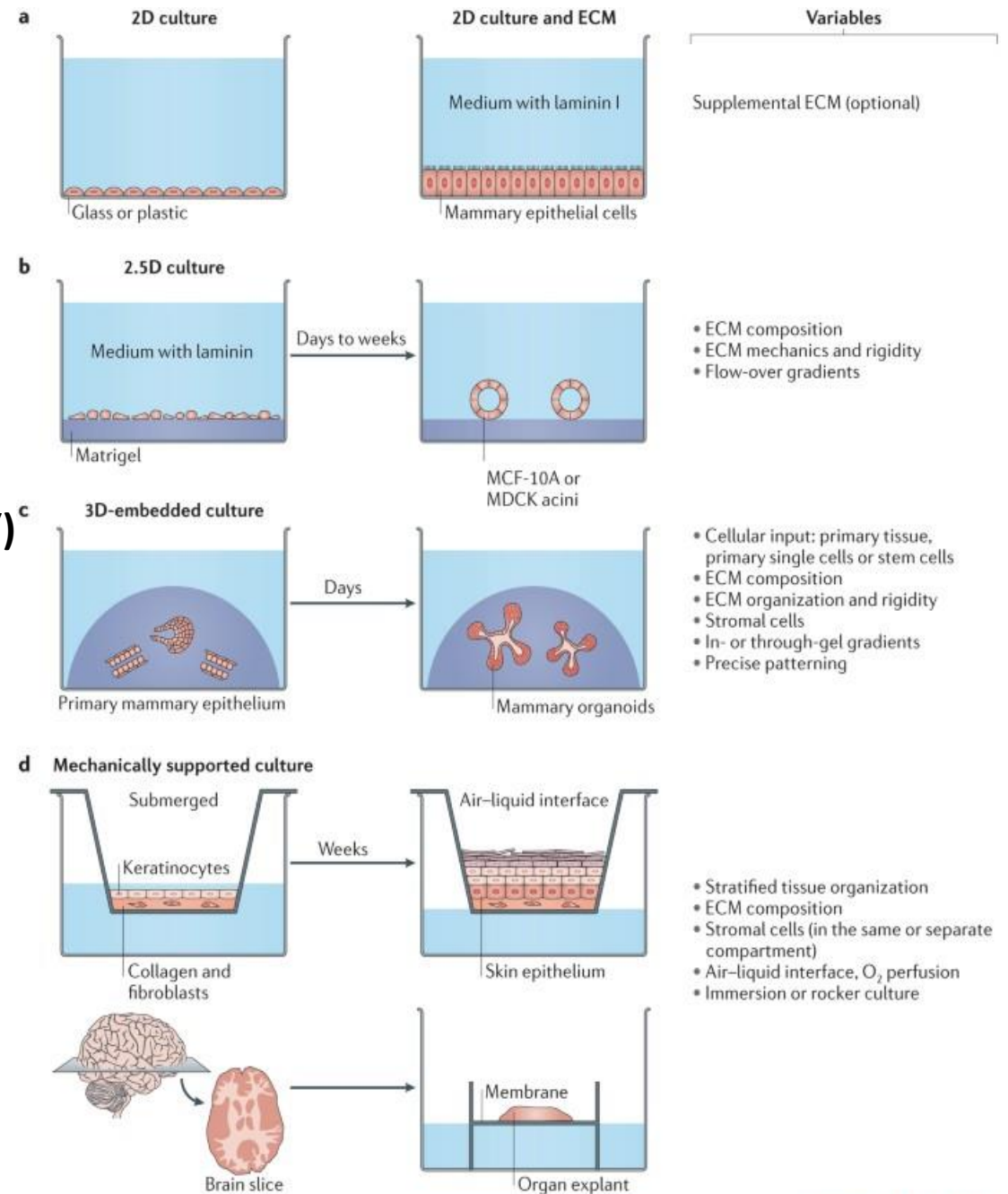
Adaptováno z Crownbio..

Co vše musíme vychytat, abychom vypěstovali organoid..

...technologie

Od 2D kultury k organoidům

- Vyrůstající množství buněčných kontaktů
- Vyrůstající potřeba okysličení
- Vyrůstající nároky na mikroprostředí („niche“)^c
- Vyrůstající komplexita kultury (kokultura)
- Vyrůstající komplexita řízení signálních drah



Faktory umožňující diferenciaci a tvorbu organoidů

Solubilní regulátory

- Hormony (glukagon, hydrokortison, tyroxin,...)
- Růstové faktory a cytokiny (TGF-transformující růstový faktor, FGF-fibroblastový růstový faktor, interleukiny, ...)
- Vitaminy (D, ...)
- Ionty (Ca^{++} , ...)
- Cukry (glu – zrání L-buněk)

Fyzické kontakty mezi buňkami (gap junctions)

Kontakt buněk s mezibuněčnou matrix (kolagen, laminin, ...)

Polarita a tvar buněk

Fyzikální parametry prostředí (teplota, tenze O_2 , ...)

Změny biochemismu a metabolické aktivity buněk – tím k určení osudu..

Jsou intracelulárně zpracovány regulačními/signálními dráhami a komplexními regulačními sítěmi zahrnujícími signální molekuly (proteiny) a expresi genetické informace

„Niche“ – klíčové faktory mikroprostředí

„niche“ faktory (aneb recyklace morfogenů)

R-spondin, WNT ligandy, Retinova kyselina, inhibitory GSK3 β a TGF- β

EGF, FGF, HGF, inhibitory HDAC

Noggin, Activin A, Gastrin, inhibitory p38

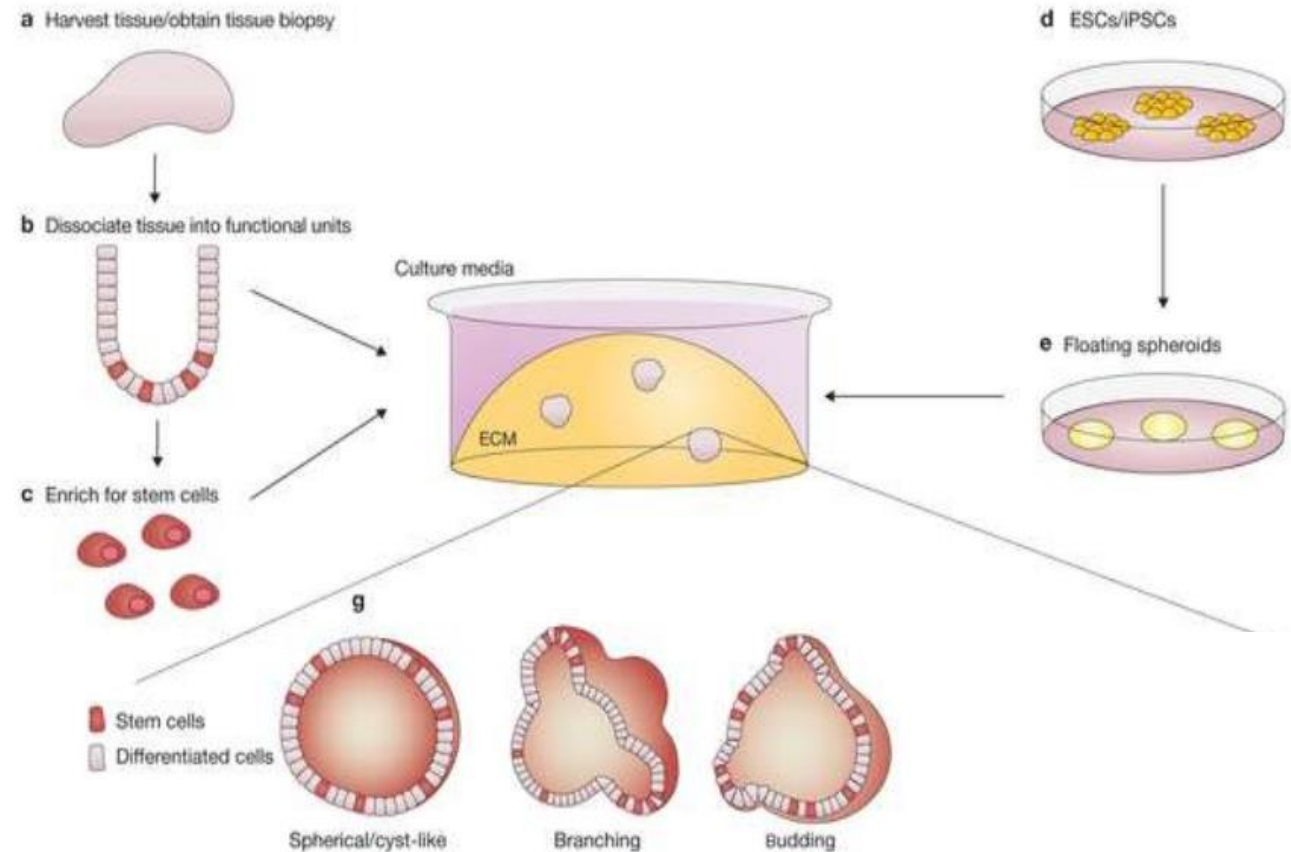
ECM faktory

Kolagen, Laminin, Entaktin, Fibronektin

Diferenční faktory

BMP, TGF- β , Inhibitory NOTCH, EGF

R-spondin, WNT, Noggin



„Niche“ – klíčové faktory mikroprostředí

„niche“ faktory (aneb recyklace morfogenů)

R-spondin, WNT ligandy, Retinova kyselina, inhibitory GSK3 β a TGF- β

EGF, FGF, HGF, inhibitory HDAC

Noggin, Activin A, Gastrin, inhibitory p38

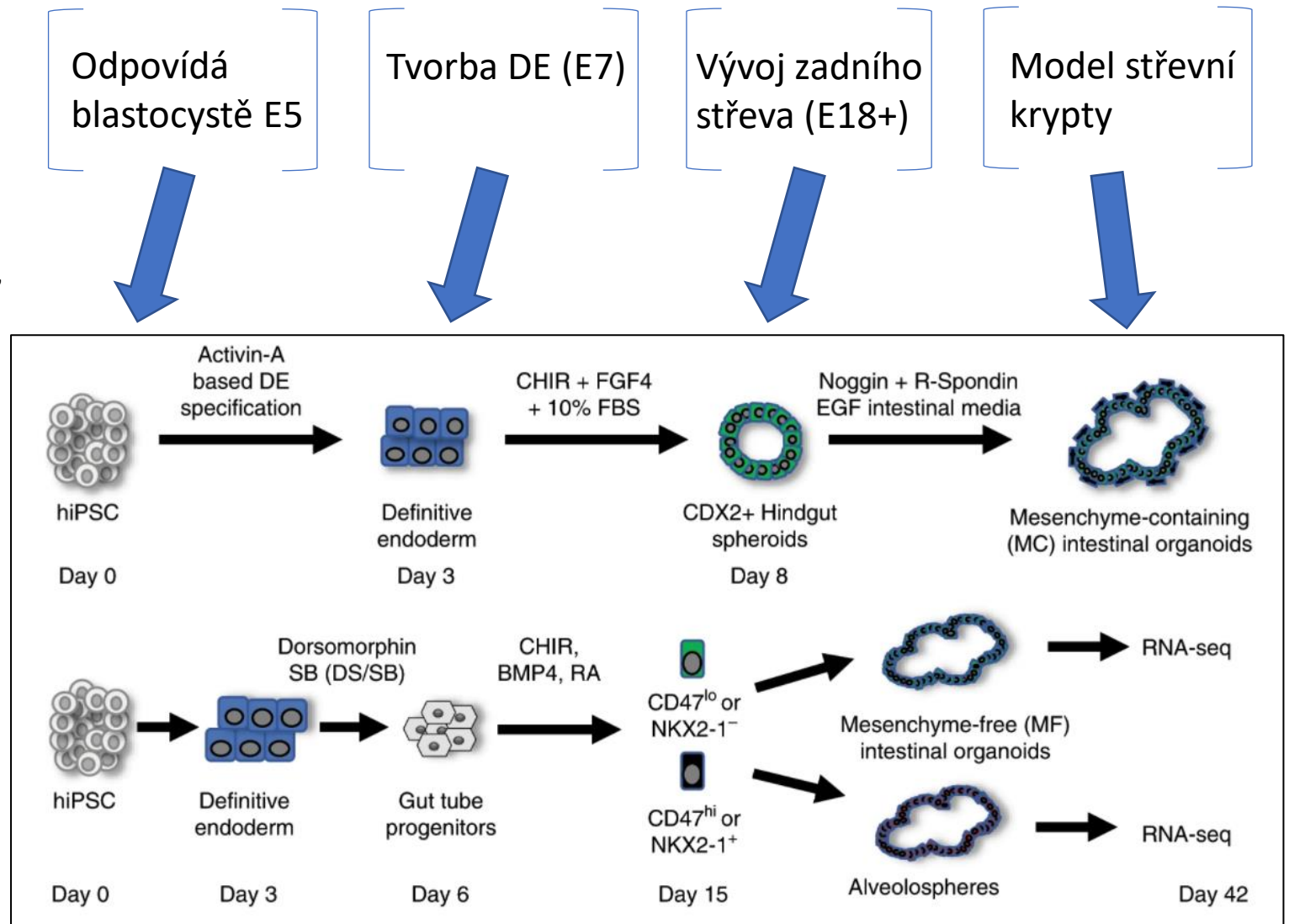
ECM faktory

Kolagen, Laminin, Entaktin, Fibronektin

Diferenciační faktory

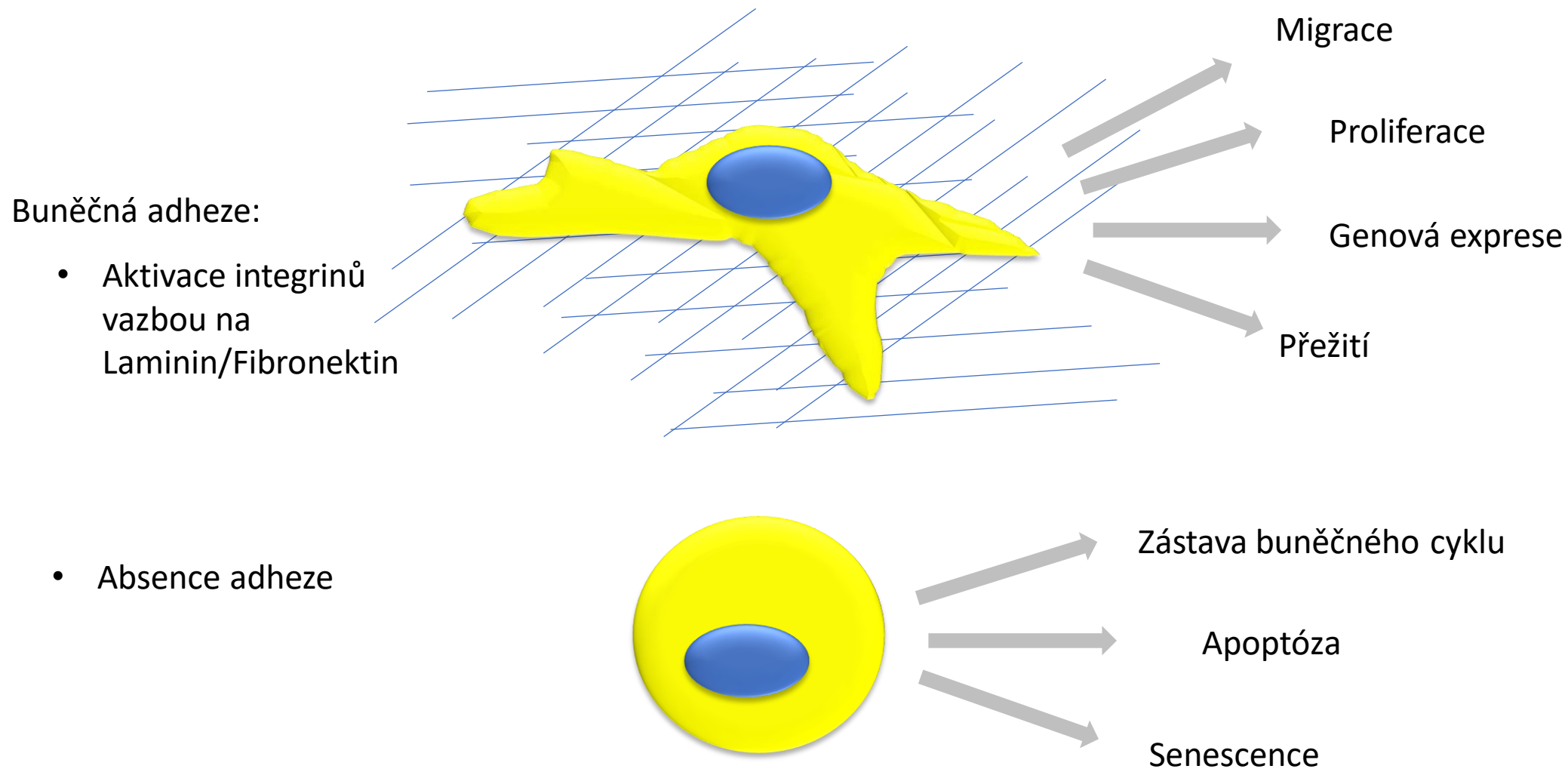
BMP, TGF-b, Inhibitory NOTCH, EGF

R-spondin, WNT, Noggin



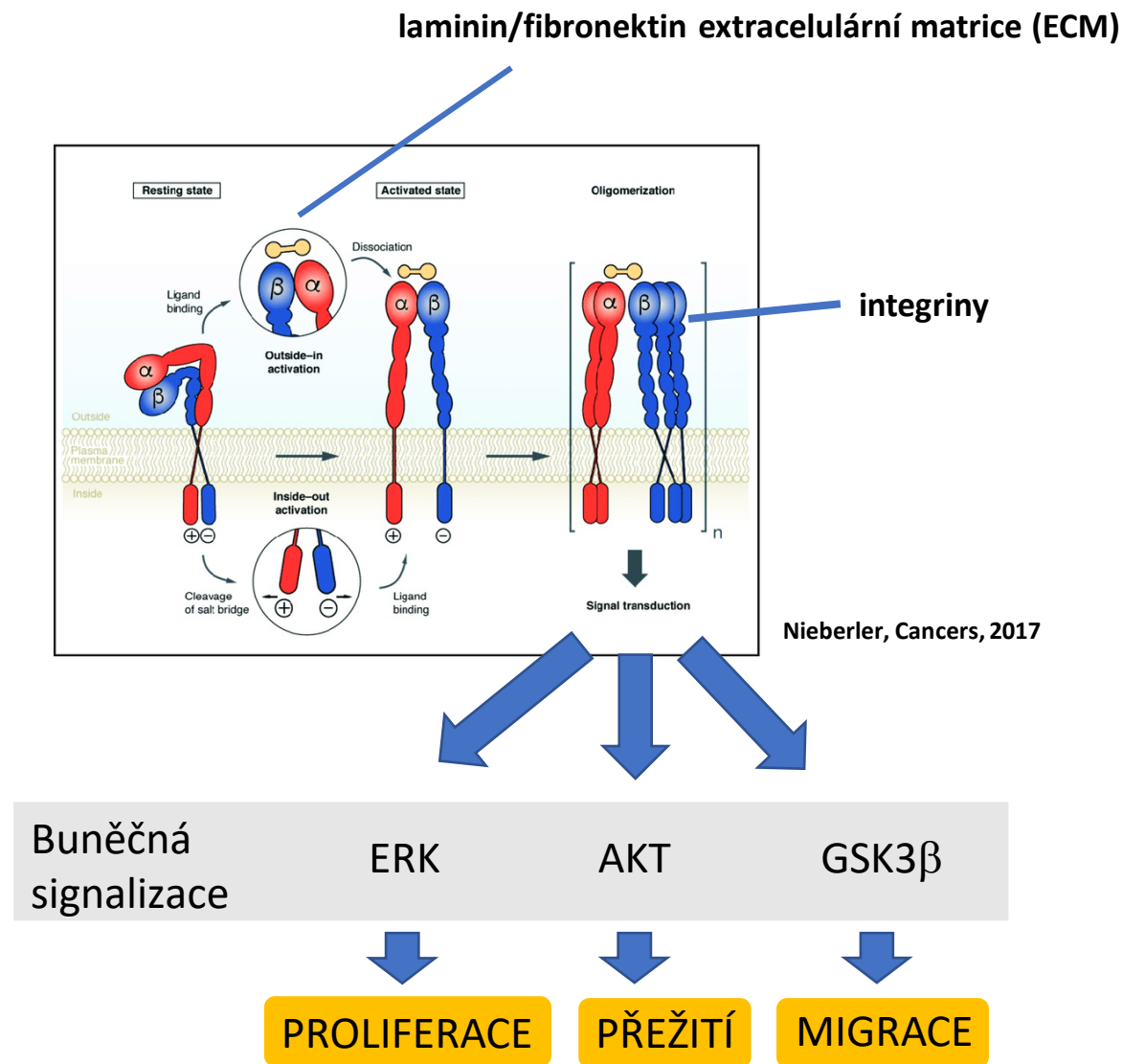
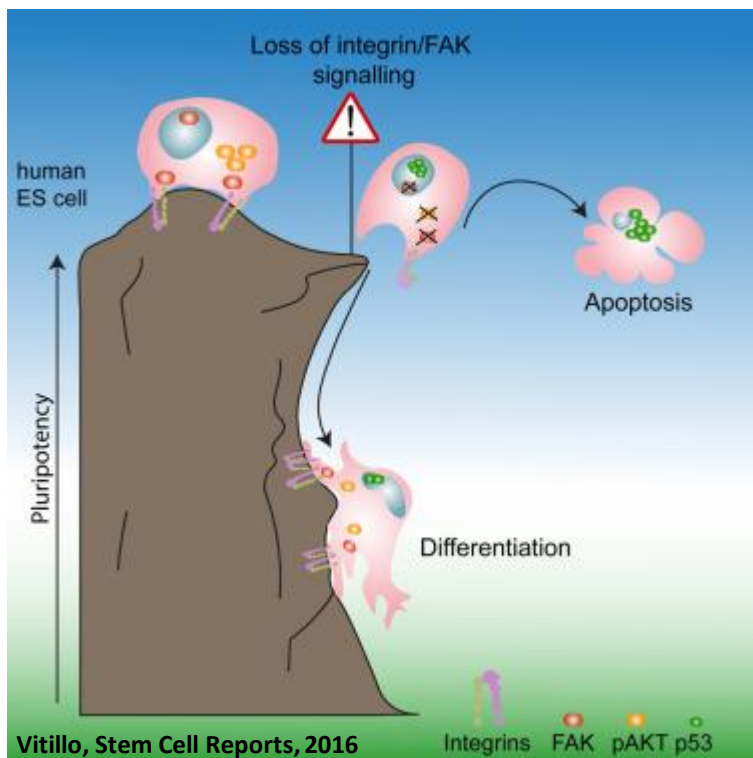
Faktory umožňující diferenciaci a tvorbu organoidů

Extracelulární matrice umožnila 3D kultivaci a diferenciaci



Faktory umožňující diferenciaci a tvorbu organoidů

Extracelulární matrice umožnila 3D kultivaci a diferenciaci

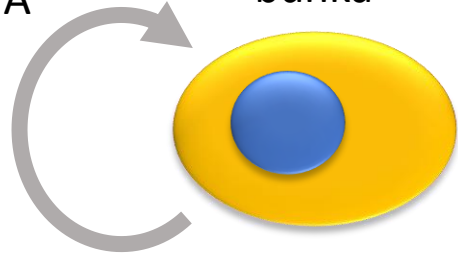


„Niche“ – klíčové faktory mikroprostředí

Faktory mikroprostředí kopírují mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje

Sebeobnova
Activin A
FGF

Kmenová
buňka



BMP4
WNT
Diferenciace

Autokrinní spolu s parakrinním signálováním a adhezí indukovaným signálem určuje osud buňky..
..(být či nebýt, sebeobnovovat se či diferencovat atd..)

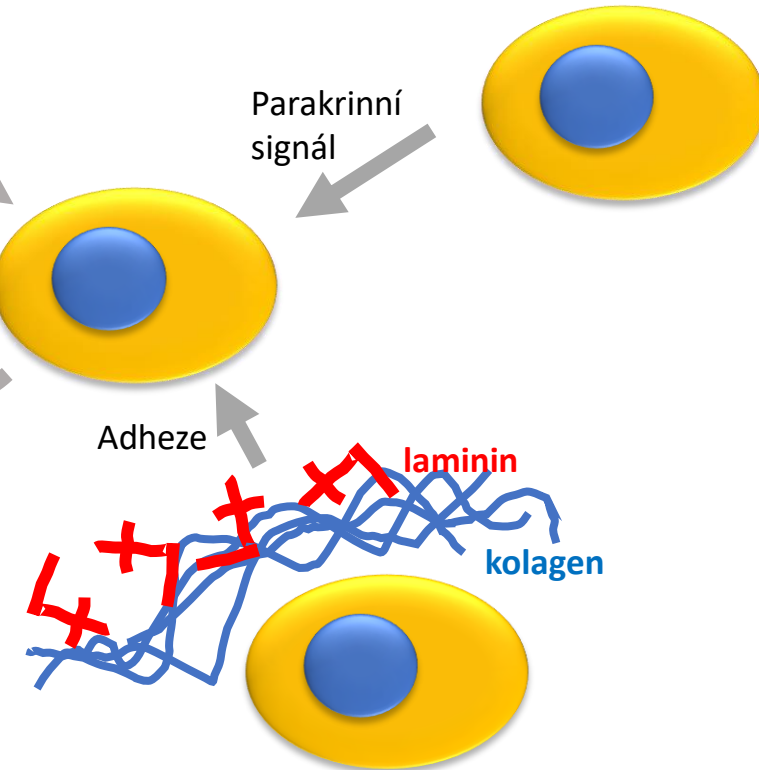
Autokrinní
signál

Parakrinní
signál

Adheze

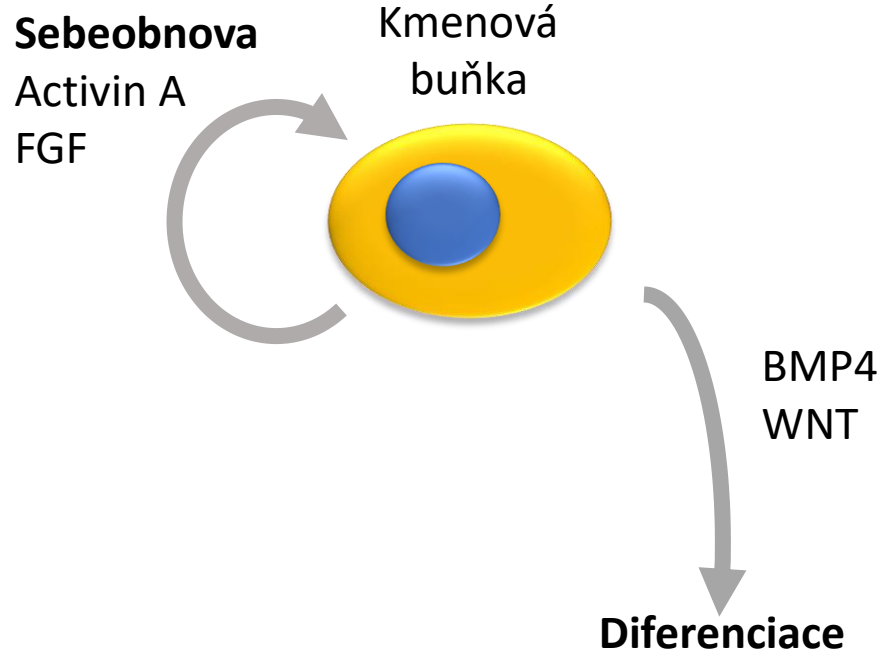
laminin

kolagen

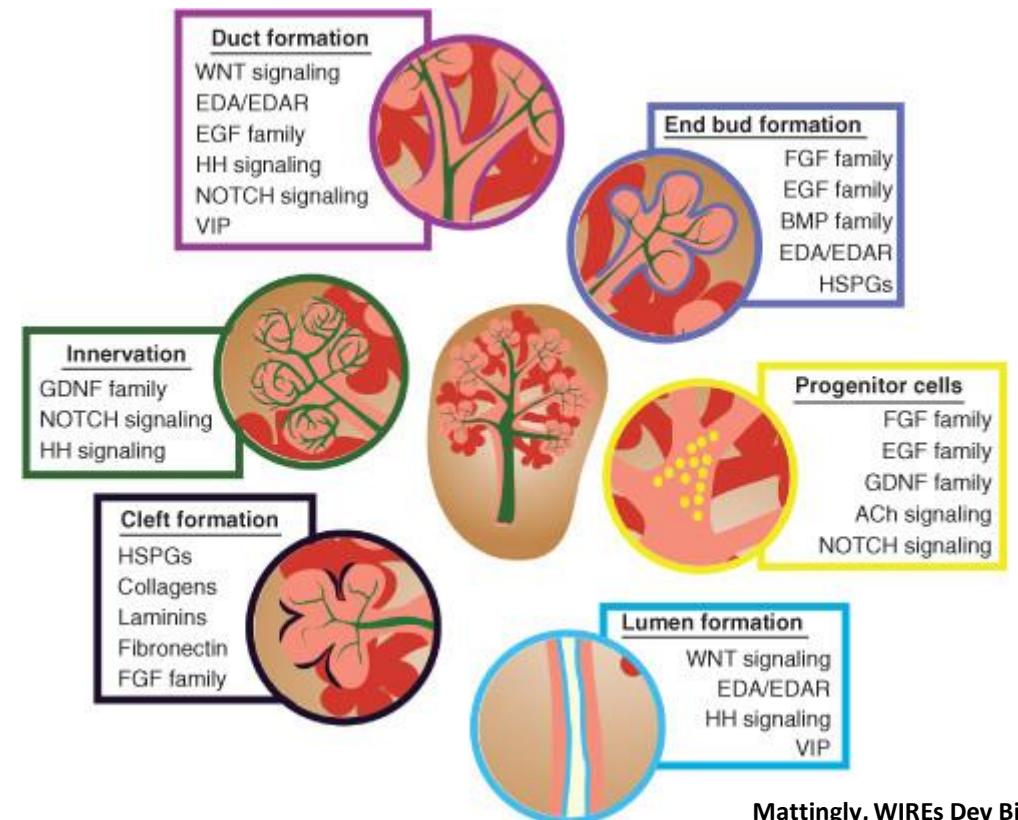


„Niche“ – klíčové faktory mikroprostředí

Faktory mikroprostředí kopírují mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje

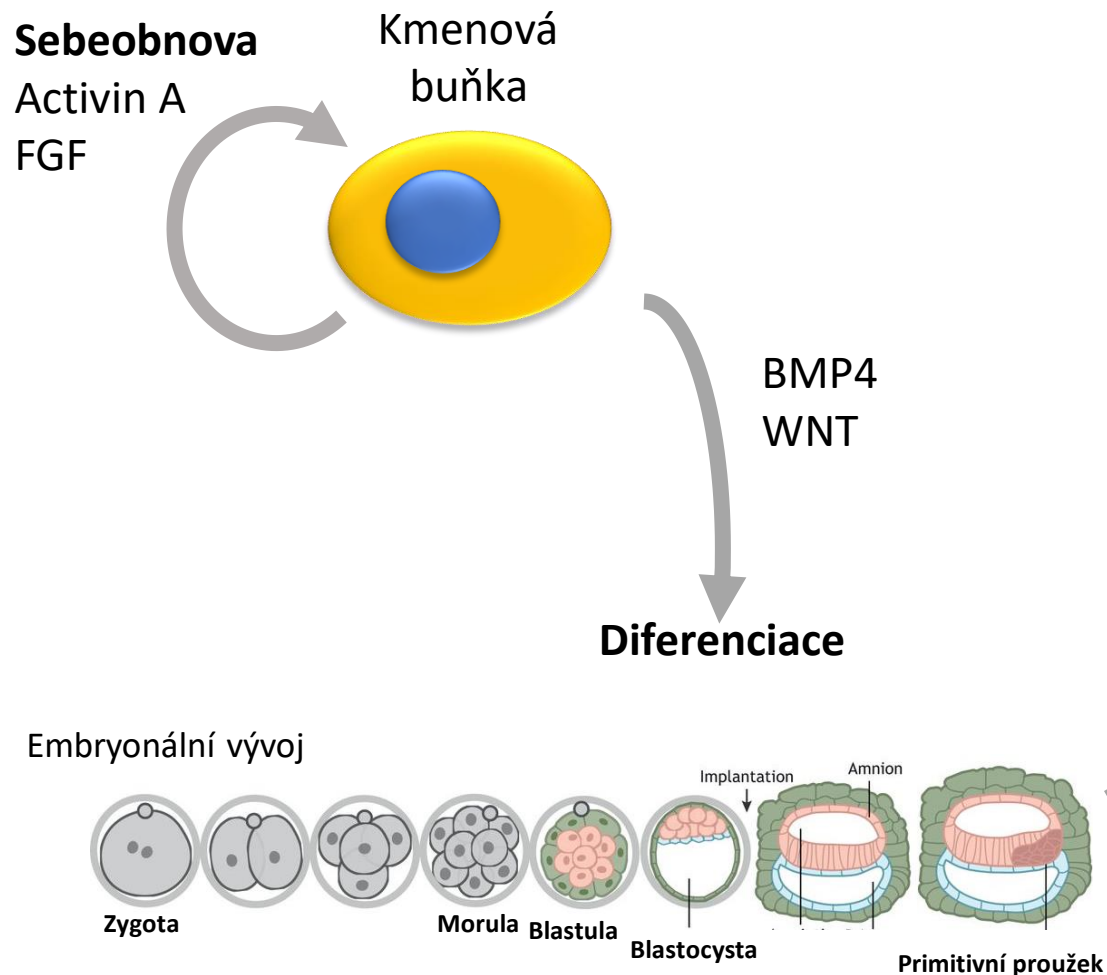


Autokrinní spolu s parakrinním signálováním a adhezí indukovaným signálem určuje osud buňky..
..(být či nebýt, sebeobnovovat se či diferencovat atd..)

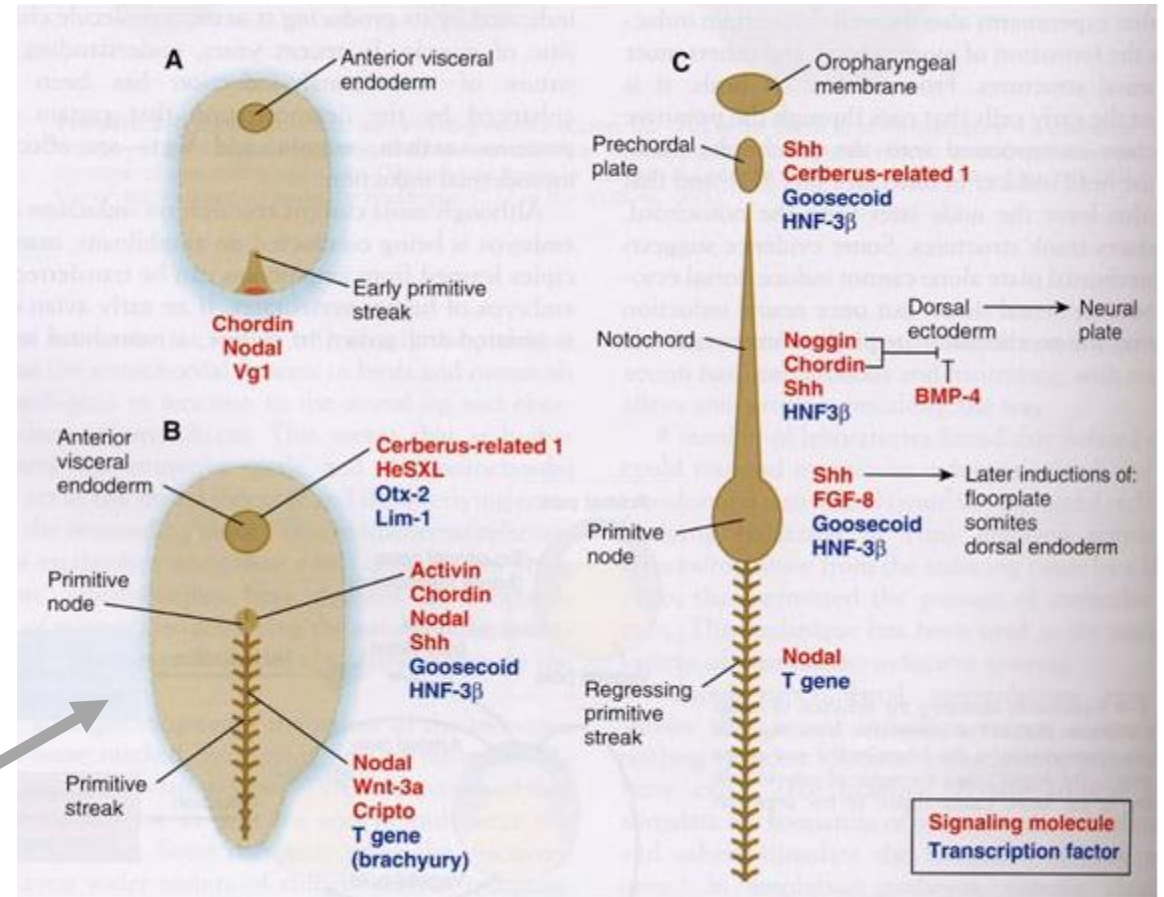


„Niche“ – klíčové faktory mikroprostředí

Faktory mikroprostředí kopírují mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje

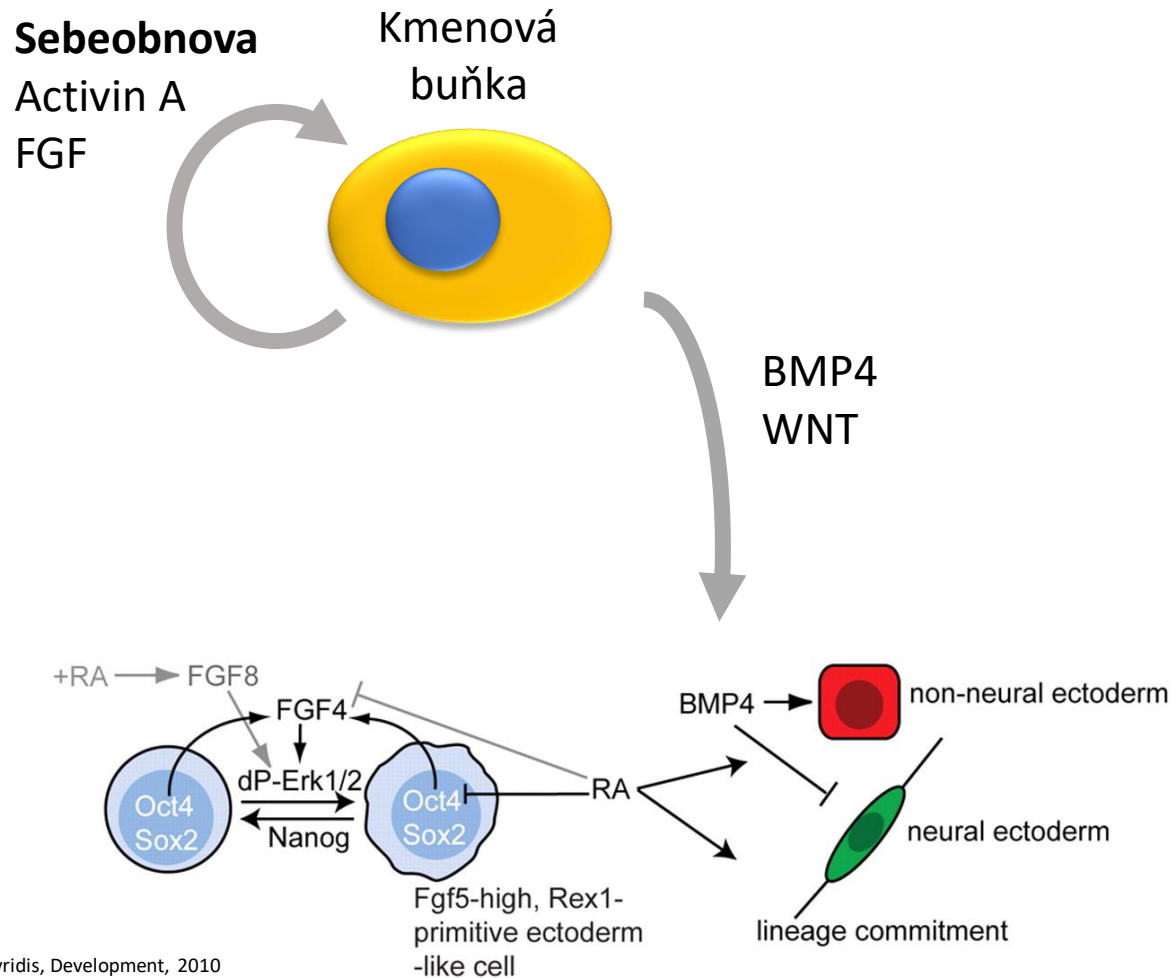


Signální dráhy řídicí tvorbu embrya (primitivního proužku)



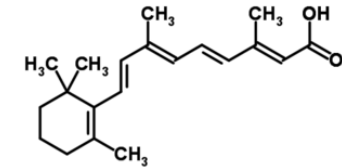
„Niche“ – klíčové faktory mikroprostředí

Faktory mikroprostředí kopírují mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje

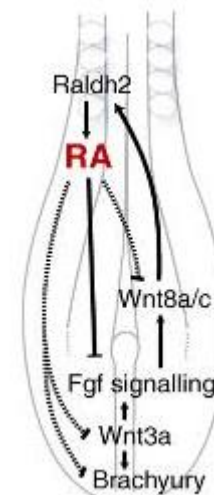


Signální dráhy řídící tvorbu embrya (primitivního proužku)

Retinová kyselina

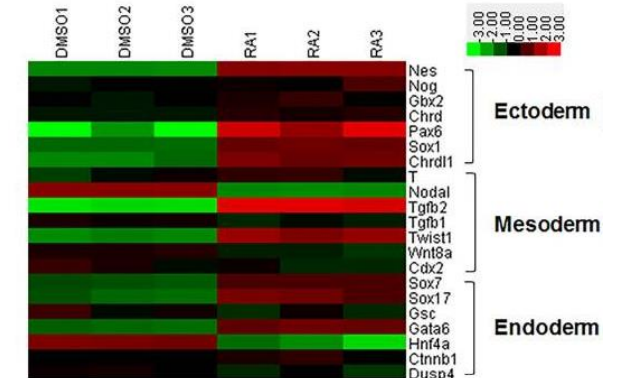


Ustavení AP osy



Ribes, Development 2009

RA indukuje tvorbu ektodermu z PSC

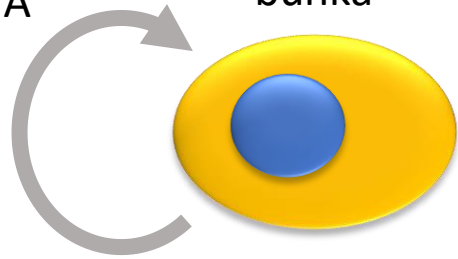


„Niche“ – klíčové faktory mikroprostředí

Faktory mikroprostředí kopírují mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje

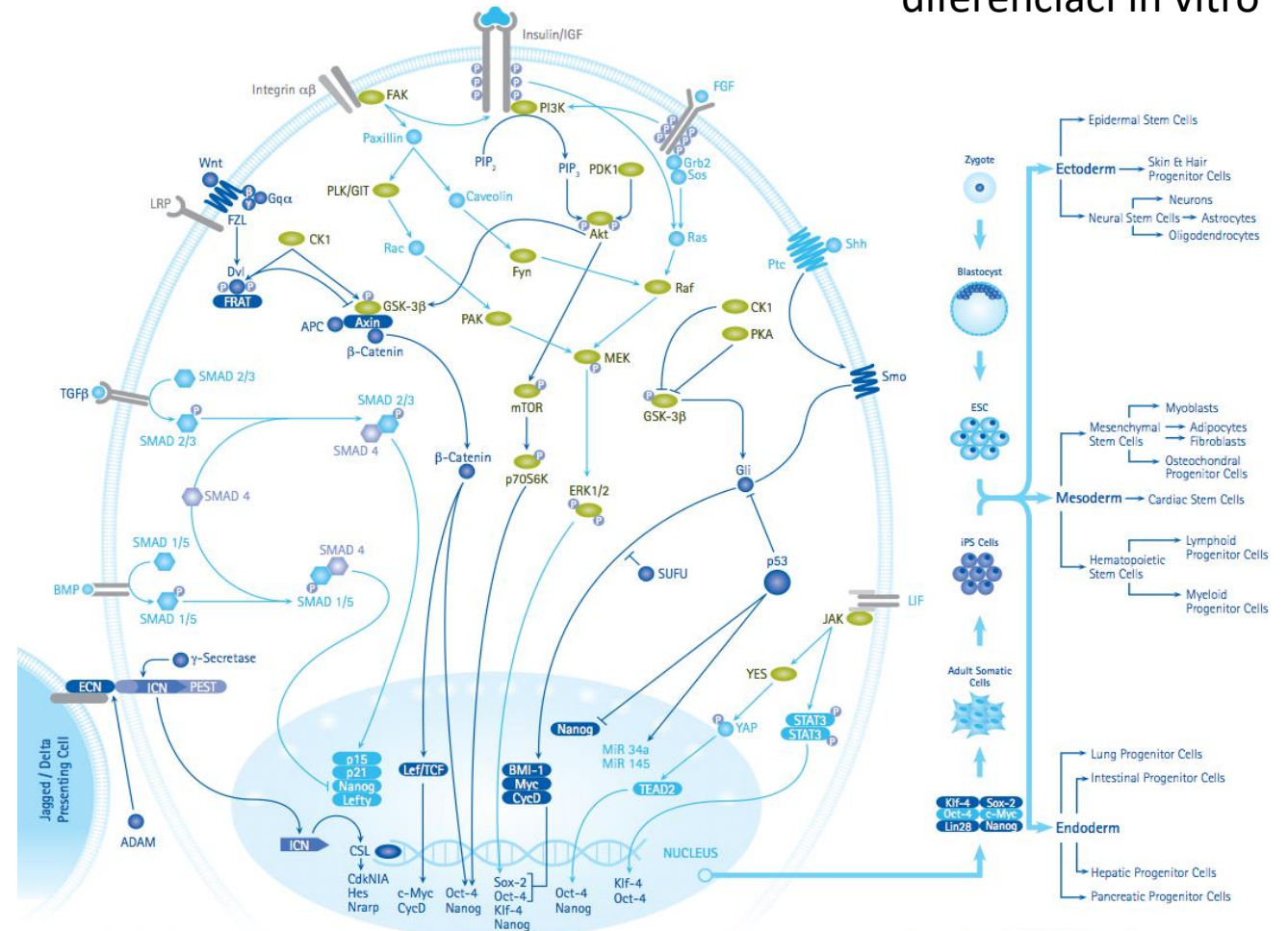
Sebeobnova
Activin A
FGF

Kmenová
buňka



BMP4
WNT
Diferenciace

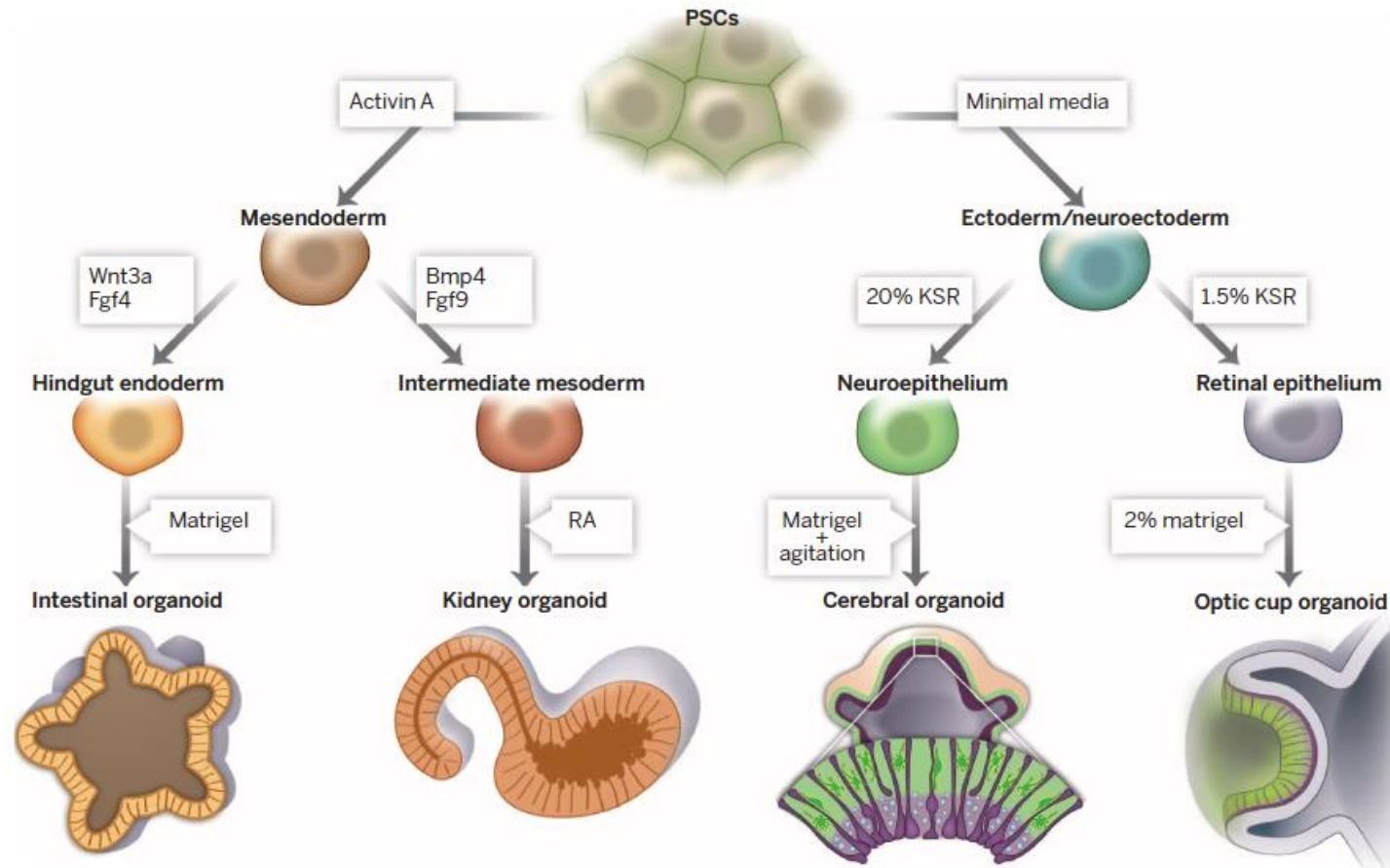
Signální dráhy řídicí tvorbu embrya – použití pro diferenciaci in vitro



Tkáňové kultury – tvorba organoidů..

Faktory mikroprostředí kopírují mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje

Signální dráhy řídící tvorbu embrya – použití pro diferenciaci in vitro



Tkáňové kultury – tvorba organoidů..

Brain organoid

Pluripotent stem cells

- Lancaster et al., *Nature* 2013
- Qian et al., *Cell* 2016
- Dang et al., *Cell Stem Cell* 2016
- Garcez et al., *Science* 2016
- Bagley et al., *Nature Methods* 2017
- Lancaster et al., *Nature Biotechnology* 2017

Cardiac organoid

Pluripotent stem cells

- Ma et al., *Nature Communications* 2011
- Ronaldson-Bouchard et al., *Nature* 2018

Intestinal organoid

Pluripotent stem cells

- Spence et al., *Nature* 2011
- Watson et al., *Nature Medicine* 2014
- Uchida et al., *JCI Insight* 2017
- Munera et al., *Cell Stem Cell* 2017
- Crespo et al., *Nature Medicine* 2017
- Workman et al., *Nature Medicine* 2017

Tissue stem cells

- Sato et al., *Nature* 2009
- Jung et al., *Nature Medicine* 2011
- Yui et al., *Nature Medicine* 2012
- Fordham et al., *Cell Stem Cell* 2013
- Schwank et al., *Cell Stem Cell* 2013
- Gjorevski et al., *Nature* 2016

Gastric organoid

Pluripotent stem cells

- McCracken et al., *Nature* 2014
- Noguchi et al., *Nature Cell Biology* 2015
- McCracken et al., *Nature* 2017

Tissue stem cells

- Barker et al., *Cell Stem Cell* 2010
- Stange et al., *Cell* 2013
- Bartfeld et al., *Gastroenterology* 2015

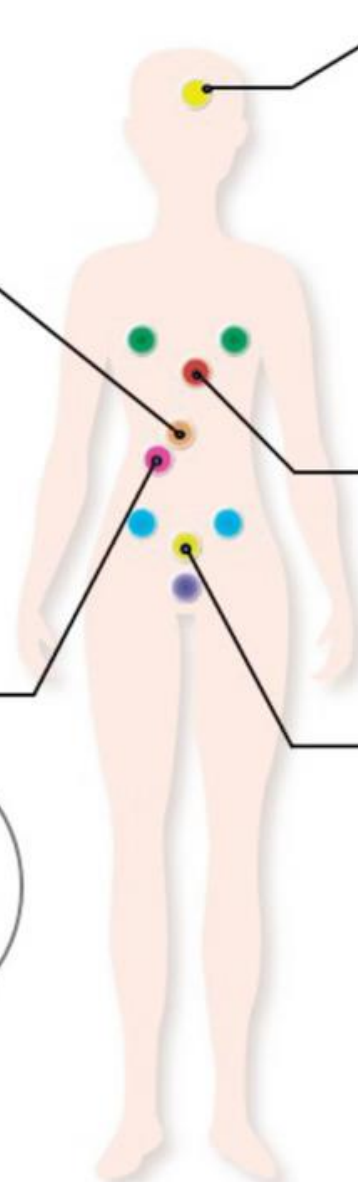
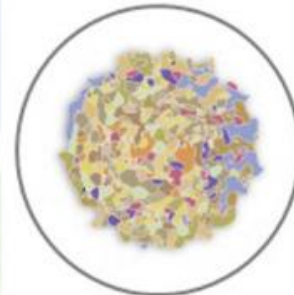
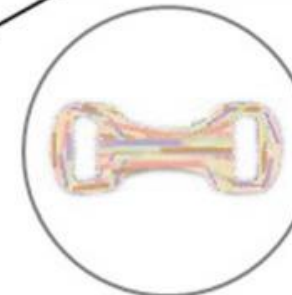
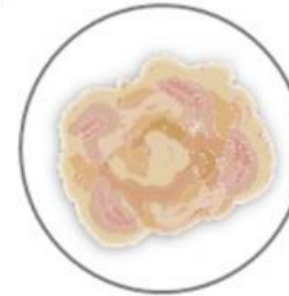
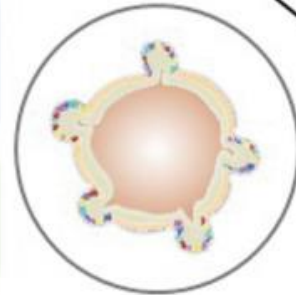
Liver organoid

Pluripotent stem cells

- Takebe et al., *Nature* 2013
- Sampaziotis et al., *Nature Biotechnology* 2015
- Ogawa et al., *Nature Biotechnology* 2015
- Takebe et al., *Cell Reports* 2017

Tissue stem cells

- Huch et al., *Nature* 2013
- Huch et al., *Cell* 2015
- Broutier et al., *Nature Medicine* 2017



Tkáňové kultury – tvorba organoidů..

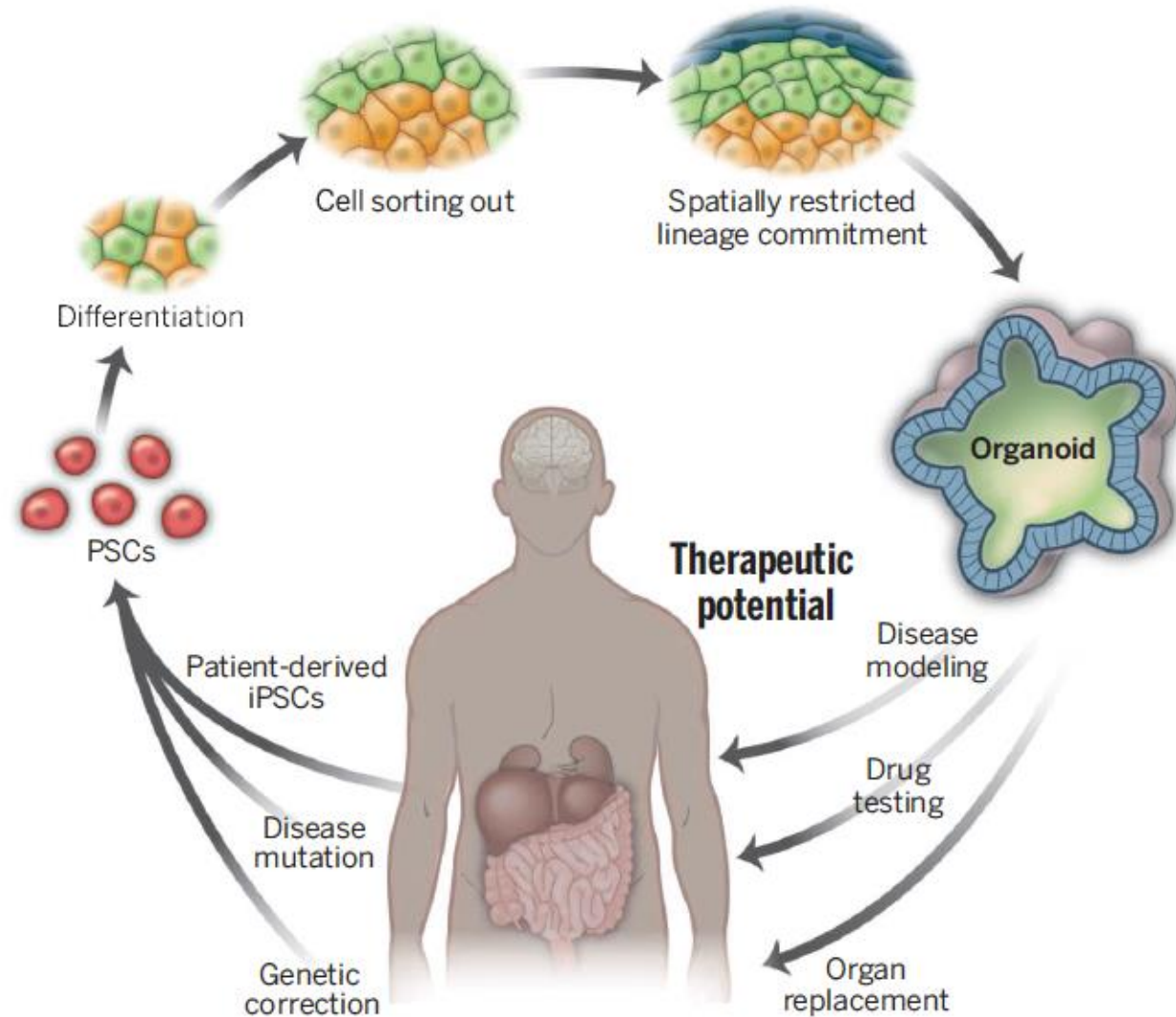
Využití organoidů

Modelování chorob

Testování léčiv

Transplantační medicína

Genová léčba



Jak to všechno začalo..

..aneb zrod organoidů

Živočišné tkáňové kultury - organoidy

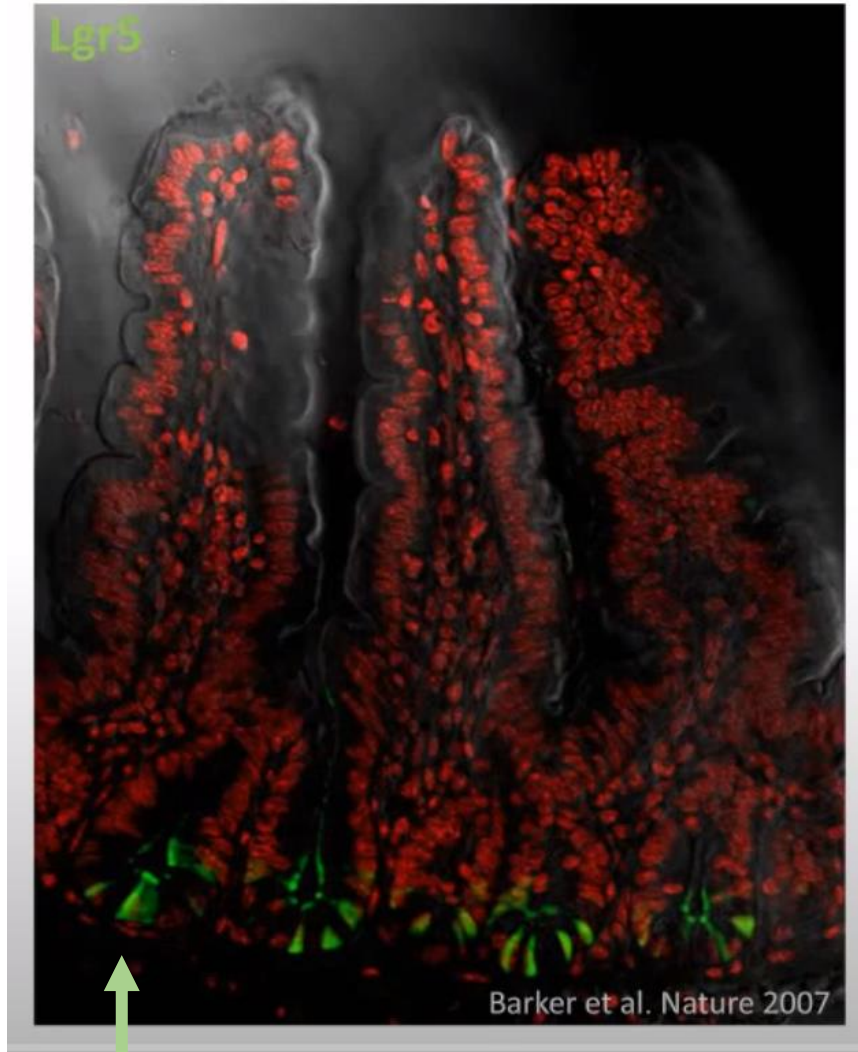


Živočišné tkáňové kultury - organoidy

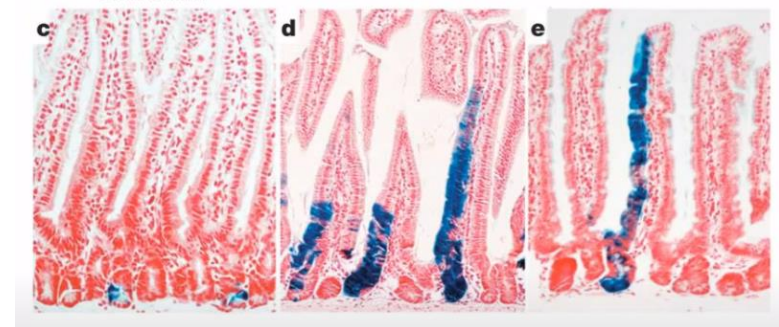
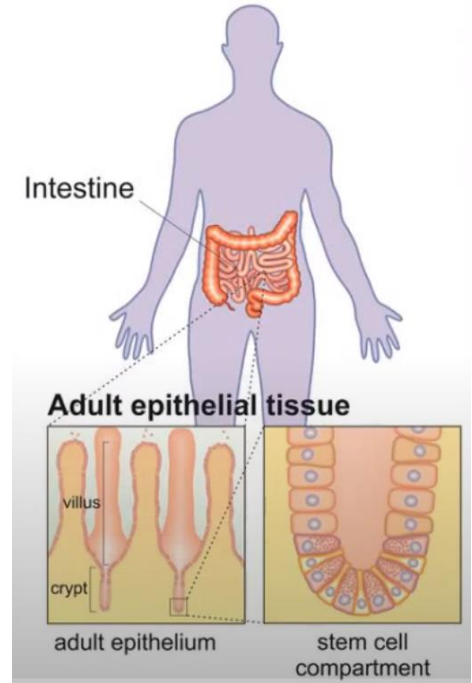
Apoptóza

Diferenciace

Proliferace



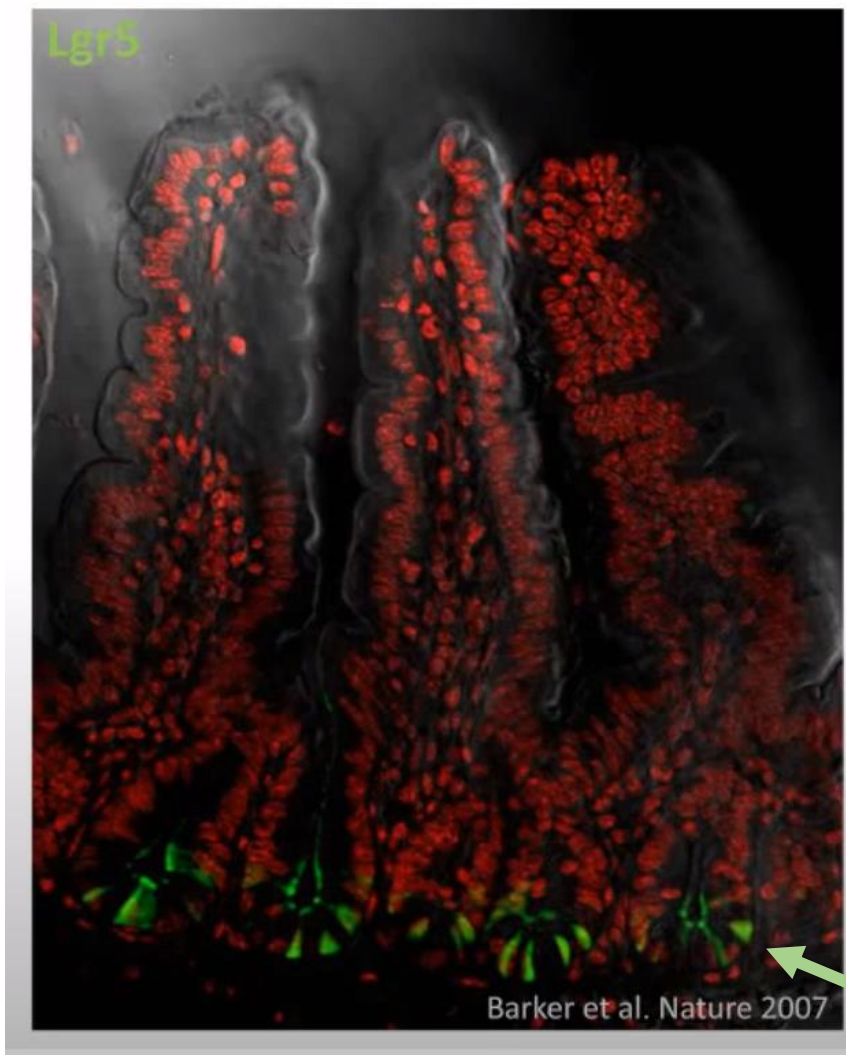
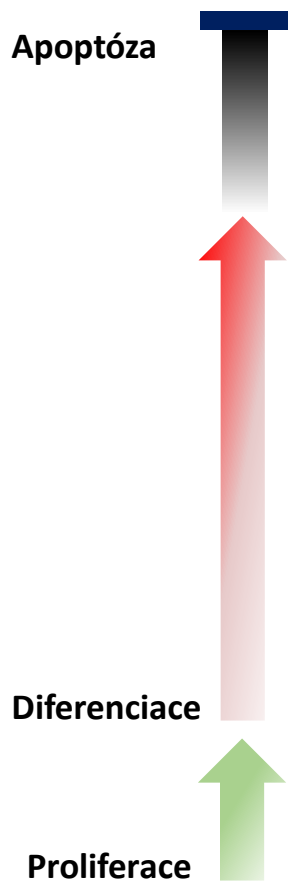
Kmenové buňky střevního epitelu



čas

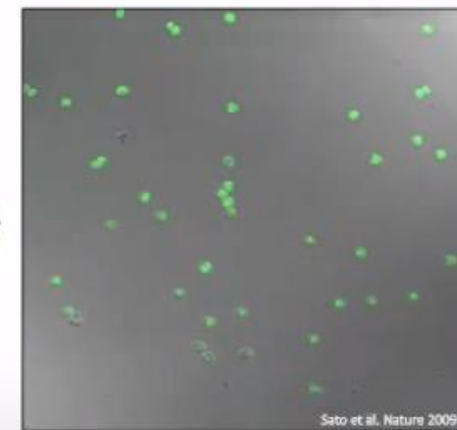
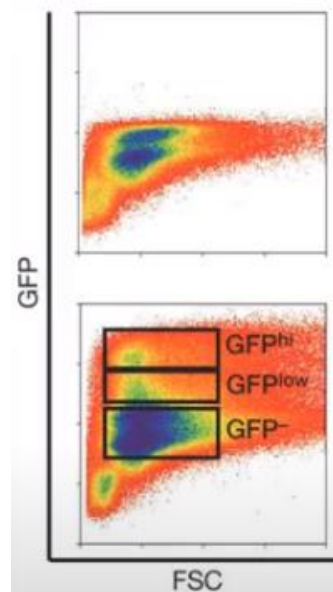
Živočišné tkáňové kultury - organoidy

Izolace primokultury kmenových buněk ze střevního epitelu



disociace

Sortování průtokovou
cytometrií (marker GFP-Lgr5)

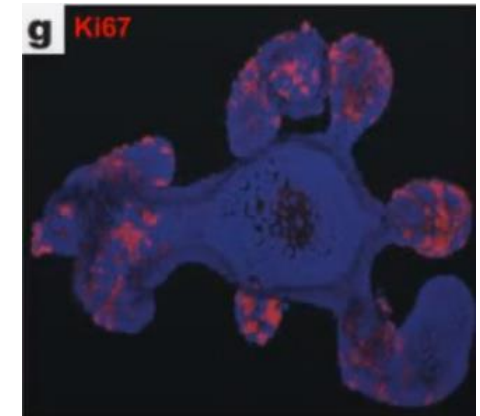
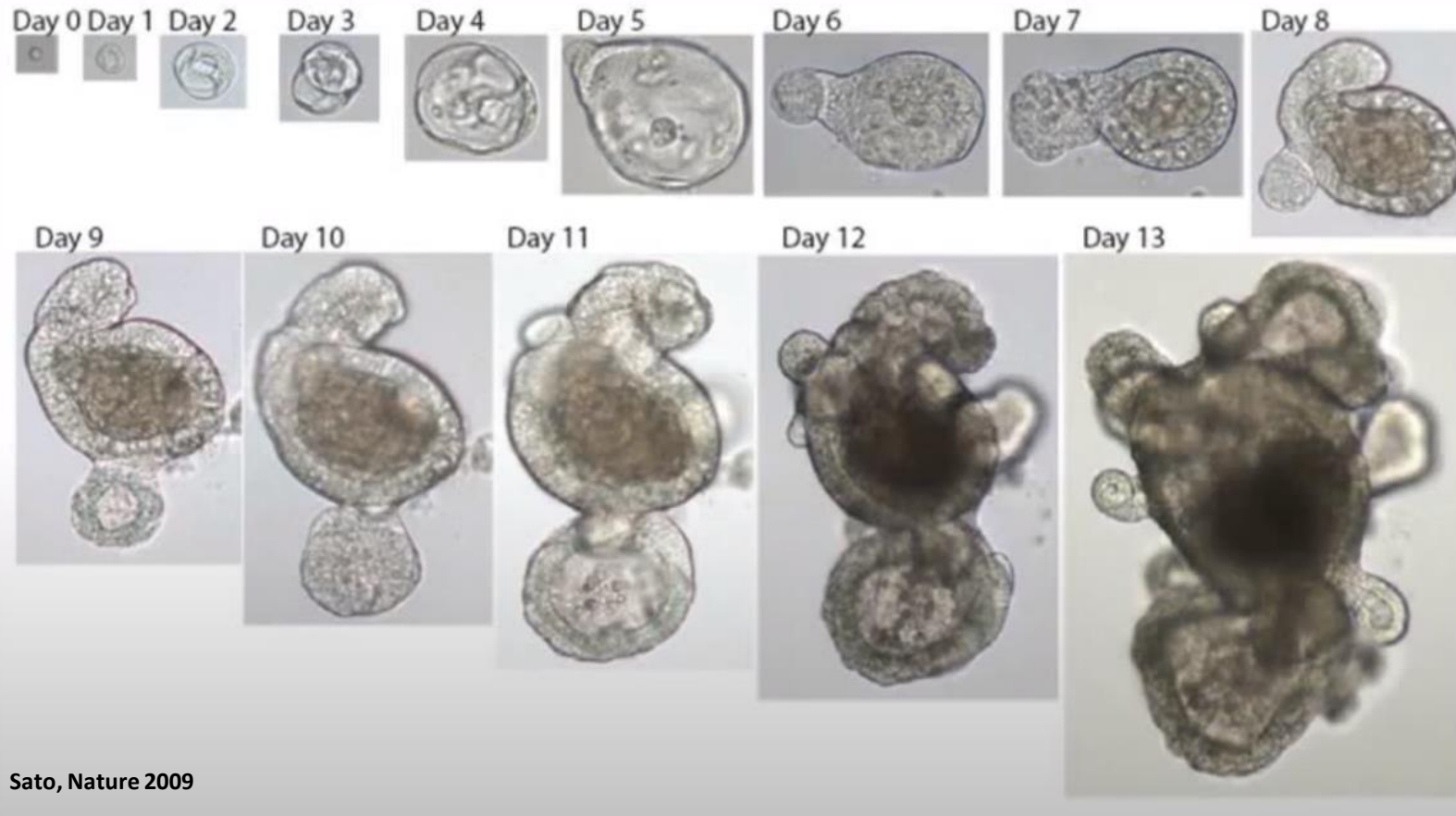


Kmenové buňky střevního
epitelu (Lgr-GFP) v kultuře

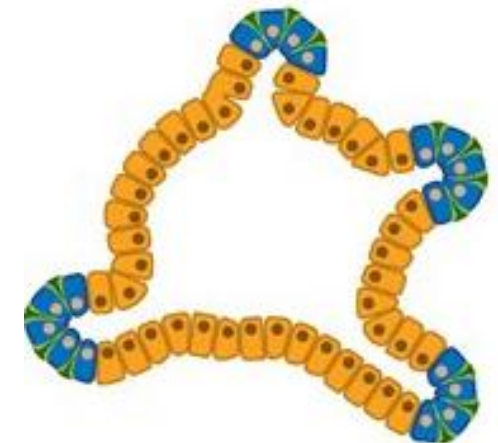
Kmenové buňky střevního epitelu

Živočišné tkáňové kultury - organoidy

Růst organoidů z kmenových buněk střevního epitelu



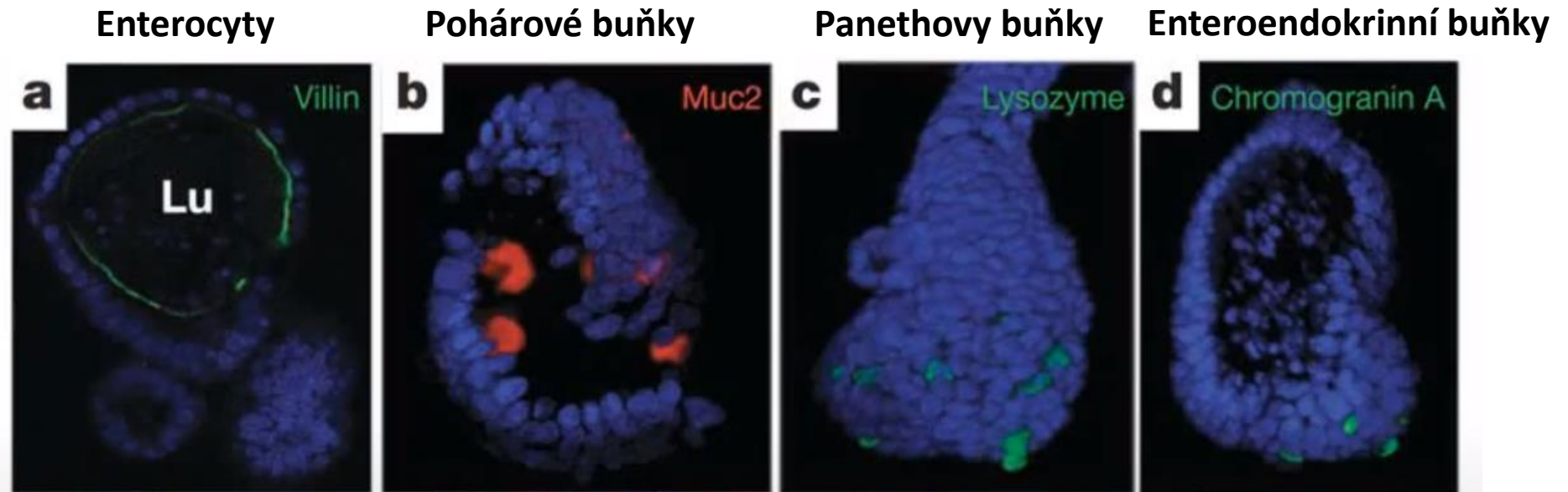
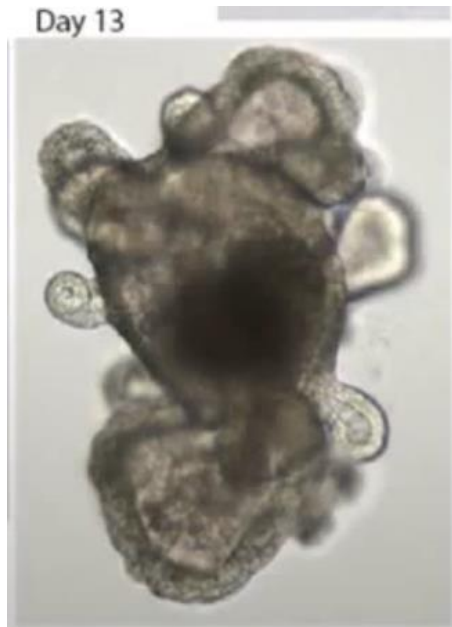
Proliferace pouze v kryptě klku
(červená = proliferace)



Plně vyvinutý organoid
(„ministřevo“) s funkčními klky
střevního epitelu

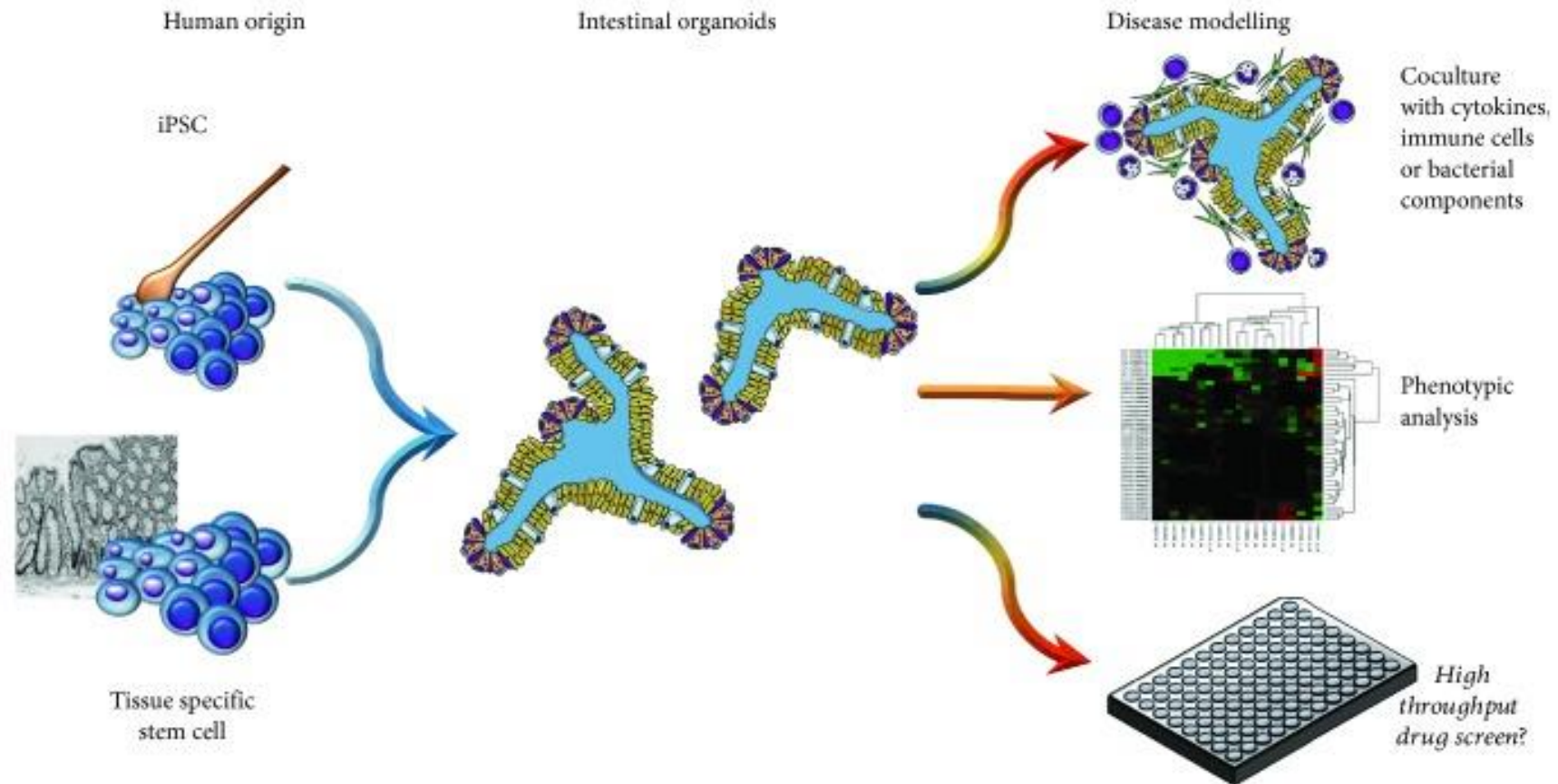
Živočišné tkáňové kultury - organoidy

„ministřevo“ obsahuje všechny typy buněk střevního epitelu



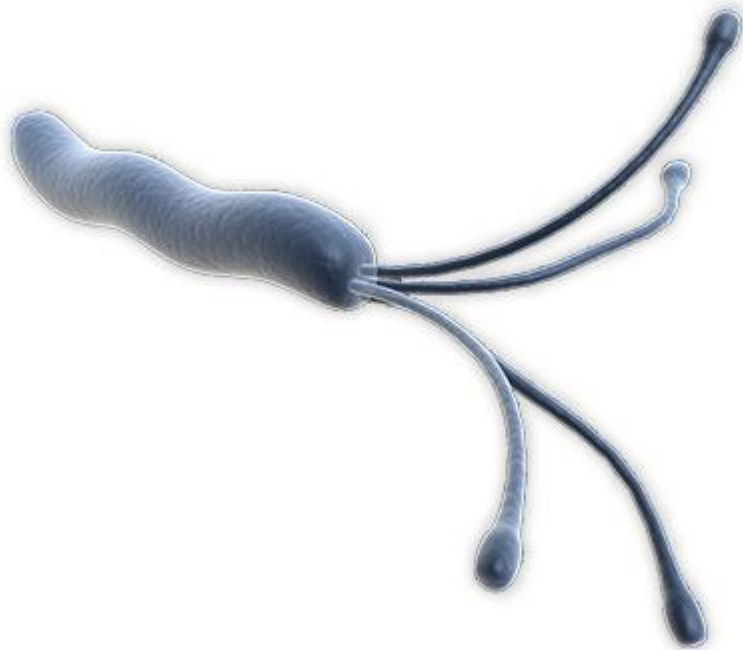
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Modelování idiopatického střevního zánětu ve střevních organoidech



Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Mechanismus infekce žaludeční sliznice bakterií *Helicobacter pylori*

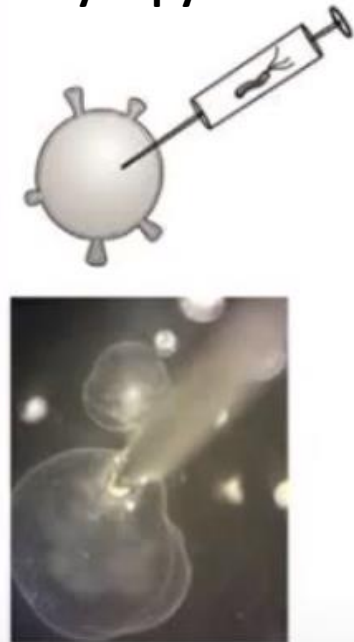


- 50% populace je nakaženo
- 90% bezpříznakový průběh (dočasný)
- Většina případů žaludečního vředu je asociována s *H.pylori*
- *H.pylori* je karcinogen I.třídy (hlavní příčina karcinomu žaludku)

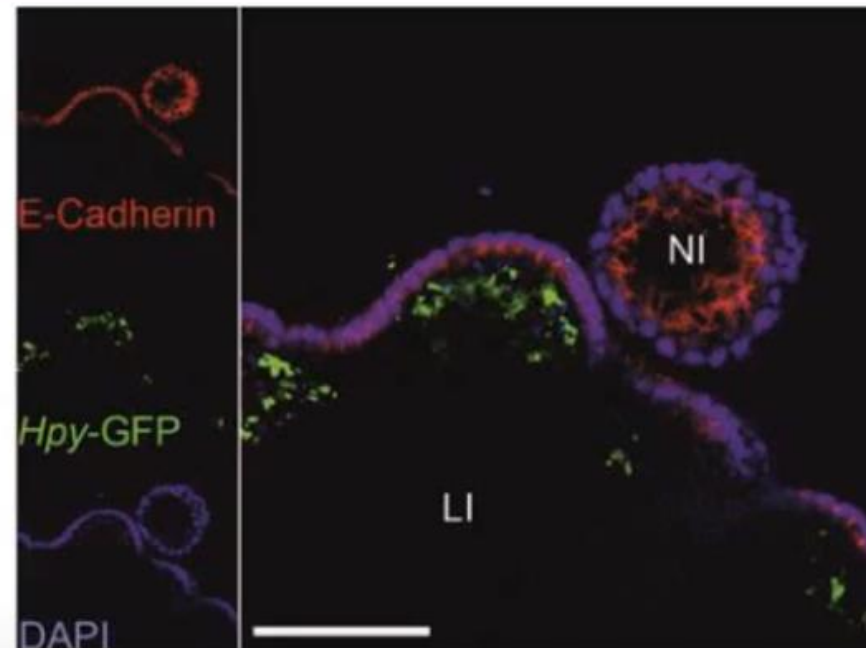
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Mechanismus infekce žaludeční sliznice bakterií *Helicobacter pylori*

Žaludeční organoidy infikovány *H.pylori*



Zelený *H.pylori* (zelená) asociuje s proliferujícími buňkami (kmenovými) žaludečního epitelu



Bartfield, Gastroenterology 2015

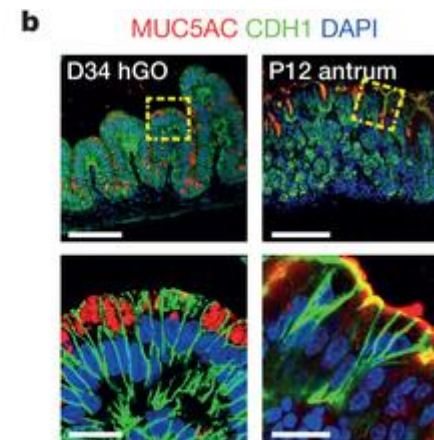
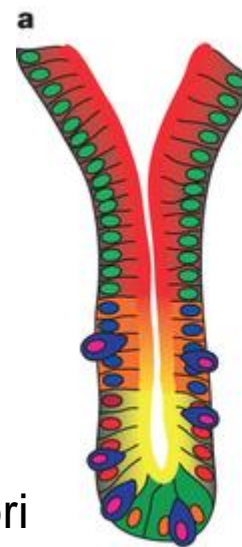
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Mechanismus infekce žaludeční sliznice bakterií *Helicobacter pylori*

Žaludeční organoidy infikovány *H.pylori*



Helicobacter pylori



Mc Cracken, Nature, 2014

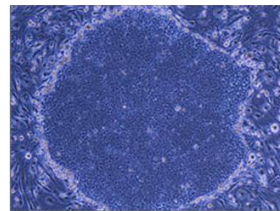
Asociace s C-MET receptorem

Epiteliační proliferace

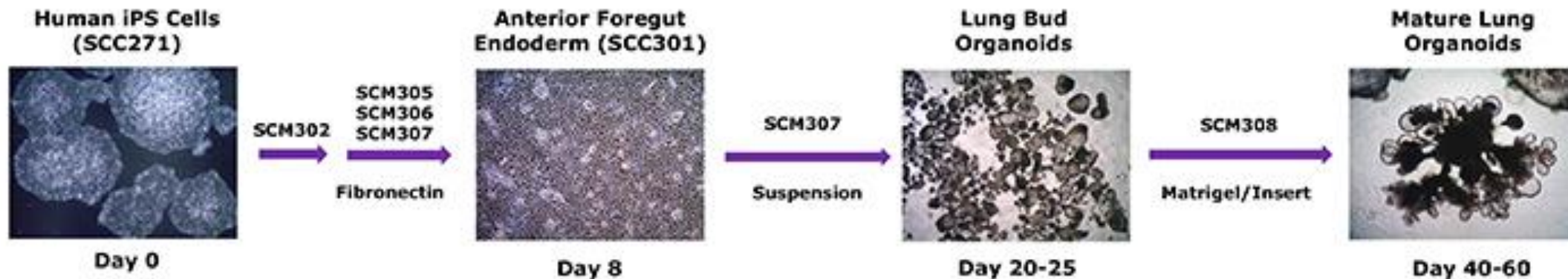
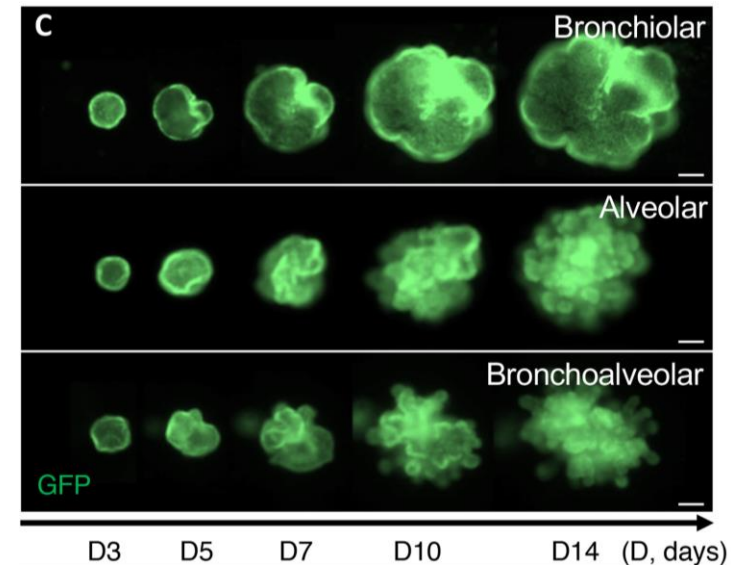
Otevírá cestu k testování a současně představuje robustní skriningový systém selektivních inhibitorů/antagonistů c-met receptoru..

Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Plicní organoidy



Pluripotentní kmenové buňky



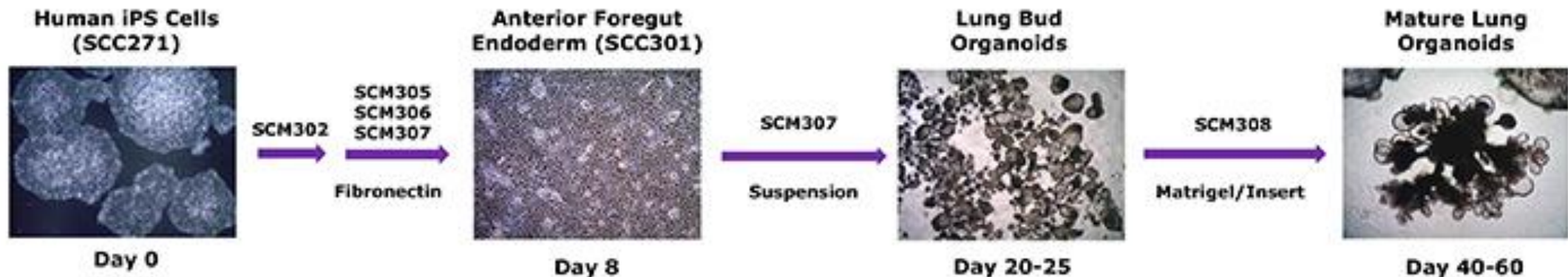
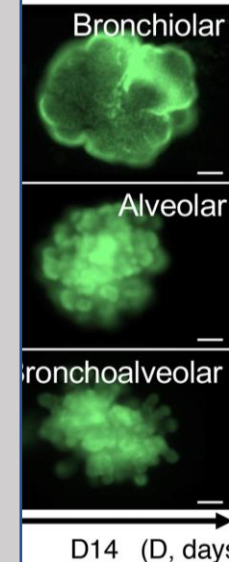
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Plicní organoidy

MERCK Sigma-Aldrich

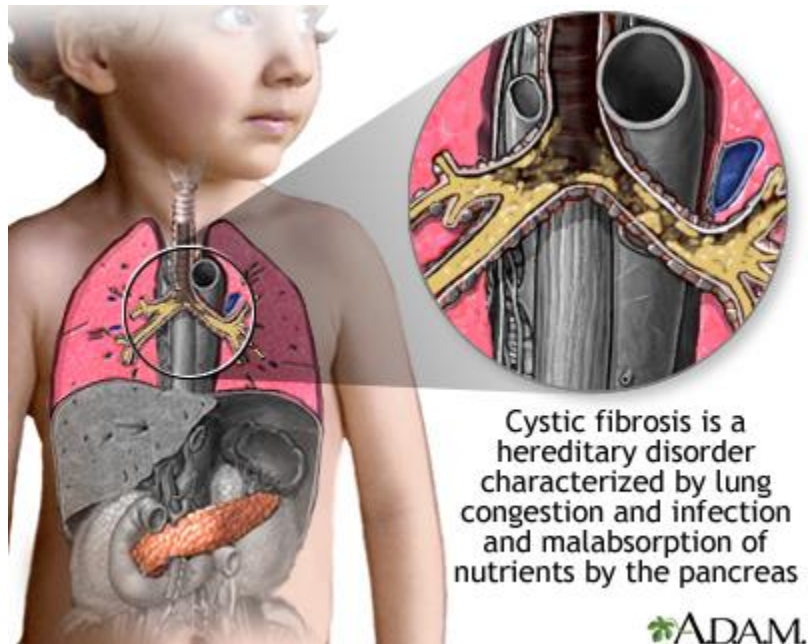
Definitive Endoderm Induction Medium (SCM302)
Anterior Foregut Endoderm Induction Medium I (SCM305)
Anterior Foregut Endoderm Induction Medium II (SCM306)
3dGRO™ Lung Organoid Branching Medium (SCM307)
3dGRO™ Lung Organoid Maturation Medium (SCM308)
Human iPSC Derived AFE Progenitors (SCC301)

Pluripot



Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Plicní organoidy : personalizovaná medicína pro pacienty trpící cystickou fibrózou

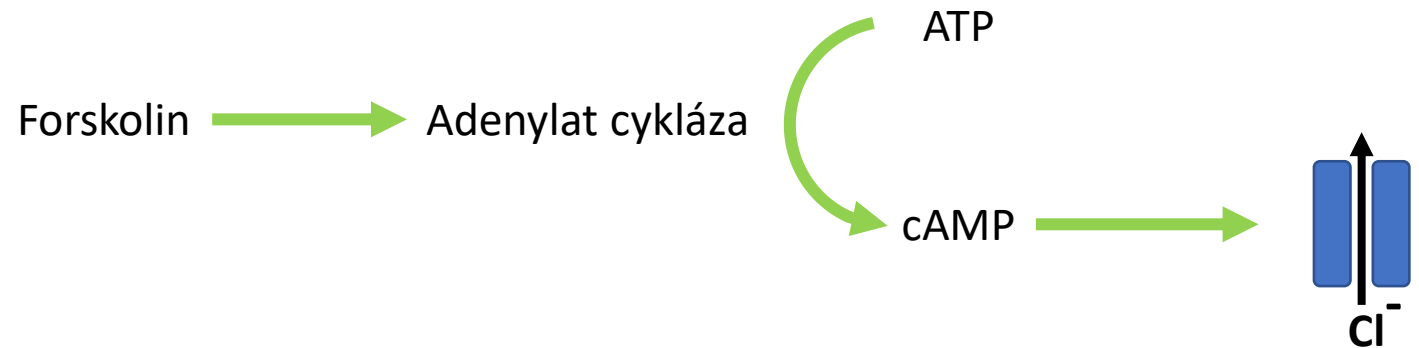


- Mutace genu CTFR chloridového kanálu
- Hustý hlen, ztěžující dýchání
- Průměrný věk dožití dospělých s CF je 44 let

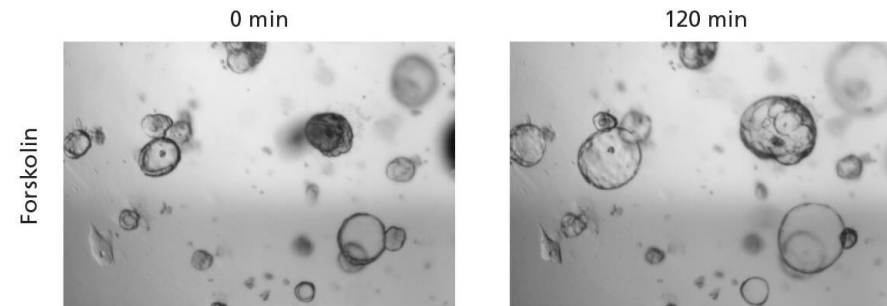
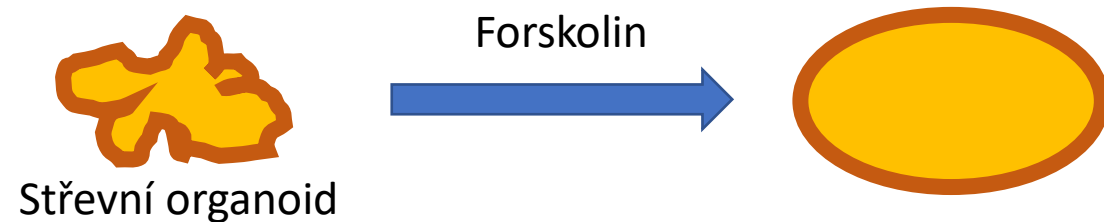
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Střevní organoidy : personalizovaná medicína pro pacienty trpící cystickou fibrózou

- Forskolin otevírá CFTR kanál:



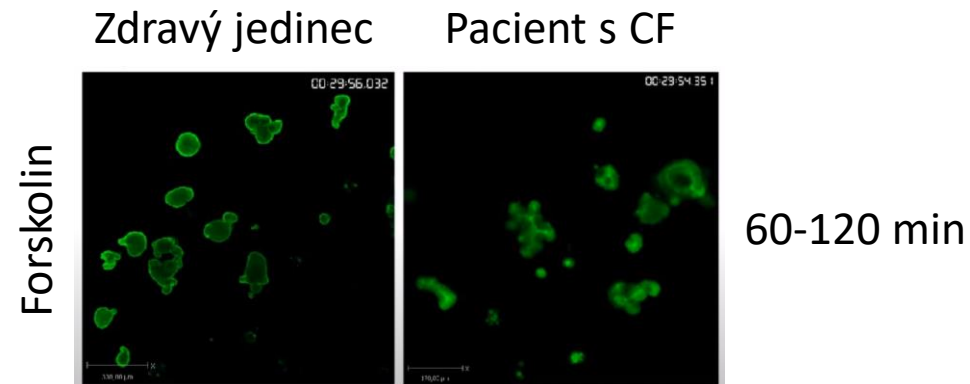
- Otevření CFTR – bobtnání orgnoidu:



Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

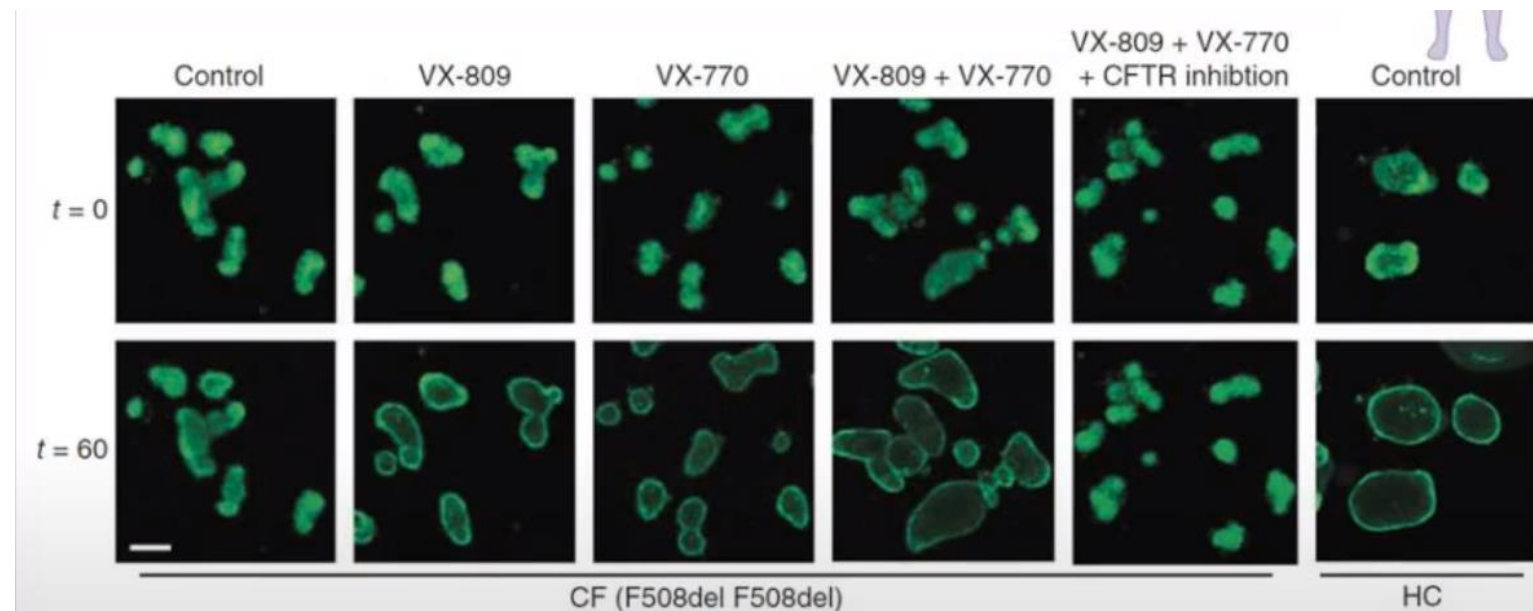
Střevní organoidy : personalizovaná medicína pro pacienty trpící cystickou fibrózou

- Forskolin otevírá CTFR kanál:



Firma Vertex:

- Skríníng >2000 mutací
- Nalezeny dvě účinné látky
- V současnosti povoleny k léčbě jako lék ORKAMBI



Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Střevní organoidy : personalizovaná medicína pro pacienty trpící cystickou fibrózou

Zdravý jedinec

Pacient s CF

- Forskolin otevírá CTFR kanál:

Dánská zdravotní pojišťovna zaplatila takový skrínig pro cca 200 dětí.

Pokrytá většina mutací CTFR (a jejich odpověď na léčbu vybranými léky

Firma Vertex:

- Skrínig >2000 mutací
- Nalezeny dvě účinné látky
- V současnosti povoleny k léčbě jako lék ORKAMBI



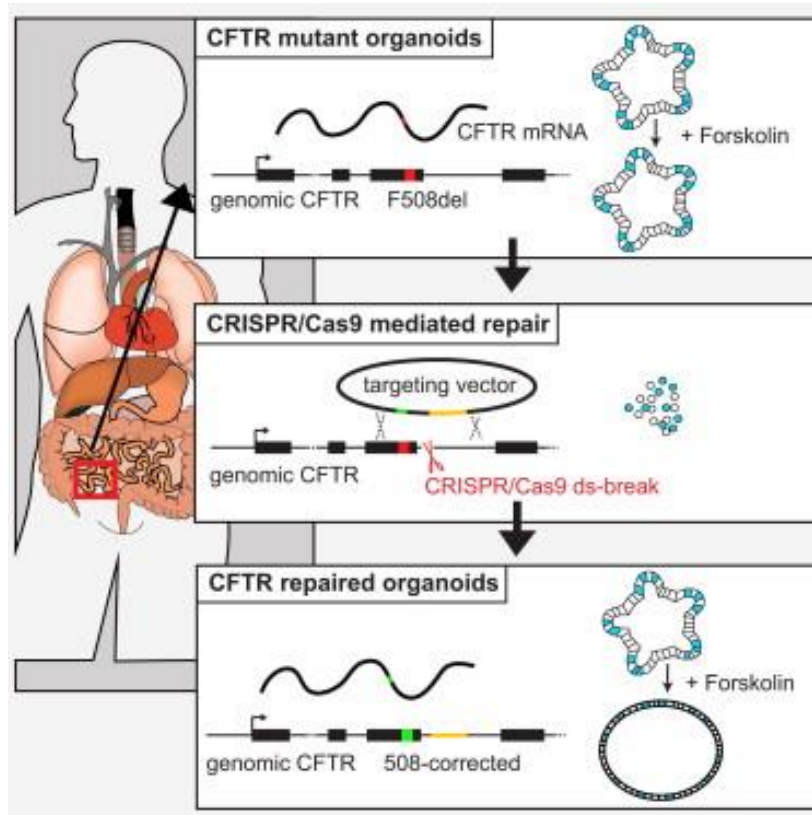
CF (F508del F508del)

HC

Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Lidské organoidy jsou vhodné k editaci genomu s pomocí CRISPR/Cas9

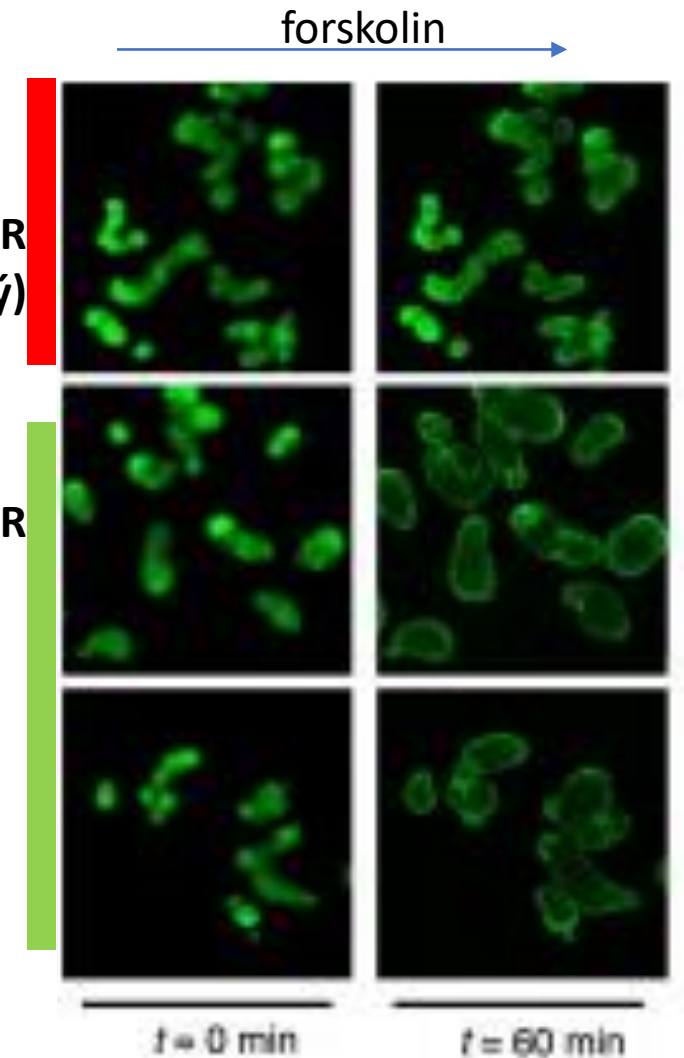
Oprava genu CTFR ve střevním organoidu



Organoidy:

Nesoucí mutaci CTFR
(nemocný)

Opravený gen CTFR



Podarilo se obnovit funkci CTFR genu v organoidu..

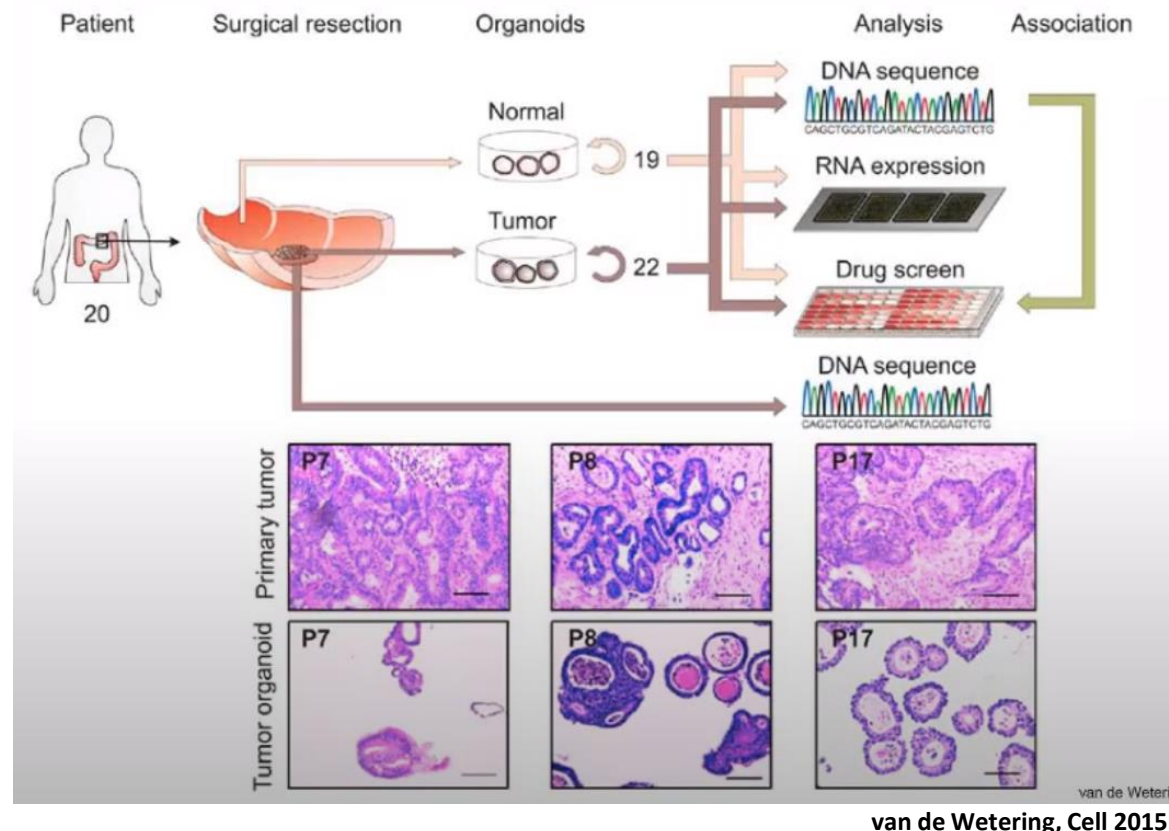
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Lidské organoidy systematický přístup k hledání nových léčiv

Tvorba a využití biobanky s organoidy k systematickému hledání účinných protinádorových látek

Pacienti s rakovinou tlustého střeva:

- Biopsie rakovinné a zdrané tkáně
- Výroba organoidů
- Analýza genomu a transkriptomu
- Skríníng léčiv



Dnes k dispozici stovky pacientů:

- Rakovina tlustého střeva
- Rakovina prsu
- Rakovina vaječníků
- Rakovina slinivky

...a bio+databanka neustále roste

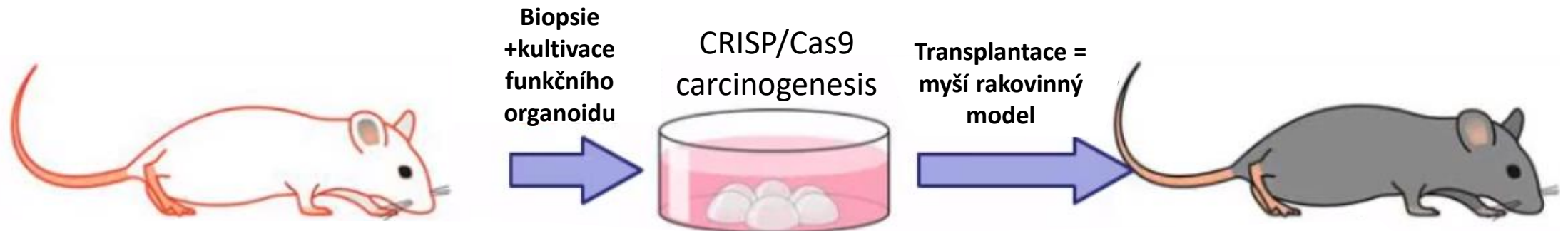
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Transplantace střevních organoidů

1. Transplantace organoidů do místa poškozené tkáně

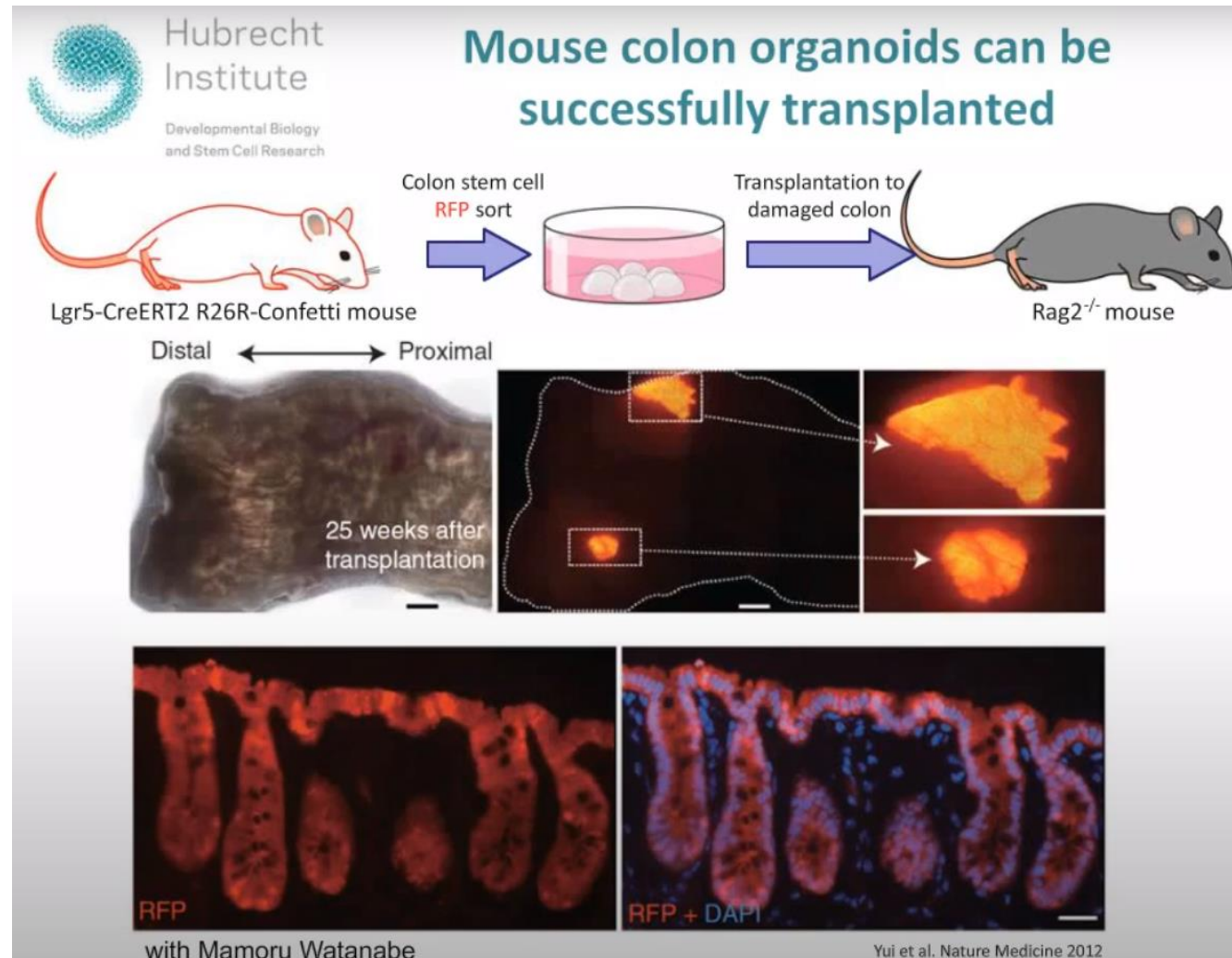


2. Transplantace organoidu s editovaným genomem (zatím spíše model rakoviny)



Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

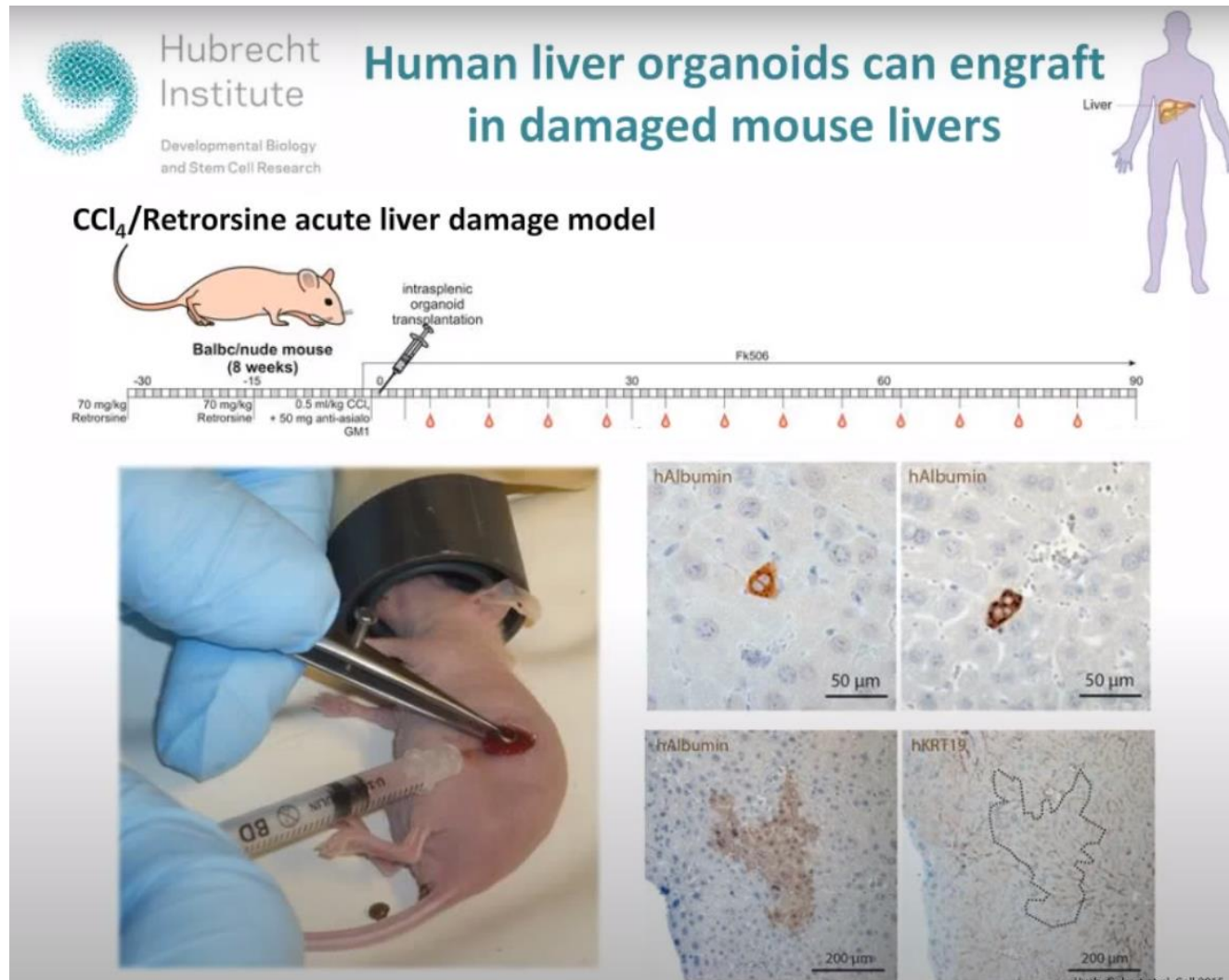
Transplantace střevních organoidů



Spontanni colitida s vysokou mortalitou

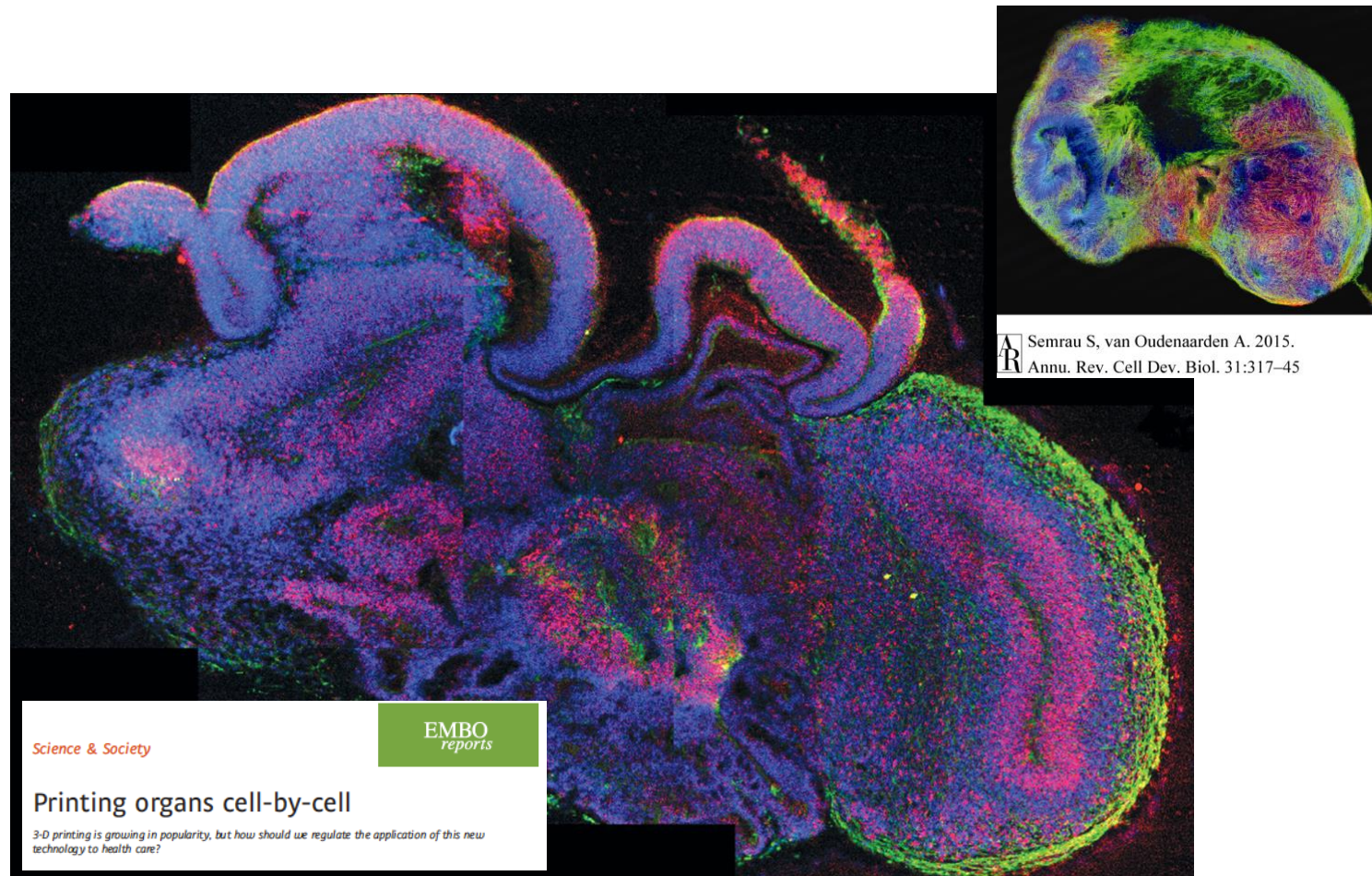
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Transplantace jaterních organiodů



Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Mozkové (neurální) organoidy – modelování chorob..



G Vogel Science 2013;341:946-947

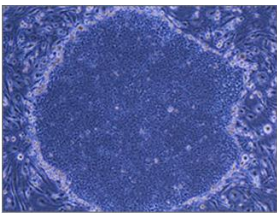
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Mozkové (neurální) organoidy – modelování chorob..

Angelmanuv syndrom – dříve nazýván „Happy puppet“

- drobná postava, menší hlava (ale ne mikrocefalus)
- vážná mentální retardace
- **epileptické záchvaty**
- motorické problémy
- problémy s rovnováhou
- dítě se nadměrně (neúměrně) směje
- mutace genu UBE3A na X chromozomu – kóduje ubikvitin ligázu E3A

Modelování choroby:



UBE3A KO
hESC



Zdroj: Wiki

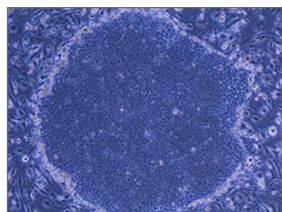
Živočišné tkáňové kultury – organoidy a příklady užití

Mozkové (neurální) organoidy – modelování chorob..

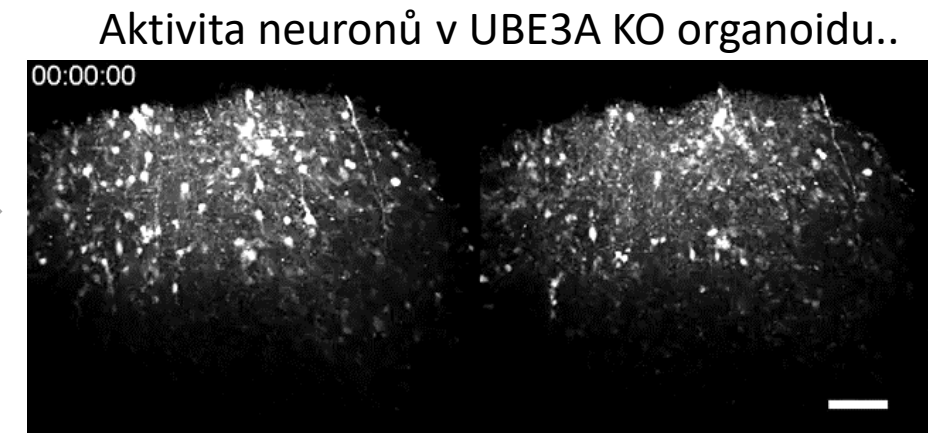
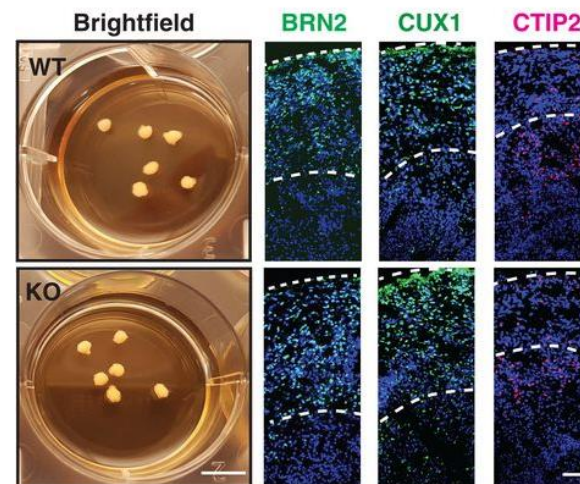
Angelmanuv syndrom – dříve nazýván „Happy puppet“

- UBE3A má za úkol degradaci draselného kanálu BK
- Neurony vykazují zvýšený draslíkový proud
- Antagonista BK kanálu Paxillin dokáže normalizovat hyperstimulaci neuronů a zabránit epileptickým záchvatům u modelové myši..

Modelování choroby:



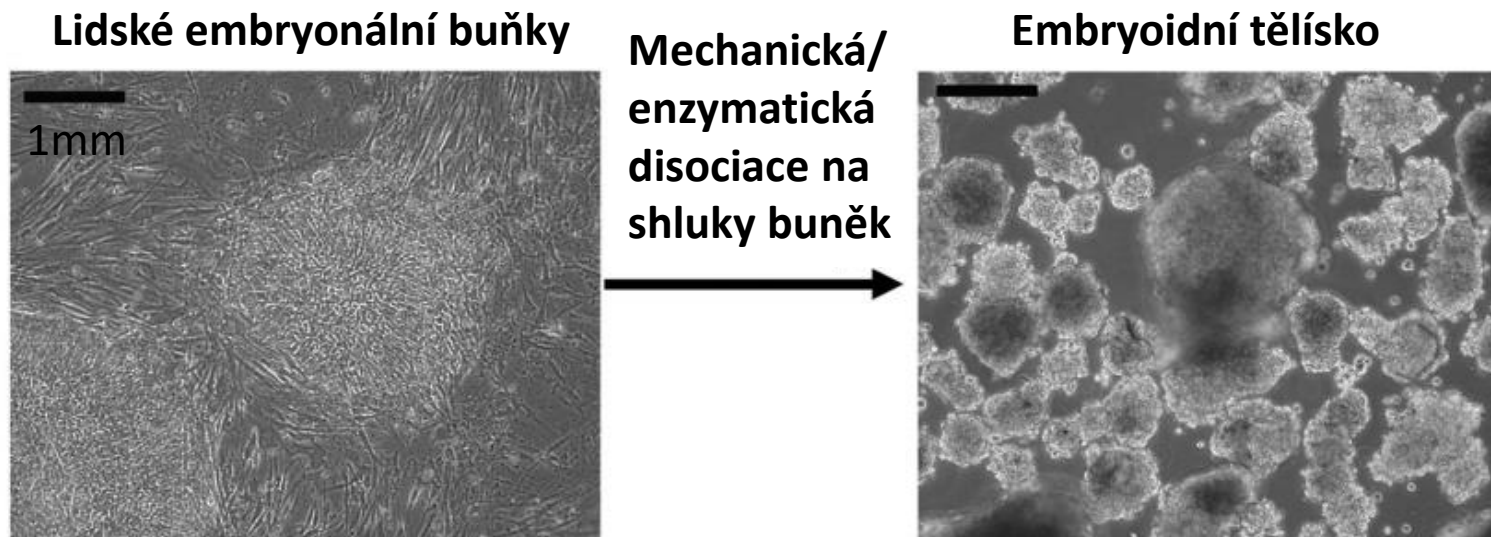
UBE3A KO
hESC



... a jak se vlastně takový organoid dá vyrobit?

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba buněčných agregátů

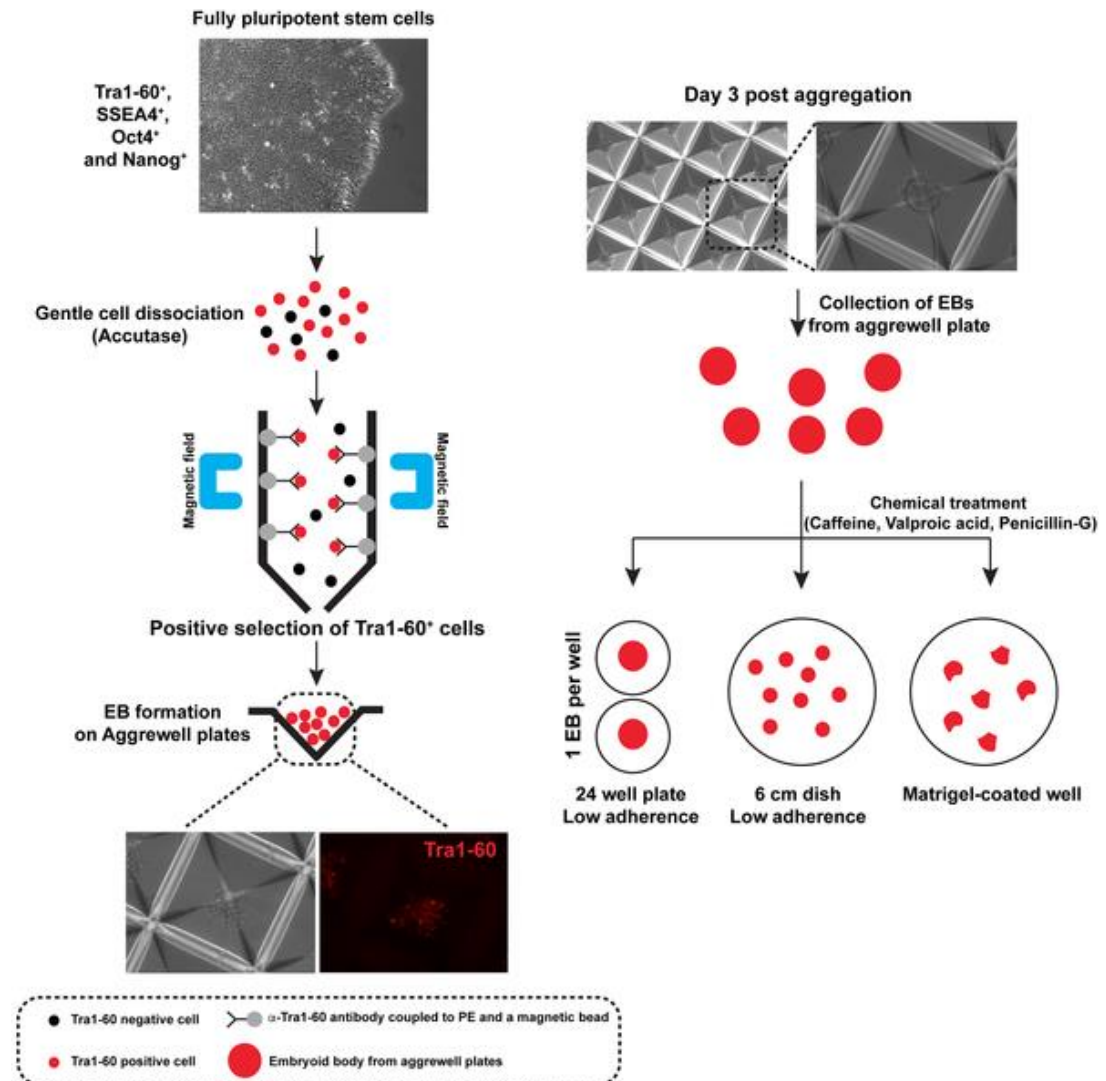
- Mechanické suspenzní metoda (kolonie, části monovrstvy atd.)
- Narostlé kolonie celé odloupnout (kolagenáza, EDTA+mechanicky atd) nebo monovrstvu narušit na makroskopické shluky buněk..
- Přenést do misky/lahve/bioreaktoru s neadhezivním povrchem (např. plastová bakteriální Petriho miska)



Živočišné tkáňové kultury – Tvorba buněčných agregátů

- Mechanické suspenzní metoda (kolonie, části monovrstvy atd.)
- Gravitační agregace (jamky, cytopsin)

- Disociace tkáňové kultury na jednotlivé buňky musí být opatrná, aby nepoškodila přiléhající ECM a receptory buněk (např. Akutáza, trypsin atd..)
- Napipetování optimalizovaného množství buněk do jamky
- Optional: Cytospin
- Samovolná agregace buněk např. za vytvoření tzv. embryoidního tělíska



Živočišné tkáňové kultury – Tvorba buněčných agregátů

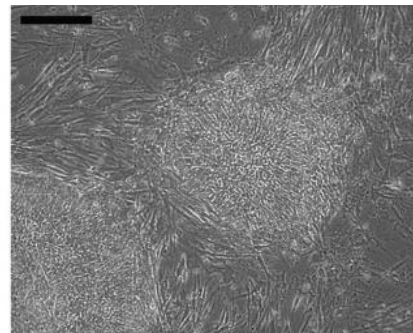
- Mechanické suspenzní metoda (kolonie, části monovrstvy atd.)
- Gravitační agregace (jamky, cytopsin)

- Disociace tkáňové kultury na jednotlivé buňky musí být opatrná, aby nepoškodila přiléhající ECM a receptory buněk (např. Akutáza, trypsin atd..)
- Napipetování optimalizovaného množství buněk do jamky
- Optional: Cytospin
- Samovolná agregace buněk např. za vytvoření tzv. embryoidního tělíska

Porovnání mechanické a mikrojamkové tvorby agregátů

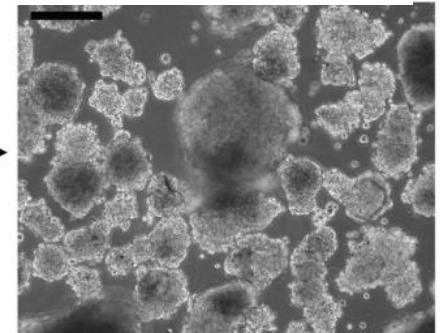
1) Mechanická/enzymatická disociace na shluky buněk

Lidské embryonální buňky

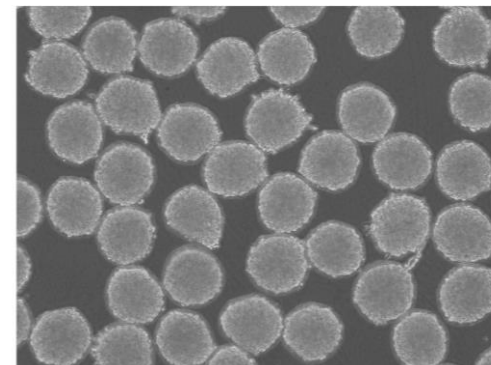


Enzymatic
dissociation
to cell clumps

Embryoidní tělísko



2) Embryoidní tělíska vytvořená z buněčné suspenze na mikrojamkách



Výhoda v homogenitě a reprodukovatelnosti

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba buněčných agregátů

- Mechanické suspenzní metoda (kolonie, části monovrstvy atd.)
- Gravitační agregace (jamky, cytospin)

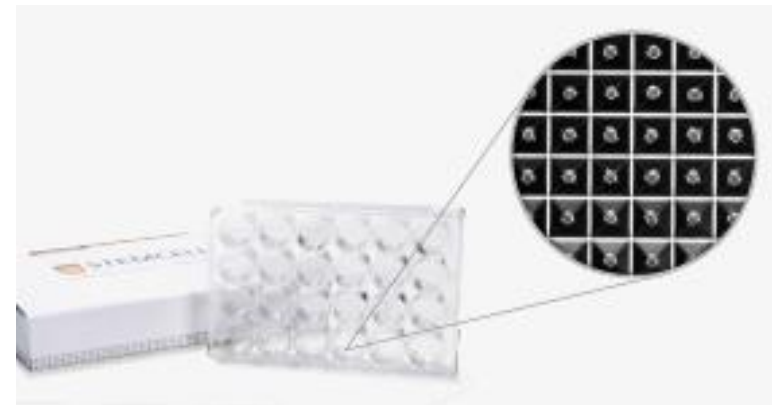
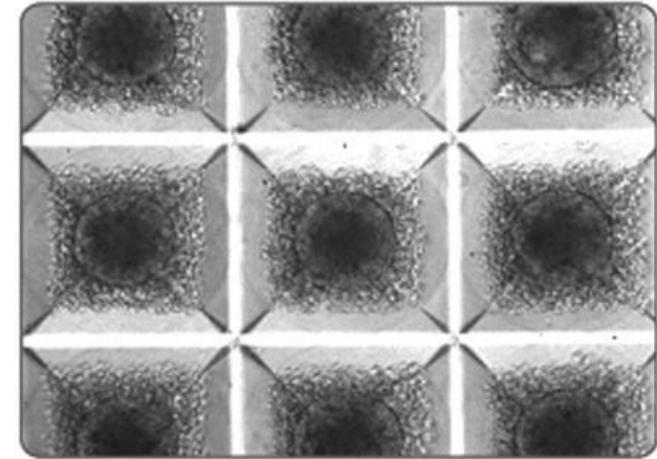
➤ Disociace tkáňové kultury na jednotlivé buňky musí být opatrná, aby nepoškodila přiléhající ECM a receptory buněk (např. Akutáza, trypsin atd..)

➤ Napipetování optimalizovaného množství buněk do jamky

➤ **Optional: Centrifugační agregace**

➤ Samovolná agregace buněk např. za vytvoření tzv. embryoidního tělíska

Agrewell

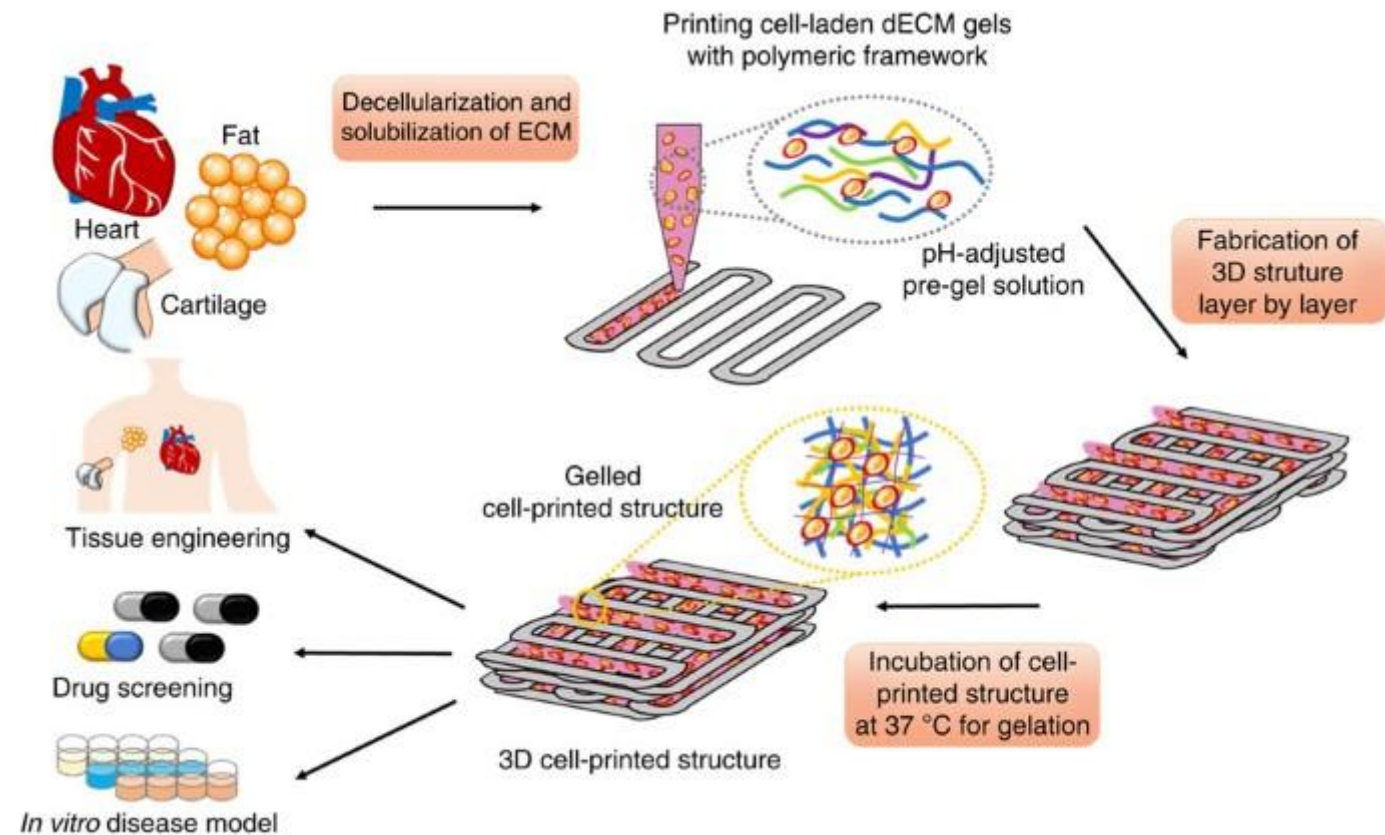


Živočišné tkáňové kultury – Tvorba buněčných agregátů

- Mechanické suspenzní metoda (kolonie, části monovrstvy atd.)
- Gravitační agregace (jamky, cytopsin)
- 3D tisk -

Snaha o získání 3D matrice, nebo přímo natištěné tkáňové kultury, které umožní:

- adhezi buněk
- regulaci interakce s ECM
- regulaci hustoty buněk
- konstrukci praktických tvarů



Živočišné tkáňové kultury – Tvorba buněčných agregátů

- Mechanické suspenzní metoda (kolonie, části monovrstvy atd.)
- Gravitační agregace (jamky, cytospin)
- 3D tisk - **matric**

Materiály:

Agaróza, Alginát, chitosan, kolagen, decelularizovaná ECM, Fibrin/fibrinogen, **Želatina**, grafen, hyaluronová kyselina, hydroxylapatit, atd..



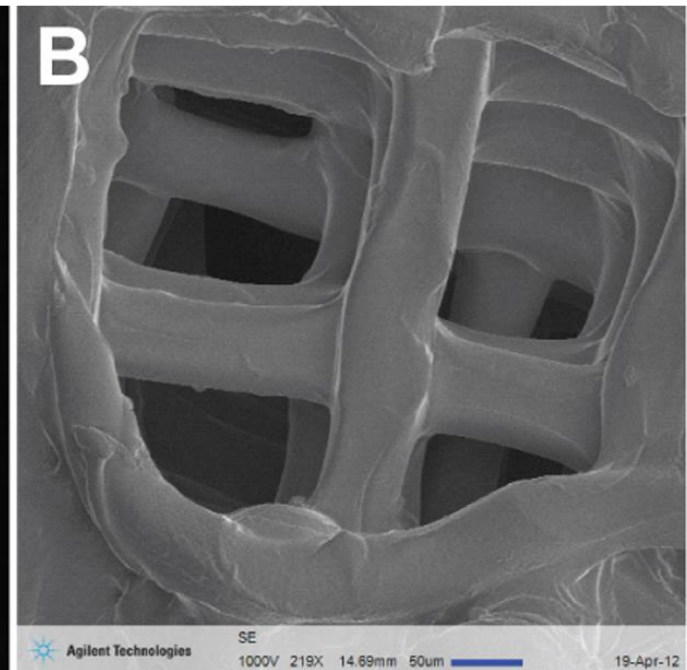
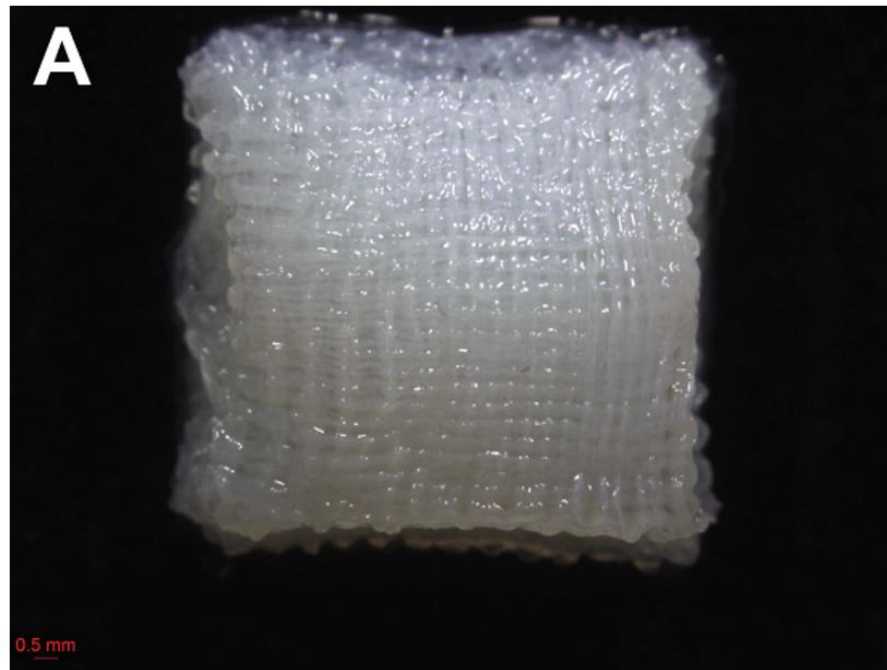
Vždy je nutné otestovat kompatibilitu daného materiálu s konkrétní buněčnou kulturou.

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba buněčných agregátů

- Mechanické suspenzní metoda (kolonie, části monovrstvy atd.)
- Gravitační agregace (jamky, cytopsin)
- 3D tisk - **matric**

Materiály (většinou tzv. hydrogely):

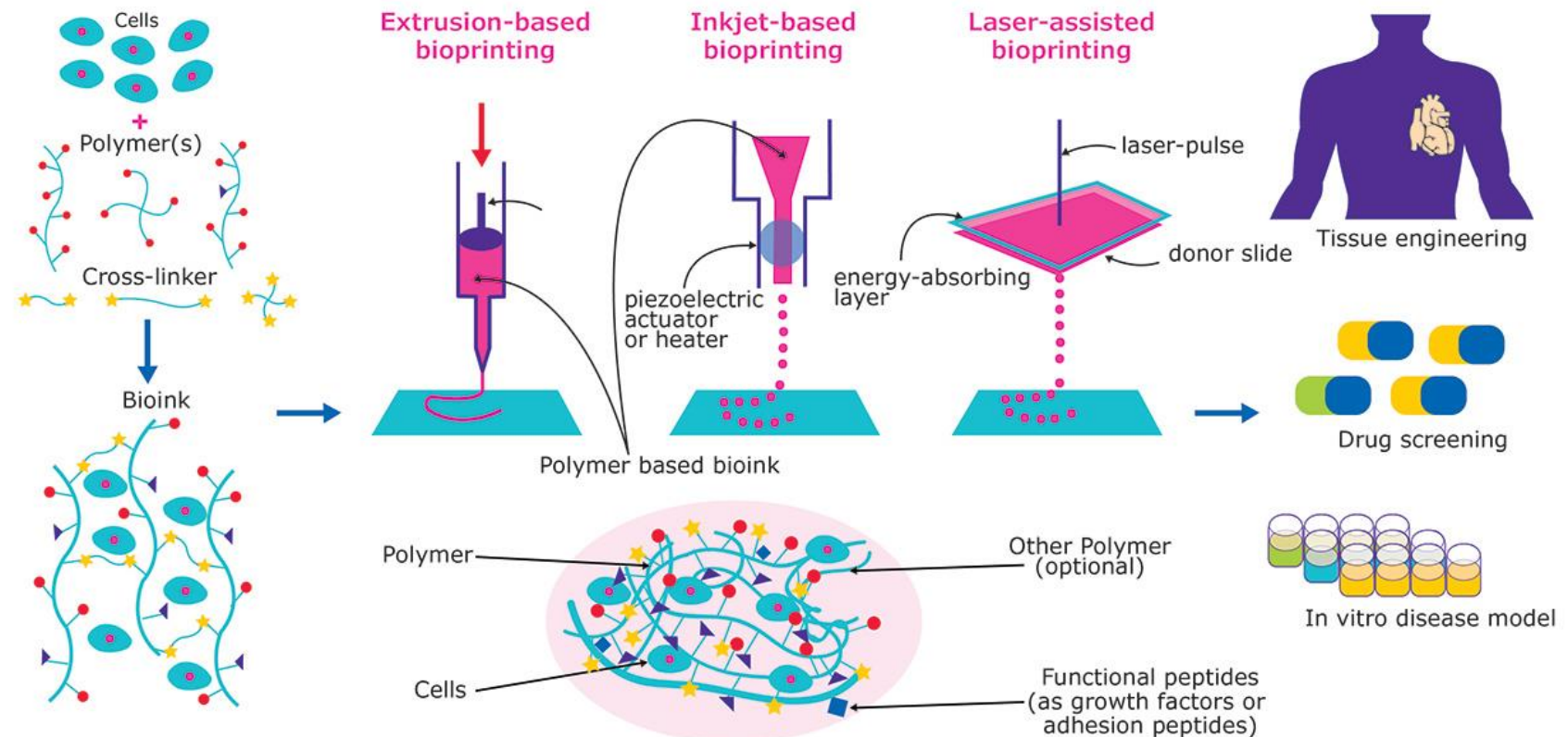
Agaróza, Alginát, chitosan, kolagen, decelularizovaná ECM, Fibrin/fibrinogen, **Želatína**, grafen, hyaluronová kyselina, hydroxylapatit, atd..



Vždy je nutné otestovat kompatibilitu daného materiálu s konkrétní buněčnou kulturou.

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba buněčných agregátů

- Mechanické suspenzní metoda (kolonie, části monovrstvy atd.)
- Gravitační agregace (jamky, cytopsin)
- 3D tisk - **matric**
- **přímý tisk**
tkáňových kultur



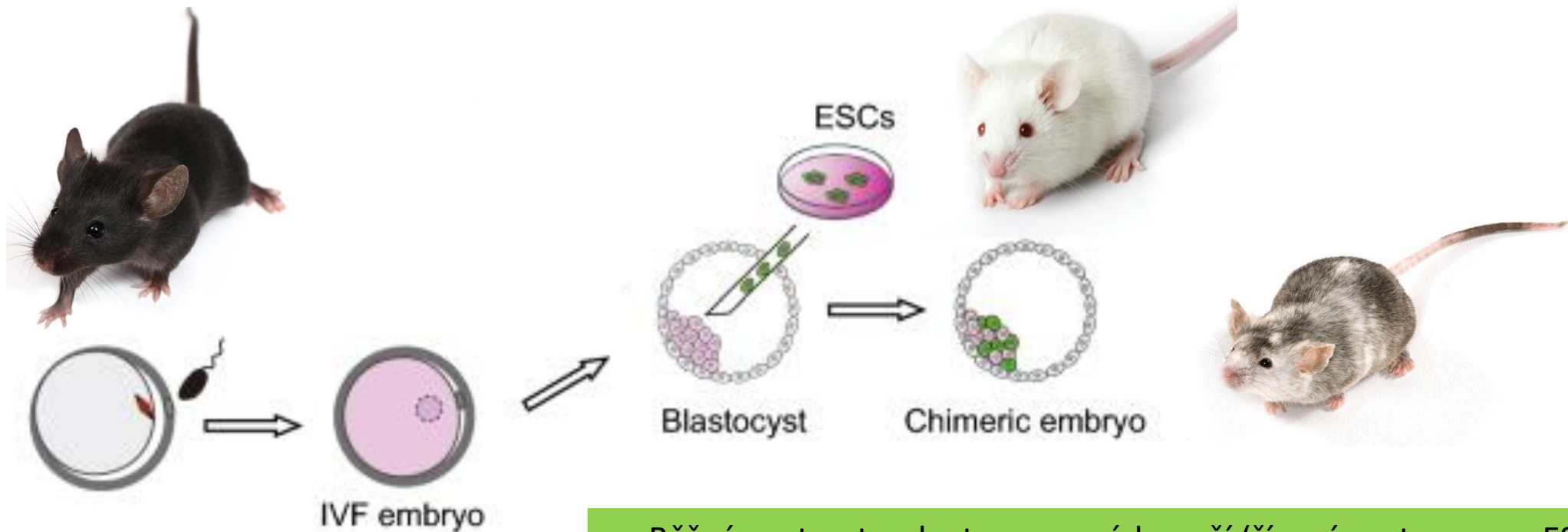
Nad organoidem je už jen celý orgán.. můžeme ho vytvořit?

..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)

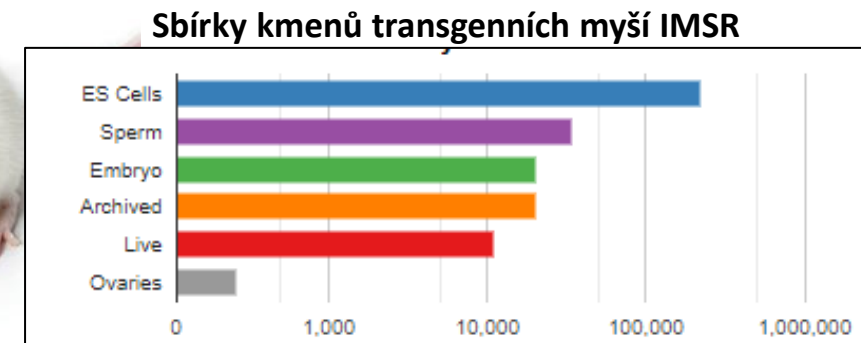
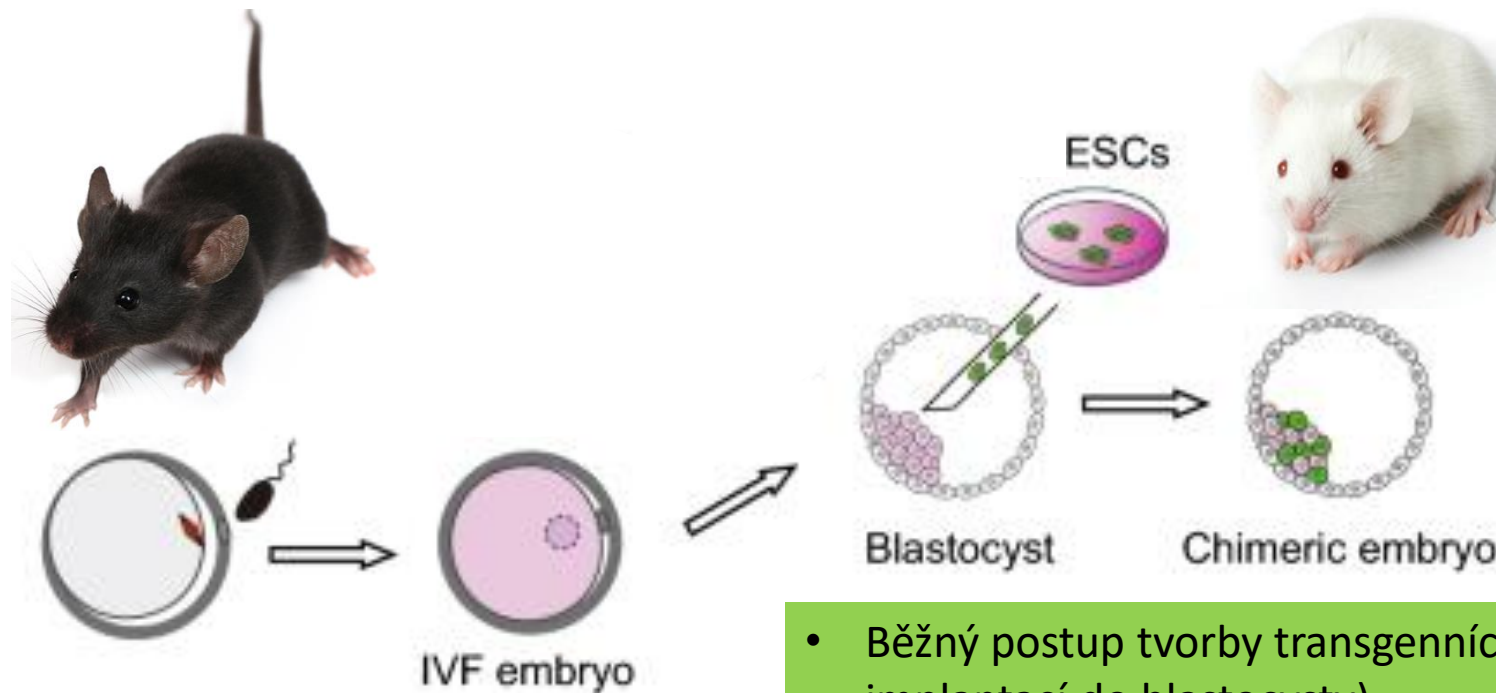


- Běžný postup tvorby transgenních myší (řízená mutageneze ES před implantací do blastocysty)

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)

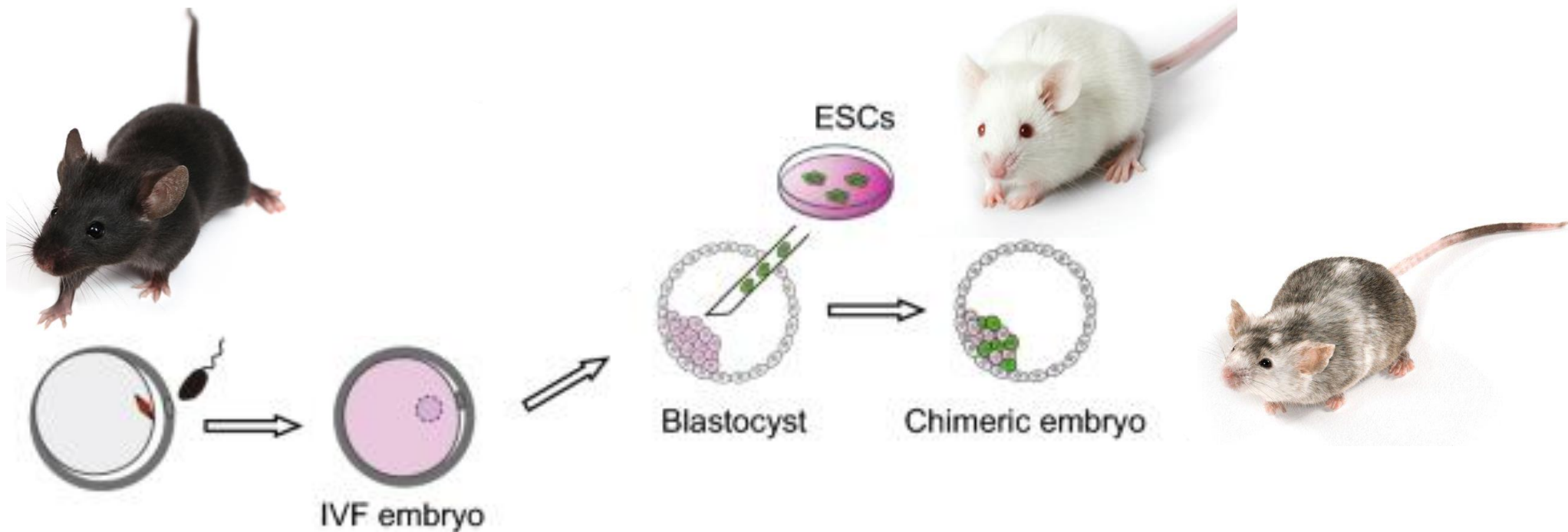


- Běžný postup tvorby transgenních myší (řízená mutageneze ES před implantací do blastocysty)
- Přes 100 tis kmenů transgenních myší po světě

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chiméreních 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 chimérodních embryí

Tvorba chimér:

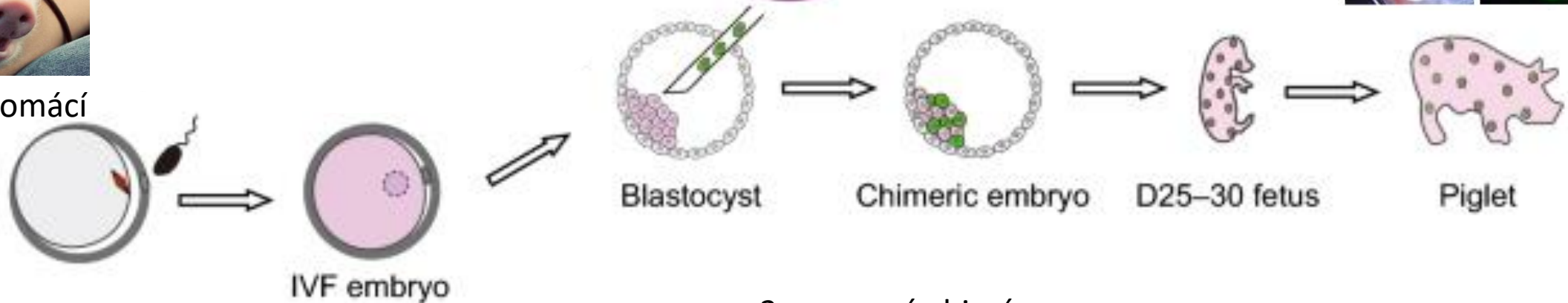
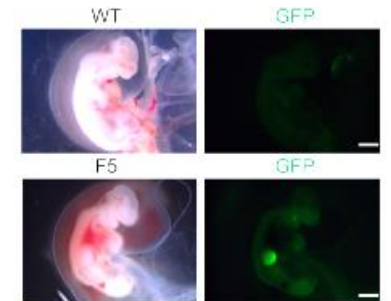
- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)



Prase domácí



Makak jávský - buňky označené zeleným fluorescenčním proteinem (GFP)



- 2 narozené chiméry.
- Opičí buňky v srdci, játrech, slezině, plicích a kůži, ale i jinde..

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérodních embryí

Tvorba chimér:

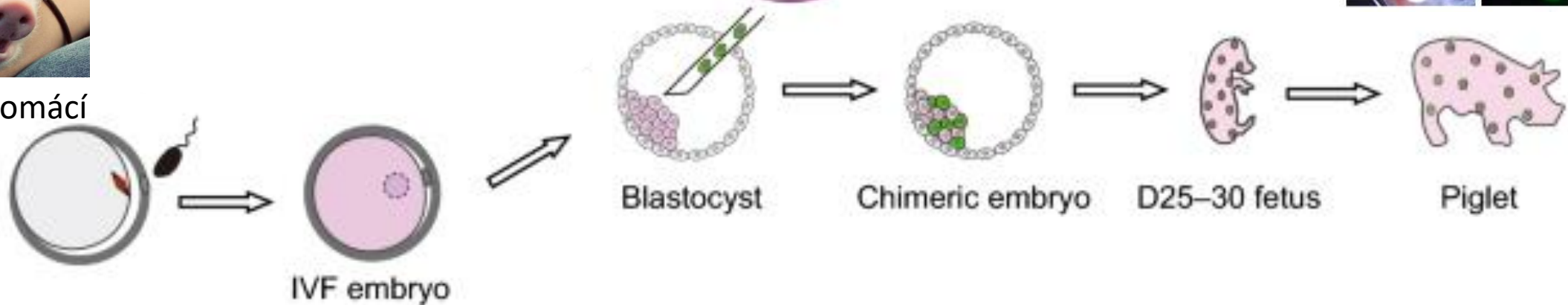
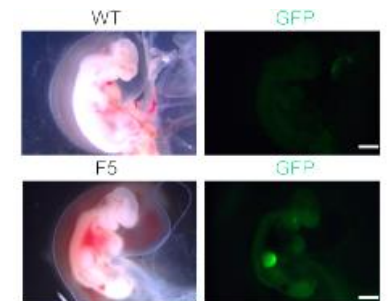
- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)



Prase domácí



Makak jávský - buňky označené zeleným fluorescenčním proteinem (GFP)



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



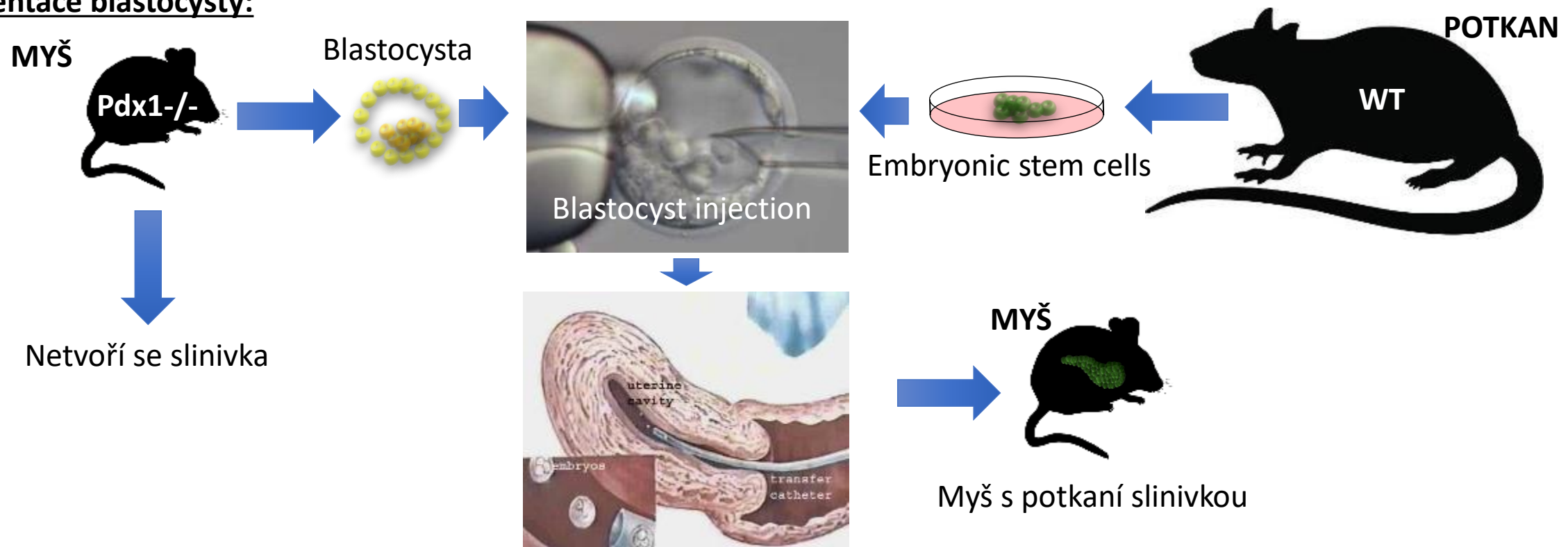
Netvoří se slinivka

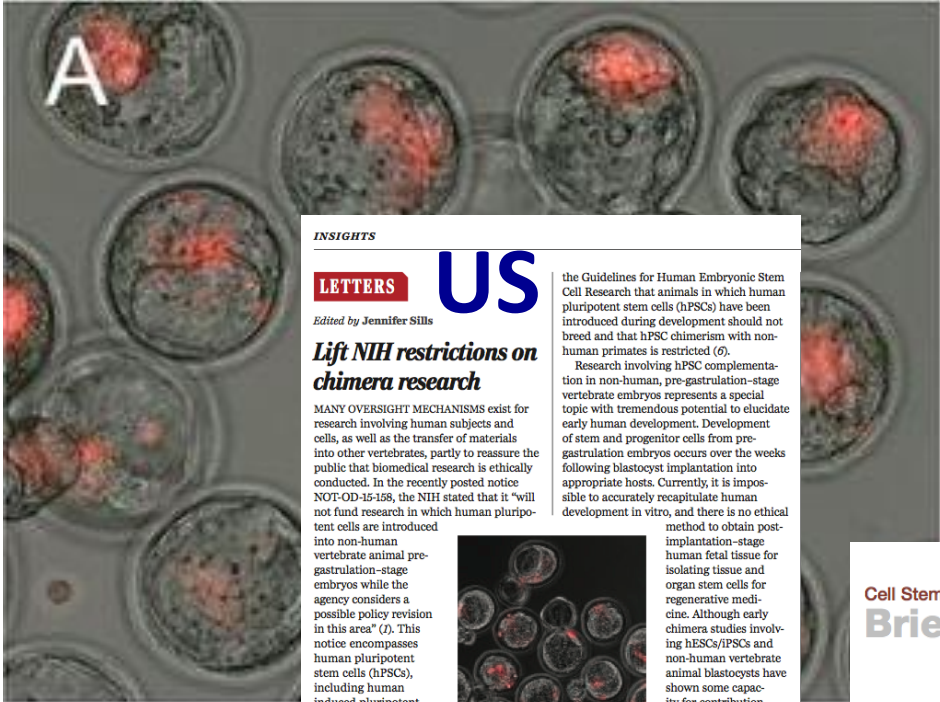
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

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

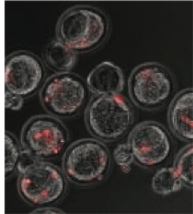
Lift NIH restrictions on chimera research

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-OD-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 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-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



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

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

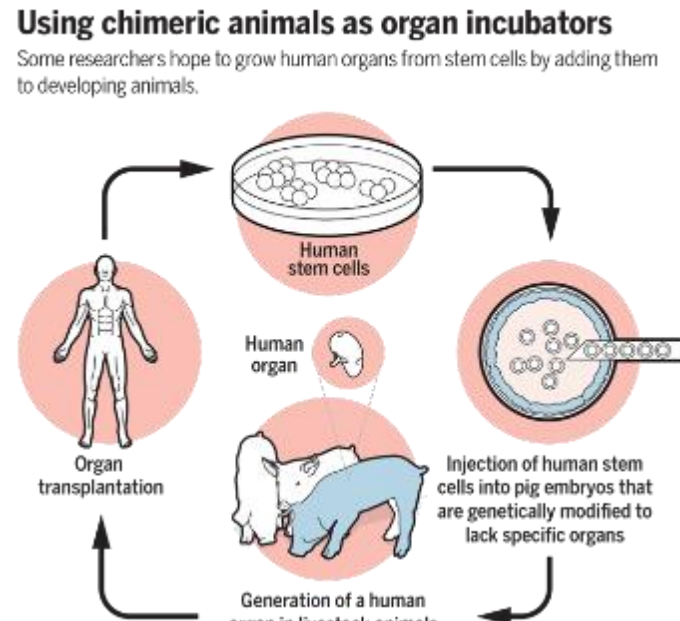
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

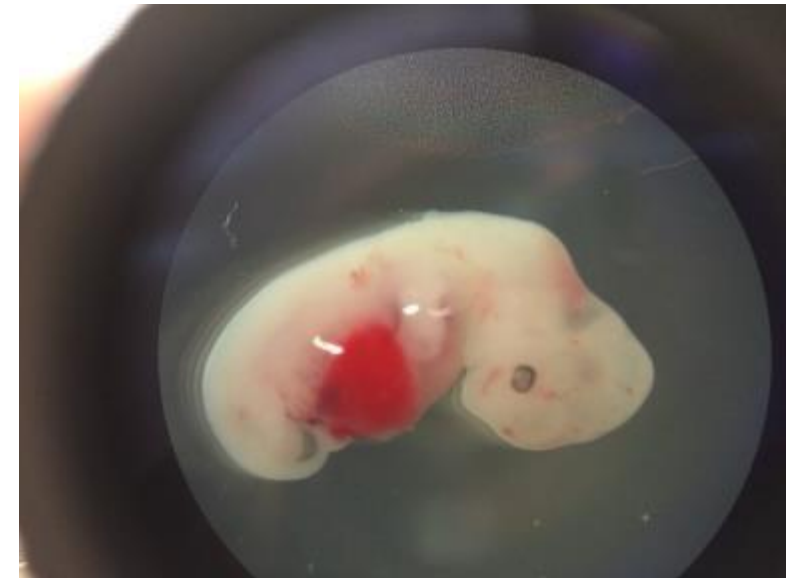
- Tkáňovou kulturu embryonálních kmenových buněk, nebo indukovaných pluripotentních kmenových buněk
- Implantace mikroinjekcí pluripotentních buněk do časného embrya (od 8-buněčné blastuly do preimplantační blastocysty)



Juan Carlos Izpisua Belmonte



Human – Pig Chimera



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



Děkuji za pozornost..

Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz