UNIVERZITA KARLOVA
FAKULTA FARMACEUTICKÁ

Katedra biologických a lékařských věd

Embryonální kmenové buňky a buněčná terapie

(bakalářská práce)

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.
Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Vladimír Semecký, CSc.

Hradec Králové, květen 2007 Šárka Kroupová

Děkuji Doc. RNDr. Vladimíru Semeckému za odborné vedení a poskytnutí informací a studijních materiálu, které jsem využila při sestavování bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem na této bakalářské práci pracovala samostatně, a že jsem použila uvedenou literaturu.

OBSAH

1. ÚVOD …….. 6

2. EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY ……. 8

2.1. Časový přehled výzkumu kmenových buněk ……..… 9

2.2. Založení linií hES buněk ……. 12

2.3. Laboratorní testy k identifikaci ES buněk ……. 14

2.4. Vlastnosti lidských ES buněk ……. 16

2.5. Diferenciace ES buněk ……... 17

2.6. Růstové faktory kmenových buněk ……. 19

2.6.1. Růstové faktory hematopoézy …… 19

2.6.2. Růstové faktory epidermálních buněk …… 20

2.7. Význam a potenciální využití kmenových buněk 21

3. DOSPĚLÉ KMENOVÉ BUŇKY ……..…… 23

3.1. Charakteristika a výzkum dospělých kmenových buněk ……. 24

3.2.Výskyt a funkce dospělých kmenových buněk ……. 25

3.3. Testy k identifikaci dospělých kmenových buněk ….…….. 26

3.4. Diferenciace dospělých kmenových buněk 27

4. BUNĚČNÁ TERAPIE ...…… 31

4.1. Vývoj transplantačních terapií …….. 33

4.2. Imunologická tolerance a transplantace …… 34

4.3. Hematopoetické kmenové buňky –

Imunologická tolerance transplantace...…… 36

4.4. Možnosti léčby některých onemocnění ……. 37

4.4.1. Reparace nervové tkáně …… 37
4.4.2. Reparace svalové tkáně …… 40

5. KMENOVÉ BUŇKY A ETICKÉ OTÁZKY …… 44
5.1. Etické otázky …… 45
5.2. Etická pravidla 47

6. ZÁVĚR …..... 51

7. SOUHRN …….... 53

8. SUMMARY 55

9. SEZNAM ZKRATEK 57

10. SEZNAM LITERATURY 60

1. ÚVOD

Problematika kmenových buněk zaznamenala v poslední době velký rozvoj. Tato bakalářská práce je zaměřena na popis kmenových buněk z hlediska biologického, medicínského a etického.

Pro pochopení biologie kmenových buněk představoval objev způsobu *in vitro* kultivace lidských kmenových (hES) buněk. hES buňky lze získat při potratech nebo z embryí při *in vitro* fertilizaci (1).

ES buňky jsou nediferencované buňky na rozdíl od specifických dospělých buněk, avšak mají schopnost se formovat v dospělé buňky. Nediferencované ES buňky mohou proliferovat neurčitou dobu v kultuře, proto by mohly poskytnout neomezený zdroj specifických, klinicky důležitých dospělých kmenových buněk jako jsou kostní, svalové, jaterní nebo krevní buňky (5).

Existuje mnoho způsobů jak by kmenové buňky mohly být použity v základním a klinickém výzkumu. Nicméně stále je mnoho překážek mezi slibem a realizací použitích kmenových buněk, které bude překonáno pokračujícím a intenzivním výzkumem kmenových buněk.

Význam kmenových buněk je obrovský, především proto, že to jsou buňky, které se mohou měnit na všechny typy buněk, ze kterých se skládá živý organismus, a vzbuzují tím naději, že by se mohly měnit podle přání lékařů a sloužit pro tzv. buněčnou terapii (2).

Ve využití kmenových buněk stojí mnoho etických překážek.

2. EMBRYONÁLNÍ KMENOVÉ BUŇKY

Embryonální kmenové buňky jsou nediferencované buňky, které mají schopnost se formovat v dospělé kmenové buňky. Mohou proliferovat neurčitou dobu v kultuře a tím poskytnout neomezený zdroj specifických a klinicky důležitých dospělých buněk (5).

2.1. Časový přehled výzkumu kmenových buněk

- 1898 – 1. pokusy o oplodnění savčího vajíčka mimo tělo (2).
- 1959 – 1. zpráva o zvířatech (králících) vypěstovaných *in vitro* oplodněním v USA (2).
- 1960 – Studie teratokarcinomů ve varlatech několika vrozených druhů myší signalizuje, že vznikly z ES buněk. Studie stanovila zárodečný karcinom buňky jako druh kmenové buňky (2).
- 1968 – Edwards a Bavister – 1. oplodněné vajíčko *in vitro* (2).
- 1970 – Buněčné linie odvozené z embryonálního karcinomu (EC buňky) injikované do myších blastocyst produkovaly chimerické myši. Kultivované EC buňky byly prozkoumány jako modely embryonálního vývoje, ačkoliv jejich sada chromozomů byla abnormální (2).
- 1973 – Prof. Martin Evans a jeho tým izoloval kmenové buňky z myší (4).
- 1978 – Luise Brown, 1. dítě narozené v Anglii *in vitro* oplodněním (2).
- 1980 – Narození dítěte *in vitro* oplodněním v Melbourne (2).

- 1981 – Evans, Kaufman a Martin odvození ES buněk z myší z vnitřní zárodečné hmoty blastocyst. Zavedení kultivačních podmínek pro růst pluripotentních myších ES buněk *in vitro*. ES buňky poskytly buněčné linie s normálním diploidním karyotypem a tvoří deriváty všech tří zárodečných vrstev stejně jako primární zárodečné buňky. Injikování ES buněk do myší vyvolalo tvorbu teratomu (2).
- 1981 - 1. narozené dítě v USA *in vitro* oplodněním (2).
- 1984 – 1988 – Andrews a kolektiv vyvinuli pluripotentní geneticky identické (klonální) buňky nazývané EC buňky z Tera – 2, buněčná linie z lidského teratokarcinomu varlat (2).
- 1989 – Pera a kolektiv odvodili klonální linie lidského zárodečného karcinomu buňky, které tvoří tkáně ze všech 3 primárních zárodečných vrstev. Buňky vykazují aneuploidii a jejich potenciál samovolně se diferencovat *in vitro* je typicky omezený. Chování lidských EC buněčných klonů se liší od myších EC nebo ES buněk (2).
- 1994 – Lidské blastocysty vytvořené pro reprodukční účely, použité pro *in vitro* oplození a darované pacienty pro výzkum jsou vytvořená v druhém projaderném období. Vnitřní buněčná hmota blastocysty je udržována v kultuře a tvořená agregáty s trofoblastovými buňkami na periferii a ES buňkami uvnitř. Buňky udržují kompletní sadu chromozómů (2).
- 1995 – Američtí vědci z Wisconsinu, získali jako první embryonální kmenové buňky z makaků. Jsou diploidní a mají normální karyotyp. ES buňky primátů se podobají lidským (4).
- 1998 – Thomson a kolektiv odvodili jako první lidské embryonální buňky z vnitřní buněčné hmoty normálních blastocyst, darovaných pacienty na oplodnění *in vitro* (2).

- 2001 – Legalizace klonování lidských embryí pro získávání kmenových buněk ve Velké Británii, ale blastocysty se musí zničit do věku 14 dní (4).
- 2003 – Založena v Británii UK Stem Cell Bank – 1. evropská banka kmenových buněk. Linie kmenových buněk jsou zde uchovávány zmrazené v tekutém dusíku (4).
- 2003 – Vědci z King College z Londýna vytvořili první linii embryonálních kmenových buněk (4).
- 2004 – Korejští vědci naklonovali 30 lidských embryí, nechali je dorůst do stadia blastocysty a získali z nich klonální buňky (4).
- 20.10. 2005 – V Soulu byla otevřena banka kmenových buněk pro vytváření a dodávání nových linií kmenových buněk (4).

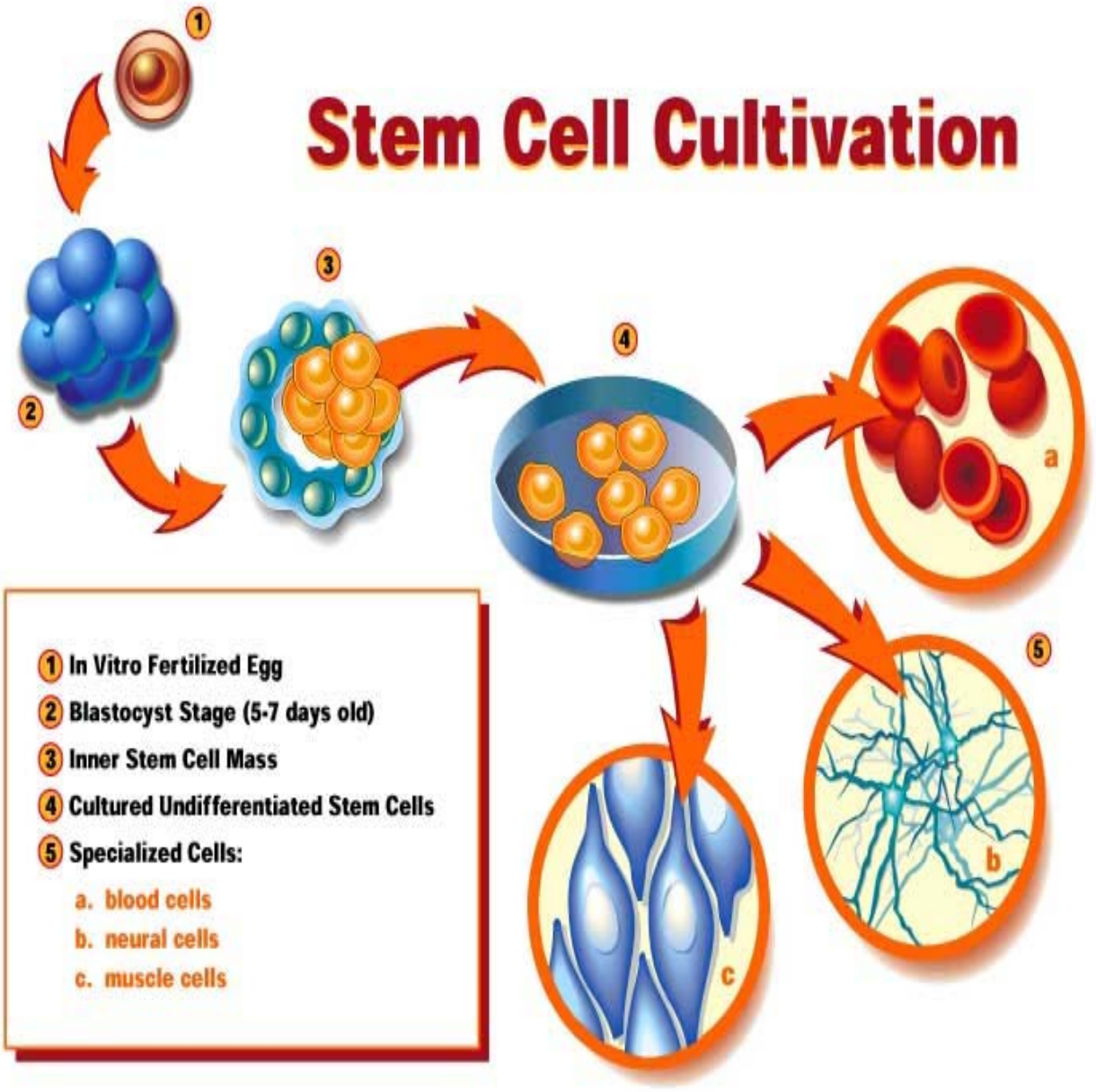
2.2. Založení linií hES buněk

Lidské embryonální kmenové (hES) buňky jsou odvozené z oplodněných embryí méně než týden staré. V listopadu 1998, skupina vědců Madisonské univerzity podporující vývoj pod vedením J. Thomsona stanovila 5 nezávislých linií kmenových buněk. To bylo poprvé, kdy byly hES buňky úspěšně izolovány a kultivovány (obr. 1). ES buňky jsou odvozeny z embryí, která se vyvinula z vajíček, ta byla oplodněna *in vitro* a po té darována pro výzkumné účely s informovaným souhlasem dárců. ES nejsou odvozena z vajíček oplodněných v ženském těle. Embrya, ze kterých jsou odvozena hES buňky jsou 4-5 dnů stará a jsou nazývána blastocysta. Blastocysta obsahuje 3 struktury : trofoblast, blastocel a vnitřní buněčnou hmotu. Trofoblast je vrstvou buněk, která obklopuje blastocyst. Blastocel je dutina uvnitř blastocysty. Vnitřní buněčná hmota je skupina přibližně 30 buněk v jednom konci blastocelu (1).

Buňky pěstující v laboratoři jsou nazývány buněčná kultura. hES buňky jsou izolovány přenosem vnitřní buněčné hmoty na laboratorní misky, které obsahují výživný bujón, známý jako živná půda. Buňky se dělí a rozšiřují přes povrch misky (1). Buňky jsou závislé na podpůrné vrstvě fibroblastů, která zajišťuje jejich kontinuální růst a expresi transkripčního faktoru Oct-4 (5). Po několika dnech, buňky vnitřní buněčné hmoty začnou proliferovat a mačkají se v misce. Po té jsou odstraněny a dány do čerstvých pěstovacích misek. Proces nahrazení buněk je několikrát opakován po mnoho měsíců a je nazýván subkultivace (1).

Každý cyklus kultivace se nazývá pasáž. Po 6 měsících z původních 30 buněk vnitřní buněčné hmoty vytěží miliony ES buněk.

ES buňky, které se množily v buněčné kultuře 6 měsíců a nebo více bez diferenciace jsou pluripotentní, zdají se být geneticky normální a jsou nazývány embryonální kmenovou buněčnou linií (1).



Obr. 1. Kultivace kmenových buněk (6).

2.3. Laboratorní testy k identifikaci ES buněk

V různých fázích během procesu vytváření embryonálních kmenových buněčných linií, vědci testují, zda buňky prokazují vlastnosti , které ES buňky mají mít. Tento proces se nazývá popis.

Vědci, kteří studují hES buňky dosud nesouhlasili se standardními soupravami testů, které měří základní vlastnosti buňky. Vědci potvrzují, že mnoho testů, které používají nejsou dobrými indikátory velmi důležitých biologických vlastností a funkcí buněk. Nicméně laboratoře, které pěstují lidské embryonální kmenové buněčné linie používají několik druhů testů (1). Tyto testy zahrnují:

- Pěstování a subkultivaci kmenových buněk po mnoho měsíců. Toto zabezpečí, že buňky jsou schopné dlouhodobé samoobnovy. Vědci buňky vyšetřují mikroskopicky, vidí, že buňky vypadají zdravě a zůstávají nediferencované (1).
- Používání specifických technik, které určí přítomnost povrchového ukazatele, který lze nalézt pouze na nediferencovaných buňkách. Další důležitý test je na přítomnost proteinu nazývaného Oct-4. Oct-4 typicky produkují nediferencované buňky. Oct-4 je transkripční faktor, který je důležitý pro zapnutí a vypnutí genů pro buněčnou diferenciaci a embryonální vývoj (1).
- Zkoumání chromozómů mikroskopicky. Tato metoda, ukazuje, zda jsou chromozomy nějak poškozeny, či je změněn jejich počet. Tato metoda neukazuje mutace v buňkách (1).
- Určení zda mohou být buňky subkultivovány po zamrazení, rozmrazení a vyměnění (1).

- Testování, zda jsou hES buňky pluripotentní:

  - Dovolení buňkám se spontánně diferencovat v kultuře.
  - Manipulování buňkami, tak aby se diferencovaly v určité specifické buněčné typy.
  - Podání buněk do imunosupresovaných myší a testování na formaci benigního tumoru, který se nazývá teratom (nádor, ze zárodečných tkání embrya). Teratomy typicky obsahují směs mnoha diferencovaných nebo částečně diferencovaných buněčných druhů – to je znamení, že ES buňky jsou schopné diferenciace do vícenásobných buněčných druhů (1).

2.4. Vlastnosti lidských ES buněk

Lidské ES buňky se od buněk nižších primátů morfologicky příliš neliší. Avšak lidské a myší ES buňky se značně liší. Jednak rychlostí růstu, lidské ES buňky rostou pomaleji. Populace lidských buněk se zdvojnásobí za 36 hodin, zatímco myší už za 12 hodin (5).

Hlavní rozdíl je, že se liší genotypem povrchového buněčného antigenu. Lidské ES buňky exprimují antigeny SSEA-3 a SSEA-4 (ty jsou specifické pro vývojové stadium 3 a 4), TRA-1-60 a TRA-1-81 (glykoproteidy s vysokou molekulovou hmotností) a alkalickou fosfatázu. Naproti tomu myší ES buňky neexprimují SSEA-3 ani SSEA-4, ale exprimují SSEA-1. Funkce těchto antigenů je prozatím neznamá (5).

Další odlišnost je různý požadavek na kultivaci *in vitro* pro nediferencovaný růst. Myší ES buňky vyžadují LIF (faktor inhibující leukémii), naproti tomu lidským buňkám samotný LIF nestačí. Lidské ES buňky vyžadují podpůrnou vrstvu fibroblastů, přítomnost séra nebo bFGF (bazický fibroblastový podpůrný faktor), v případě, že kultivace probíhá v médiu bez séra. Fibroblastové vrstvy jsou nutné pro zabránění diferenciace hES buněk. Nyní se prozkoumává možnost udržet nediferencované buňky bez podpůrných buněk (5).

Lidské ES buňky vykazují velmi stabilní karyotypy. Tyto vlastnosti činí hES buňky významným modelem pro studium mechanismů vývojové biologie a pro diferenciaci buněk pro transplantační terapii (5).

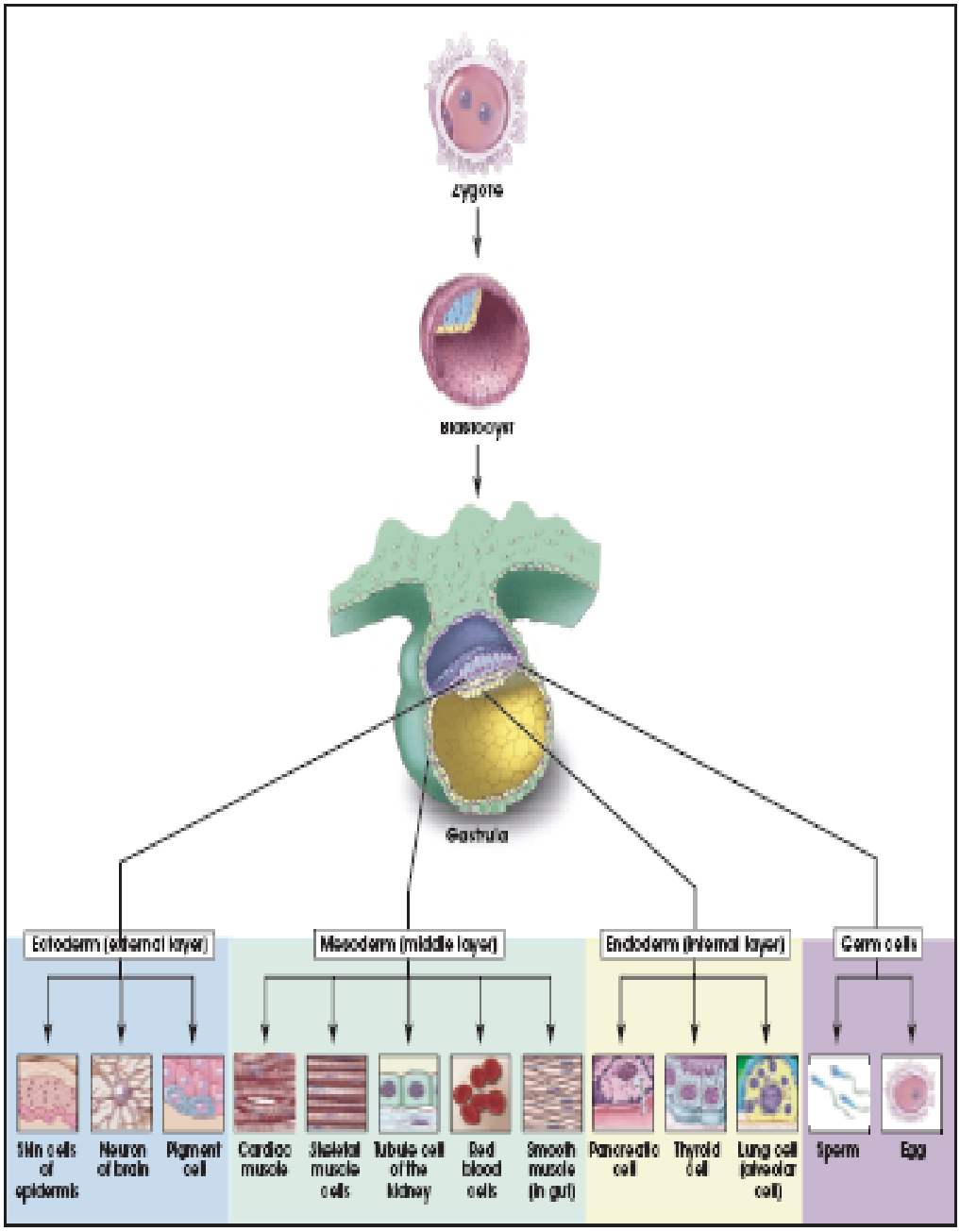
Dále hES buňky exprimují vysoké hodnoty telomerázy (ribonukleotidprotein) , který doplňuje chybějící úseky telomer na konci chromosomů, čímž udržuje jejich konstantní délku. Tím je vysvětlena nesmrtelnost lidských buněčných linií (5).

Vlastnosti těchto buněk jako je normální karyotyp a vysoká aktivita telomerázy, mají význam pro studium buněčného stárnutí a regeneraci kmenových buněk (5).

2.5. Diferenciace ES buněk

Dokud jsou ES buňky v kultuře za jistých podmínek, mohou zůstávat nediferencované. Pokud jsou buňky odebrány z podpůrných vrstev a přesunuty do kultivační suspenze, začnou se diferencovat v multicelulární shluky – embryoidní tělíska (EBs). Mezi 7 – 14 dny postdiferenciačního vývoje se lidská EBs vyvíjí přes řadu stádií. Od jednoduchých podobným morulám až po dutá a cystická EBs. hES buňky jsou schopné v kultuře diferencovat až na trofoblast, to prokázala syntéza α -fetoproteinu a mRNA choriového gonadotropinu (CG) a produkce bioaktivního CG. Tím lidské ES buňky představují vhodný model pro studium vývoje a funkce lidské placenty.

hES buňky, které diferencují v kultuře jsou schopné aktivovat expresi genů zadaných pro každou ze tří zárodečných vrstev (5).



Obr. 2. Diferenciace kmenových buněk (1).

2.6. Růstové faktory

Růstové faktory jsou biochemické sloučeniny, které „ zapínají ‘‘ geny kmenových buněk, a ty se v důsledku toho vyvíjejí v žádoucí typy buněk (2).

2.6.1. Růstové faktory hematopoézy

Mohou být produkovány trámčinou kostní dřeně, jinými typy buněk, které jsou nutné pro přežití, diferenciaci a proliferaci hematopoetických buněk.

V roce 1987 vědci publikovali představu o působení hematopoetických růstových faktorů, především myeloidní růstové faktory jako IL-3, GM-CSF (granulocyte – macrophage colony stimulating factor) , G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) a M-CSF (macrophage colony stimulating factor). Tyto faktory působí na různých úrovních diferenciace a mají různé cílové buňky. Interakce mezi různými faktory udržují správnou rovnováhu mezi jednotlivými typy diferencovaných buněk a mezi kmenovými buňkami, progenitory a terminálně diferencovanými buňkami. Každý růstový faktor se váže na specifické receptory a vazba některého faktoru na jeho receptor může vést k poklesu exprese receptorů pro ostatní růstové faktory. V tomto období byly zároveň popsány faktory s inhibičním efektem na hematopoetické buňky. Cytokiny jsou produkovány různými druhy buněk a jejich účinky se vzájemně překrývají. Vytvářejí komplikovanou síť na níž se podílí víc než 100 různých cytokinů, jejichž účinek je zprostředkován specifickými receptory (5).

Objev MGF (mast cell growth factor), který se původně označoval jako růstový faktor pro žírné buňky, vedl k řadě objevů pro proliferaci kmenových buněk. V současné době je znám jako SCF; c-kit-ligand (stem cell faktor nebo též steel factor). Stimuluje proliferaci pluripotentních hematopoetických buněk a zvyšuje jejich citlivost na jiné hematopoetické růstové faktory, zejména na IL-1, IL-3, IL-6.
Má dvě formy, membránově vázanou a solubilní (chybí u myší kmene Steel – proto také název Steel factor). Tvoří se ve stromálních buňkách kostní dřeně jako fibroblasty, adipocyty a endotelové buňky (5).

Podle Schofieldovy hypotézy (1978) , kmenová buňka sídlí v optimálním mikroprostředí, nazývaném niche – z francouzského slova výklenek, okénko, uhnízděný, usazený. Po mitotickém dělení zůstává uvnitř niche jen jedna kmenová buňka, druhá je nasměrována k diferenciaci. Kmenová buňka uvnitř niche získá vysokou schopnost sebeobnovy. Výsledkem budou kmenové buňky s různou schopností sebeobnovy a různým potenciálem pro diferenciaci (5).

2.6.2. Růstové faktory epidermálních buněk

Stejně jako u hematopoézy je i proliferace epidermálních buněk řízena růstovými stimulačními a inhibičními faktory. EGF (epidermal growth factor) a TGF-α (transforming growth factor alfa) zvyšují počet buněčných generací v kulturách lidských keratinocytů bez zvyšování rychlosti růstu a stimulují laterální migraci proliferujících buněk na okraji expandujících kolonií. TGF-β (transforming growth factor beta) inhibuje proliferaci a způsobuje zastavení růstu v G1 fázi.

Je známo, že keratinocyty syntetizují molekuly, které regulují jejich vlastní růst (např. TGF-α a β), aže hladina exprese se může měnit jako odpověď na stimuly z okolí (5).

2.7. Význam a potenciální využití kmenových buněk

Existuje mnoho způsobů jak mohou být kmenové buňky používány v základním a klinickém výzkumu. Nicméně stále je zde stále mnoho překážek mezi slibem a realizací použití. Toto bude překonáno pokračujícím a velice intenzivním výzkumem kmenových buněk (1).

Rakovina a vrozené defekty jsou dány abnormálním buněčným dělením a diferenciací. Pro pochopení genetických a molekulárních kontrol těchto procesů, můžeme navrhnout strategii pro terapii (5).

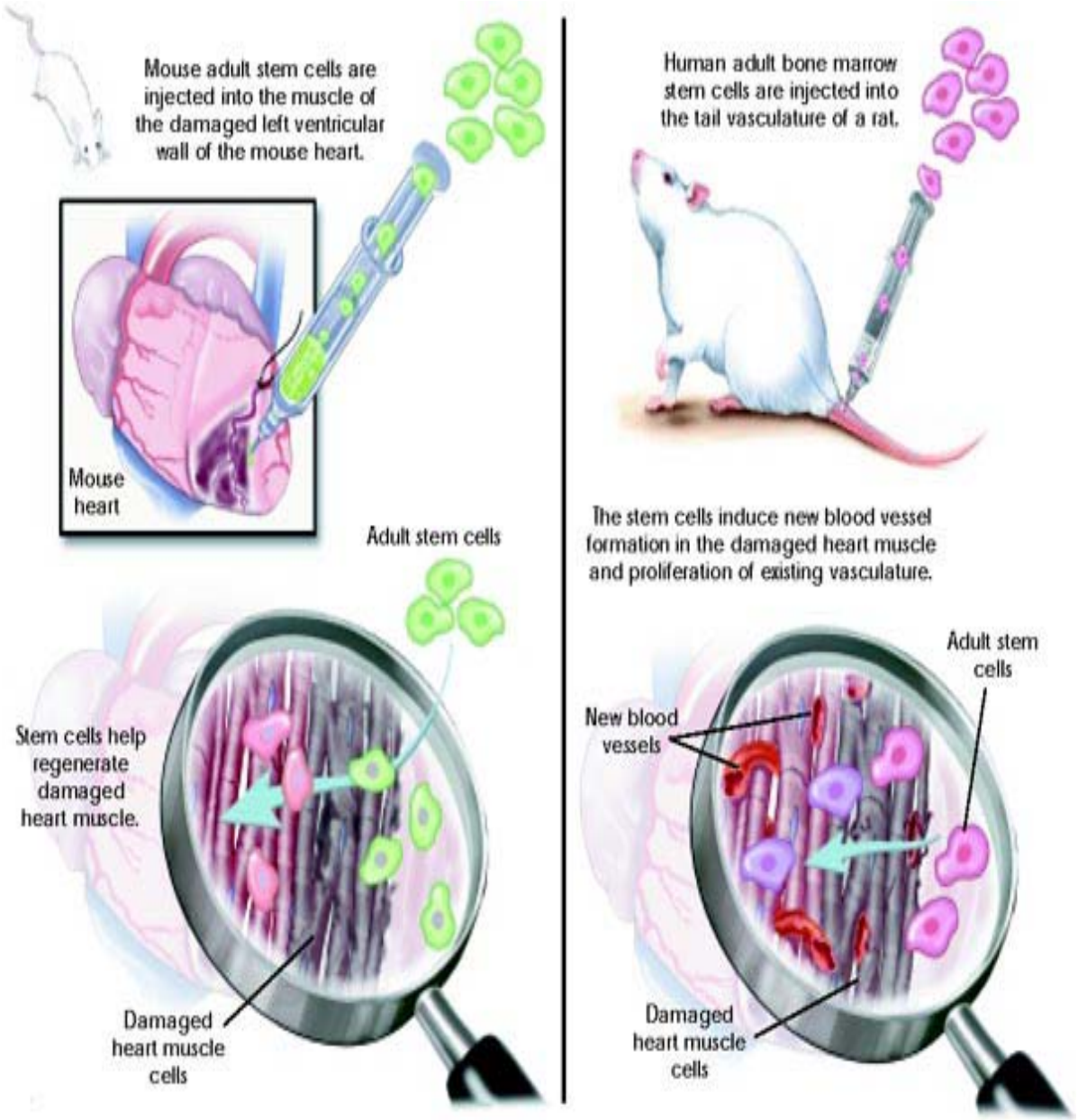
Lidské embryonální kmenové buňky mohou být použity pro testování nových léků. Například nové léky by mohly být testované na bezpečnost diferenciace (1).

Možná nejdůležitější možná aplikace lidských kmenových buněk je tvoření buněk a tkání, které je možné použít pro buněčnou terapii. Darované orgány a tkáně jsou používány pro nahrazení nemocné nebo zničené tkáně, avšak potřeby daleko převáží zásoby. Kmenové buňky nasměrované k diferenciaci do specializovaných buněčných typů, by nabízely možnost obnovitelného zdroje náhradních buněk a tkání. Možnost léčit nemoci jako jsou Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, poranění míchy, mrtvice, popáleniny, srdeční onemocnění, diabetes mellitus, artritida, revmatismus (5).

Potenciální možností může být vygenerování zdravého srdečního svalu v laboratoři a po té vpravení srdečních buněk do pacienta s chronickým poškozením srdce. Předběžný výzkum u myší ukazuje, že

kmenové buňky kostní dřeně transplantované do poškozeného srdce, mohou generovat srdeční buňky a úspěšně opět osídlit srdeční tkáň.

Další studie naznačila, že je možné nasměrovat diferenciaci embryonálních kmenových buněk nebo dospělých kmenových buněk kostní dřeně do buněk srdečního svalu (5).



Obr. 3. Oprava srdečního svalu dospělými kmenovými buňkami (6).

3. DOSPĚLÉ KMENOVÉ BUŇKY

3.1. Charakteristika a výzkum dospělých kmenových buněk

Dospělá kmenová buňka je nediferencovaná. Vyskytuje se diferencovanými buňkami v tkáních nebo orgánech. Má schopnost sebeobnovy nebo se může diferencovat do specializovaných buněčných druhů tkáně nebo orgánů. Prvořadá role dospělých kmenových buněk v žijícím organismu je oprava tkáně ve které sídlí. Někteří vědci dávají přednost názvu somatická kmenová buňka místo dospělá kmenová buňka. Na rozdíl od ES buněk, které mají původ ve vnitřní buněčné mase blastocysty, původ dospělých kmenových buněk je ve zralých tkáních neznámý (1).

Výzkum dospělých kmenových buněk nedávno vzbudil velké vzrušení. Vědci nalezli dospělé kmenové buňky v mnoha tkáních, než sami předpokládali. Tento nález vedl vědce k otázce, zda by dospělé kmenové buňky mohly být vhodné pro transplantace. Ve skutečnosti, krev tvořená kmenovými buňkami kostní dřeně byla používána pro transplantaci po 30 let. Jisté druhy dospělých kmenových buněk se zdá, že budou mít schopnost se diferencovat do několika různých buněčných druhů, ale za daných podmínek. Jestliže by se mohla diferenciace buněčných druhů řídit v laboratoři, pak by se tyto buňky mohly stát základem terapií mnoha vážných běžných nemocí (1).

Výzkum dospělých kmenových buněk začal asi před 40 lety. V roce 1960, vědci objevili, že kostní dřeň obsahuje nejméně dva druhy kmenových buněk. Jedna populace, nazývána hematopoetické kmenové buňky, tvoří všechny druhy krevních buněk v těle. Druhá populace, nazývána stromální kmenové buňky kostní dřeně (mezenchymové), byla objevena o několik let později. Stromální buňky jsou smíšenou buněčnou populací, která tvoří kost, chrupavku, tuk a vazivo (1).

Také v roce 1960, vědci, kteří studovali krysy, objevili dvě oblasti mozku, které obsahují dělící se buňky, které se stávají nervovými. Navzdory těmto zprávám, většina vědců věřila, že se nové nervové buňky nemohou tvořit v dospělém mozku.

Až v roce 1990, vědci souhlasili s tím, že dospělý mozek obsahuje kmenové buňky, které jsou schopné tvořit tři hlavní buněčné druhy mozku:

- Astrocyty
- Oligodendrocyty
- Neurony

3.2. Výskyt a funkce dospělých kmenových buněk

Dospělé kmenové buňky byly identifikovány v mnoha tkáních a orgánech. Důležitým bodem pro pochopení dospělých kmenových buněk je, že jejich výskyt ve tkáních nebo orgánech je velmi malý. Kmenové buňky se zdržují ve specifických oblastech každé tkáně, tam kde mohou zůstávat v klidu – nedělit se po mnoho let, dokud nejsou aktivovány onemocněním nebo poraněním tkáně. Dospělé tkáně, které obsahují kmenové buňky jsou: mozek, kostní dřeň, periferní krev, krevní cesty, kosterní sval, kůže a jaterní buňky.

Vědci se v mnoha laboratořích snaží nalézt cestu pro pěstování dospělých kmenových buněk v kultuře, manipulování s nimi pro vytvoření specializovaných buněčných druhů. Tak by mohly být využity k léčbě zranění nebo onemocnění. Například z potenciálních ošetření zahrnují nahrazování dopamin produkujích buněk v mozku pacientů s Parkinsonovou nemocí, vývoj inzulín produkujících buněk pro léčbu diabetu mellitu I. typu, opravu poškozeného srdečního svalu po infarktu myokardu (1).

3.3. Testy k identifikaci dospělých kmenových buněk

Vědci příliš nesouhlasí s kritérii které testy by se měly používat k identifikaci a testování dospělých kmenových buněk. Nicméně, často používají jeden nebo více z následujících třech metod:

- Označení buněk v žijící tkáni molekulárními markery a po té určení specializovaných buněčných druhů, které tvoří tuto tkáň.
- Odstranění buněk z žijícího zvířete, označení buněk v buněčné kultuře a transplantování buněk zpět do jiného zvířete, určení zda buňky znovu osídlí tkáň svého původu.
- Izolací buněk, pěstování buněk v kultuře a manipulací s nimi, často přidáváním růstových faktorů nebo představující nové geny, určení jakými buněčnými druhy se mohou stát.

Také jednotlivá dospělá kmenová buňka by měla být schopna tvořit linie geneticky identických buněk, známý jako klon, který pak dává vzniknout všem příslušným diferencovaným buněčným typům. Vědci chtějí ukázat, že kmenová buňka může dát vznik klonu v buněčné kultuře, nebo, že purifikovaná populace příslušných kmenových buněk může znovu osídlit tkáň po transplantaci do zvířete. V poslední době infikovanými dospělými kmenovými buňkami s virem, který je jednoznačný identifikátor, ke každé jednotlivé buňce, vědci byli schopni ukázat, že jednotlivé buněčné klony dospělých kmenových buněk mají schopnost znovu osídlit zraněné tkáně v žijícím zvíře (1).

3.4. Diferenciace dospělých kmenových buněk

Jak již bylo uvedeno dospělé kmenové buňky se nacházejí v mnoha tkáních a orgánech a vstupují tím do normální diferenciace, tvoří tak specializované buněčné druhy tkáně, které osídlují. Dospělé kmenové buňky, mají schopnost tvořit specializované buněčné druhy dalších tkání, známé jako transdiferenciace nebo plasticita (1).

- Normální diferenciace – v žijícím organismu se dospělé kmenové buňky dělí a dávají vznik zralým buněčným druhům, které mají charakteristické struktury a funkce specializované tkáně. Příklady diferenciace dospělých kmenových buněk:
  - Hematopoetické kmenové buňky dávají vznik všem druhům krevních buněk: červené krvinky, B lymfocyty, T lymfocyty, přirození zabíječi (NK buňky) , neutrofily, bazofily, eosinofily, monocyty, makrofágy a destičky.
  - Stromální kmenové buňky kostní dřeně (mezenchymové kmenové buňky) dávají vznik různým druhům buněk: kostní buňky (osteocyty), buňky chrupavky (chondrocyty), tukové buňky (adipocyty) a jiné druhy spojovacích tkáňových buněk jako ty ve šlachách.
  - Nervové kmenové buňky v mozku dávají vznik astrocytům, oligodendrocytům a neuronům.
  - Epiteliální kmenové buňky v lemech zažívacího ústrojí se vyskytují v hlubokých zářezech a dávají vznik několika buněčným druhům: absorbující buňky, pohárkové buňky, Panethovy buňky a enteroendokrinní buňky.

- Kožní kmenové buňky se vyskytují v základní vrstvě epidermis a na spodu vlasových folikulů. Epidermální kmenové buňky dávají vznik keratinocytům, které migrují k povrchu kůže, kde tvoří ochranou vrstvu.

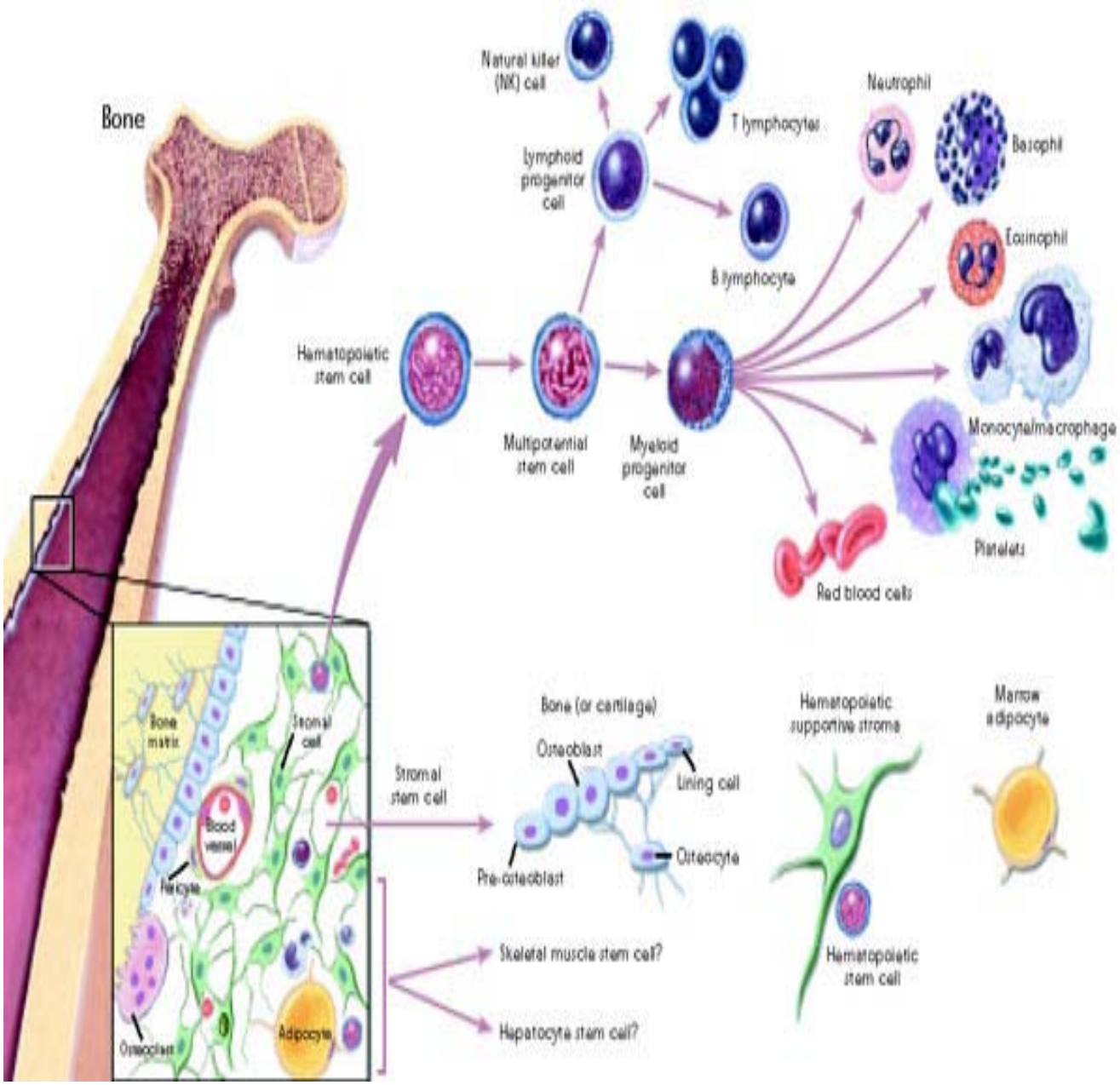
❖ Plasticita a transdiferenciace dospělých kmenových buněk.

Plasticita je schopnost zadaných (tkáňově specifických) kmenových buněk změnit repertoár produkovaných buněk potomstva. Tato změna je možná pokud taková kmenové buňka vycestuje do nového niche (mikroprostředí) , které poskytne signální molekuly vedoucí k aktivaci nových genů umožňujících produkci nového a odlišného potomstva (5).

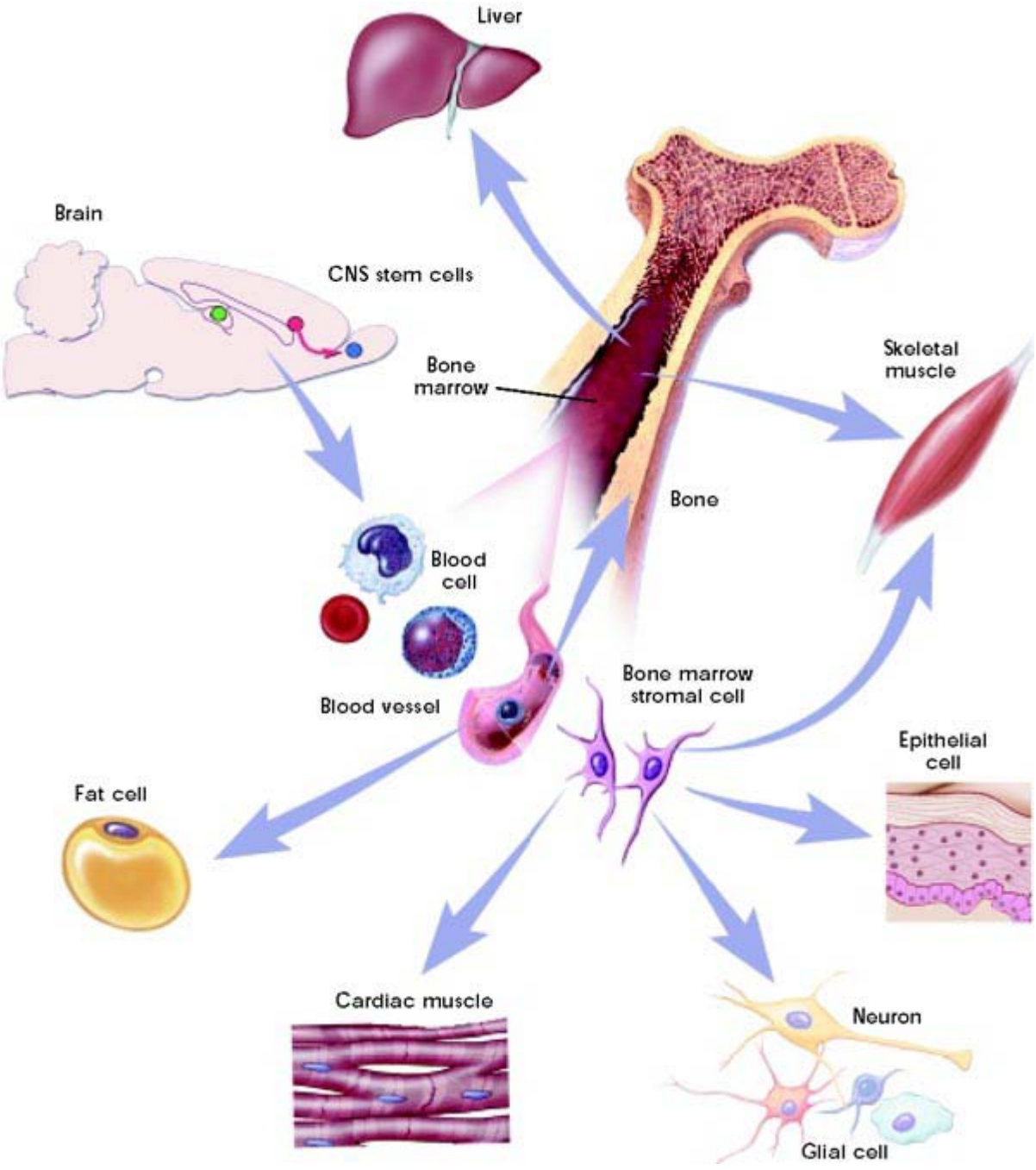
Příklady plasticity:

- Hematopoetické kmenové buňky mohou diferencovat do tří hlavních buněčných druhů mozku, kosterních svalových buněk, buněk srdečního svalu a jaterních buněk.
- Stromální buňky kostní dřeně mohou diferencovat do: buněk srdečního svalu, a buněk kosterního svalu.
- Kmenové buňky mozku mohou diferencovat do krevních buněk a do buněk kosterního svalu.

Aktuální výzkum je zaměřen k určování mechanismů, kteří tvoří základ plasticity kmenových buněk. Jestliže takové mechanismy budou identifikovány, popsány a kontrolovány, kmenové buňky za zralé tkáně by mohly být vpravovány do poškozené tkáně a opravit ji.



Obr. 4. Diferenciace dospělých kmenových buněk (6).



Obr. 5. Plasticita dospělých kmenových buněk (6).

4. BUNĚČNÁ TERAPIE

Kmenové buňky, jsou buňky, které se mohou měnit na všechny typy buněk, ze kterých se skládá živý organismus, a vzbuzují tím naději, že by se mohly měnit podle přání lékařů a sloužit pro tzv. buněčnou terapii. Důsledky pro medicínu by mohly být velice významné, ale jejich využití bude předcházet ještě velni intenzivní výzkum. Pro využití kmenových buněk stojí v cestě ještě mnoho praktických i etických překážek (2).

Regenerativní medicína je nový obor, který zahrnuje buněčnou terapii, využití kmenových buněk pro léčbu nervového, kardiovaskulárního systému, léčbu diabetu, kostí, svalů, kloubů a dalších onemocnění. Je to lékařský směr zaměřený na reparaci poškozených orgánů a tkání často s pomocí kmenových buněk, kde je snahou nahradit poškozené a staré buňky produkcí nových (3).

Transplantace je vnesení buněk, tkání či orgánů do organismu příjemce. Míra úspěšnosti transplantace závisí na co největší podobnosti mezi transplantátem a příjemcem. Podobnost nebo rozdílnost určují imunokompetentní buňky (lymfocyty) , podle povrchových molekul MHC (major histocompatibility complex) (5). Transplantace dělíme na:

- Alogenní - transplantace buněk, tkání a orgánů mezi jedinci stejného živočišného druhu. Jedná se o transplantaci mezi geneticky odlišnými jedinci, která vede k odvržení transplantátu (5).
- Autologní – transplantace buněk, tkání a orgánů z jednoho organismu zpět stejnému jedinci. Nenavozuje imunitní odpověď a transplantát je přijat (5).

Hlavním problémem transplantace kmenových buněk je pochopení děje GvHD (graft versus host disease) , a tím problém nastolení imunologické tolerance (5).

4.1. Vývoj transplantačních terapií

Nemoci, které budeme moci léčit transplantací diferencovaných derivátů ES buněk jsou diabetes mellitus, při níž dochází k destrukci beta buněk Langerhansových ostrůvků pankreatu, Parkinsonova nemoc, ta vzniká destrukcí dopaminergních neuronů v oblasti substancia nigra středního mozku. Studie na zvířatech ukazují, že bude možné úspěšně léčit i řadu dalších onemocnění jako jsou míšní poranění, Purkyňova buněčná degenerace, selhání jater, selhání srdce, Duchennova muskulární dystrofie, osteogenesis imperfekta a další (5).

V posledních letech se docílilo v transplantační léčbě velkého pokroku, avšak stále existují překážky v aplikaci buněčné transplantace v rutinní léčbě. Například potřeba velikých dávek imunosupresiv pro prevenci rejekce transplantátu a nedostatek orgánů od mrtvých dárců. Transplantace na bázi ES buněk by znamenala vyřešení problému nedostatku buněk, protože jejich přísun by byl neomezený. Problém rejekce by se mohl vyřešit genetickou modifikací ES buněk (5).

První krok k úspěšnému používání terapie na bázi ES buněk je důkaz, že hES buňky mají schopnost se diferencovat v určitý typ buněk, který bude nutné ze smíšené populace purifikovat. Při samovolné diferenciaci však vznikají heterogenní populace buněk, které nelze pro transplantaci použít. Jen vzácně vedly specifické růstové faktory nebo kultivační podmínky ke vzniku kultur obsahující pouze jediný buněčný typ (5).

Druhý krok spočívá v posouzení, zda diferencované buněčné deriváty budou fungovat fyziologickým způsobem. To znamená, že například sekrece inzulínu v buňkách pankreatických ostrůvků je normální a odpovídá hladině glukózy (5).

Třetím krokem bude důkaz efektivity na modelech nemocí u větších zvířat. ES buňky makaka jsou výborným preklinickým modelem pro vývoj transplantačních terapií na bázi ES buněk a studia pro prevenci imunitní rejekce. U makaka jsou již připraveny vhodné modely Parkinsonovy nemoci a diabetu mellitu (5).

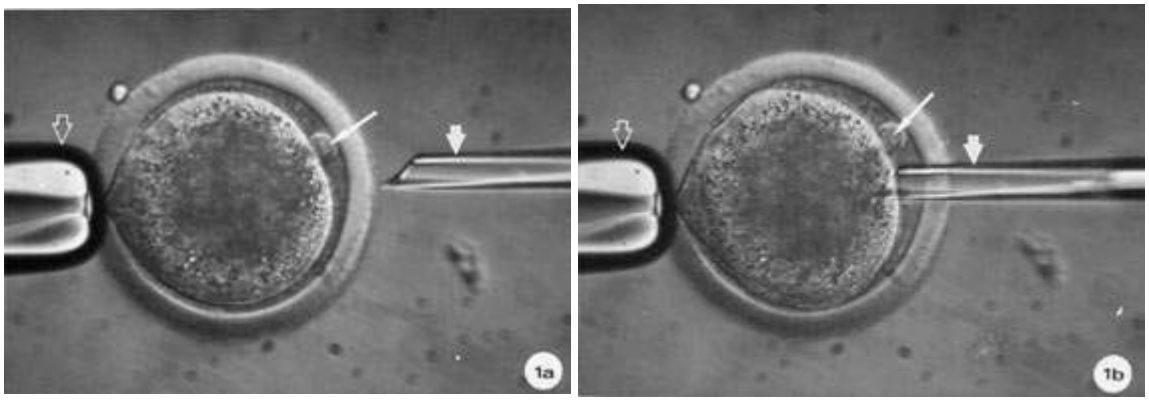
Čtvrtým krokem se musí posoudit možnost, zda transplantace hES buněk lidským příjemcům může mít za následek tvorbu tumorů z odvozených ES buněk. Výsledkem pak může být teratom nebo teratokarcinom. Tyto tumory nejsou většinou metastatické a nevedou k rychlému úhynu hostitelských zvířat. Je třeba navrhnou metodu, která nebude selhávat a která zabrání růstu potenciálnímu růstu tumoru. Jakmile bude navržena, bude možné testovat různé strategie na modelu makaka s použitím ES buněk makaka a teprve po té přejít na klinické studie u lidí (5).

4.2. Imunologická tolerance a transplantace

Vážný problém je rejekce buněčného štěpu, který je odvozen z hES buněk, zprostředkovaná imunitním systémem příjemce. V současné době jsou přístupné imunosupresivní režimy, které brání rejekci štěpu. Používaná imunosupresiva bohužel nejsou ideální a jsou spojena s četnými komplikacemi jako jsou zhoršené hojení ran, výskyt oportunních infekcí, poléková intoxikace, kožní malignity a lymfomy označované jako posttransplantační lymfoproliferativní poruchy.

Aby se snížila nebo eliminovala imunologicky zprostředkovaná rejekce, mohou být ES buňky geneticky upraveny. Potenciální metoda pro omezení imunitní odpovědi je snížení imunogenicity transplantovaných buněk homologií rekombinací. Ta měla vyřadit MHC molekuly I. a II. třídy v myších ES buňkách. Přesto byly kožní štěpy odvrhovány. Jinou možností by bylo zavedení genů pro imunosupresivní molekuly, jako je Fas-ligand, do ES buněk nebo odstranění nezbytných imunostimulačních proteinů jako je antigen B7 nebo CD40-ligand. Profil exprese MHC molekul u derivátů hES buněk závisí na stupni diferenciace (5).

Specifické odstranění buněk exprimujících MHC antigeny z transplantátů solidních orgánů obecně zvyšuje přežití štěpu. Transplantáty odvozené z ES buněk mohou v některých případech poskytovat značnou imunologickou výhodu ve srovnání s tkáňovými transplantáty od zemřelých lidí (5). Další metodou může být technologie přenosu jader. Tato technika by mohla vést k buňkám odvozeným z ES buněk, které jsou přesnou genetickou kopií buněk příjemce. Imunitní odpověď by tedy měla být minimální. Technika spočívá v tom, že se vyjme jádro ze somatické buňky pacienta, získané třeba biopsií kůže, a injikuje se do enukleovaného oocytu. Cytoplazma oocytu má schopnost reprogramovat diferencovaná jádra. Blastocysta, která vznikne z takového oocytu, bude zdrojem pro založení nové linie hES buněk, která bude geneticky shodná s každým genem pacienta (3).



Obr. 6. Enukleace savčího oocytu. Fixační pipeta (prázdná šipka) udržuje oocyt ve stabilní pozici. Enukleační pipetou (plná šipka) odsáváme chromozomy, které se nacházejí pod prvním pólovým tělískem (tenká šipka) (3).

Na základě popsaných principů by neměl být transplantát odmítnut, protože bude pacientovým imunitním systémem pokládán za vlastní. Pak nebude nutná léčba imunosupresivy (5).

4.3. Hematopoetické kmenové buňky a imunologická tolerance a transplantace

Hematopoetická kmenová buňka (HSCs) je dokonale přizpůsobena k produkci krevních buněk díky své schopnosti sebeobnovy a nesmrtelnosti. Lze je transplantovat fétu, přičemž můžeme očekávat, že příjemci vydrží po celý život. Za druhé mohou produkovat všechny linie krevních buněk, tím umožňují léčit širokou škálu hematopoetických poruch. Dnes můžeme transplantovat přes alogenní bariéry a s nízkou dávkou buněk navodíme chimerismus, kdy u příjemce po celou dobu života vedle sebe existují dvě hematopoetické populace (5).

Hematopoetický chimerismus je dalším způsobem prevence rejekce transplantovaných buněk. Avšak úspěch transplantace kostní dřeně nebo hematopoetických kmenových buněk vyžaduje obecně vysokou toxickou imunosupresy (5).

4.4. Možnosti léčby některých onemocnění

Perspektivními směry buněčné terapie jsou: terapeutické klonování, embryonální kmenové buňky, léčba fétu, dospělé kmenové buňky, využití humorálních působků k usměrnění chování kmenových buněk a případně genetická modifikace kmenových buněk (3). Dříve se zdálo, že by dospělé embryonální kmenové buňky mohly být jakýmsi etickým kompromisem embryonálních kmenových buněk, dnes však chápeme, že jednotlivé přístupy jsou navzájem propojeny a zodpovězení etických otázek se oddaluje. Vědci již prokázali, že některé buněčné typy, jako neurony, svalové buňky a beta buňky pankreatu, lze získat kultivací ES buněk (5).

Problematika klinického využití kmenových buněk není zcela vyřešena jelikož řada experimentů není ještě uzavřena.

4.4.1. Reparace nervové tkáně

Transplantace buněk pro náhradu neuronů představuje nový a nadějný přístup k léčbě progresivních neurodegenerativních onemocnění. První klinicky testovanou transplantací byla náhrada dopaminergních neuronů u pacientů s Parkinsonovou nemocí (PD). Úspěch s náhradou buněk v léčbě PD je založen na následujících předpokladech: symptomy PD jsou závislé na dysfunkci či ztrátě dopaminergních neuronů v nigrostriátové dráze. Transplantované dopaminergní neurony do dopamin

deficitního corpus striatum mohou nahradit neurony ztracené v důsledku nemoci a mohou zvrátit symptomy nemoci. Výsledky rozsáhlých experimentálních prací prováděných na zvířatech prokázaly terapeutický efekt náhrady buněk (5).

Klinické testy s transplantací fetálních buněk u PD se vyvíjely ve dvou fázích :

- 1987 – Zahájena série malých testů s pečlivě vybranými pacienty. Studie poskytly, že štěpy mohou být terapeuticky efektivní.
- Začátek 90. let – NIH (Národní ústav zdraví) podpořil druhou fázi. Dvě slepé studie přinesly veliké zklamání.

V současné době pokračují otevřené studie s cílem získat více informací. Sbírají se údaje ze 4 center (Švédsko, Francie, USA a Kanada). Klinické zlepšení se dostavovalo 6 – 24 měsíců po transplantaci spojené s regenerací pohybové aktivace premotorického a suplementárního motorického kortexu, což je deficit, o němž se myslí, že je příčinou hypokinetických symptomů PD. Hlavním problémem je, že výsledky byly rozdílné mezi jednotlivými centry a mezi skupinami pacientů. Dalším problémem je, že publikovaná klinická zlepšení po transplantaci mohou pramenit buď ze zaujatosti výzkumných pracovníků, účinků placeba nebo obou. Studie sponzorované NIH poukázaly na dva problémy: v transplantovaných skupinách byla pozorována malá účinnost léčby a některých pacientů vznikla po transplantaci dyskineze. Stále ještě nedokážeme plně využít transplantace fetálních buněk k dosažení žádoucích výsledků (5).

Další problémy transplantace:

- Problém dyskineze – Štěpy s vyšší produkcí dopaminu, by mohly být příčinou nechtěných pohybů. Další zdroj dyskineze by mohla být nerovnoměrná a nepravidelná inervace.
- Výběr pacientů – Pacienti s lehčí formou vykazují určitý klinický benefit. Mladší pacienti by mohli mít z transplantace větší prospěch.
- Výběr místa pro umístění štěpu
- Standardizace přípravy buněk pro transplantaci
- Problém imunosprese

Transplantace xenoštěpů, tzn. transplantace tkáně jednoho živočišného druhu jinému. Prase je považováno za správnou volbu zdrojové tkáně. Výhody jsou velké vrhy mláďat, potenciál pro větší buněčnou migraci a růst axonů v dospělém CNS. Hlavní nevýhodou jsou rizika zoonotické infekce, rejekce xenoštěpů, funkční kapacita a schopnosti xenoštěpů.

Xenotransplantáty prasečí nervové tkáně nabízejí určitou naději, přestože existuje množství problémů. Stále se hledají alternativní buněčné zdroje, včetně možného použití neurálních a embryonálních kmenových buněk (5).

4.4.2. Reparace svalové tkáně

Primární myopatie je charakteristická progresivním úbytkem kosterní svaloviny, který vede ke zhoršování pohyblivosti. U Duchennovy svalové dystrofie (DMD) vede k úplné paralýze a smrti (5).

Většina myopatií je způsobena mutacemi postihující proteiny, které tvoří supramolekulární spojení mezi cytoskeletem a extracelulární matrix, jako je dystrofin, jehož mutovaný gen je u DMD. Pokud chybí jeden z těchto proteinů, pak mechanická zátěž a kontrakce vedou k degeneraci svalových vláken. V první fázi nemoci se tvoří nová svalová vlákna fúzí satelitních buněk, které jsou nositely molekulárního defektu vláken. Jakmile se proliferační potenciál satelitních buněk vyčerpá, kosterní svalovina je nahrazena pojivovou tkání. Současná terapie DMD spočívá ve farmakologické supresi zánětlivých a imunitních odpovědí, které mají jen mírné a dočasné příznivé účinky. Budoucí postupy v léčbě spočívají v buněčné a genové terapeutické technologii. Transplantace myogenních nebo pluripotentních kmenových nebo progenitorových buněk by mohla vést ke klinickým úspěchům u pacientů s DMD nebo jinými formami dystrofie (5).

Během let se laboratoře zaměřily na problémy transplantace těchto buněk a výsledkem bylo postupné progresivní zvýšení regenerace, přežití a kolonizační efektivity injikovaných myoblastů u myších modelů. Myogenní buňky lze v malém počtu získat za svalových biopsií, *in vitro* však špatně rostou a rychle podléhají stárnutí (5).

Byla také zkoumána možnost použít gen MyoD pro indukci myogenní konverze nemuskulárních autologních buněk jako jsou kožní fibroblasty, jejichž růstový potenciál se u primárních myopatií nesnižuje.

Fibroblasty lze získat z různých zdrojů (např. kůže) , snadno se expandují a *in vitro* je lze geneticky modifikovat. Příklad genetické modifikace je vystavení fibroblastů adenovirovému vektoru, který do jejich genomu vnese aktivní gen pro MyoD, kultivované fibroblasty podstoupí myogenní diferenciaci jak *in vitro*, tak *in vivo.*

Toto je alternativa použití k transplantaci velkých množství geneticky modifikovaných fibroblastů směrovaných k mytogenezi s pomocí přechodné exprese MyoD *ex vivo.* Přímá i.m. injekce pro aplikaci myogenních buněk představuje neefektivní a nepraktickou cestu. Alternativní řešení je systémové zavedení (5).

Transplantace kostní dřeně pro náhradu svalů vyžaduje další testování. V roce 1999 experiment Gussoniho a kolektivu ukázal, že transplantací kostní dřeně dystrofin-deficitním myším, po 8 – 12 týdnech vznikl malý počet dystrofin-pozitivních vláken. Experiment přinesl zklamání, protože počet vláken je nedostačující (5).

U svalové dystrofie lidí je klinický obraz odlišný. Regenerační potenciál svalových satelitních buněk se ztrácí v prvních letech pacientova života a kosterní svaly prodělávají ireverzibilní degeneraci. Jackson a spol. dokázali, že svalová tkáň je zdrojem buněk schopných dlouhodobé hematopoetické rekonstituce při sériové transplantaci, přičemž ve svalovině je takových buněk ještě více než v samotné kostní dřeni. Termín plasticita použitý pro tuto příležitost, naznačuje kapacitu pluripotentních kmenových buněk diferencovat se po alternativních dráhách v závislosti na lokálních podnětech v různých tkáních nebo v odpovědi na specifické signály vysílané z místa poškození (5).

V současné době bohužel neexistují uspokojivé modely lidské svalové dystrofie, model dystrofie u psa je příliš drahý a postrádá

imunologickou a molekulární výbavu. V takové situaci bylo nutné začít s klinickými experimenty přímo u lidí, zaměřit se na vymezené a specifické biologické otázky a vyzkoušet kapacitu buněk kostní dřeně pro náhradu svalové tkáně na vhodném klinickém podkladě.

Zdá se, že selekce kmenových buněk s požadovanými pluripotentními vlastnostmi bude zřejmě krokem k vývoji transplantace kostní dřeně jako terapie primární dystrofie. Současně užívané terapie spojené s klinickou transplantací kostní dřeně zahrnují ozáření a použití toxických myeloablativních léků a představují pro prekancerózní pacienty značná rizika, která se musí pečlivě zvážit (5).

Lepší základní znalosti kmenových buněk spolu s vhodným postupným výzkumem by nakonec mohly poskytovat nástroje pro léčbu svalové dystrofie buněčnou a genovou terapií. Příkladem může být infarkt myokardu. Infarkt vede ke ztrátě tkáně a zhoršení srdečního výkonu. Řešením by mohly být skupiny buněk kostní dřeně. Náhrada mrtvých srdečních buněk živými by byla atraktivní alternativou, ale uskutečnění stále brání mnohé biologické, technické i etické překážky. Poškozená srdce u zvířecích modelů byla postupně transplantována buněčnými populacemi od dárců, o nichž se předpokládá, že by mohly být potenciálně vhodní pro regeneraci. K zástupcům buněčných populací patří elementy kosterní svaloviny, imortalizované buňky ze srdeční předsíně, myocyty hladkého svalu, buňky kostní dřeně a kardiomyocyty. Tyto buňky lze získat od embrya, fétu nebo dospělého jedince. Použití kmenových buněk kostní dřeně k regeneraci srdce je velice přitažlivé. Za prvé jsou pluripotentní, za druhé odběr buněk kostní dřeně je snadný a rutinní a za třetí léčba pacienta buňkami získanými z jeho vlastní dřeně eliminuje obavy, že tkáň bude odmítnuta. Za čtvrté, je známo, že přenesení dřeňových buněk do jizvy v poškozeném srdci zlepšuje srdeční činnost, jsou-li buňky týden předtím

kultivovány a pak ošetřeny tak, aby indukovaly expresi svalových proteinů. Hlavním problémem je, že hlavní funkcí kostní dřeně je tvorba krevních buněk (5).

V současné době pro regeneraci poškozeného myokardu lze použít hematopoetické a mezenchymové kmenové buňky získané z kostní dřeně. Lidská kostní dřeň obsahuje 1 – 2 % hematopoetických kmenových buněk a méně než 0,05 % mezenchymových kmenových buněk. Reparaci poškozeného myokardu lze navodit aplikací autologních svalových buněk nebo aplikací některých cytokinů SCF (stem cell factor) a G-CSF (granulocyte colony stimulating factor). Každá z uvedených metod má svoje výhody a nevýhody. Při aplikaci kmenových buněk se předpokládá jak reparace myokardu, tak jeho revaskularizace. Při aplikaci svalových buněk je podíl revaskularizace menší. Experimentální otázkou zůstává použití cytokinů. Existují dva způsoby aplikací buněk pro reparaci myokardu:

- Intrakoronární katetrizační technika.
- Transendokardiální a transepikardiální technika.

Buněčná terapie představuje novou metodu léčby poškozené tkáně myokardu. První klinické studie poukazují na to, že transplantované autologní buňky kostní dřeně mohou hrát při reparaci poškozeného myokardu hlavní roli (5).

5. KMENOVÉ BUŇKY A ETICKÉ OTÁZKY

5.1. Kmenové buňky a etické otázky

Problém v užití lidských embryií v medicíně tkví v tom, že jde o plnohodnotný lidský subjekt, který si zaslouží úctu jako dospělá bytost. Lidské embryo má již definovanou identitu, není tedy prostým shlukem buněk. Lidský plod od prvního okamžiku prodělává celou řadu proměn, než se stane úctyhodnou lidskou bytostí.

Člověk je za svůj život schopen vyprodukovat nespočetné množství embryí. Některá z nich dojdou do finále, jiná nikoliv. Taková je realita bio-evolučního bytí. Toto lze pochopit, poznat a využít k prospěšným činům pro žijící, nejen zdravé, ale především nemocné (5).

Regenerační medicína, která zahrnuje buněčnou terapii zkoumá na biologickém modelu potenciály embryogeneze. Snaží se o formování, růst tkáňových struktur, které by vedly k vytvoření jejich náhrad ve prospěch nemocného pacienta (3). Využívá k tomu kmenové buňky, které získává různými způsoby. Problémem není finální využití kmenových buněk, které jsou prospěšné pacientovy, jako z jakých zdrojů se kmenové buňky získávají a jakým způsobem. Negativní reakce se vyskytují v případech využívání embryí , v nichž se vyskytují buňky s největším potenciálem plasticity (5).

Zde se naskýtá otázka: Zda kmenové buňky získávat z embryí pro léčebné účely nebo zda používat méně efektivní a prozkoumané zdroje?

ES buňky se získávají několika cestami:

- Užití nadbytečných embryí u asistovaného oplodnění – běžná věc.
- Dobrovolné dárcovství spermií a vajíček→ tvorba embrya pro diferenciální klonální výtěžnost.
- Využití jiných druhů oocytu, např. kravské.
- Izolace lidských gamet přímo z kultur hES buněk→ nová možnost.

Po odebrání buněk embryoblastu embrya zanikají (hodiny či dny). Takové to postupy odpůrci potratů odmítají i kdyby šlo o dobrovolnost a léčebnou užitečnost. Odpůrci potratů neuznávají ani výzkumné účely. Avšak v řadě zemí je legalizováno umělé přerušení těhotenství, to umožňuje volbu rodičů, zda zplodit a vychovávat dítě či ne. Při odběru kmenových buněk je tomu jinak→ jde o to terapeuticky zlepšit kvalitu života nemocného, ne o přerušení záměru mít dítě (5).

Problém využívání hES buněk:

- Otázka potratů – odpůrci namítají, že regenerativní medicína stojí na ničení zárodků.
- Problém využití buněk embrya a dospělých kmenových buněk – dospělé kmenové buňky etické otázky zcela nevyřeší, protože aby bylo možno zachovat potřebný stupeň plasticity, není možné od sebe oddělit dospělé kmenové buňky a ES buňky.
- Problém rodičů a jejich práv – matka má poslední slovo, zda donosí plod. Někdy však nastává problém s právy nenarozeného dítěte. Reálný dopad takové legislativy jsou nelegální potraty. Projednávají se i práva otce.

- Problém ochrany vývoje populace a populací – v regenerativní medicíně nejde o plození nové generace, ale o žádoucí ovlivnění žijící generace

- Problém nadbytečnosti gamet – žena za svůj život produkuje stovky vajíček, avšak většina z nich není využita. Muž vyprodukuje miliardy spermií ke zplození jedince je potřeba jediná. Tato přirozená nadbytečnost by se dala v medicíně využít.
- Problém financování – daňové a právní systémy zajisťují, aby veřejné kontrole podléhaly činnosti, které je záhodno financovat a regulovat z hlediska celku.
- Problém zájmu všech pro zlepšení léčby nevyléčitelných nemocí (5).

5.2. Etická pravidla výzkumu a terapeutického využití kmenových buněk

Velké problémy se hromadí kolem otázek využití lidských embryí. Nalezení asistovaného oplodnění *in vitro*, přineslo i možnost získávat části embryí k léčebným účelům. Důležité je dodržovat pravidla manipulace s „ laboratorními embryi ‘‘ z let 1994 – 1995.

Tyto pravidla zní:

- Zákaz výzkumu embrya po 14 dnech jeho stáří.
- Vyloučit ty možnosti, která nemají ověřený informovaný souhlas dárců.
- Zákaz placení dárcovství gamet.

- Schvalování v několika úrovních, pak konečný souhlas (5).

Po odběru kmenových buněk z embrya je embryo určeno k zániku. Ve světě stále stoupá morální i odborný souhlas s takovouto procedurou, zvláště když jde o vývoj nadějné a úspěšné léčby.

Kmenové buňky jsou předmětem rozsáhlého výzkumu, to jak tkáně dospělých jedinců, tak i tkáně embryonální. V současné době etický zájem vědy vzbudila možnost přípravy kmenových buněk z lidských embryí.

Izolace hES zahrnuje:

- Lidské embryo.
- Kultivace embrya do stádia blastocysty.
- Odebrání vnitřní buněčné masy.
- Přenesení odebraných buněk na podpůrnou vrstvu fibroblastů.
- Opakované přenášení.

→ takto se získávají buněčné linie, které jsou schopny trvalého dělení a růstu (5).

Embryonální kmenové buňky se mohou na vhodném kultivačním diferencovat do tří zárodečných listů → toto znamenalo velký pokrok pro léčení těžkých nemocí. Avšak použití kmenových buněk má i svá rizika, například vznik nádorového bujení, který vede k tvorbě teratomu. Dále se bude muset překonat imunologická inkompabilita.

Předpokládají se tři hlavní možnosti terapeutického klonování:

- Přenos jádra somatické buňky do lidského oocytu → takto by se získaly buňky s požadovanou vývojovou potencí.
- Přenos jádra somatické buňky do oocytu jiného druhu.

- Reprogramování jádra somatické buňky cytoplazmou kmenové buňky → vytvoření hybridu, který by mohl sloužit jako zdroj nezralých buněk.

Kmenové buňky, které se odebraly z již narozených jedinců, jsou obsaženy v plně diferencovaných tkáních, ale jsou schopné se vyvinout pouze v buňky dané tkáně. V poslední době se prokázalo, že v různých tkáních existují multipotentní kmenové buňky. Mezi tyto tkáně patří kostní dřeň, mozek, tkáně mezenchymového původu, pupečníková krev → tím by bylo terapeutické použití dospělých kmenových buněk velmi reálné (5).

1. Etický problém: Je morálně přípustné vytvářet a používat lidská embrya k přípravě kmenových buněk? Lidské embryo je lidský subjekt s definovanou identitou. I pro léčebný důvod je podle církve toto nemorální čin.
2. Etický problém: Je morálně dovoleno provádět ve snaze o tzv. terapeutické klonování výrobu lidských embryí s cílem je následně ničit pro přípravu hES buněk.
3. Etický problém: Je morálně dovolené používat ES buňky a buňky z nich diferencované, dodání případně od jiných badatelů, nebo dosažitelné komerčně?

19. – 20.9. 2002 se v Bruselu konala 1. Mezinárodní bioetická konference ,, Conceiving the embryo ‘‘ (pochopení embrya). Projednávalo se postavení embrya z medicínského, právního a etického pohledu (5).

Výzkum embryí má v různých zemích různé legislativní podmínky. Úplný zákaz mají Irsko, Německo, Norsko a Rakousko. Zákaz tvorby embryí pro výzkum mají Finsko, Lucembursko, Norsko.

Povolení, za účelem diagnostiky a terapie mají Dánsko, Francie, Španělsko. Povoleno mají Belgie, Itálie, Portugalsko.

Etické otázky ES buňky a kmenové buňky dospělé zůstávají zatím otevřené.

V ČR výzkum i užití ES buněk ovlivňují poradní orgány:

- Bioetická komise Rady pro výzkum a rozvoj
- Etická komise MZ a lokální etické komise (5)

6. ZÁVĚR

Z literárních zdrojů jsem nastudovala problematiku kmenových buněk. Na problematiku kmenových buněk jsem nahlížela z více pohledů, biologického, medicínského a etického.

Prvním krokem pro pochopení biologie kmenových buněk byl objev kultivace lidských kmenových buněk *in vitro.*

Kmenové buňky a jejich klinické použití v buněčné terapii bude předcházet ještě mnoho překážek, jak medicínských, tak etických. Hlavní etická překážka tkví v získávání hES buněk. Lidské kmenové buňky se získávají při potratech a při fertilizaci *in vitro*. Někteří lidé tento způsob pokládají za neetický. Dalším problémem je legislativa. V různých zemích jsou různé legislativní podmínky výzkumu kmenových buněk.

Regenerativní medicína, jež zahrnuje buněčnou terapii, je velmi perspektivní a vyvíjející se obor.

7. SOUHRN

Tato bakalářská práce se zabývá velmi aktuálním tématem, embryonálními kmenovými buňkami. Embryonální kmenové buňky jsou zde probrány z biologického, medicínského a etického pohledu.

Biologický pohled na embryonální kmenové buňky se zabývá jejich vlastnostmi, kultivací, laboratorními testy, diferenciací a potenciálním využitím. Pro srovnání je zde nastíněna problematika dospělých kmenových buněk. Jsou zde popsány vlastnosti, výskyt, diferenciace a laboratorní testy.

Medicínské hledisko pojednává o velmi aktuálním tématu, o buněčné terapii. Řešeny jsou otázky transplantace, imunologické tolerance, rejekce transplantátu, možnosti léčby některých onemocnění, reparace svalové nebo nervové tkáně.

Probrány jsou etické otázky a legislativa, překážky, které brání ve výzkumu a klinickém využití kmenových buněk.

8. SUMMARY

This baccalaureate work deals with very actual subject embryonic stem cells. Embryonic stem cells are work go through from biological medical and ethical perspective here.

Biological perspective on the embryonic stem cells deals with their properties, cultivation, laboratory tests, differentiation and potential usage. Work refers to problems of adult stem cells in comparison with embryonic stem cells here. Work describes their properties, occurrence, differentiation and labolatory tests.

Medical perspective deals about very actual subject about cell-based therapy. Questions of transplantion, immunological tolerantion, rejection of graft, possibilities of treatment some diseases, reparation muscular or nervous tissues are dealt here.

Ethical questions and legislature, obstacles, are dealt here. This obstacles defend from research and clinical usage of embryonic stem cells.

9. SEZNAM ZKRATEK

bFGF	bazický fibroblastový růstový faktor (basic fibroblast growth factor)
CD	označení povrchových molekul leukocytů (cluster of differentation)
CG	choriogonadotropin
CNS	centrální nervový systém (central nervous system)
CSF	faktor stimulující tvorbu kolonií buněk (colony stimulating factor)
DMD	Duchennova svalová dystrofie (Duchenne muscular dystrophy)
EBs	embryoidní tělíska (embryoid body)
EC	buněčné linie odvozené z embryonálního karcinomu (embryonic carcinoma)
EGF	epidermální růstový faktor (epidermal growth factor)
ES	pluripotentní diploidní embryonální kmenové buňky založené přímo z jejich blastocyst (embryonic stem cells)
G-CSF	růstový faktor stimulující růst granulocytů (granulocyte colony stimulating factor)
GM-CSF	růstový faktor stimulující růst granulocytů a makrofágů (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
GvHD	nemoc štěpu proti hostiteli (graft versus host disease)
hES	lidské embryonální kmenové buňky (human embryonal cells)
HSCs	hematopoetické kmenové buňky (hematopoetic stem cells)
IL	interleukin
LIF	faktor inhibující leukémii (leukemia inhibitory factor)
M-CSF	růstový faktor stimulující růst makrofágů (macrophage colony stimulating factor)
MGF	růstový faktor pro mastocyty (mast cell growth factor)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)

NIH	National Institut of Health
NK-buňky	podskupina lymfocytů, přirození zabíječi (natural killer cells)
PD	Parkinsonova nemoc (Parkinson´s Disease)
SCF	růstový faktor kmenových buněk (stem cell factor)
SSEA	povrchové karbohydrátové epitopy (stage-specific embryonic antigen = antigeny, specifické pro vývojové stadium)
TGF	transformující růstový faktor (transforming growth factor)
TRA	povrchové glykoproteinové epitopy

10. SEZNAM LITERATURY

(1) http://stemcells.nih.gov/info/basics/ , (3.3. 2007)

(2) http://www.news.wisc.edu/packages/stemcells/facts.html#1, (3.3. 2007)

(3) prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., Doc. MUDr. Miroslav Ryska, CSc. Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad, (kmenová buňka HTML dokument, 14.11. 2006)

(4) http://cs.wikipedia.org/wiki/Kmenov%C3%A9_bu%C5%88ky, (3.4. 2007)

(5) Stanislav Filip, Jaroslav Mokrý, Ivan Hruška: KMENOVÉ BUŇKY biologie, medicína, filozofie. Nakladatelství Galén, 2006, 223 stran

(6) http://www.news.wisc.edu/packages/stemcells/illustration.html, (3.3. 2007)