

Kmenové Buňky a Tkáňové Inženýrství..

Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz

Bilogický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity
@2024



NYT... stem cells not a miracle in waiting (2006)

Kmenové Buňky a Tkáňové Inženýrství..

Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz

Biologický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity



NYT... stem cells not a miracle in waiting (2006)

Sylabus: Základní charakteristiky kmenových buněk. Mechanismus sebeobnovy kmenových buněk dělením. Základní typy kmenových buněk podle schopnosti diferenciaci – totipotentní, pluripotentní, multipotentní, oligopotentní, unipotentní kmenové buňky a jejich vlastnosti. Typy kmenových buněk podle zdroje – embryonální, fetální a dospělé (tkáňové, orgánové) kmenové buňky. Vztah normálních a nádorových kmenových buněk. Progenitorové buňky. Symetrické a asymetrické buněčné dělení. Určení diferenciačních směrů kmenových buněk. Struktura a funkce „niche“ kmenových buněk. Kmenové buňky a buněčná terapie. Etika a legislativa ve výzkumu kmenových buněk. Perspektivy ve výzkumu a použití kmenových buněk v léčbě; dediferenciace a transdiferenciace buněk – indukované pluripotentní kmenové buňky (iPS cells). Principy a metody tkáňového inženýrství. Syntetické a biologické buněčné nosiče. Aplikace a perspektivy tkáňového inženýrství v medicíně.

Kmenové Buňky

Proč vlastně kmenové buňky?



- Vývoj organismu a vývojové poruchy
- Regenerace tkání po poškození
- Stárnutí

..ale také



- Buněčná terapie
- Modely genetických chrob



NYT... stem cells not a miracle in waiting (2006)

Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

Od Promethea k...



By Peter Paul Rubens

Sny o regeneraci..

- Mnoho mýtických postav má schopnost regenerovat (údy, tělo atd..)
- Divoká fantazie vs racionální poznání přírodních zákonitostí?



Nejstarší zmínka o
Prometheovi (Hesiod
approx.700 b.C.; wiki)

Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

Od Promethea k...



By Peter Paul Rubens

Sny o regeneraci..

- Mnoho mýtických postav má schopnost regenerovat (údy, tělo atd..)
- Divoká fantazie vs racionální poznání přírodních zákonitostí?

Lidská játra – jediný orgán, který plně regeneruje

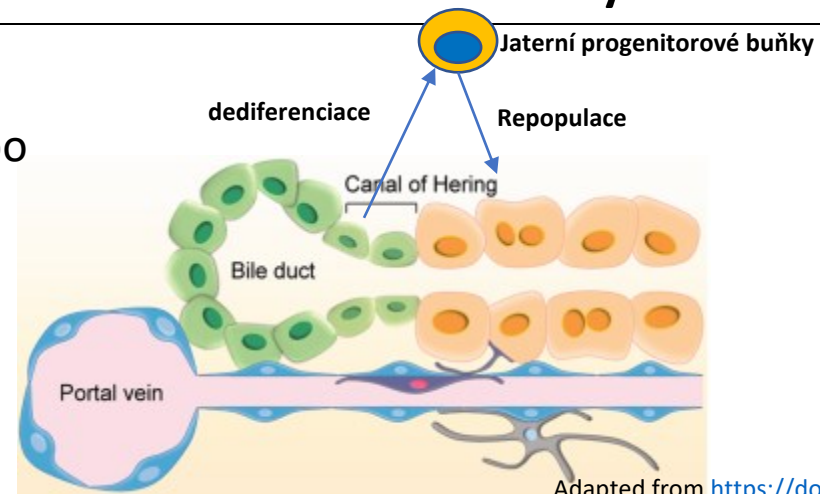
Regenerace po hepatectomii – až 50% hmoty dělením hepatocytů

Repopulace po akutním selhání – dediferencované jaterní progenitory – jsou to ve skutečnosti kmenové buňky



Nejstarší zmínka o Prometheovi (Hesiod approx. 700 b.C.; wiki)

Repopulace po selhání jater



Adapted from <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0483-0>

Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

Od Promethea k...



By Peter Paul Rubens

➤ „Omnis cellula e cellula“ -Rudolf Virchow 1855



Rudolf Virchow



Robert Remak



Nejstarší zmínka o
Prometheovi (Hesiod
approx.700 b.C.; wiki)

Rudolf Virchow publikoval práci R.Remaka jako svoji..

Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

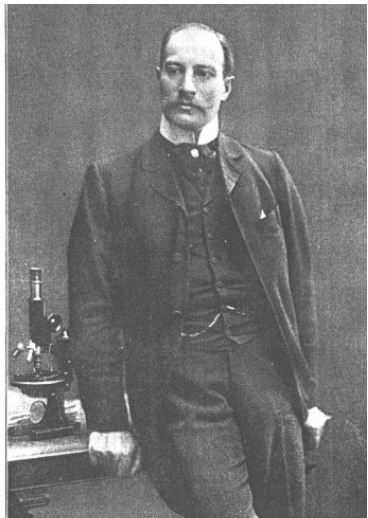
Od Promethea k...



By Peter Paul Rubens

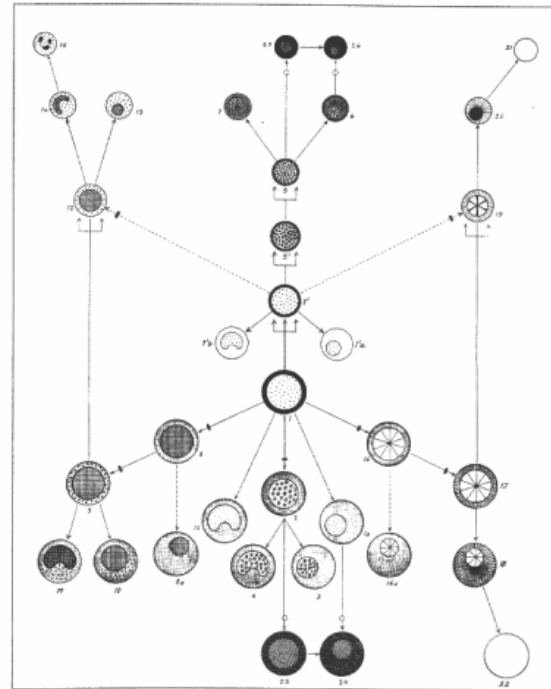
➤ „Omnis cellula e cellula“ -Rudolf Virchow 1855

➤ Primitivní „kmenové“ buňky v krvi –Pappenheims 1917



Arthur Pappenheims

„retikuloendothelzelle“



Figurenerklärung.

Ausgang und Stammzelle I.

Leite für erythrocytischer Art.
Rechte für erythrocytischer Art.
Links oben für lymphocyten Art.
Mitte unten für erythrocytischer Art.
Die Linien zeigen die Entwicklung der
erythrocytischen (1), links oben
erythrocytischen (2), rechts oben
lymphocyten (3, 7, 11) sowie
erythrocytischen (3, 4, 11) sowie unten

Arten und die normalen Zellen von Blute.

— Differenzierende Teilung.
— Differenzierende Entwicklung.
— Stetige Wuchstums- und individuelle Altersentwicklung.
— pathologische Entwicklung.
— Apoptotische Möglichkeiten für Entwicklungsrichtung.

1. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 1.
2. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 2.
3. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 3.
4. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 4.
5. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 5.
6. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 6.
7. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 7.
8. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 8.
9. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 9.
10. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 10.
11. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 11.
12. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 12.
13. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 13.
14. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 14.
15. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 15.
16. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 16.
17. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 17.
18. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 18.
19. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 19.
20. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 20.
21. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 21.
22. Erythrocyt; Prot. 12, Fig. 22.

Abbildung 12: Stammzellbaum Artur Pappenheims von 1905 (68, S.347-348).

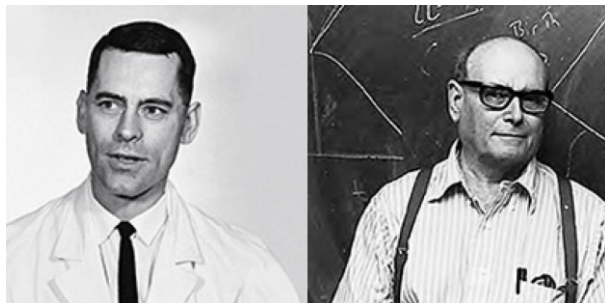
A. Pappenheim

Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

Od Promethea k...

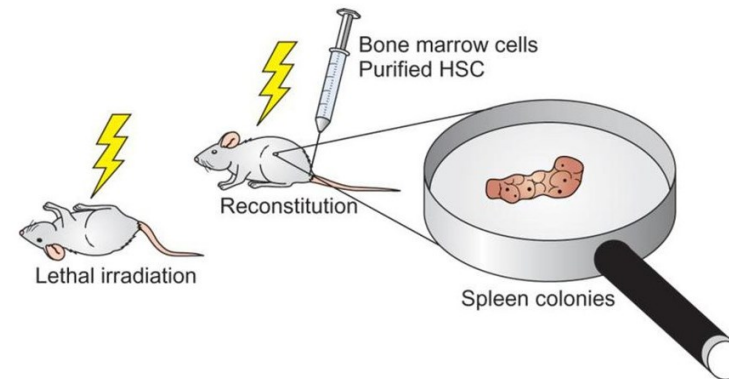


By Peter Paul Rubens



James Till & Ernst McCulloch

- „Omnis cellula e cellula“ -Rudolf Virchow 1855
- Primitivní „kmenové“ buňky v krvi –Pappenheim 1917
- „kolonie tvořící buňky“ z kostní dřeně –Till 1961



Záchrana ozářené myši spočítaným množstvím buněk kostní dřeně (Till a McCulloch 1961)

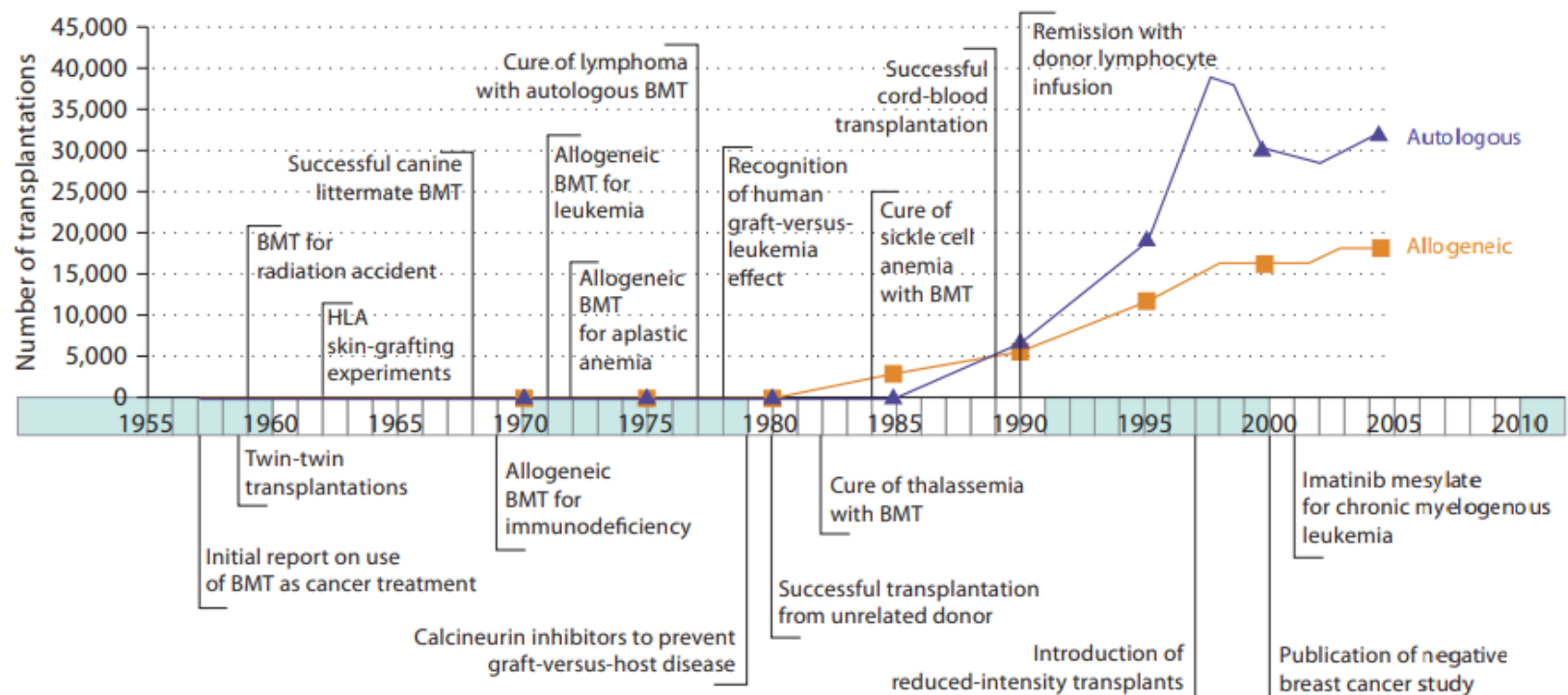
Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

Od Promethea k...



By Peter Paul Rubens

- „Omnis cellula e cellula“ -Rudolf Virchow 1855
- Primitivní „kmenové“ buňky v krvi –Pappenheim 1917
- „kolonie tvořící buňky“ z kostní dřeně –Till 1961



Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

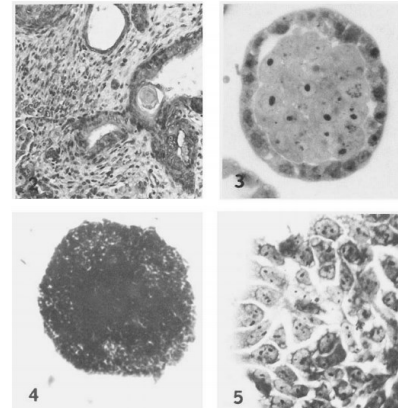
Od Promethea k...



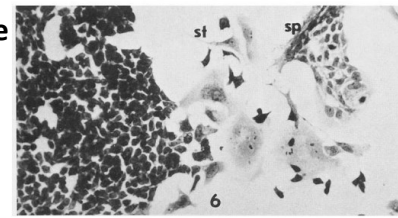
By Peter Paul Rubens

- „Omnis cellula e cellula“ -Rudolf Virchow 1855
- Primitivní „kmenové“ buňky v krvi –Pappenheim 1917
- „kolonie tvořící buňky“ z kostní dřeně –Till 1961
- Linie embryonálních karcinomů – Lehman and Pierce 1974

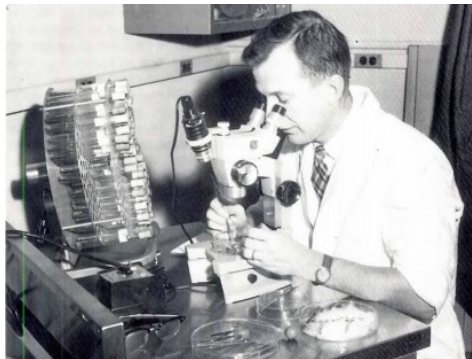
Teratokarcinom (řez)



Imortalizovaná linie



Lehman and Pierce 1974



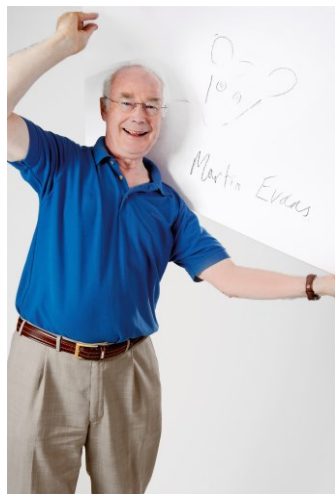
Barry Pierce

Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

Od Promethea k...



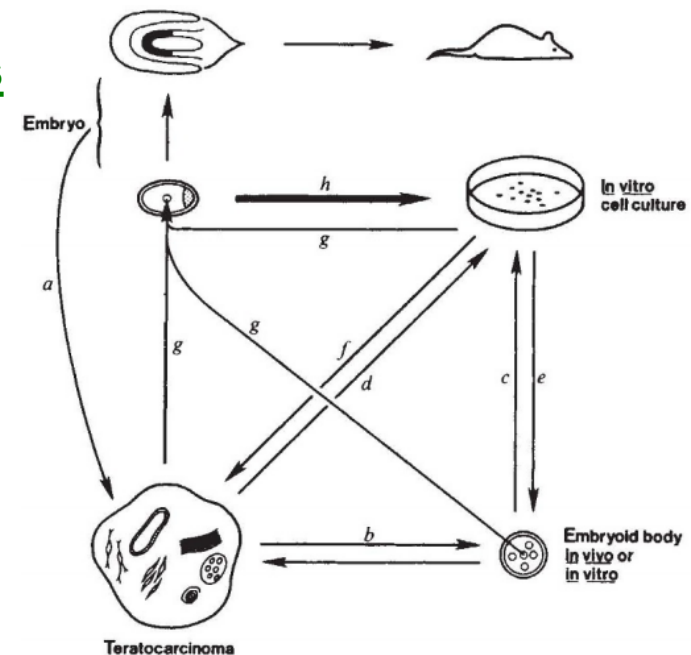
By Peter Paul Rubens



Sir Martin J. Evans

- „Omnis cellula e cellula“ -Rudolf Virchow 1855
- Primitivní „kmenové“ buňky v krvi –Pappenheim 1917
- „kolonie tvořící buňky“ z kostní dřeně –Till 1961
- Linie embryonálních karcinomů – Lehman and Pierce 1974
- **Myší embryonální SC - 1981 by Evans**

Kultivace embryonální linie a tvorba chimerních myší z linií embryonálních kmenových buněk a teratokarcinomů



Historie objevů spojených s kmenovými buňkami

Od Promethea k...



By Peter Paul Rubens



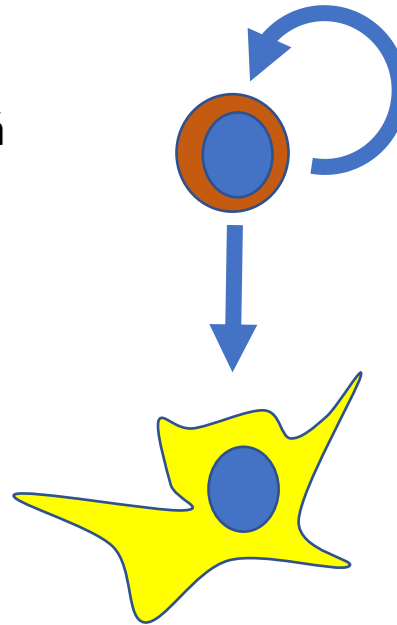
Nejstarší zmínka o Prometheovi (Hesiod approx. 700 b.C.; wiki)

- „Omnis cellula e cellula“ -Rudolf Virchow 1855
- Primitivní „kmenové“ buňky v krvi –Pappenheim 1917
- „kolonie tvořící buňky“ z kostní dřeně –Till 1961
- Linie embryonálních karcinomů – Lehman and Pierce 1974
- **Myší embryonální SC - 1981 by Evans**
- Dospělé SCs ~1980 →
- **Embryonální SC z lidského embrya – Thompson 1998**
- **Indukované pluripotentní buňky – Yamanaka 2006**

Kmenové buňky: kritéria a definice

Definice: kmenová buňka je buňka schopná sebeobnovy a diferenciacie

Sebeobnova



Diferenciace

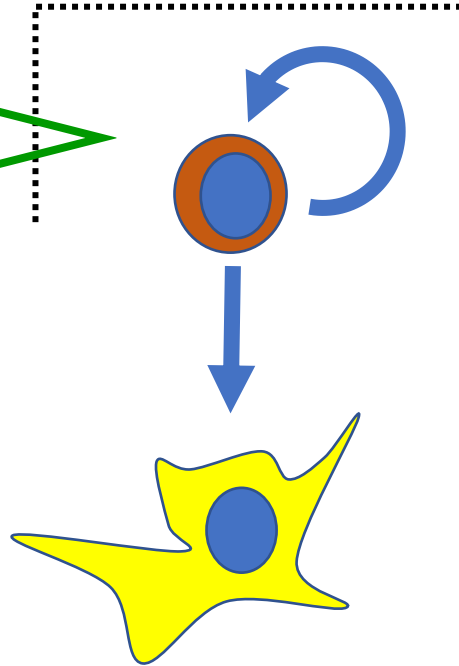


Kmenové buňky: kritéria a definice

Nejen geneticky identická kopie, ale také srovnatelná epigeneticky, metabolicky..

Schopnost vytvářet vlastní kopie

Sebeobnova



Sebeobnova je schopnost vytvořit vlastní kopii

Sebeobnova je provázena:

- Schopností prodlužování telomer
- Rezistencí ke kontaktní inhibici
- Rezistence k apoptóze
- Rychlým, převážně glykolytickým metabolismem



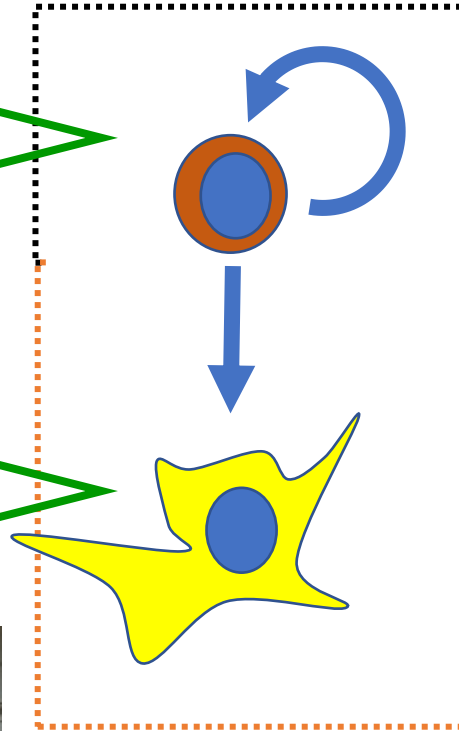
Kmenové buňky: kriteria a definice

Nejen geneticky identická kopie, ale také srovnatelná epigeneticky, metabolicky..

Schopnost vytvářet vlastní kopie

Schopnost měnit vlastnosti a funkčně se specializovat

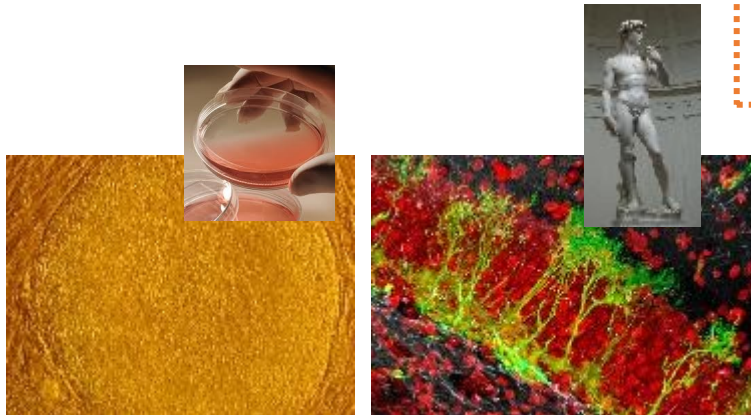
Sebeobnova



Sebeobnova je schopnost vytvořit vlastní kopii

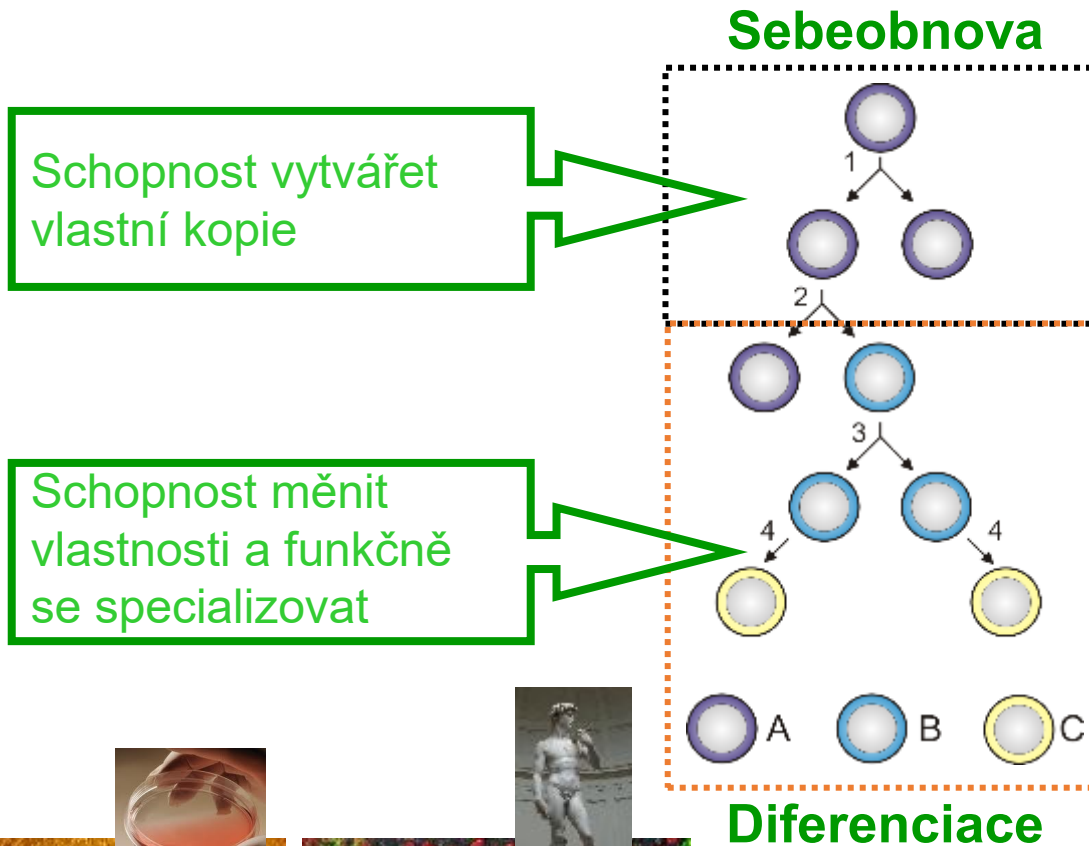
Diferenciace – je proces, při kterém buňka pochází změnami v genové expresi a stává se tak více specializovanou

Diferenciace



Epigenom se mění následován proteomem a metabolomem..

Kmenové buňky: kriteria a definice

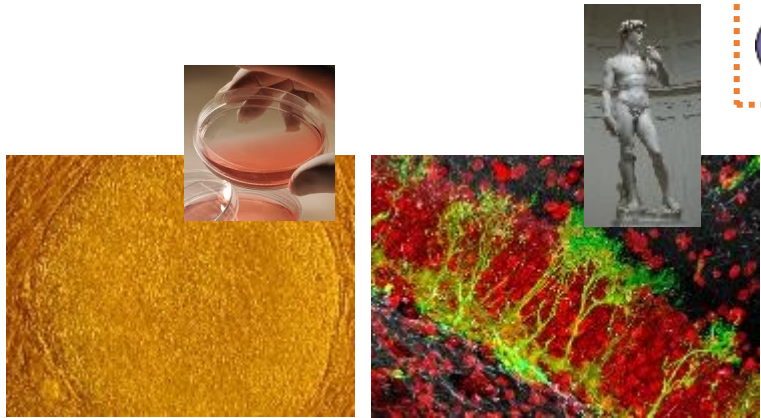


Klonální kapacita

- Symetrické dělení
- Asymetrické dělení

Toti
Pluri
Multi
Oligo
Uni

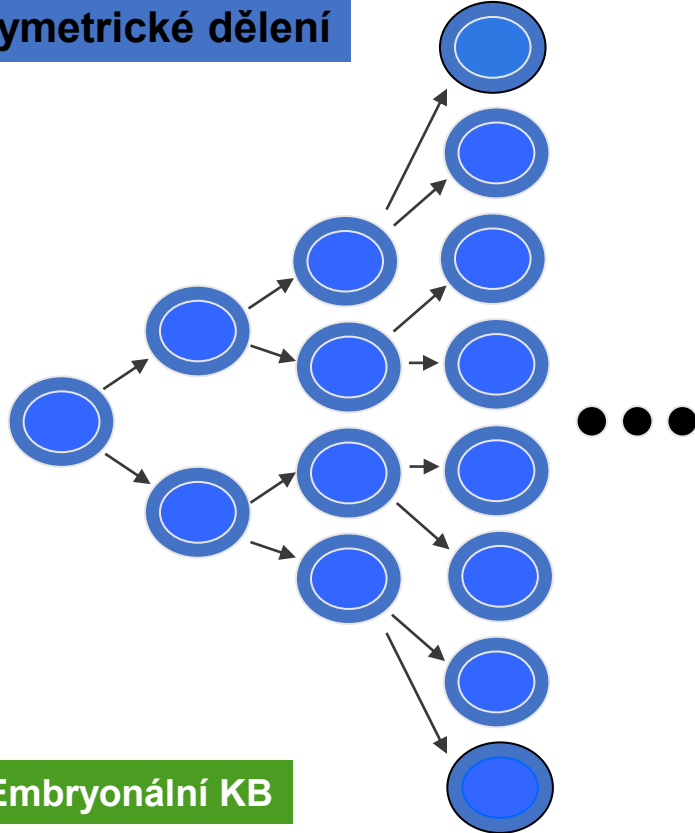
potence



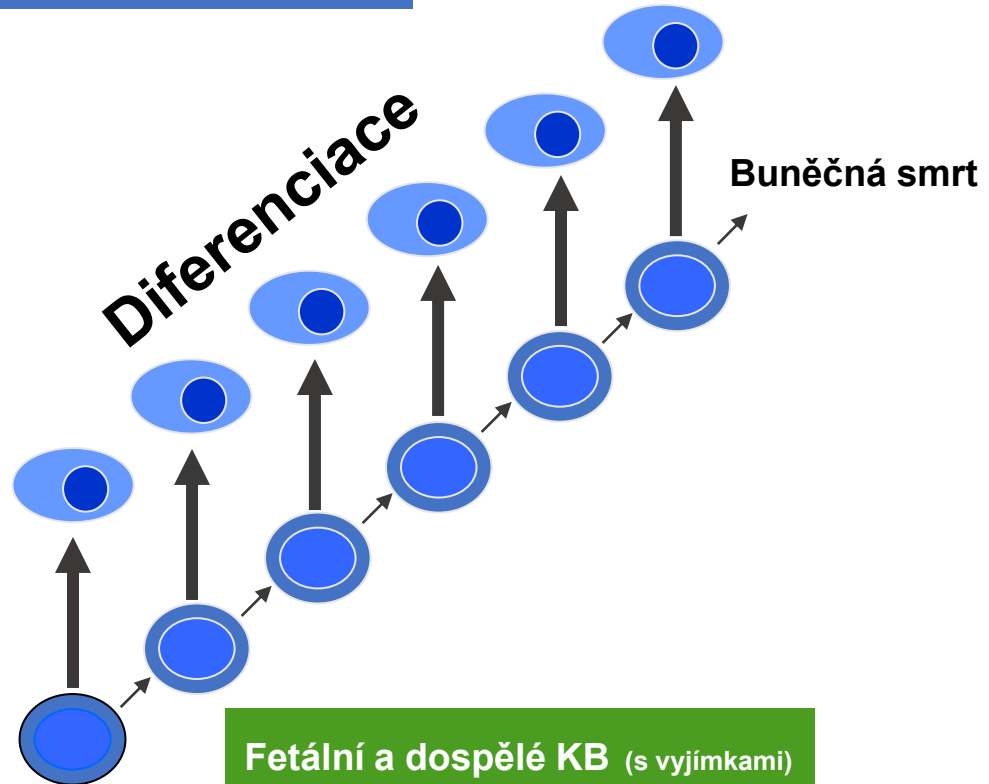
Kmenové buňky se sebeobnovují, množí

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

Symetrické dělení



Asymetrické dělení

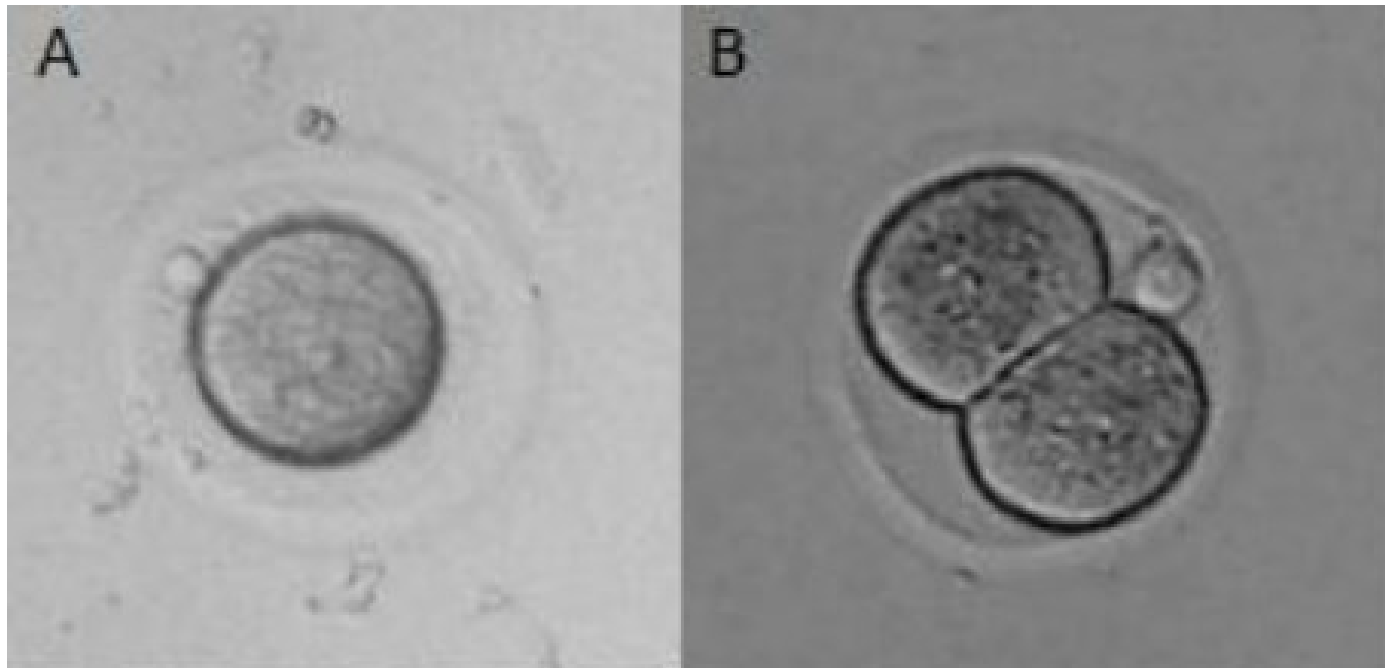


Kombinace obou mechanismů = neurální KB !!!

.... a diferencují a regenerují tkáně orgány

totipotence

Totipotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, včetně embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: zygota, časná 2-buněčná stádium embrya)



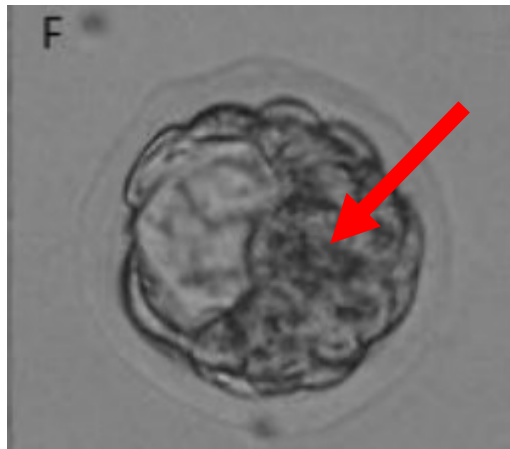
Kyvelidou (2013). Qualification and Quantification of Pre-Implantation Embryo Health.

... a diferencují a regenerují tkáně orgány

totipotence → pluripotence

Totipotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, včetně embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: zygota, časně 2-buněčné stádium embrya)

Pluripotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, ale nepodílí se na embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: embryonální kmenové buňky; embryoblast blastocysty).



Embryoblast (inner cell mass) Blastocysty



Embryonální kmenové buňky

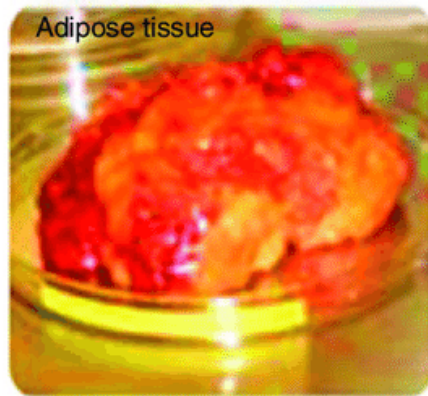
... a diferencují a regenerují tkáně orgány

totipotence → pluripotence → multipotence

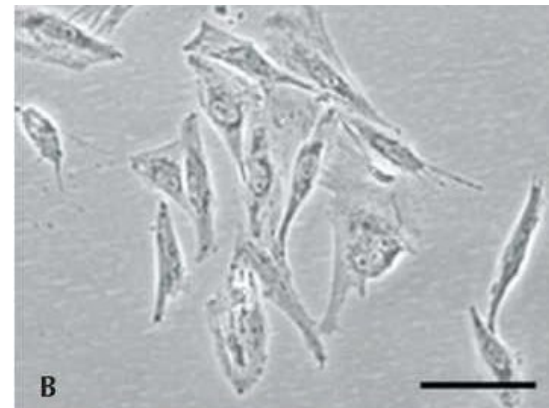
Totipotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, včetně embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: zygota, časné 2-buněčné stádium embrya)

Pluripotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, ale nepodílí se na embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: embryonální kmenové buňky; embryoblast blastocysty).

Multipotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do několika specializovaných buněčných typů, ale vše v rámci konkrétní tkáně, jednoho orgánu, nebo fyziologického systému (příklad: hematopoetické kmenové buňky)



Tuková tkáň



Mezenchymální kmenové buňky z tukové tkáně

... a diferencují a regenerují tkáně orgány

totipotence → pluripotence → multipotence → oligopotence

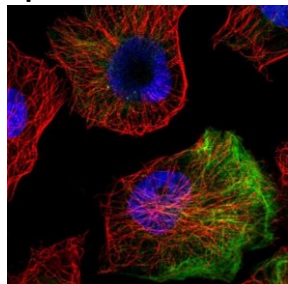
Totipotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, včetně embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: zygota, časné 2-buněčné stádium embrya)

Pluripotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, ale nepodílí se na embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: embryonální kmenové buňky; embryoblast blastocysty).

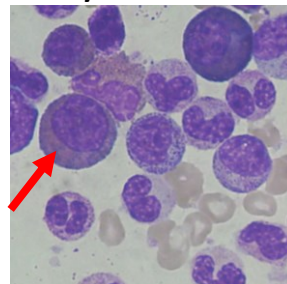
Multipotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do mnoha specializovaných buněčných typů, ale vše v rámci konkrétní tkáně, jednoho orgánu, nebo fyziologického systému (příklad: hematopoetické kmenové buňky)

Oligopotentní buňky – buňky, které mohou diferencovat do více buněčných typů (často se jedná o progenitory; příklad: neurální kmenové buňky versus myeloidní progenitorové buňky)

NESTIN
DNA
β-TUBULIN



Neurální kmenové



Myeloidní progenitor

... a diferencují a regenerují tkáň orgány

totipotence ➡ pluripotence ➡ multipotence ➡ oligopotence ➡ unipotence

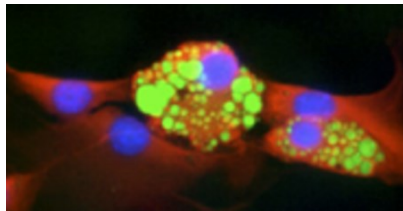
Totipotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, včetně embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: zygota, časné 2-buněčné stádium embrya)

Pluripotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do všech buněčných typů, které se nachází v embryu, plodu a vyvíjejícím se organismu, ale nepodílí se na embryonálních komponent trofoblastu a placenty (příklad: embryonální kmenové buňky; embryoblast blastocysty).

Multipotentní kmenové buňky – mohou se specializovat do mnoha specializovaných buněčných typů, ale vše v rámci konkrétní tkáň, jednoho orgánu, nebo fyziologického systému (příklad: hematopoetické kmenové buňky)

Oligopotentní buňky – buňky, které mohou diferencovat do více buněčných typů (často se jedná o progenitory; příklad: neurální kmenové buňky versus myeloidní progenitorové buňky)

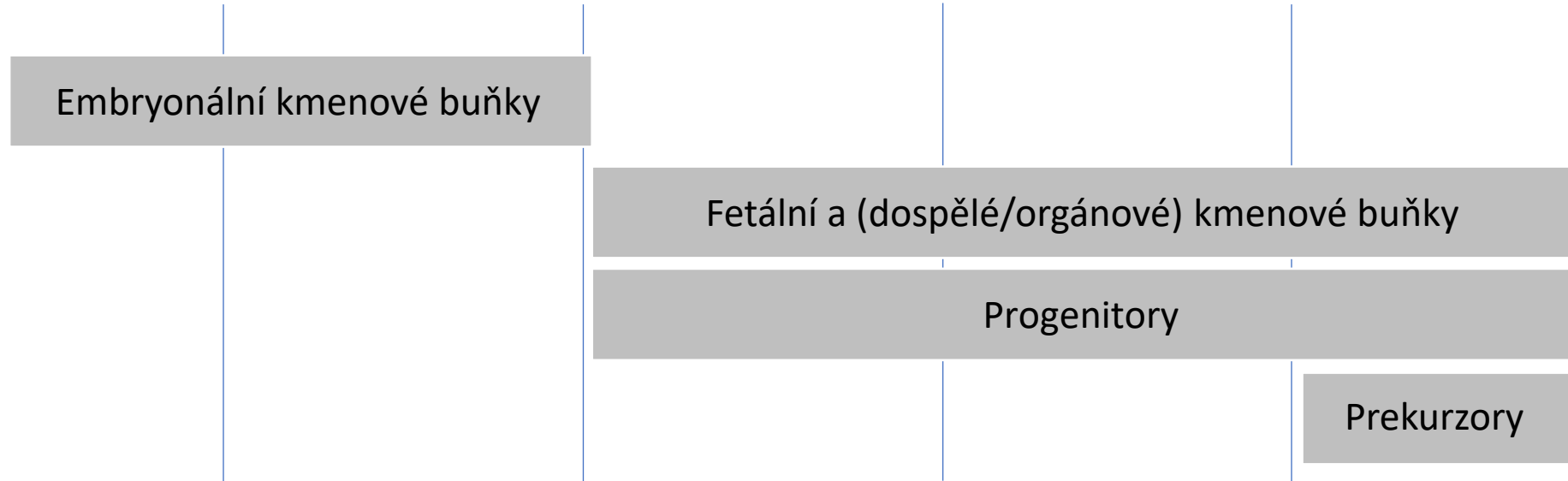
Progenitorové buňky (často pleteny s kmenovými buňkami.) – časný potomek kmenové buňky, více diferencovaný, než kmenová buňka; progenitory mohou diferencovat, ale nejsou schopny sebeobnovy.



Myeloid derived adipose tissue progenitor

.... a diferencují a regenerují tkáň orgány

totipotence ➡ pluripotence ➡ multipotence ➡ oligopotence ➡ unipotence

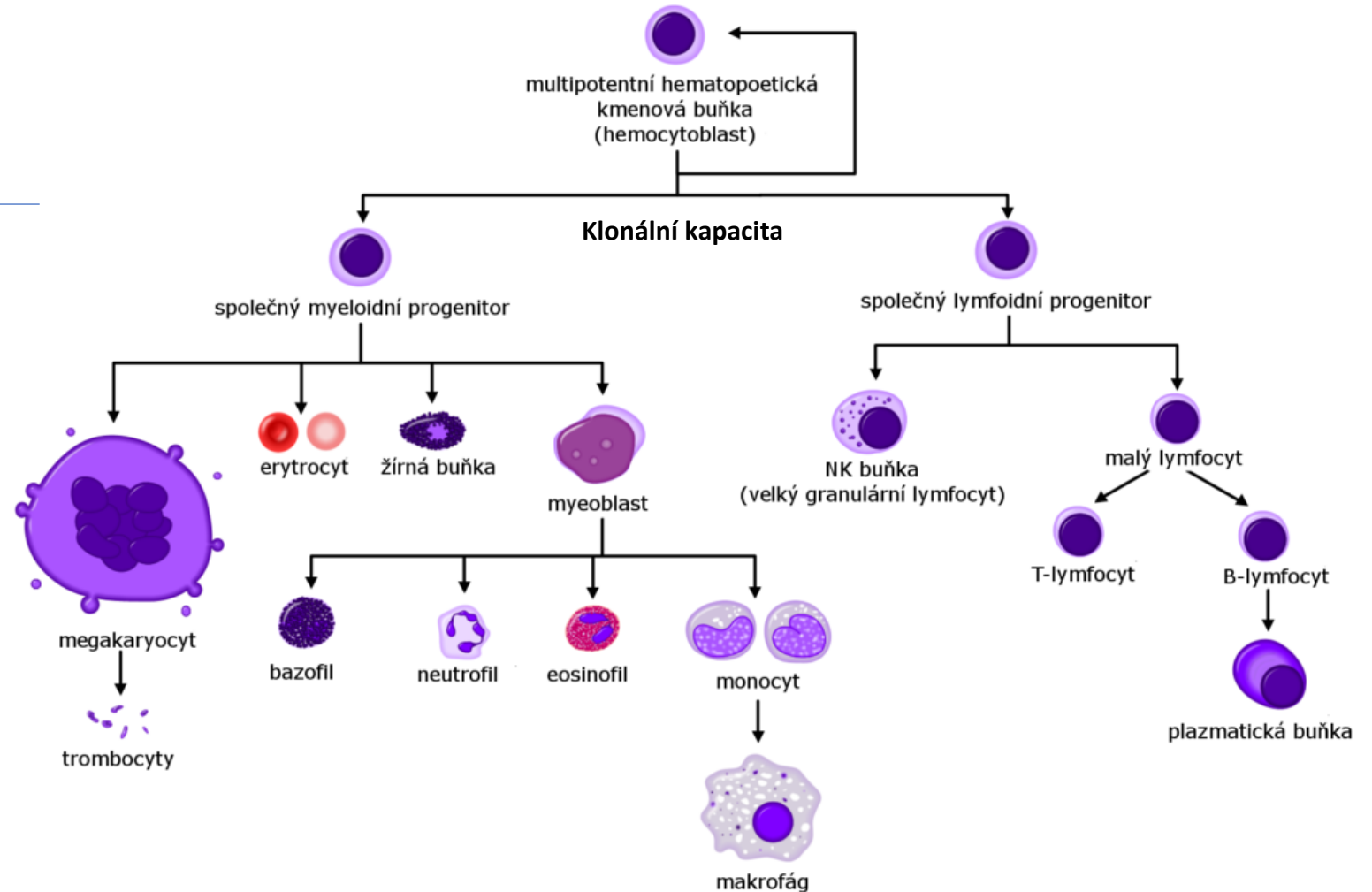


... a diferencují a regenerují tkáň orgány

totipotence ➡ pluripotence ➡ multipotence ➡ oligopotence ➡ unipotence

Příklad: hematopoetické buňky

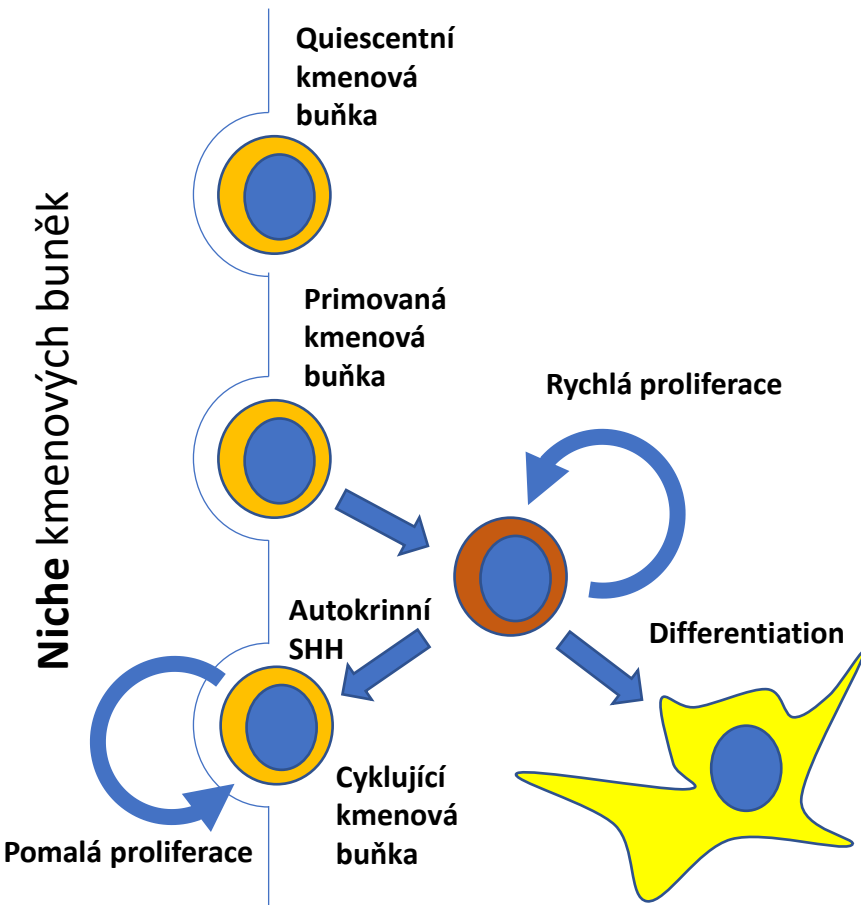
Ztráta schopnosti sebeobnovy



Diferenciace kmenových buněk

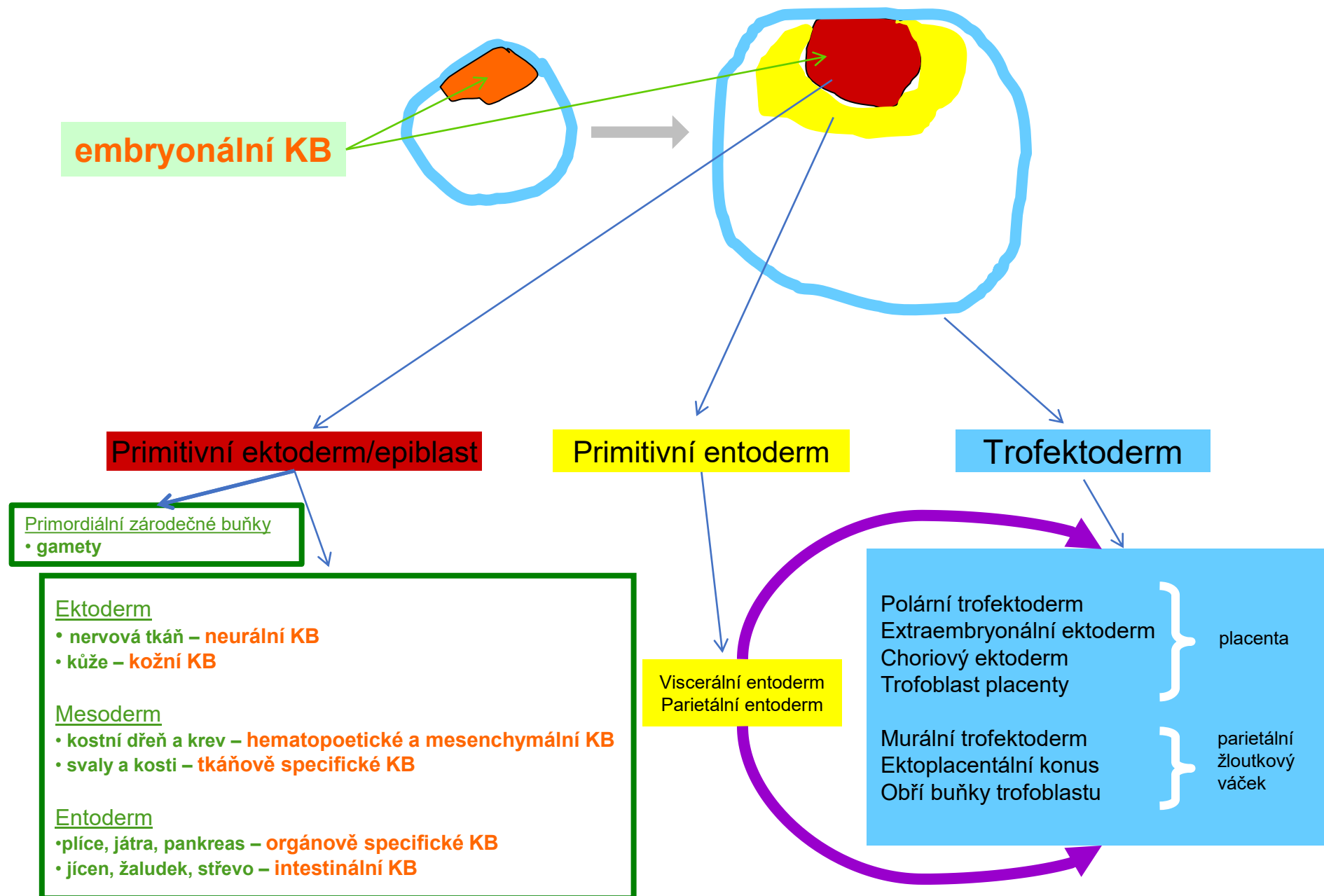
Přechodné dělicí se buňky (Transit amplifying cells)

Buňky na cestě diferenciace pomalu se množících kmenových buněk (př. Lidské HSCs – se replikují 1x za 10 měsíců)
Jsou časným stádiem regenerace tkáně. Autokrinní expresí proteinu Sonic Hedgehog (SHH) aktivují kmenové buňky



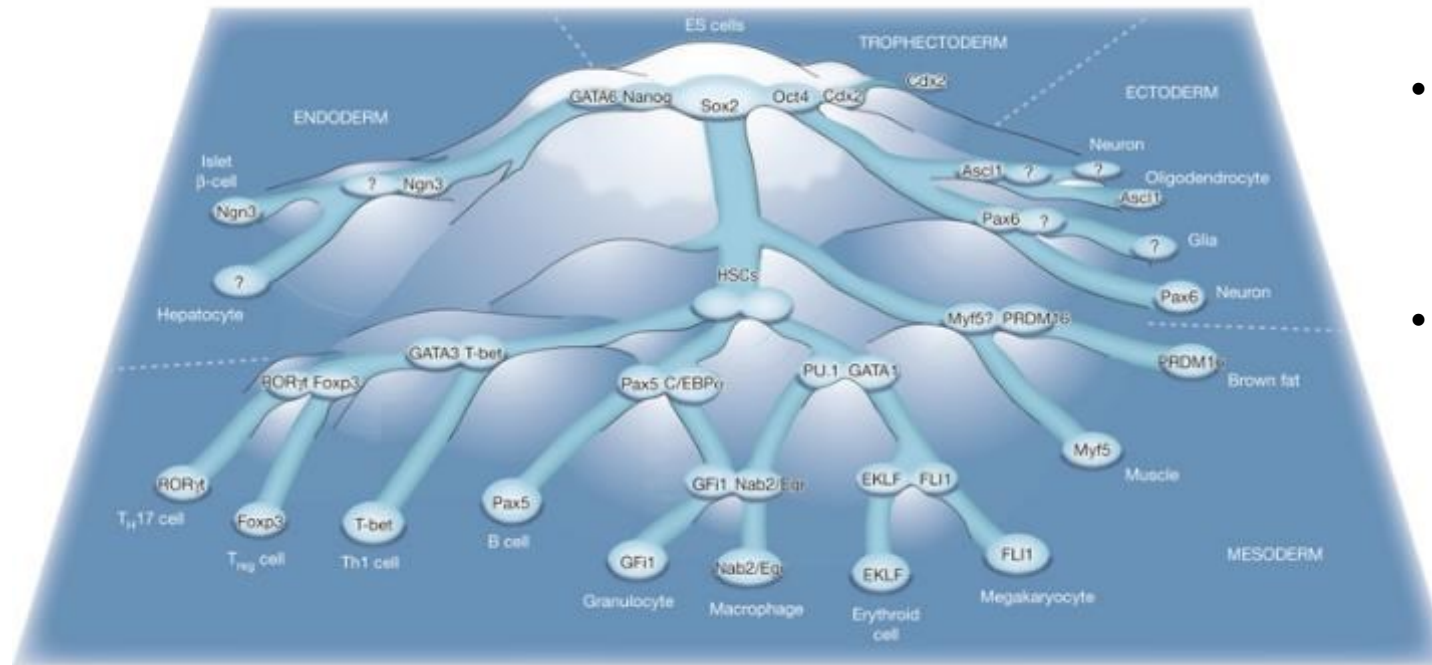
Jedná se o obecný proces, který funguje ve vlasovém váčku i při aktivaci hematopoetických kmenových buněk bakteriální infekcí

Schopnost a cesty (linie) diferenciace kmenových buněk



Co řídí a určuje osud KB:

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



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

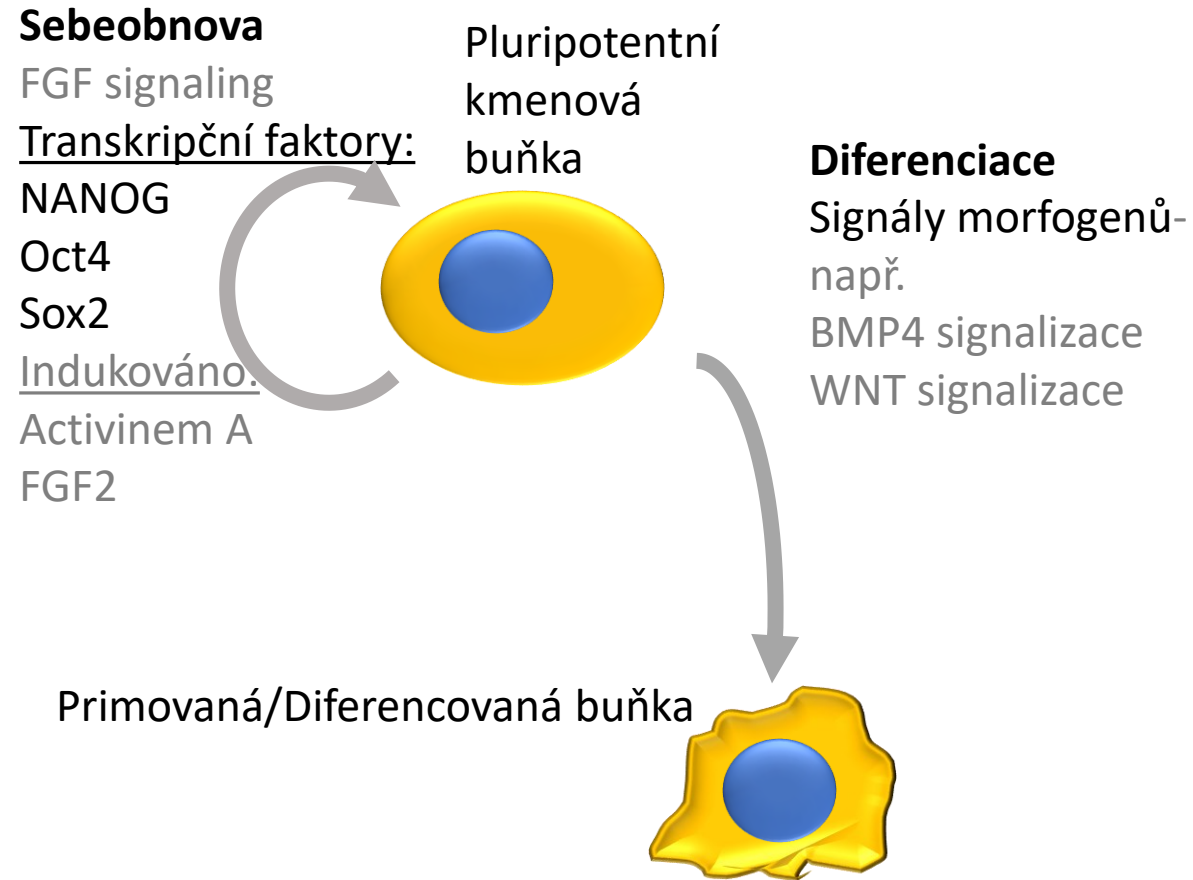
- další **osud buňky** předurčuje dráha, kterou se pohybuje
- Dráha na kterou se vydá (osud) je určena **signály z mikroprostředí**, tzv. niche

Cesta je řízena **transkripčními faktory** a vede k celé řadě různých typů kmenových buněk..
Změna osudu je změna epigenetického stavu vyvolaná transkripčními faktory

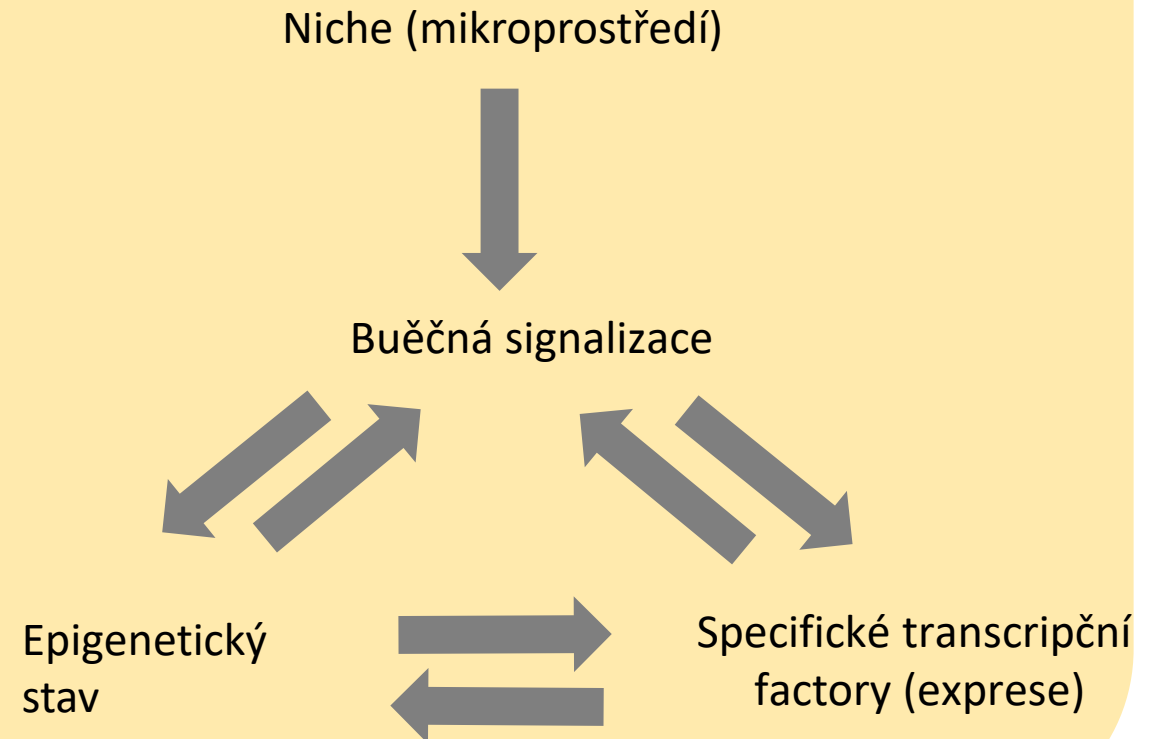
! PLATÍ IN VIVO i IN VITRO !

Co řídí a určuje osud KB:

Osud kmenové buňky je určen mikroporostředím (niche) cílového orgánu, nebo časoprostorové lokalizace v embryu

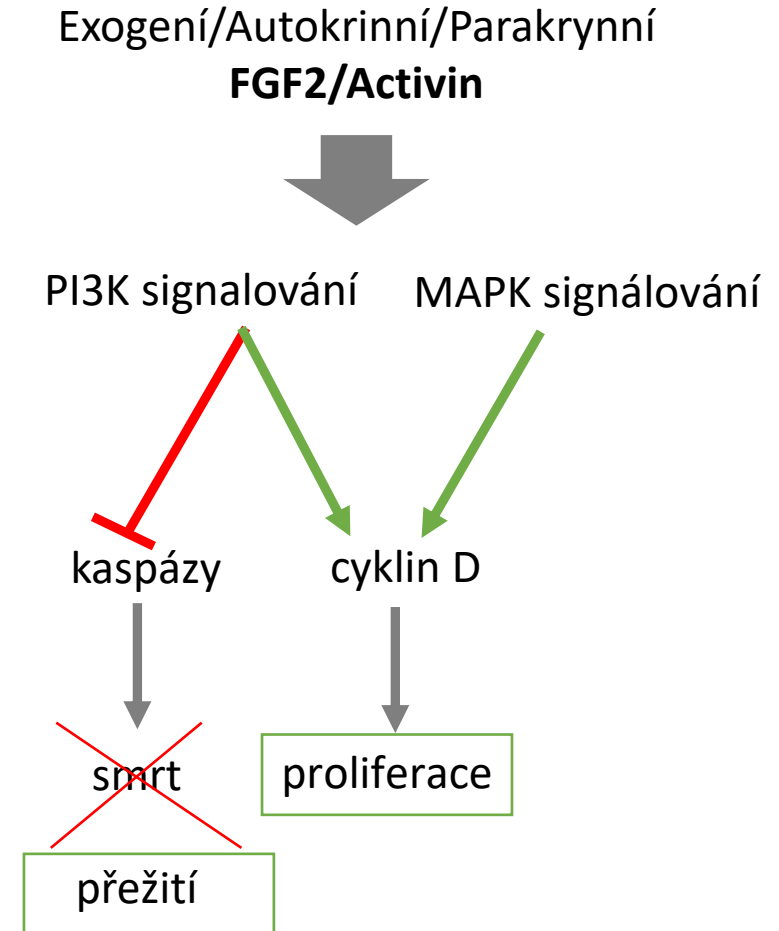
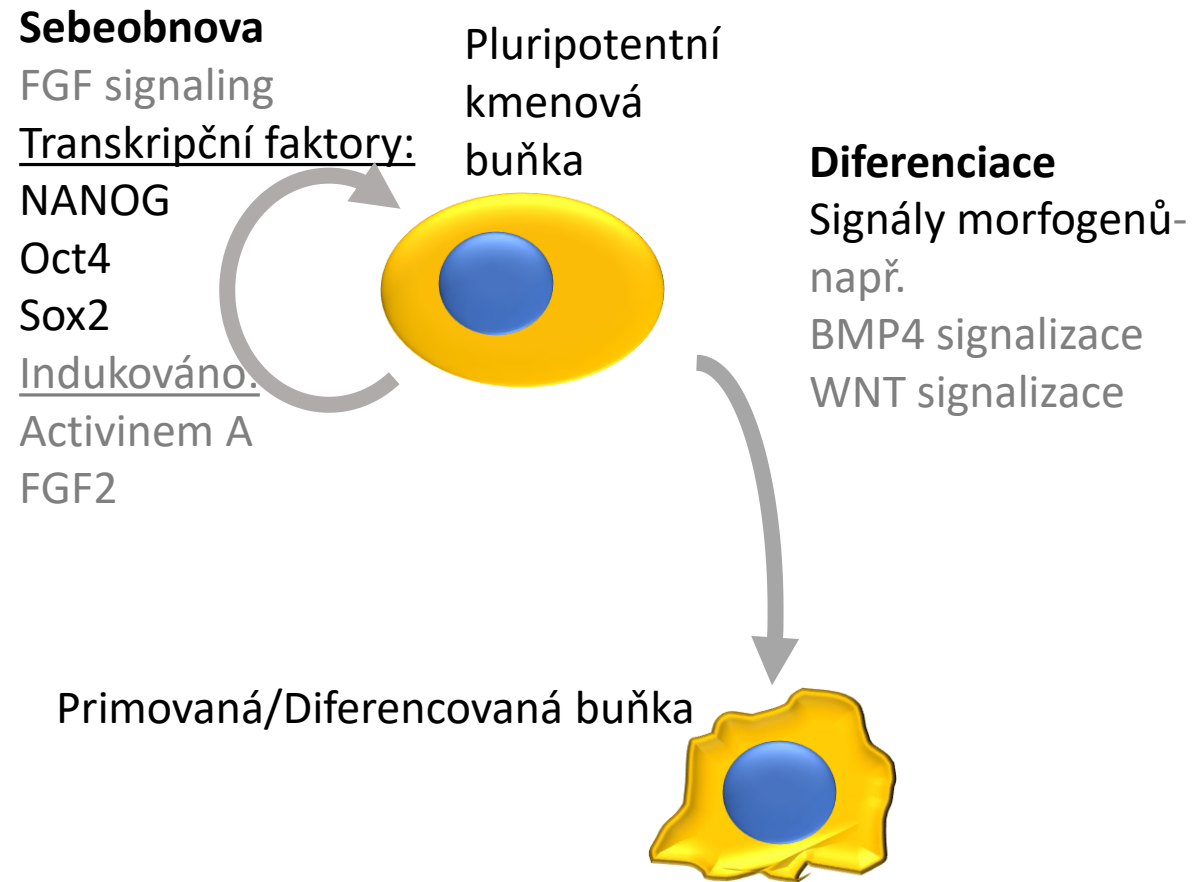


Co dělá kmenovou buňku kmenovou buňkou



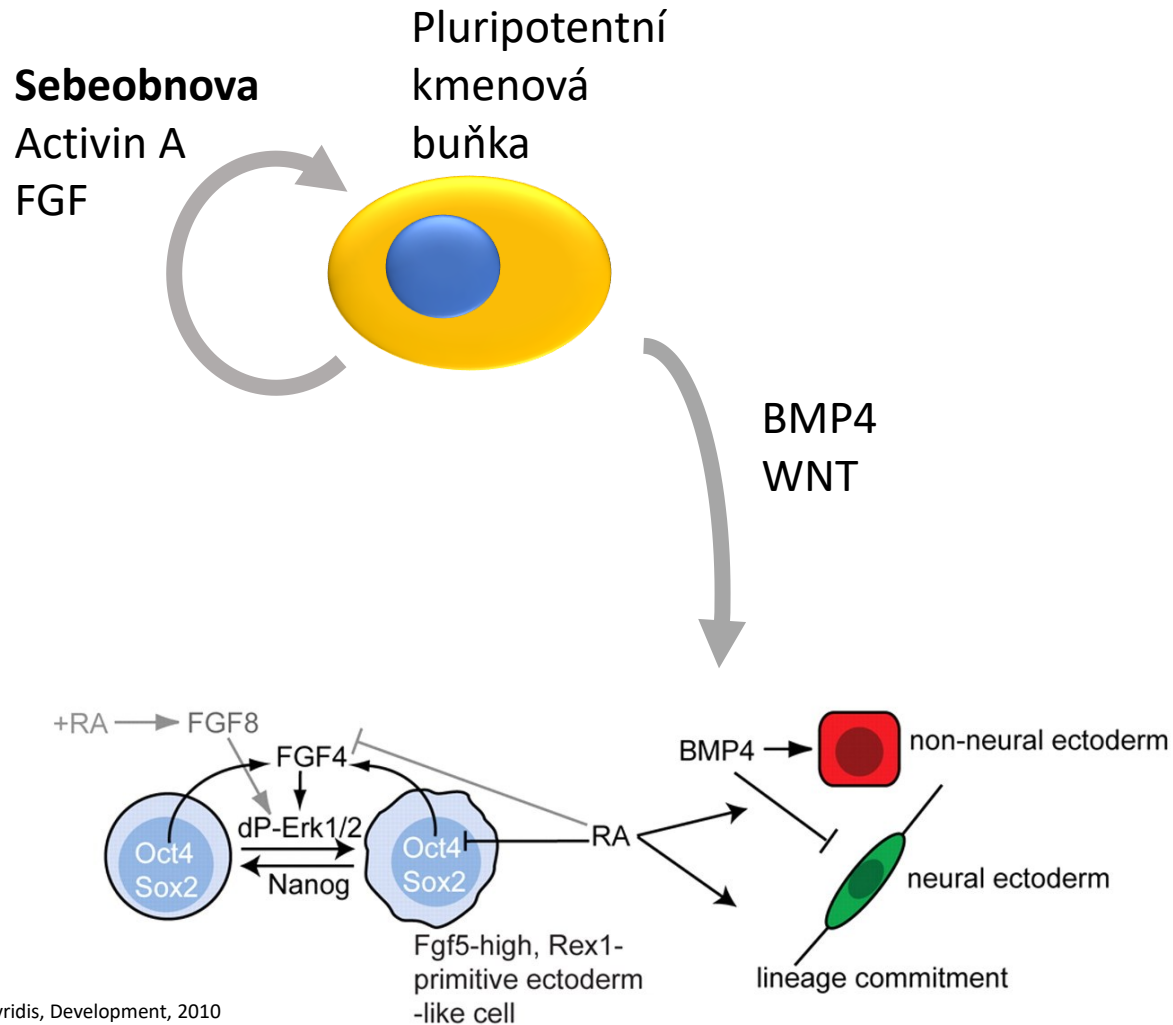
Co řídí a určuje osud KB:

Osud kmenové buňky je určen mikroporostředím (niche) cílového orgánu, nebo časoprostorové lokalizace v embryu



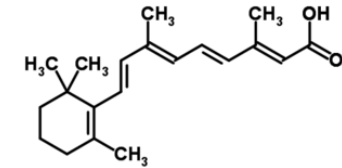
Co řídí a určuje osud KB:

Osud kmenové buňky řídí faktory mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje

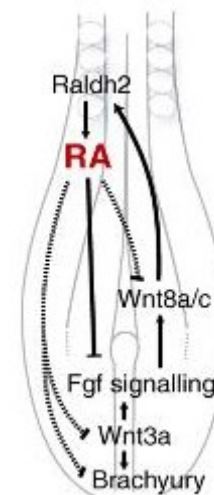


Signální dráhy řídící tvorbu embrya (primitivního proužku)

Retinová kyselina

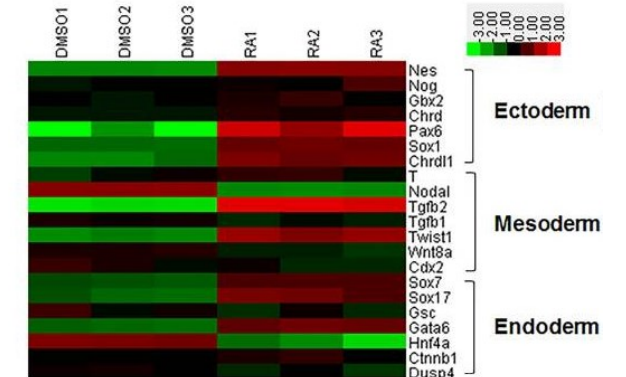


Ustavení AP osy



Ribes, Development 2009

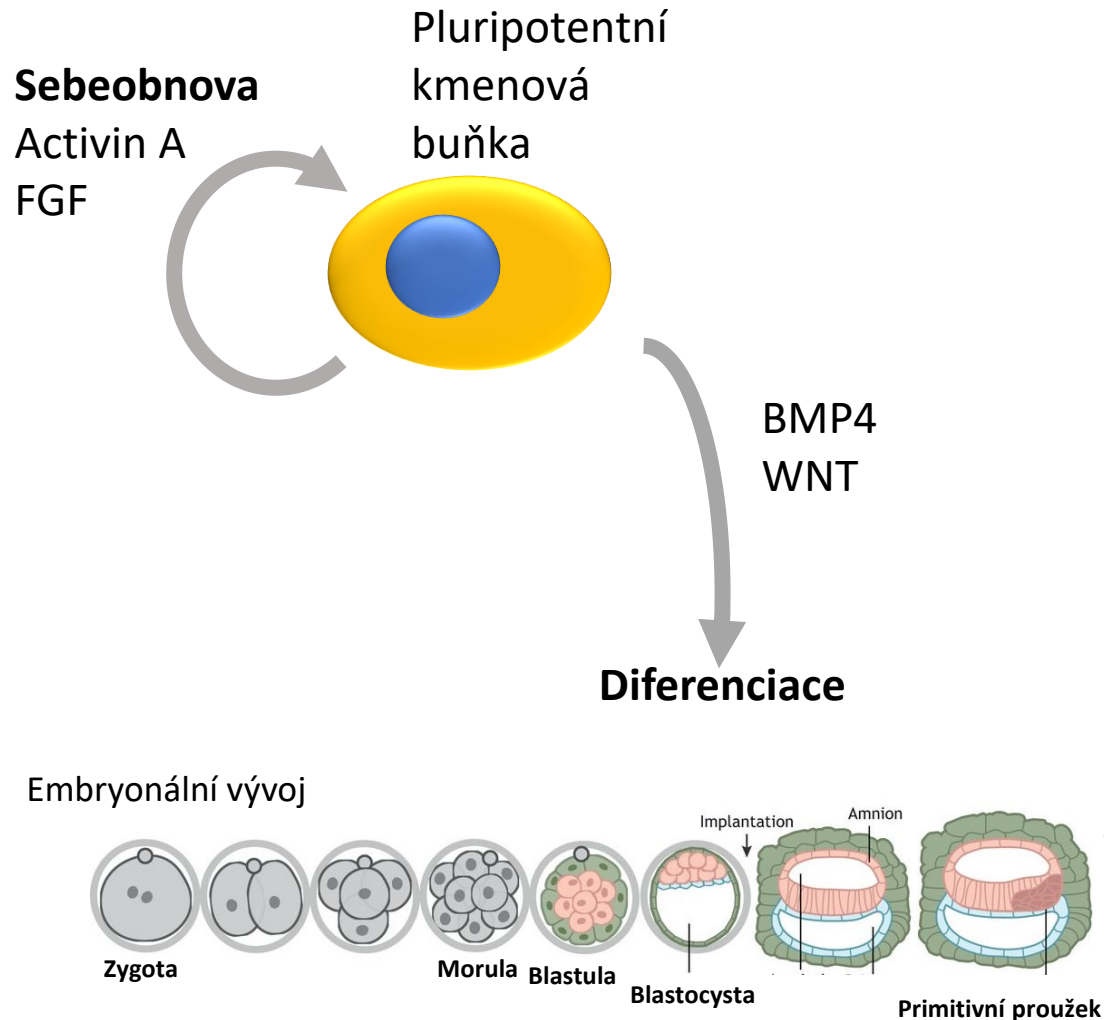
RA indukuje tvorbu ektodermu z PSC



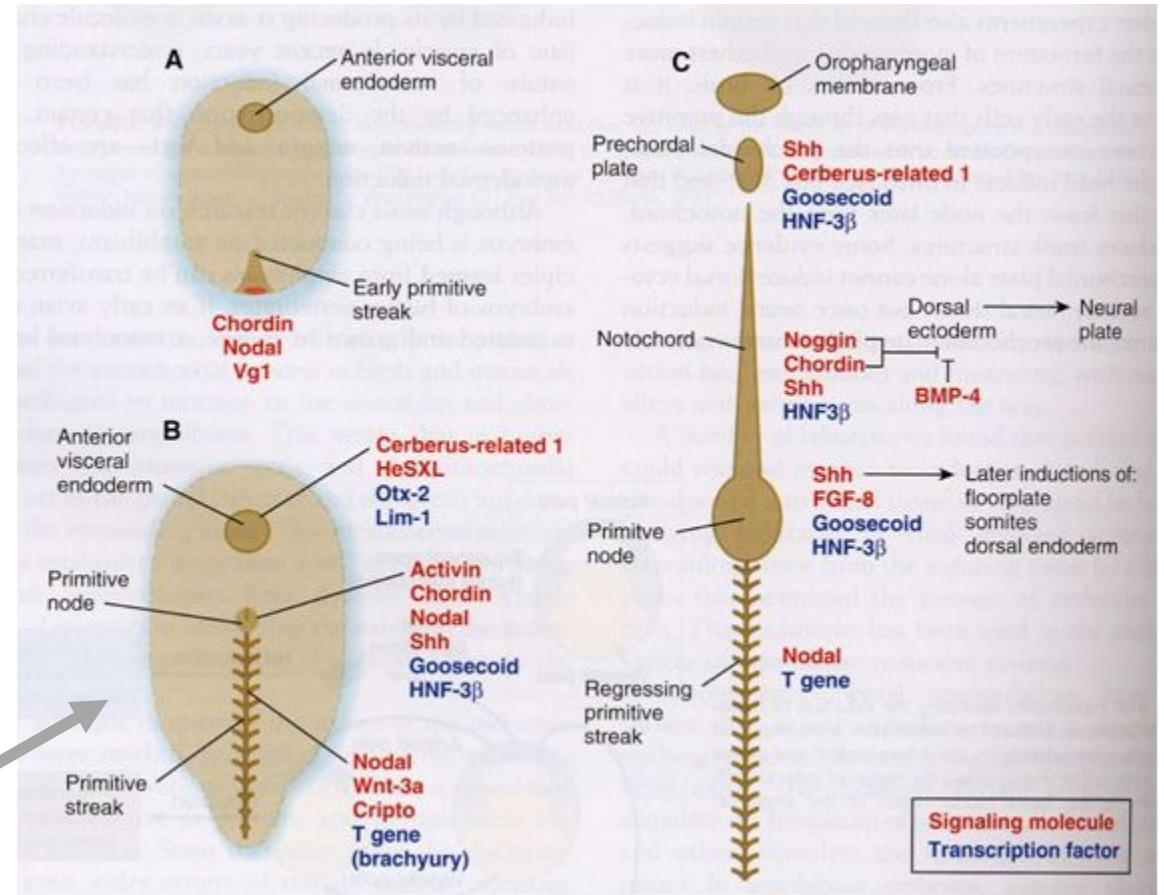
Zhang, PLOS 2015

Co řídí a určuje osud KB:

Osud kmenové buňky řídí faktory mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje



Signální dráhy řídící tvorbu embrya (primitivního proužku)



Možné osudy KB a jejich řízení:

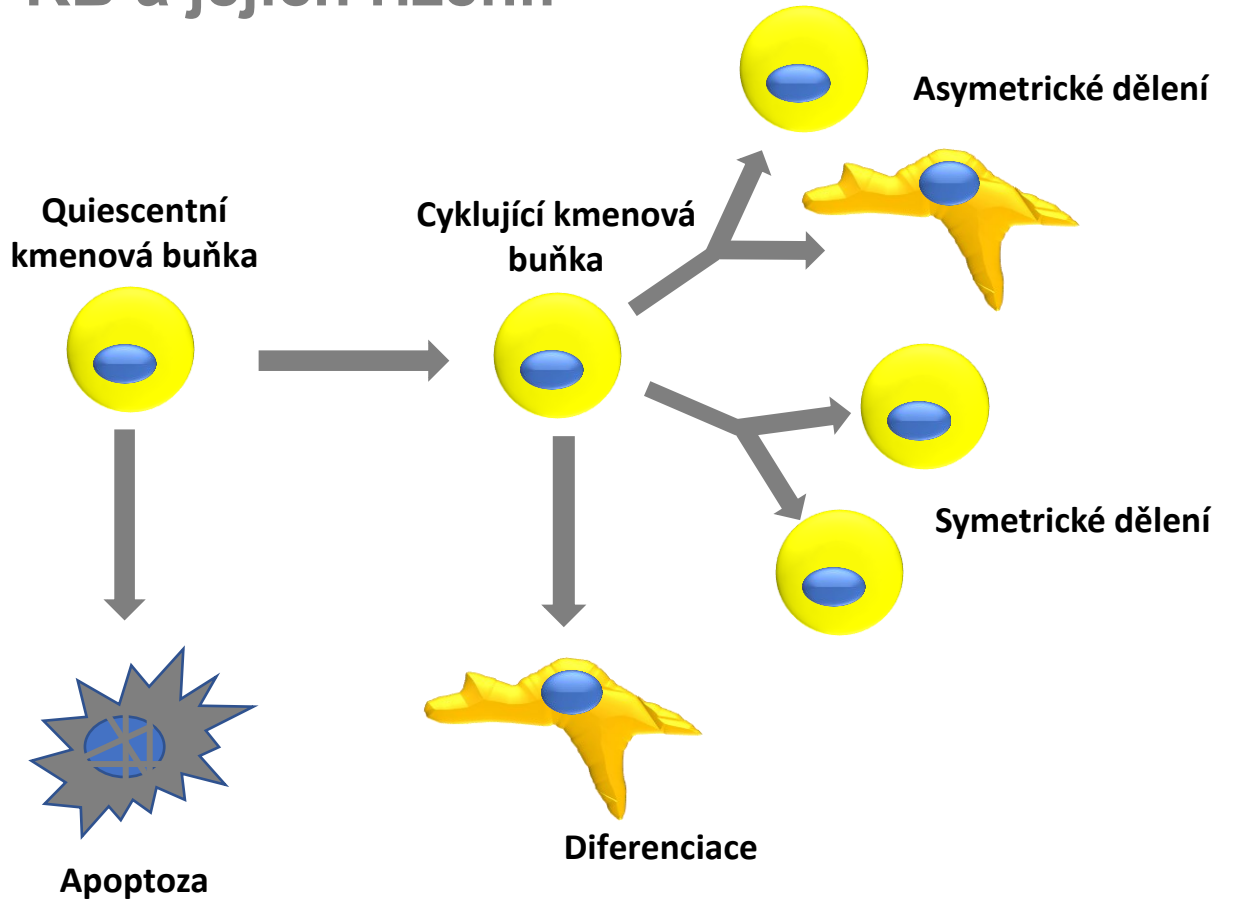
5 možných osudů kmenové buňky:

- 1) Qiescence (absence mitogeních signálů)
- 2) Symetrické dělení (expanze – časný embryonální vývoj)
- 3) Asymetrické dělení (integriny-orientace dělicího vřeténka)
- 4) Diferenciace
- 5) Apoptóza

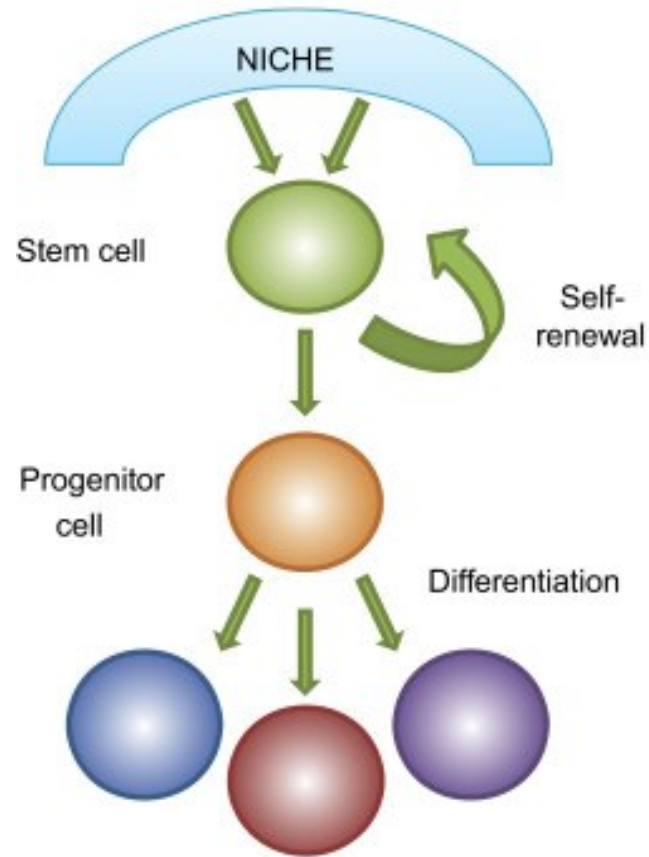
Osud KB je řízen:

- 1) Růstovými faktory
- 2) Interakcí s dalšími buňkami
- 3) Humorálními signály
- 4) Chemickými signály
- 5) Fyzikálními silami
- 6) Atd..

Niche
(mikroprostředí)



Mikroprostředí - Niche

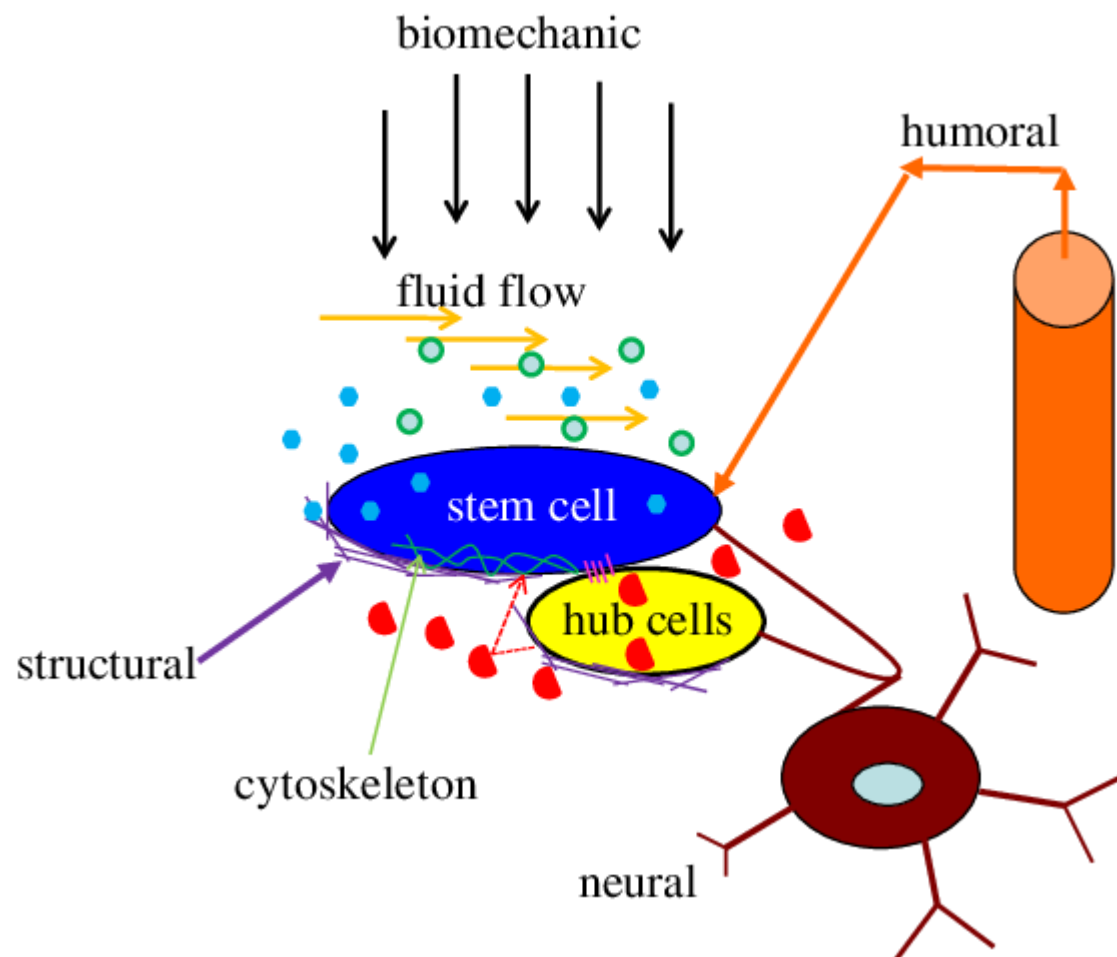


Niche je mikroprostředí v rámci anatomického umístění ve kterém se kmenové buňky nachází, které s kmenovými buňkami interaguje a určuje jejich osud..

Do niche patří:

- Fyzický kontakt buněčné membrány
- Buněčná signalizace autokrinní i parakrinní
- Signály neuronů
- Metabolické produkty aktivity tkáně
- atd..

Mikroprostředí – Niche



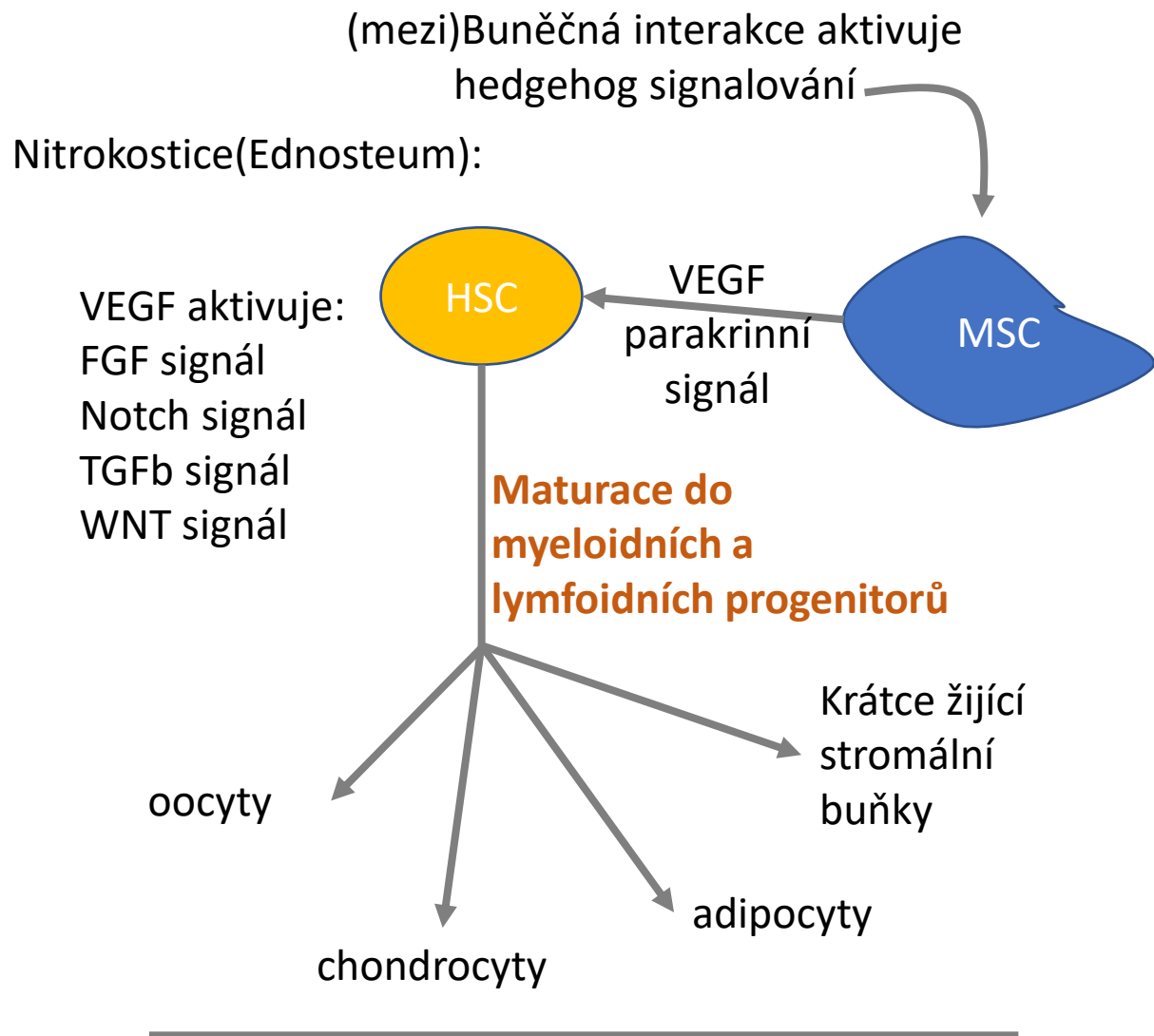
Niche je mikroprostředí v rámci anatomického umístění ve kterém se kmenové buňky nachází, které s kmenovými buňkami interaguje a určuje jejich osud..

Do niche patří:

- Fyzický kontakt buněčné membrány
- Buněčná signalizace autokrinní i parakrinní
- Signály neuronů
- Metabolické produkty aktivity tkáně
- atd..

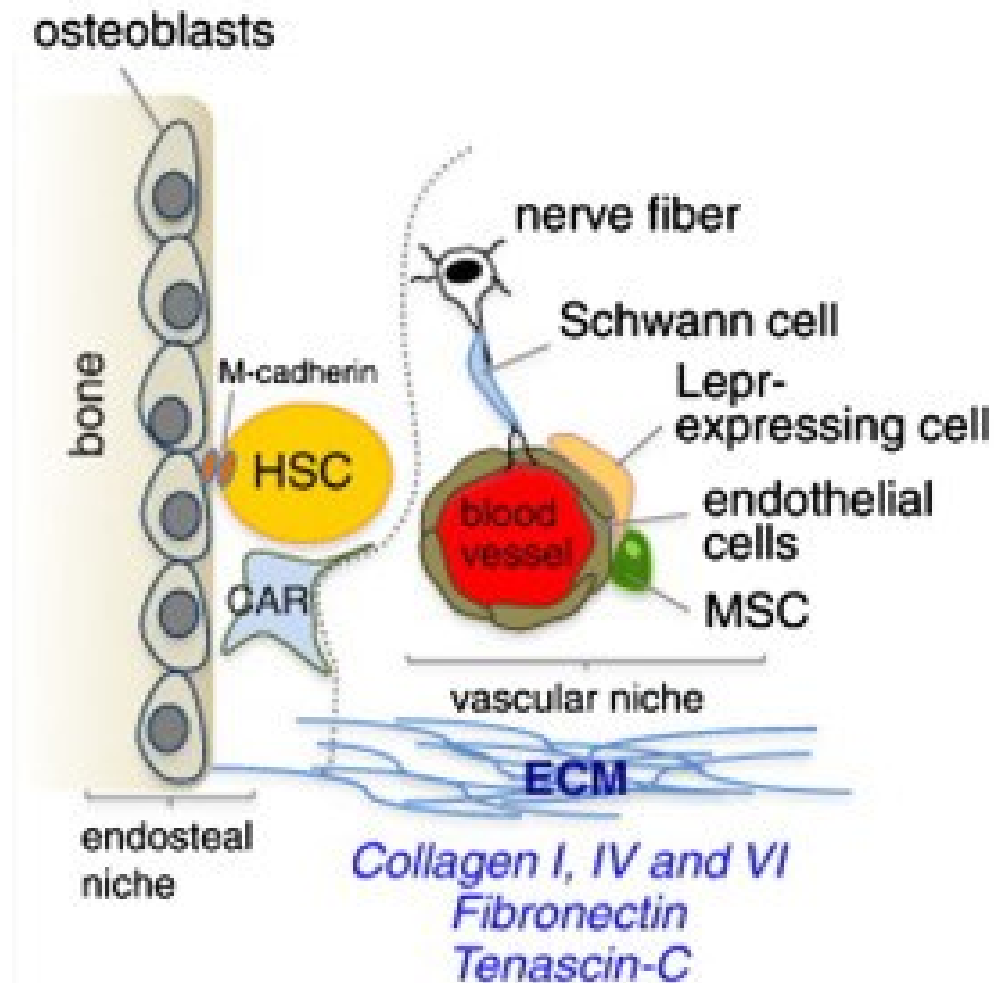
- kyslík
- ⬡ autokrinní faktory
- parakrinní signál
- /// mezibuněčné interakce
- ↔ interakce s extracelulární hmotou

Examples of niches and their effect on stem cell fate determination



Konkrétní diferenciacie je určena anatomickou polohou

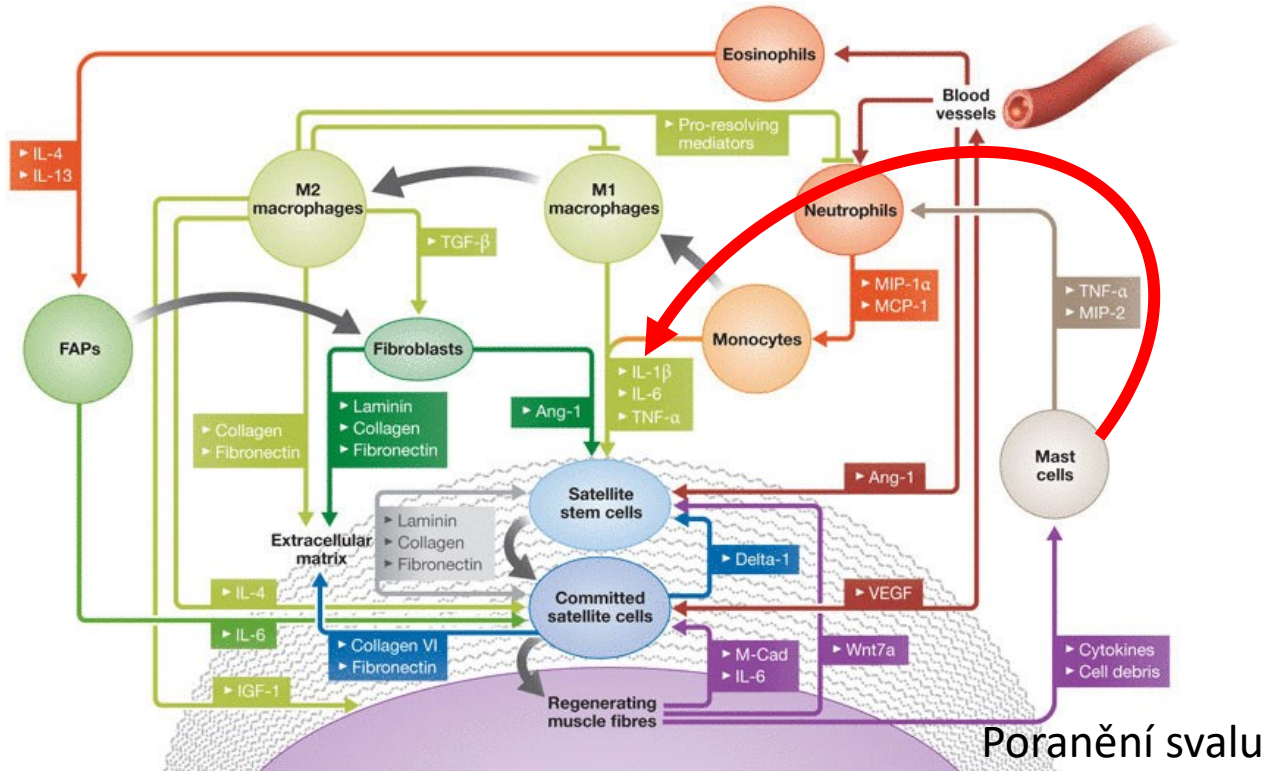
(A) Hemopoietic stem cell niche



Příklady niche a jeho působení na osud kmenových buněk

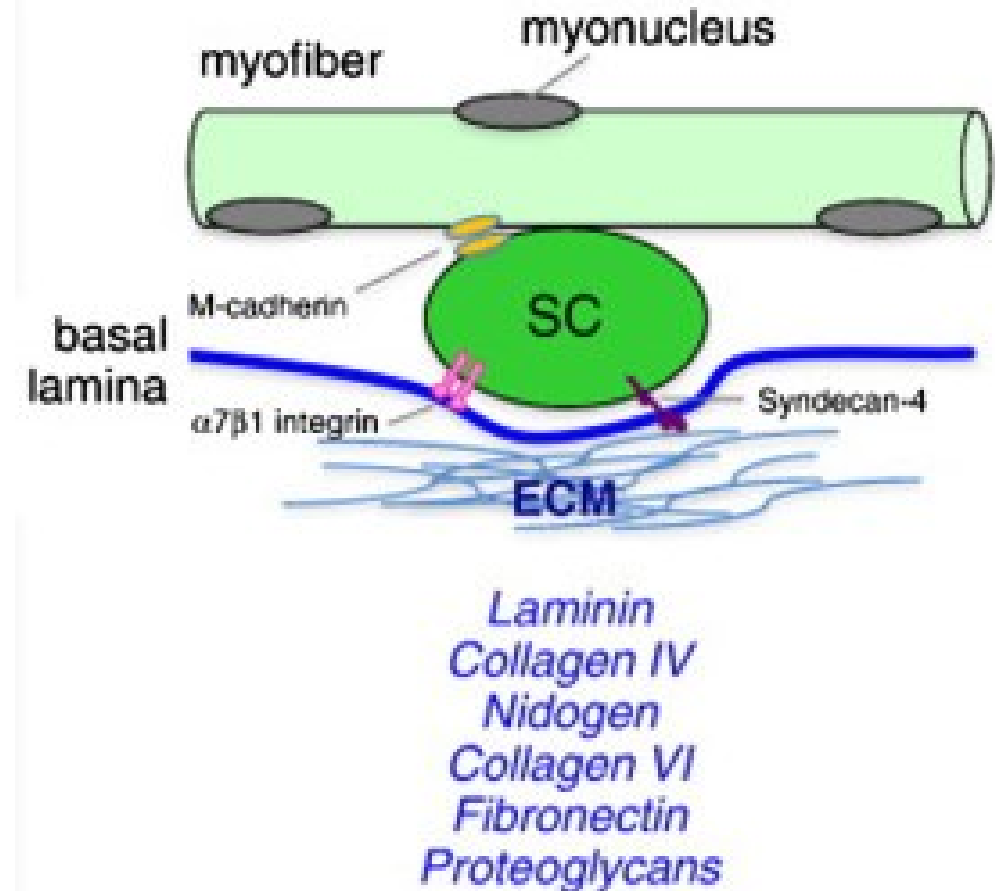
Proliferační aktivita satelitních buněk je regulována intenzivní mezibuněčnou komunikací, prostřednictvím klíčových signálních drah

Anatomie mikroporostředí se dynamicky mění v průběhu regenerace svalu.



(C)

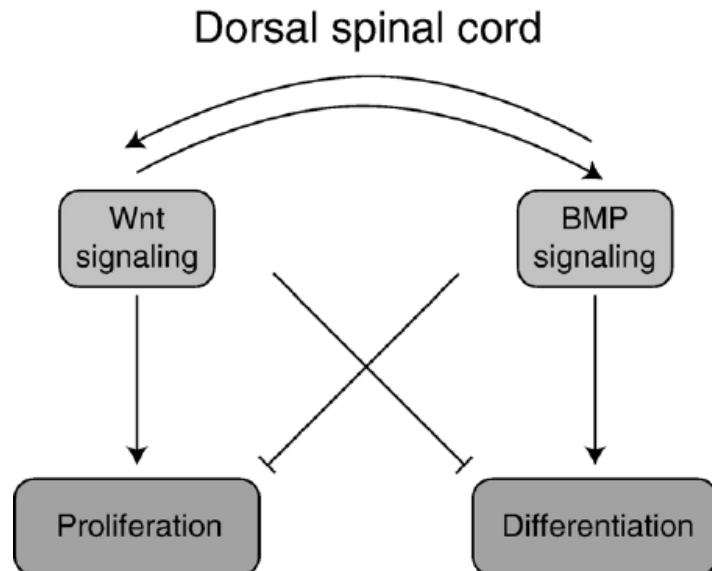
Satellite cell niche



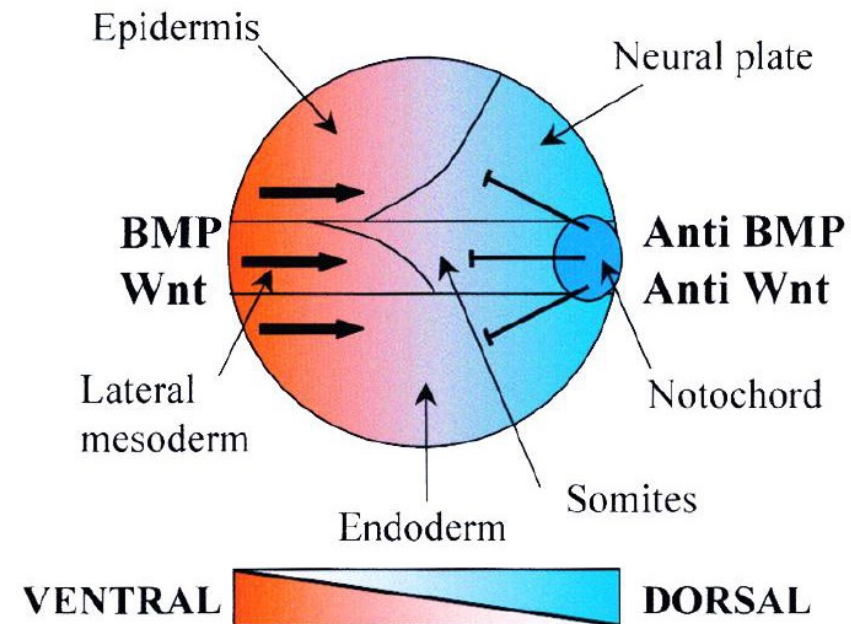
Syntetické a biologické buněčné matrice

Napodobení niche a jeho působení na osud kmenových buněk *in vitro*

- gradient signalizace vytvořený vzájemným působením WNT a BMP reguluje rovnováhu mezi diferenciací a proliferací při neurulaci embrya



Tvorba spemannova organizéru



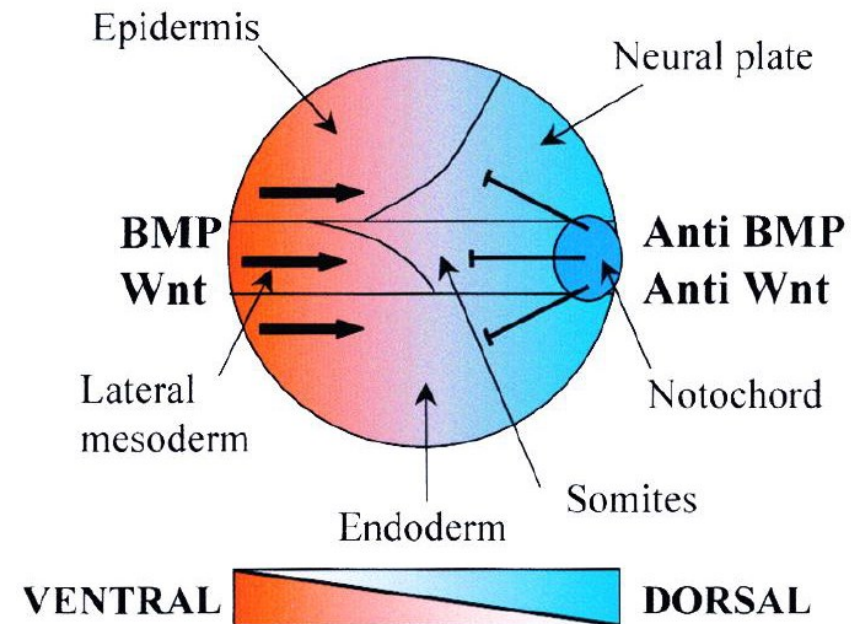
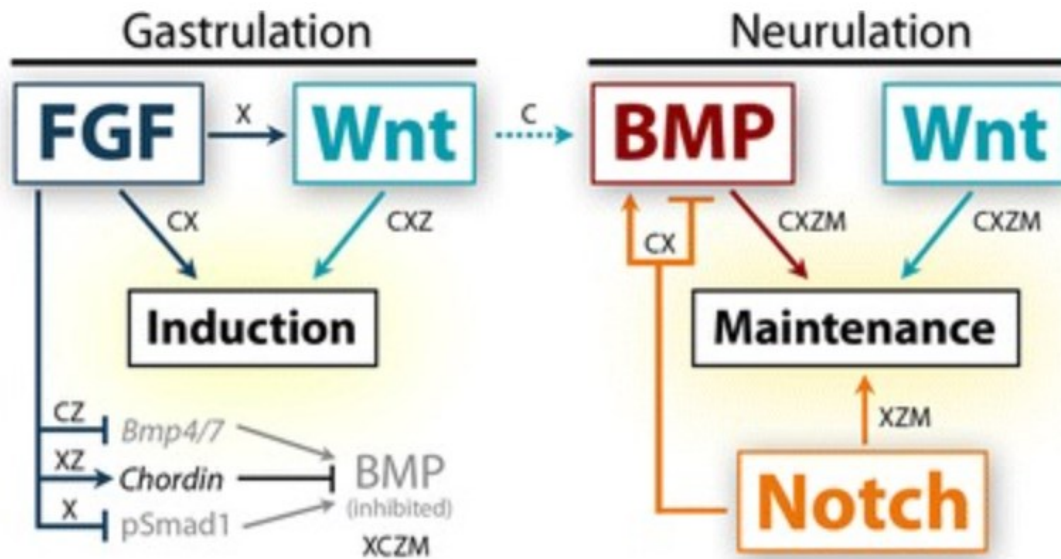
Syntetické a biologické buněčné matrice

Napodobení niche a jeho působení na osud kmenových buněk *in vitro*

- gradient signalizace vytvořený vzájemným působením WNT a BMP reguluje rovnováhu mezi diferenciací a proliferací při neurulaci embrya

- chceme-li indukovat specifický osud kmenových buněk *in vitro*, musíme napodobit mikroprostředí *in vivo*

Tvorba spemannova organizéru

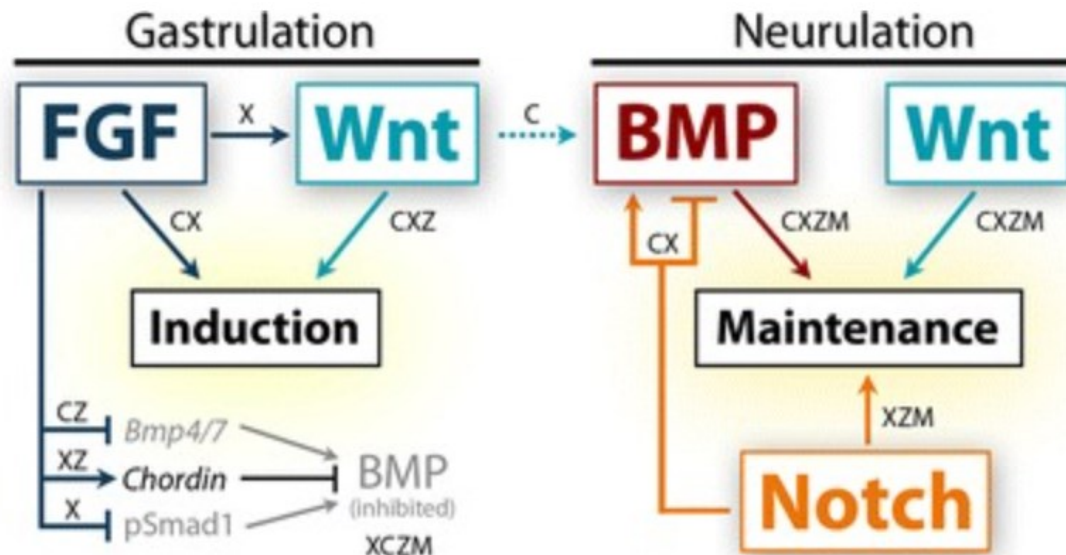


Syntetické a biologické buněčné matrice

Napodobení niche a jeho působení na osud kmenových buněk *in vitro*

- gradient signalizace vytvořený vzájemným působením WNT a BMP reguluje rovnováhu mezi diferenciací a proliferací při neurulaci embrya

- chceme-li indukovat specifický osud kmenových buněk *in vitro*, musíme napodobit mikroprostředí *in vivo*



	niche NSC	niche HSC	niche EpSC
Signální dráhy	Wnt, BMP, Notch	Wnt, BMP, Notch	Wnt, BMP, Notch
Růstové faktory	TGF-β1, FGF-2, IGF-1	TGF-β, FGF-1, IGF	TGF-β-1, FGF-18, IGF-1
Hypoxie	2,5–5 %	1–6 %	1,5–5 %
Buněčné složení niche	Ependymální buňky, Neurální kmenové buňky, Neuroblasty, Oligodendrocyty	Osteoblasty, Vřetenovité N-cadherin pozitivní osteoblasty, Stromální buňky, Endotelové buňky cév, Osteoklasty	Buňky dermální pochvy, Buňky dermální papily, Epiteliální buňky, Melanocyty

L.Hujnak, bakalářská práce MU

Syntetické a biologické buněčné matrice

Napodobení niche a jeho působení na osud kmenových buněk *in vitro*

klíčové faktory mikroprostředí – lekce z embryologie

„niche“ faktory

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

EGF, FGF, HGF, inhibitory HDAC

Noggin, Activin A, Gastrin, inhibitory p38

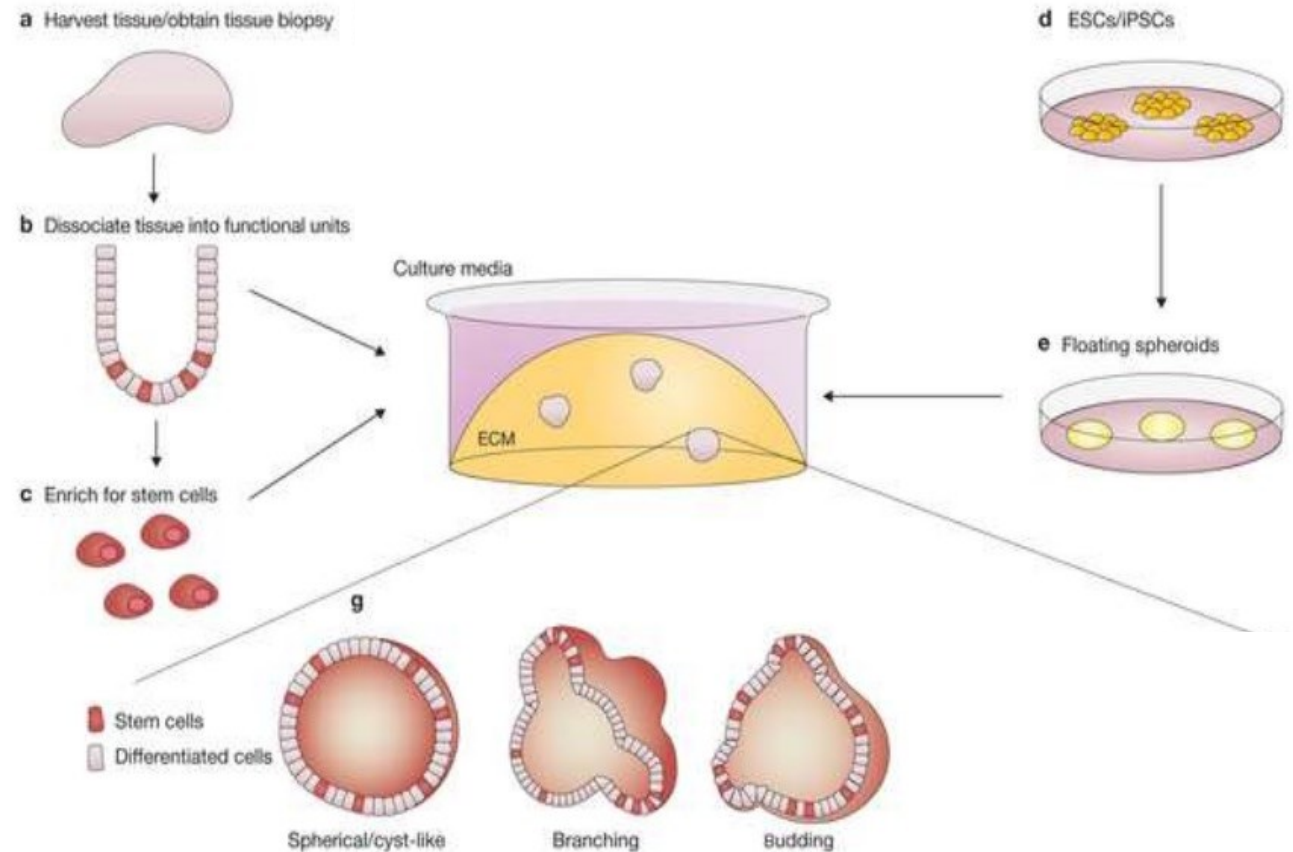
Diferenciační faktory

BMP, TGF- β , Inhibitory NOTCH, EGF

R-spondin, WNT, Noggin

Extracelulární matrice (ECM) faktory

Kolagen, Laminin, Entaktin, Fibronektin



Klíčové faktory mikroprostředí - tkáňové inženýrství

Faktory umožňující diferenciaci a tvorbu organoidů

Extracelulární matrice umožnila 3D kultivaci a diferenciaci

Buněčná adheze:

Migrace

Proliferace

Genová exprese

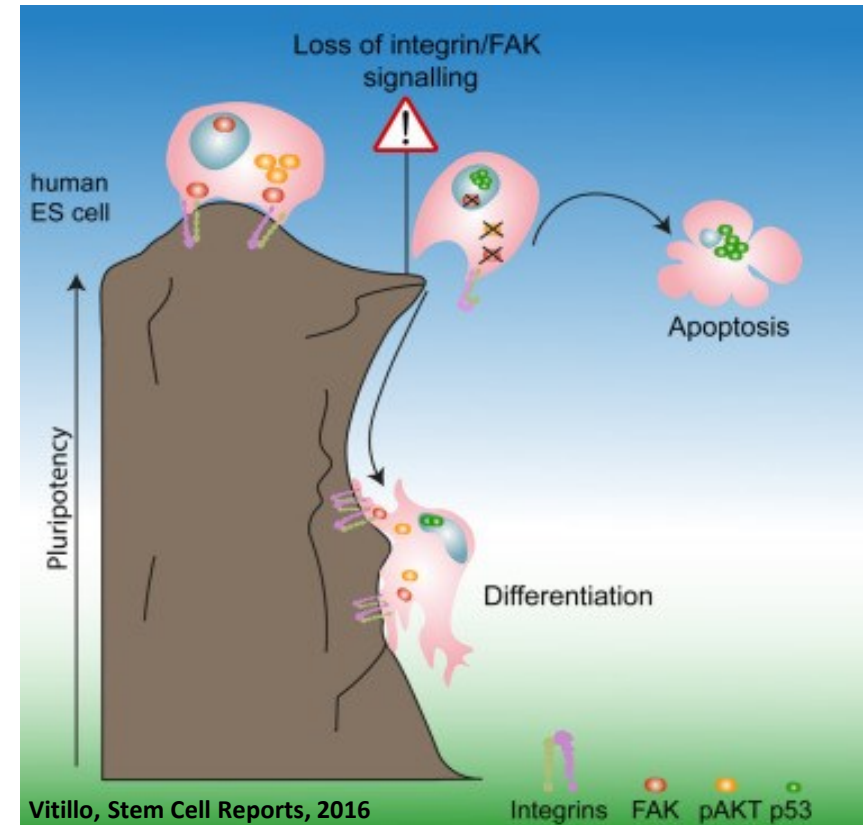
Přežití

Absence adheze

Zástava buněčného cyklu

Apoptóza

Senescence



Mutace v signálních drahách od integrinů umožňují EMT přechod u rakovin

Faktory umožňující diferenciaci a tvorbu organoidů

Extracelulární matrice umožnila 3D kultivaci a diferenciaci

Syntetická matrice ho musí obsahovat

Buněčná adheze:

Migrace

Proliferace

Genová exprese

Přežití

Absence adheze

Zástava buněčného cyklu

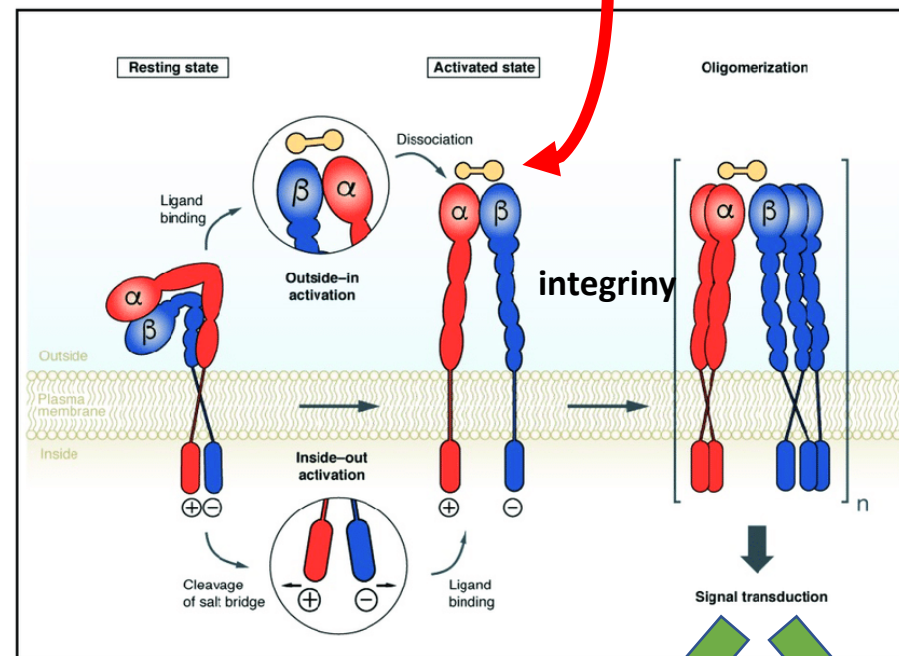
Apoptóza

Senescence

Extracelulární matrice:

Laminin
Kolagen
Fibronektin
A další ECM proteiny..

RDG motiv
(ligand pro
integriny)

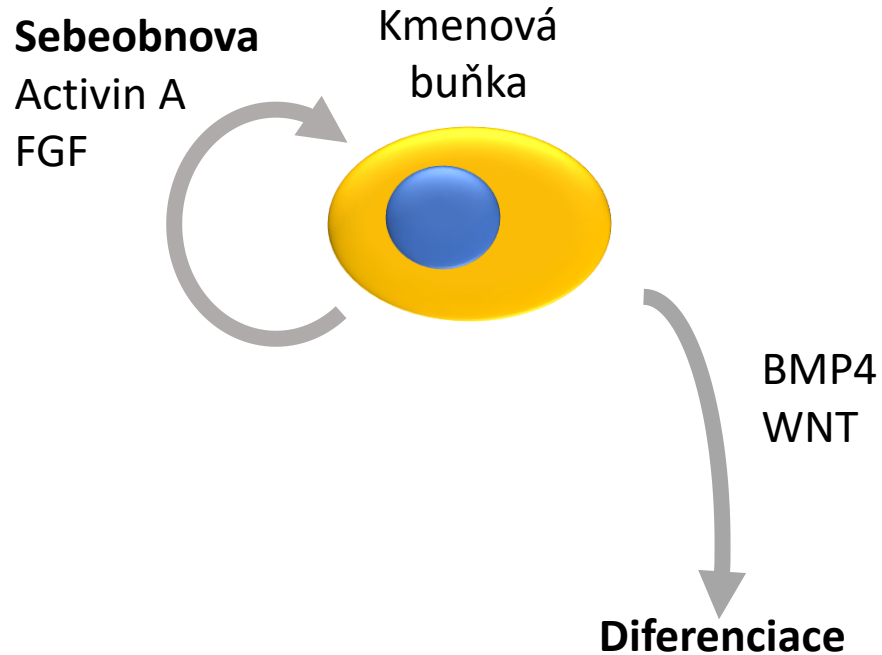


Přežití

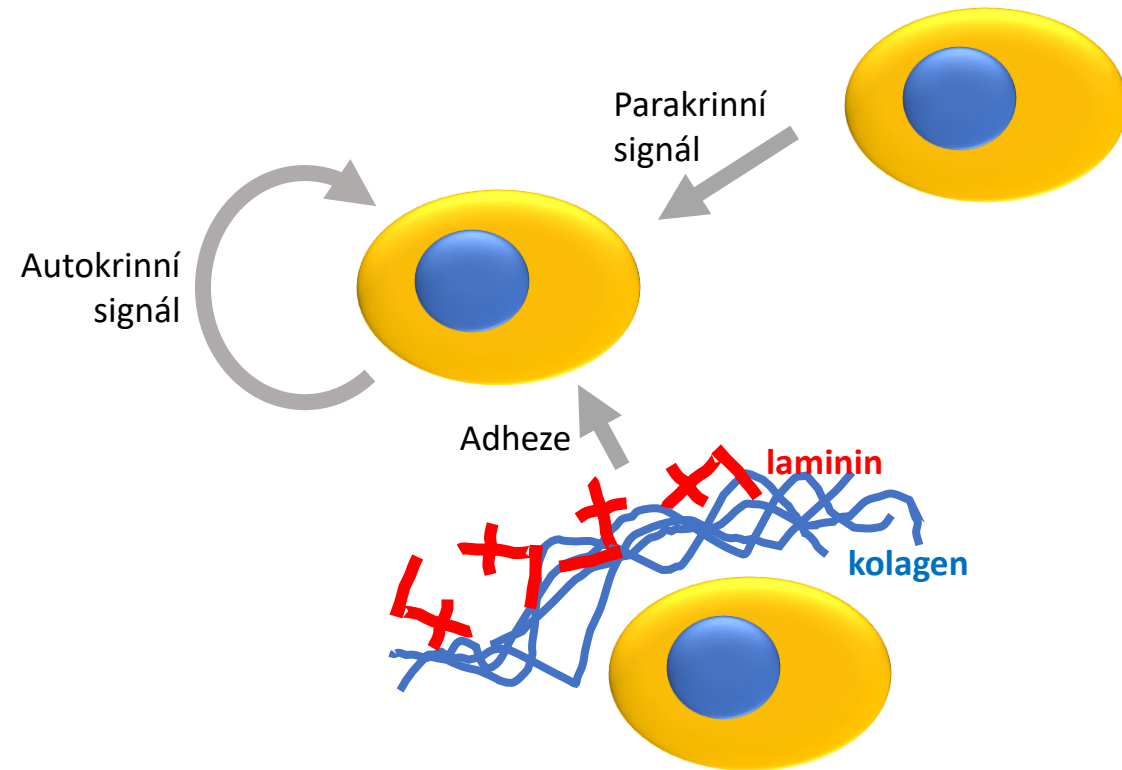
Proliferace

„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..)

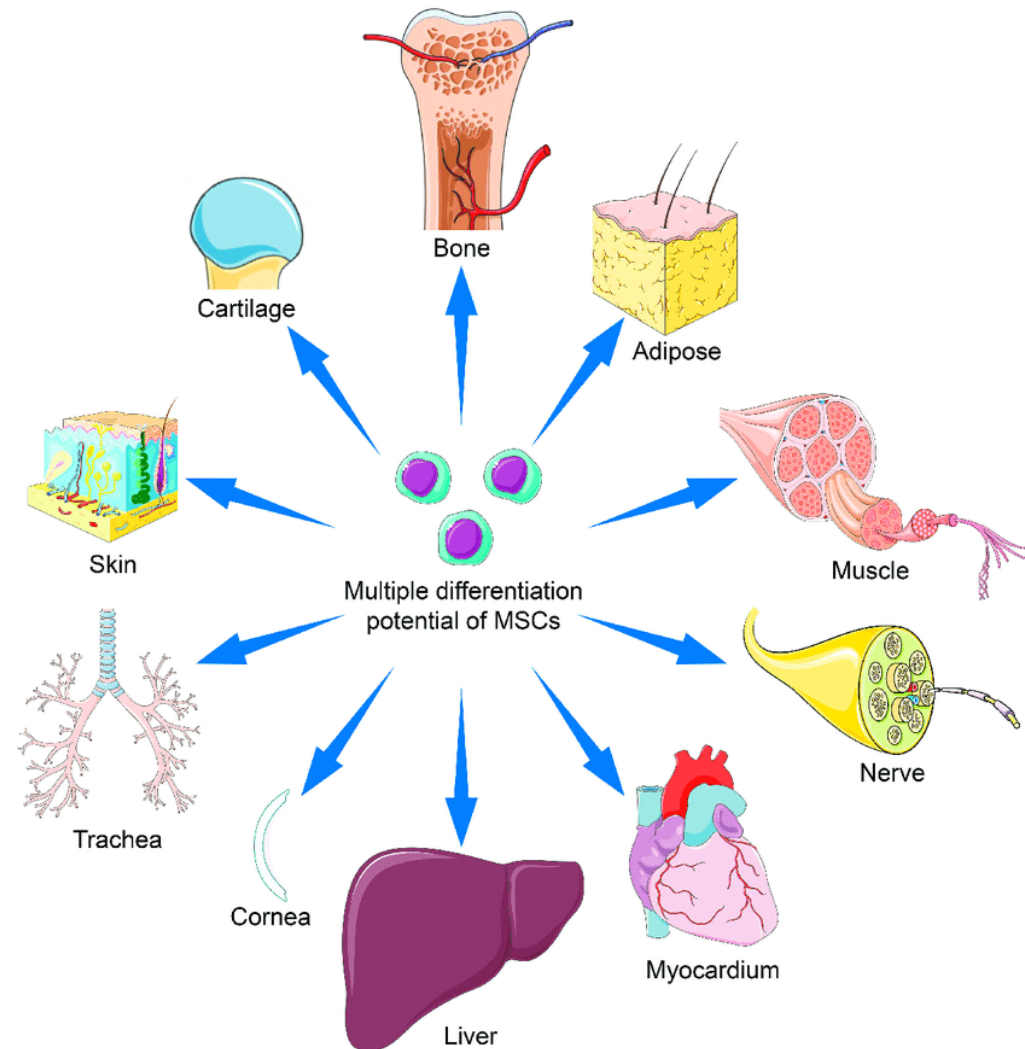


Kmenové buňky v medicíně

- Mezenchymální experimentální léčba a turistika za kmenovými buňkami
- Hematopoeitické především hematologické a imunitní onemocnění
- Pluripotentní embryonální a indukované a „extended“...

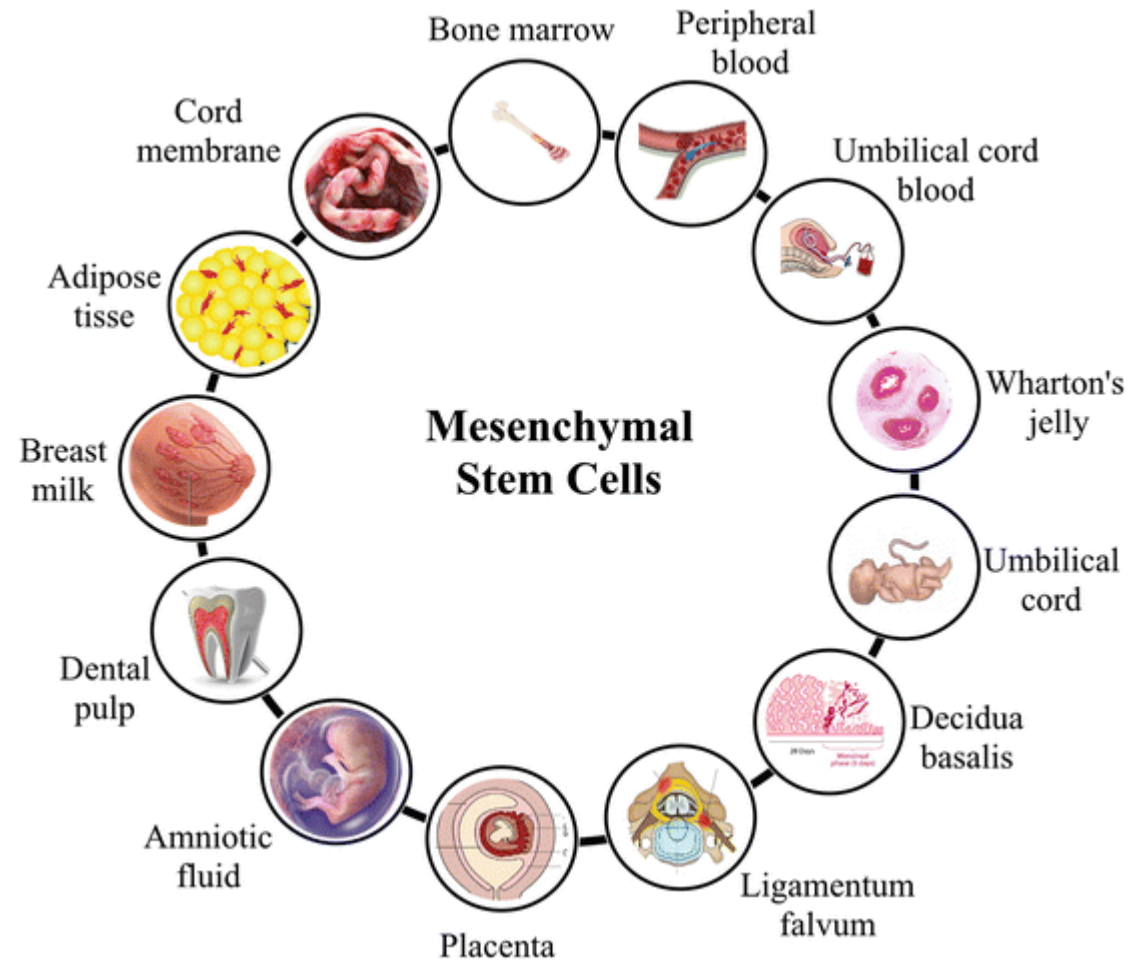
Mezenchymální kmenové buňky

- MSCs mají vysoký diferenciační potenciál
- Vysokou proliferační kapacitu
- Vysokou sekreci cytokinů a ligandů zprostředkávajících parakrinní podporu tkáňově specifických buněk (progenitorů)



Mezenchymální kmenové buňky

Zdroje MSC pro lékařské aplikace



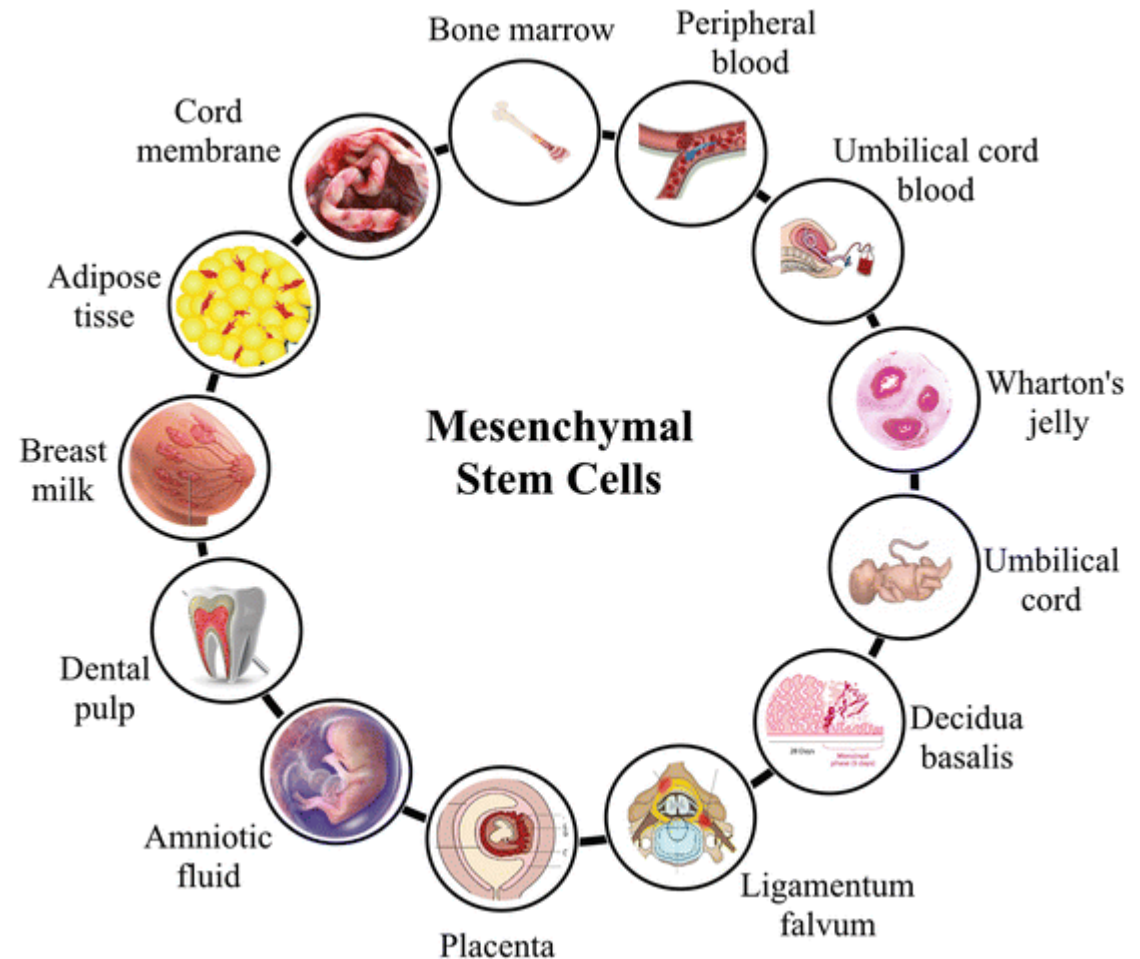
Mezenchymální kmenové buňky

Zdroje MSC pro lékařské aplikace

ALE!!!!

MSC se mezi sebou liší:

- Reakcí na růstové faktory a cytokiny
- Svým sekrečním profilem (rozdílná parakrinní stimulace)
- Svým diferenciačním potenciálem



Mezenchymální kmenové buňky

Možné způsoby působení transplantovaných mezenchymálních kmenových buněk

Přímá diferenciaci a náhrada cílových buněk nebo buněčná fúze s cílovou buňkou

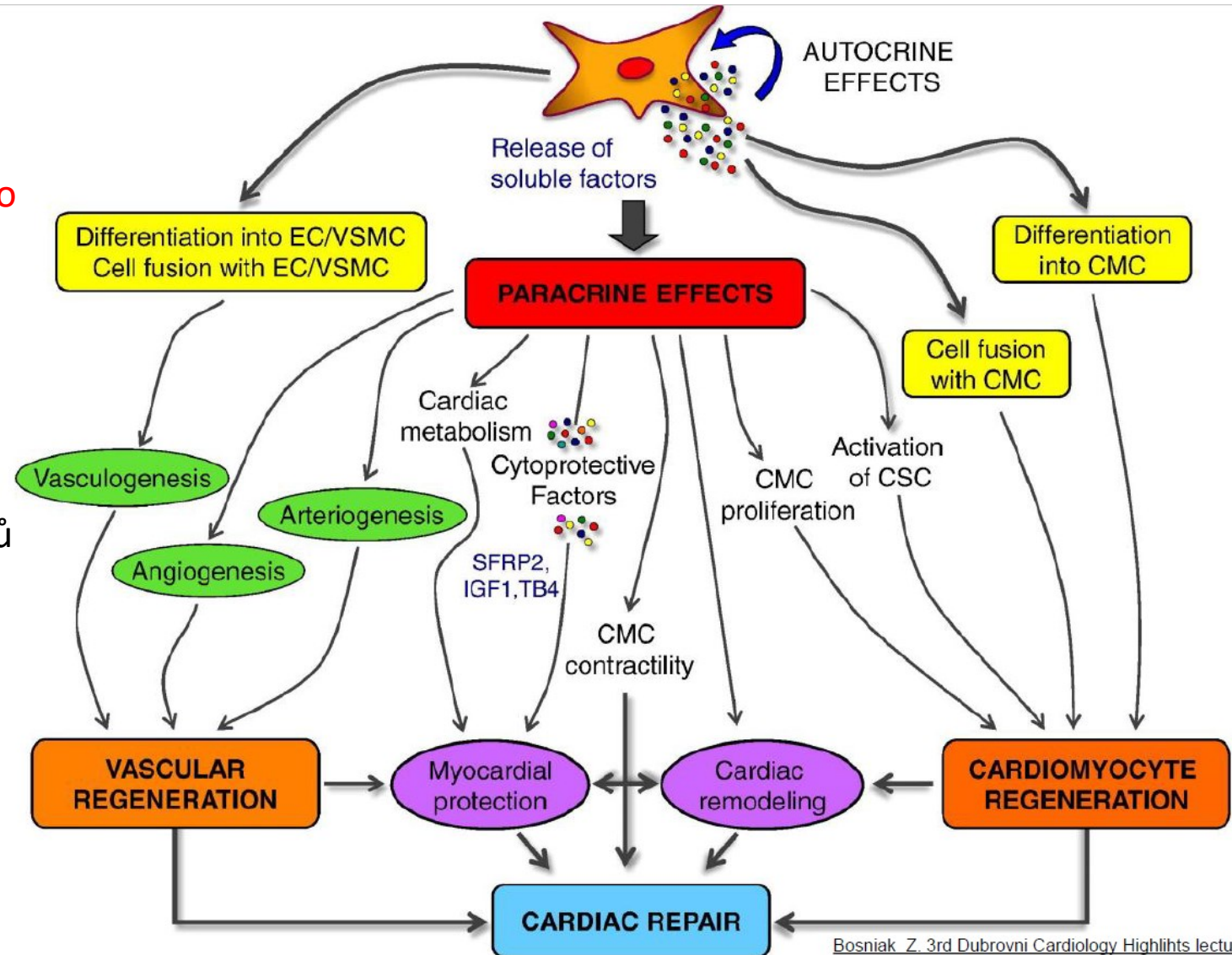
- regenerace kostí a chrupavky
- regenerace svaloviny (kosterní či srdeční)

Přímá podpora angiogeneze a vaskularizace

- Přímá diferenciaci MSC do buněk hladkých svalů cév a endotelových buněk

Parakrinní efekt:

- Podporující vaskularizaci prostřednictvím angiogeneze
- podporující tkáňově specifickou homeostázu



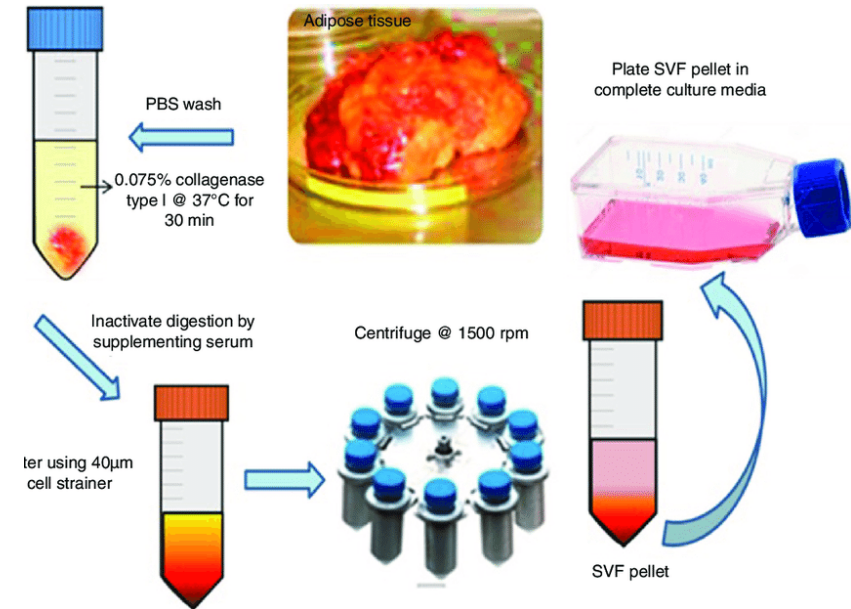
Mezenchymální kmenové buňky

Zdroje MSC pro lékařské aplikace

MSC se mezi sebou liší:

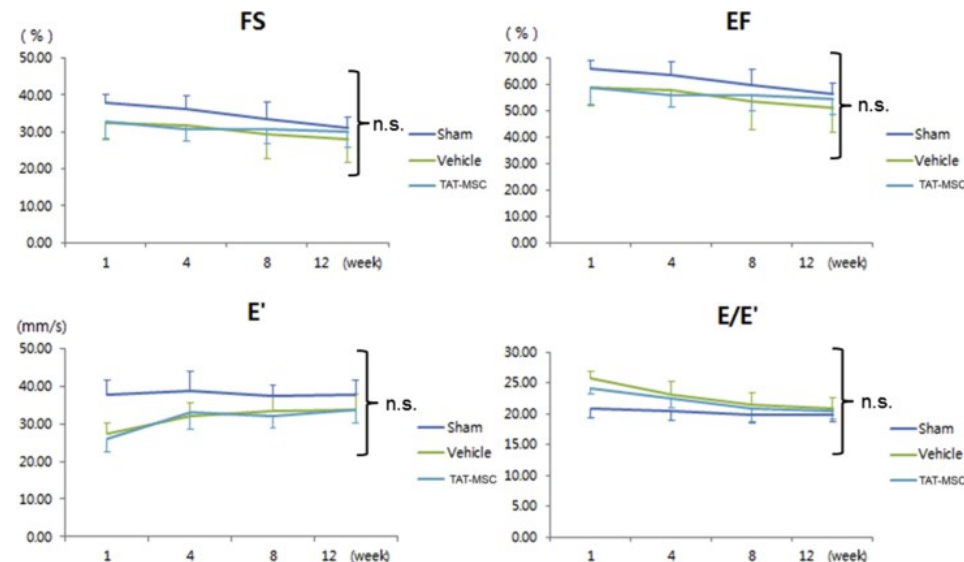
- Reakcí na růstové faktory a cytokiny
- Svým sekrečním profilem (rozdílná parakrinní stimulace)
- Svým diferenciačním potenciálem

Jednoduchá izolace MSC z tuku



DOI:[10.1016/j.htct.2018.05.001](https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.05.001)

Aplikace MSC z tukové tkáně do srdce po infarktu



Bez signifikantního efektu na rekonvalescenci po infarktu

doi: [10.1016/j.reth.2019.07.005](https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.07.005)

Mezenchymální kmenové buňky

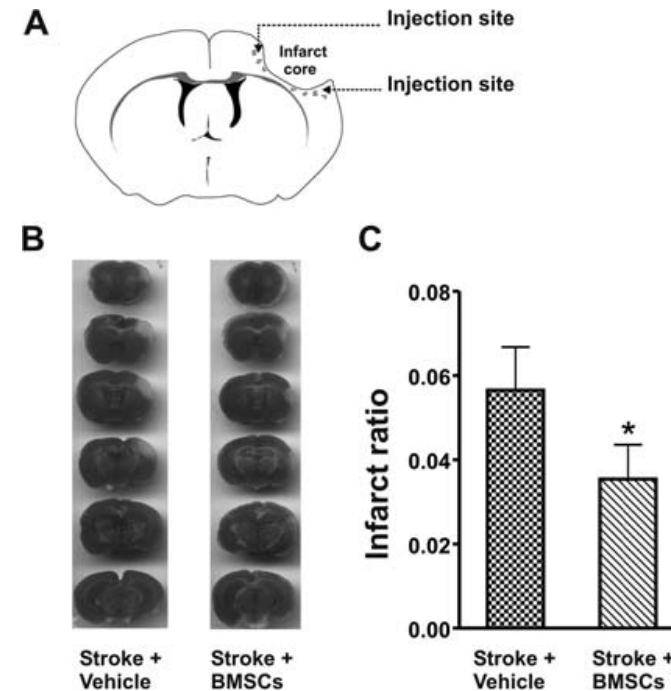
Zdroje MSC pro lékařské aplikace

MSC se mezi sebou liší:

- Reakcí na růstové faktory a cytokiny
- Svým sekrečním profilem (rozdílná parakrinní stimulace)
- Svým diferenciačním potenciálem

Důležitá je volba typu buněk pro zamýšlenou aplikaci

Pozitivní efekt kmenových buněk kostní dřeně na lezi po infarktu mozku



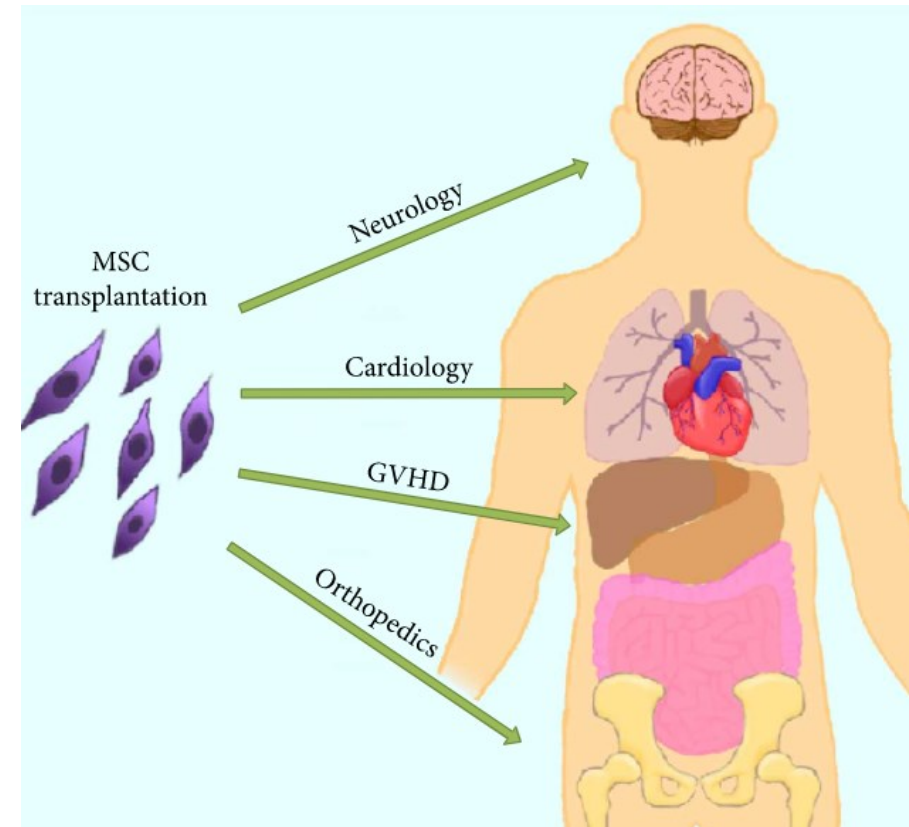
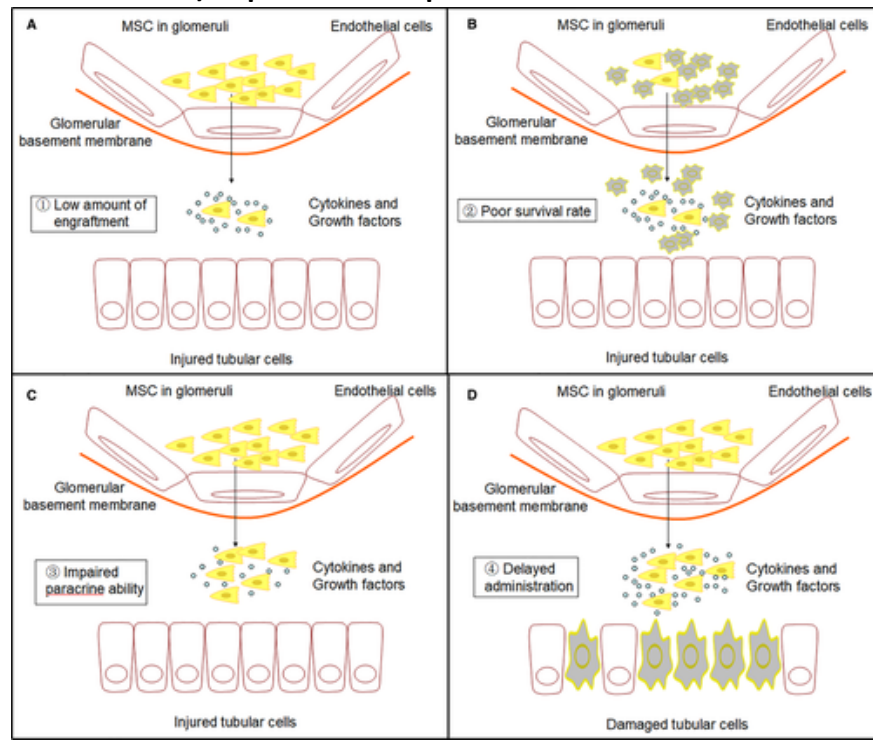
! Není MSC jako MSC !

Mezenchymální kmenové buňky

Odvrácená strana použití MSC v medicíně

Riziko:

- Tumorigeneze
- Imunitní odpověď (autologní < allogenní)
- Selhání léčby kvůli-
 - i) snížené diferenciační kapacitě
 - ii) diferenciaci do jiných typů buněk
 - iii) krátkému přežití graftu
 - iv) opožděné použití



<https://doi.org/10.1155/2019/9628536>

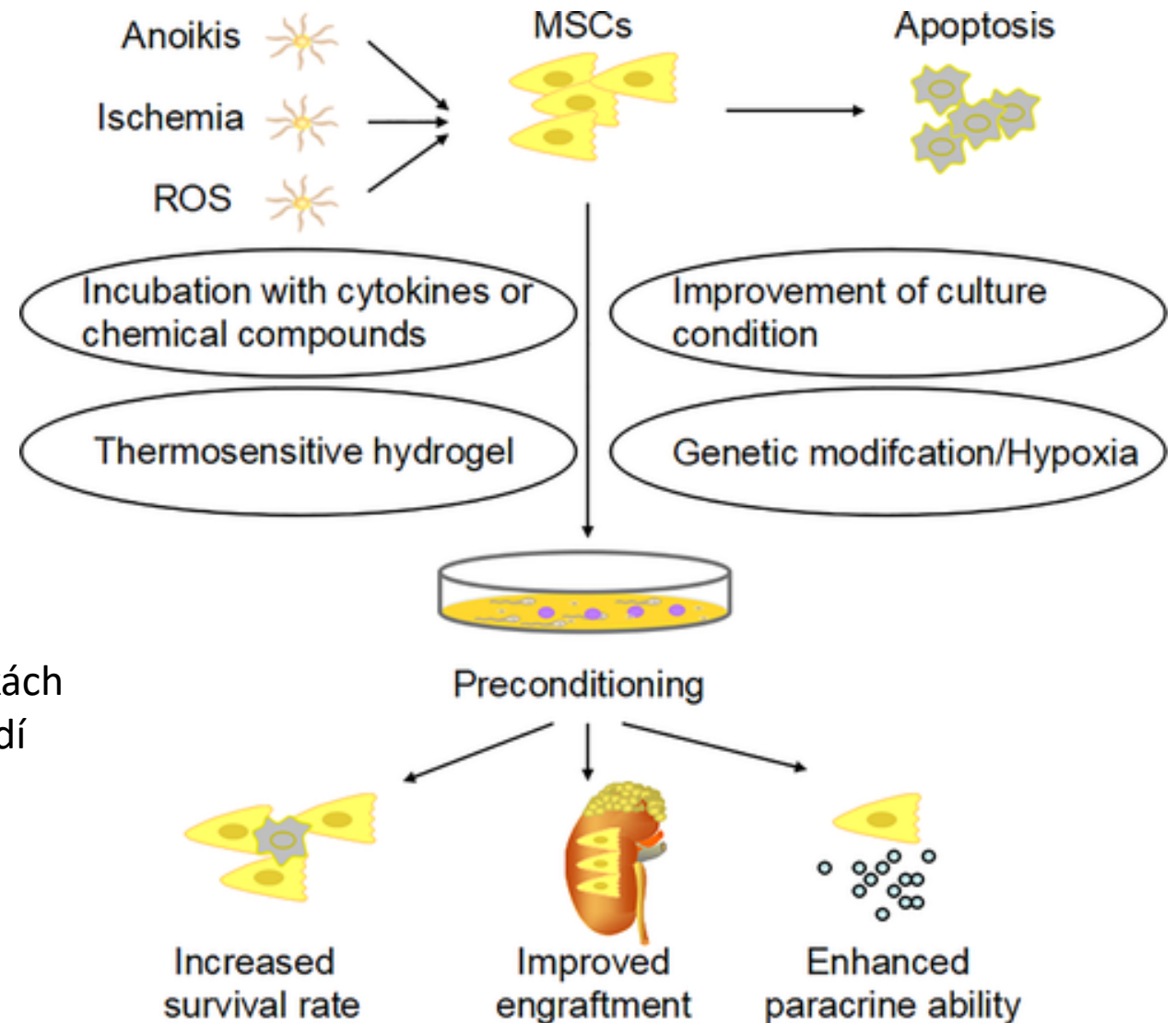
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14035>

Mezenchymální kmenové buňky

Odvrácená strana použití MSC v medicíně

Riziko:

- Tumorigeneze
- Imunitní odpověď (autologní < allogenní)
- Selhání léčby kvůli-
 - i) snížené diferenciační kapacitě
 - ii) diferenciaci do jiných typů buněk
 - iii) krátkému přežití graftu
 - iv) opožděné použití



Možnosti zlepšení technologie

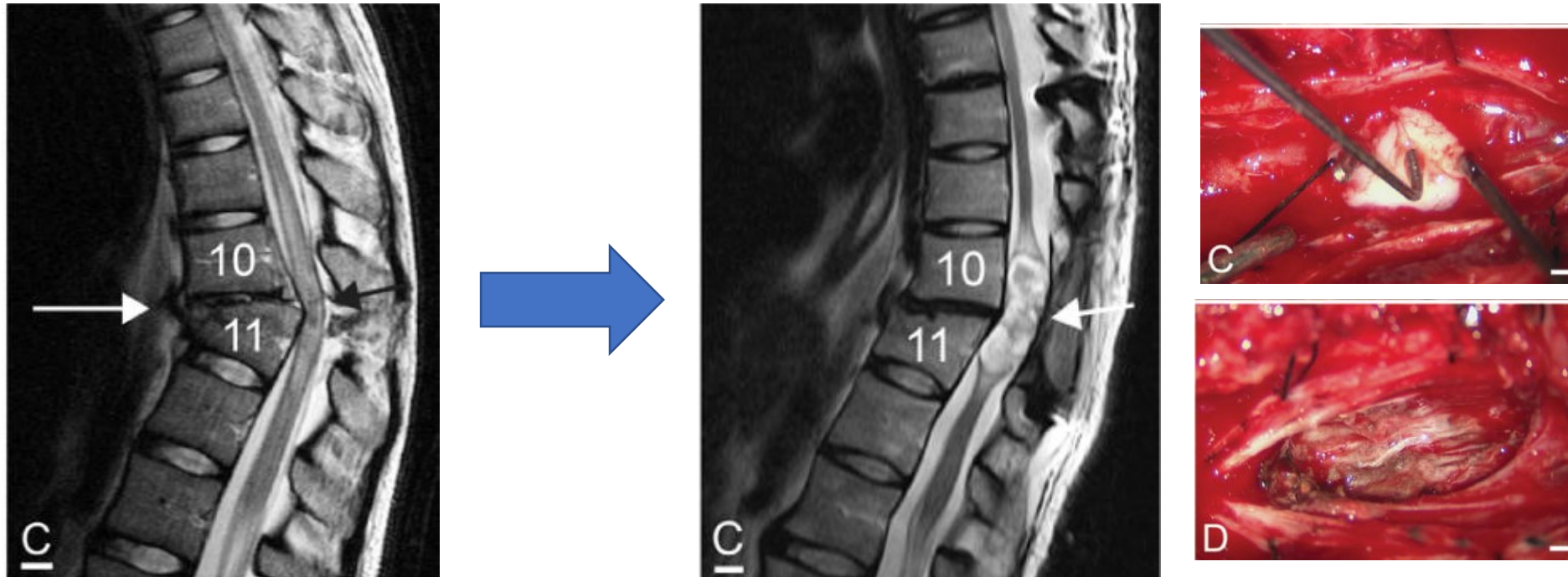
- Preinkubace v optimálních (selekčních) podmínkách
- Užití matric a materiálů udržujících mikroprostředí
- Genetické modifikace

Mezenchymální kmenové buňky

Odvrácená strana použití MSC v medicíně

Odvrácená strana použití MSC v medicíně

Tumorogeneze



Casereport: Autograft olfaktorických MSC 3 roky po zranění míchy. Po 8 letech nutná resekce masy buněk z páteřního kanálu
Multicystická masa nalezená v místě transplantace MSC (po zranění míchy) z olfaktorických buněk nosní sliznice

Kmenové buňky v medicíně

- Mezenchymální
experimentální léčba a turistika za kmenovými
buňkami
- Hematopoeitické
především hematologické a imunitní
onemocnění
- Pluripotentní
embryonální a indukované

Pluripotentní kmenové buňky

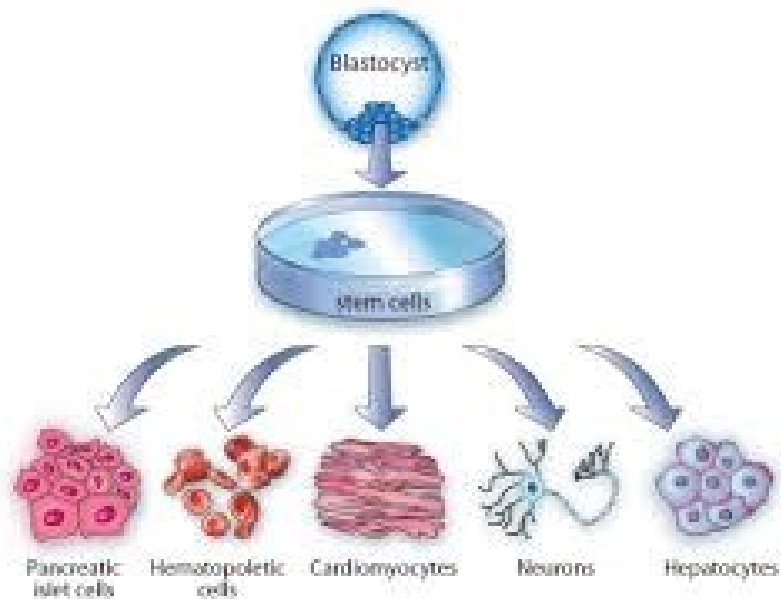
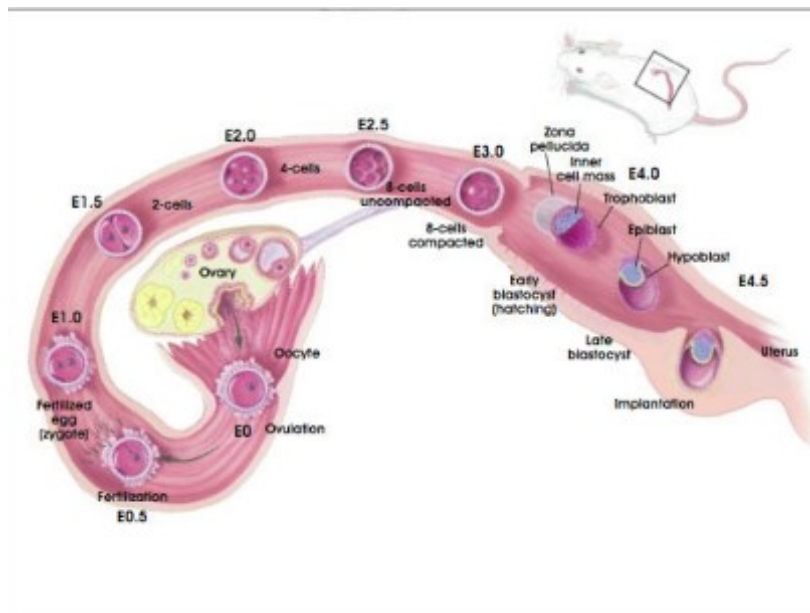


Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.



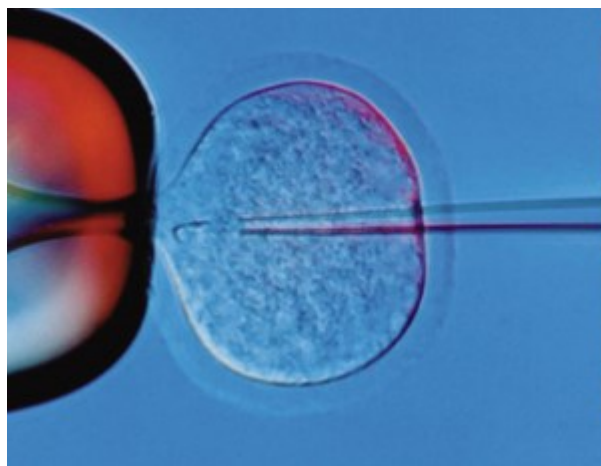
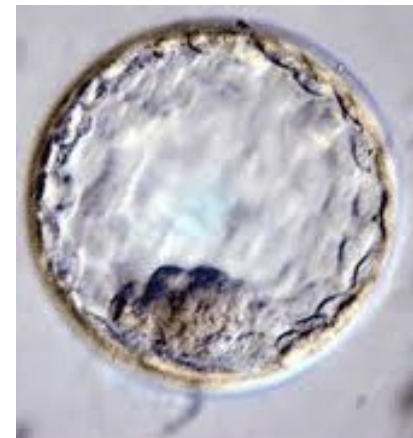
One Ring to Rule Them All...

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



Co myslíme EMBRYEM, když mluvíme O kmenových buňkách

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



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

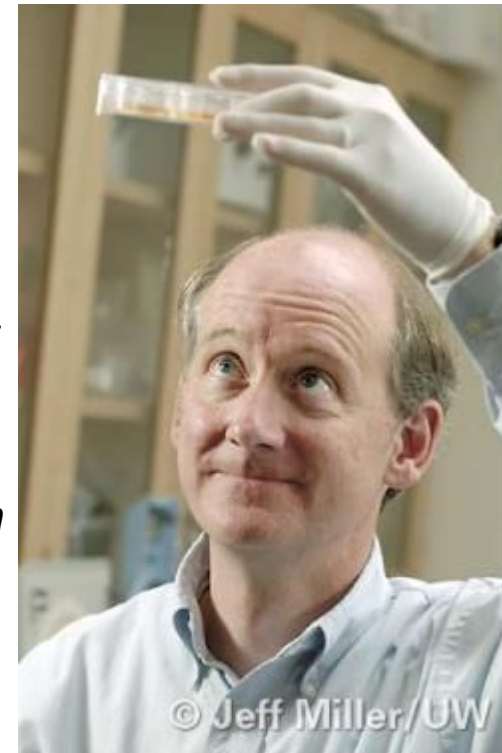


Benedict XIV

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

James Thompson

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



Zákon 227/2006 Sb

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

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

Zákon 273/2011 Sb

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

Zákon 227/2006 Sb

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

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

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

v roce 2007 – 3400 asistovaných reprodukcí

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

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

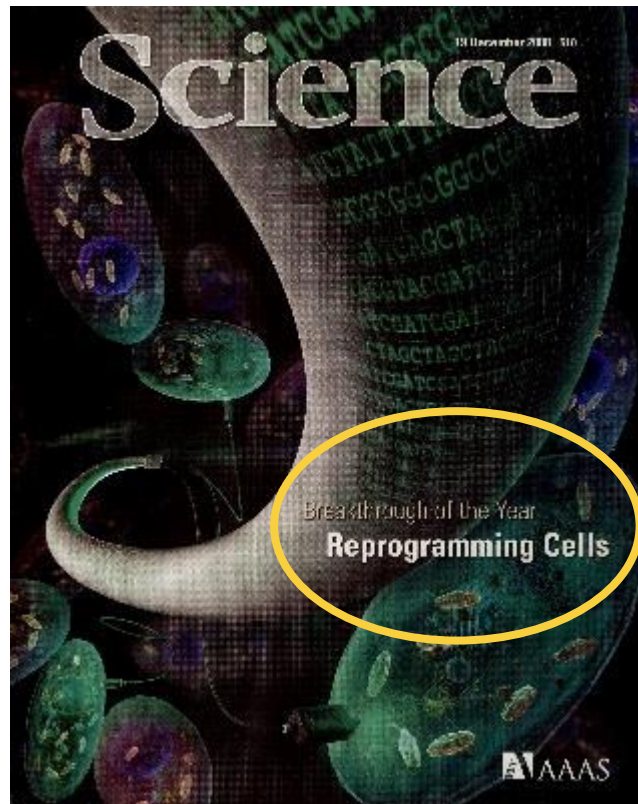
Kazutoshi Takahashi¹ and Shinya Yamanaka^{1,2,*}

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

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

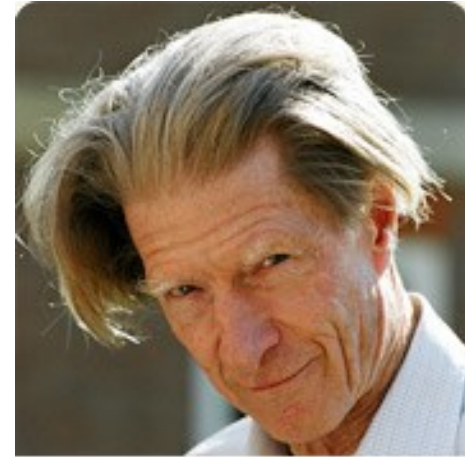
*Contact: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2006.07.024



Shinya Yamanaka
Kyoto University

Albert Lasker basic medical
research award 2009



John Gurdon
University of Cambridge

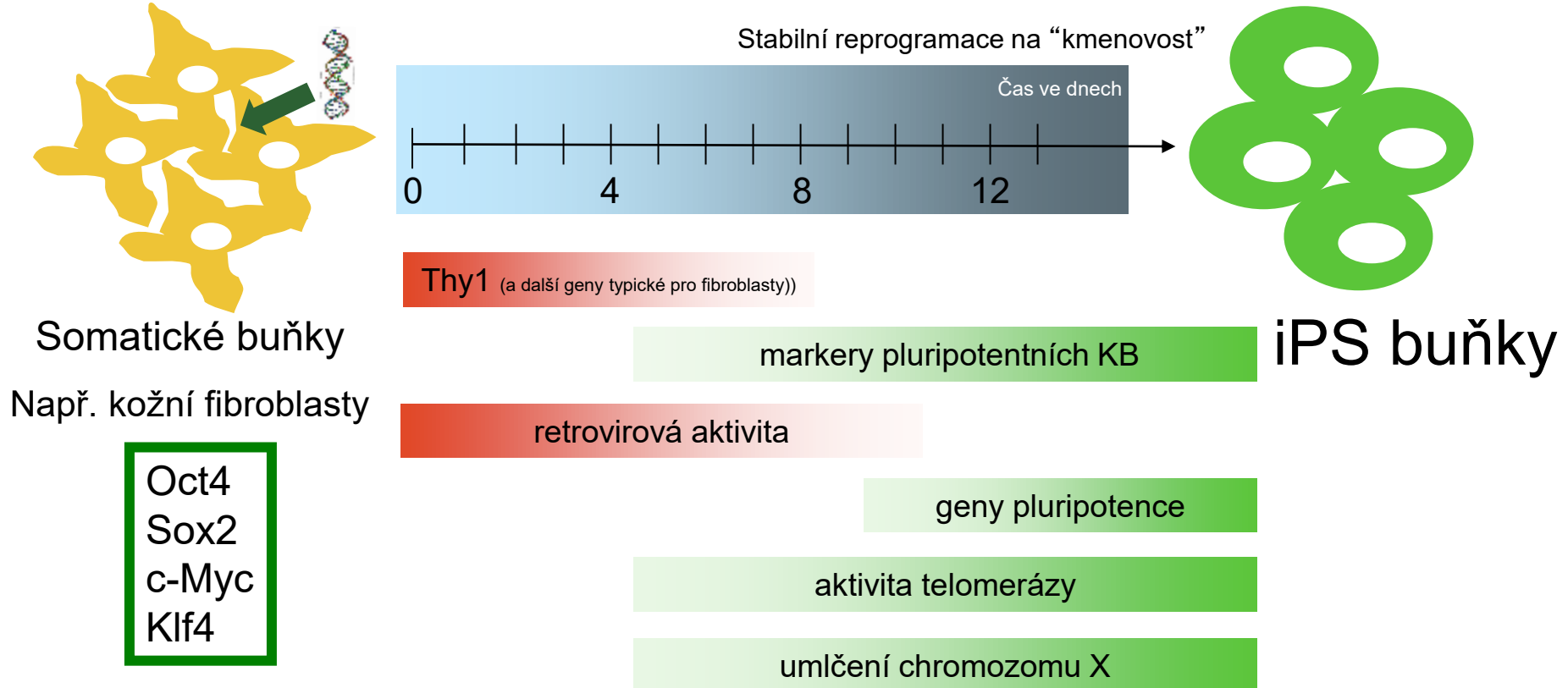


Indukované pluripotentní KB (Yamanaka 2006)

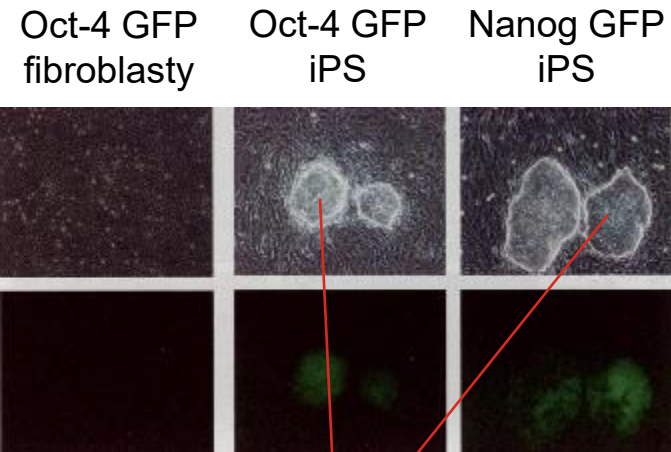
Alternativní zdroj pluripotence - **Indukované pluripotentní KB (iPS cells)**

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

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



iPS jsou schopny vytvořit chimérní organizmus



Injekce chiméry
(bílá a hnědá srst)



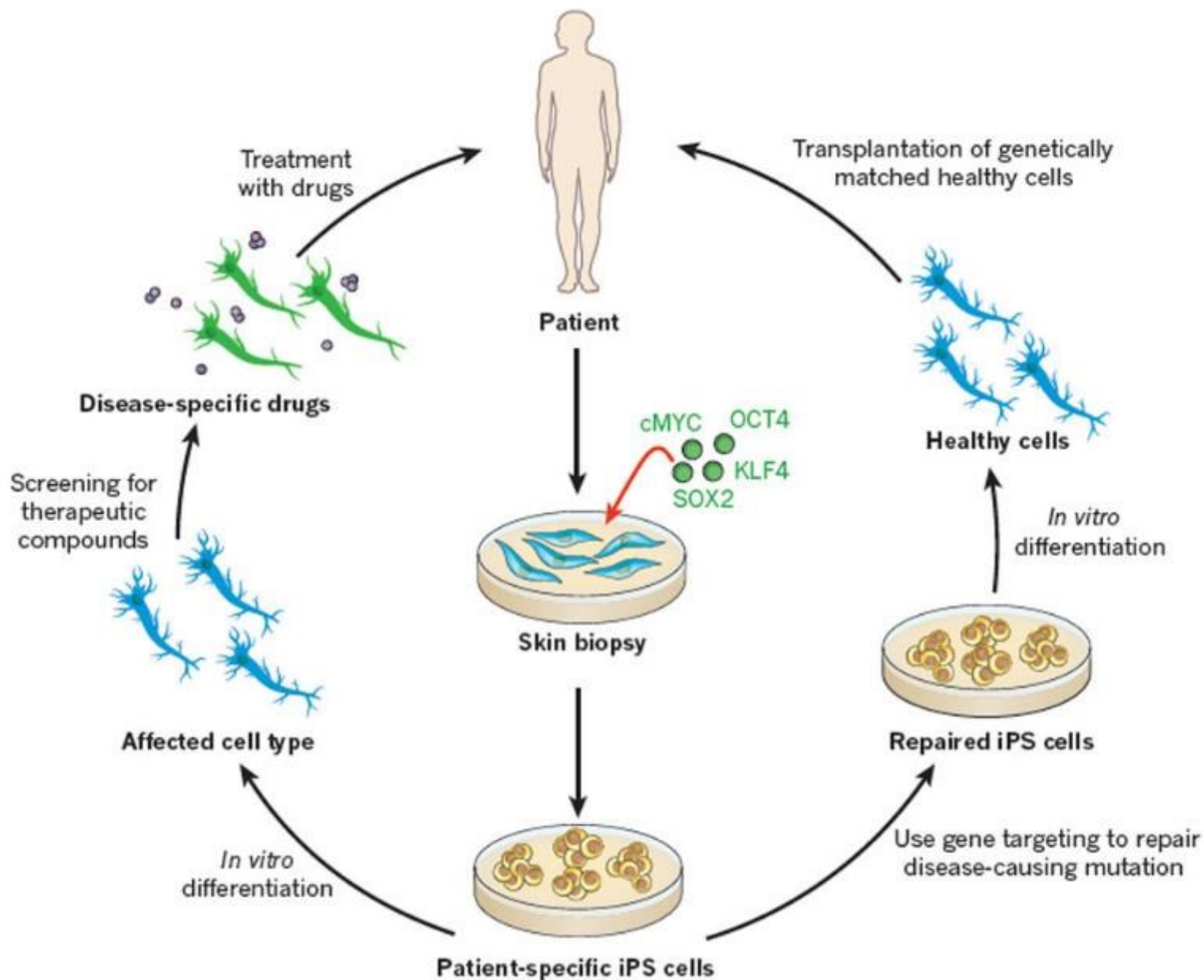
Nanog GFP iPS chiméra



Oct-4 GFP iPS chiméra

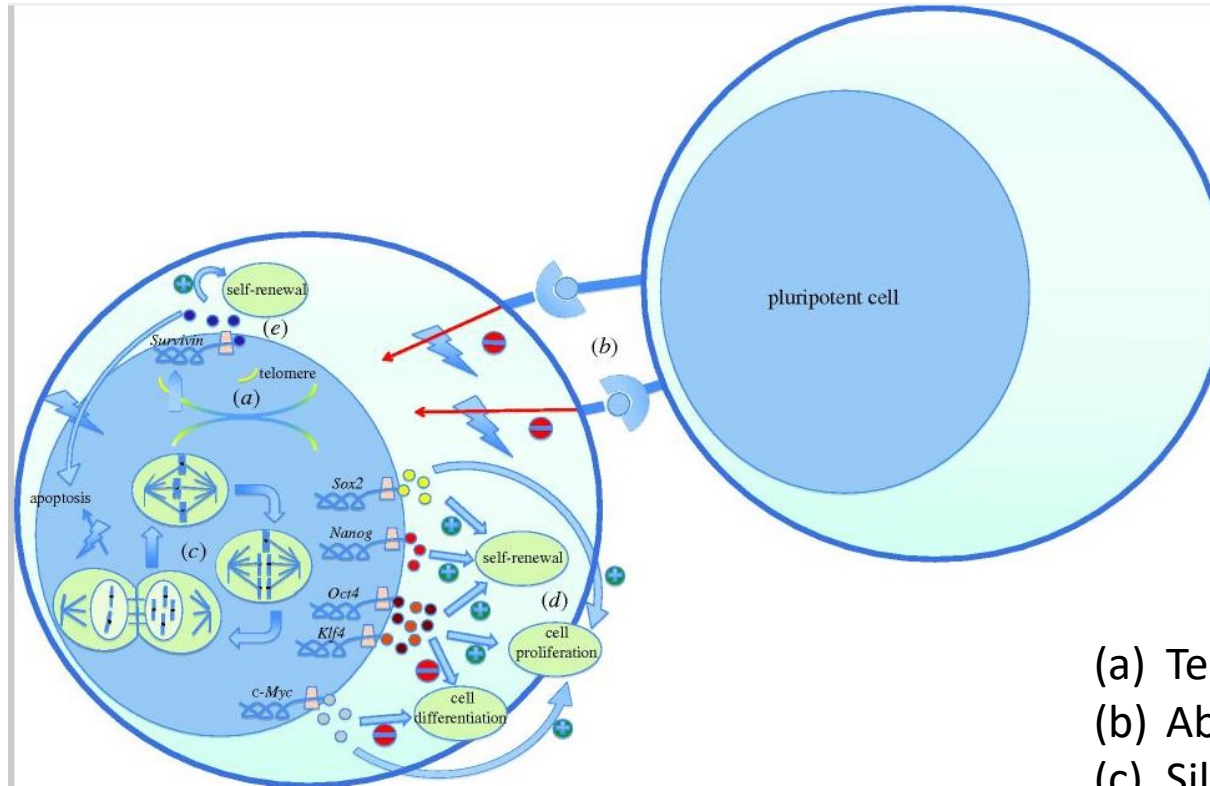
Indukované pluripotentní kmenové buňky

mají obrovský potenciál pro medicínu - tzv. „patient-specific cells“ pro „personalizovanou medicínu“



Jakákoliv aplikace PKB je podmíněna kvantitativní diferenciací do kýžené tkáně

Vztah mezi pluripotencí a tumorigenicitou



Kooreman, J R Soc Interface. 2010

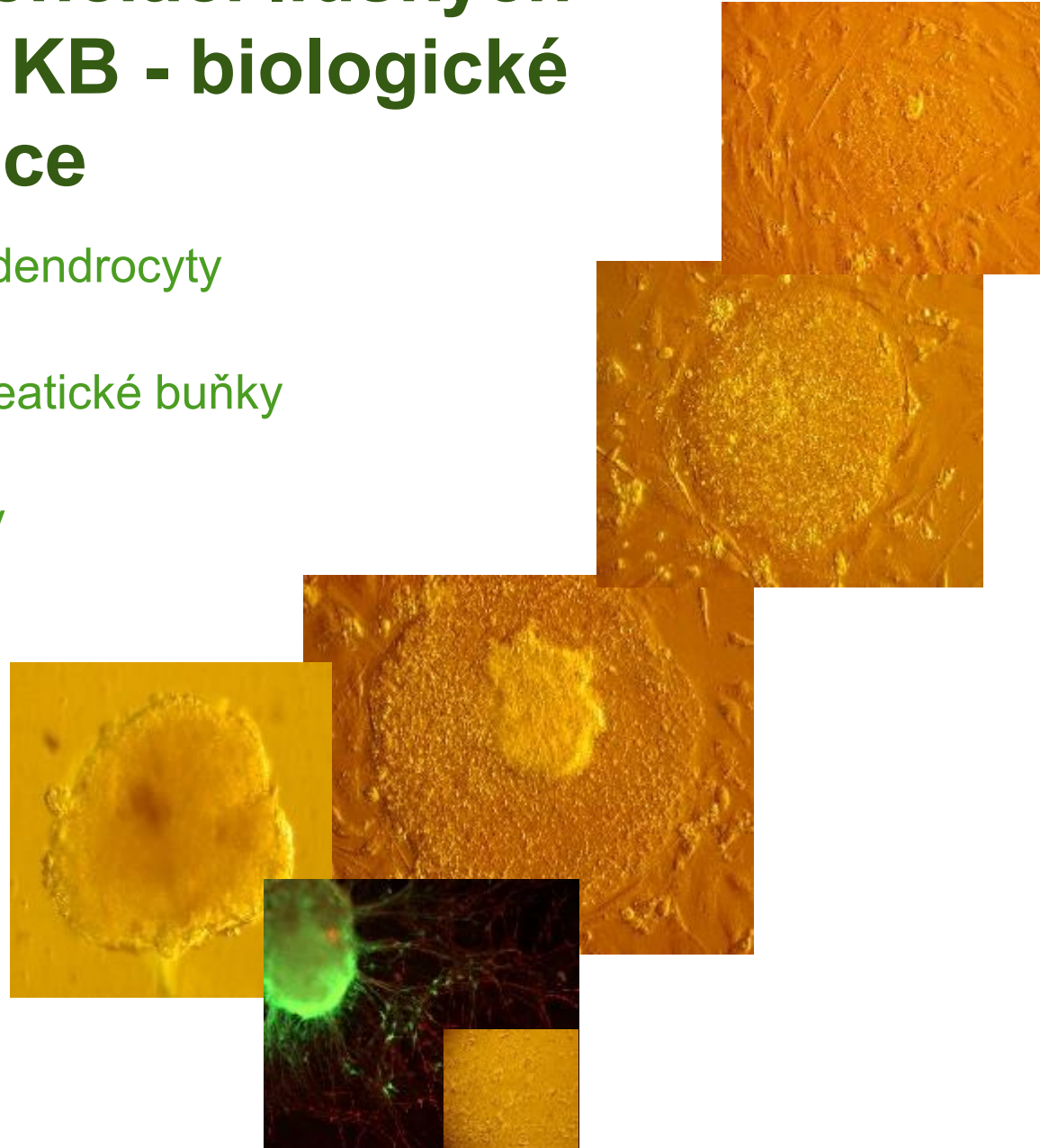
Buňky musí být diferencovány in vitro!

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

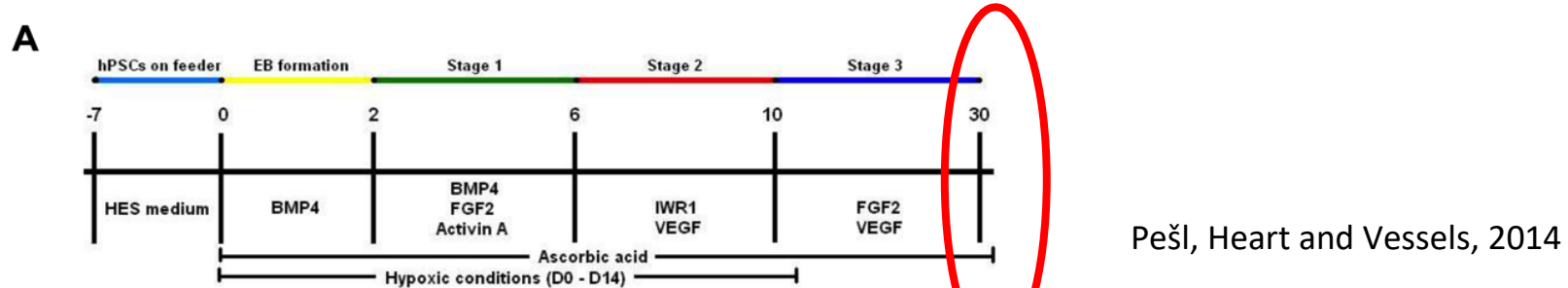
Současný standard pro klinické zkoušky: Maximálně 1 pluripotentní buňka na 10^6 diferencovaných buněk v off-the-shelf produktu!

Pokroky v diferenciaci lidských pluripotentních KB - biologické modely a aplikace

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



PŘ. DIFFERENCIACE PSC DO FUNKČNÍCH KARDIOMYOCYTŮ...



BMP4 pomáhá polarizaci embrya při gastrulaci (primitivní mesendoderm)

Hensenův uzel v přítomnosti FGF2 spouští kardiogenezi

Activin A spouští tvorbu mezodermu

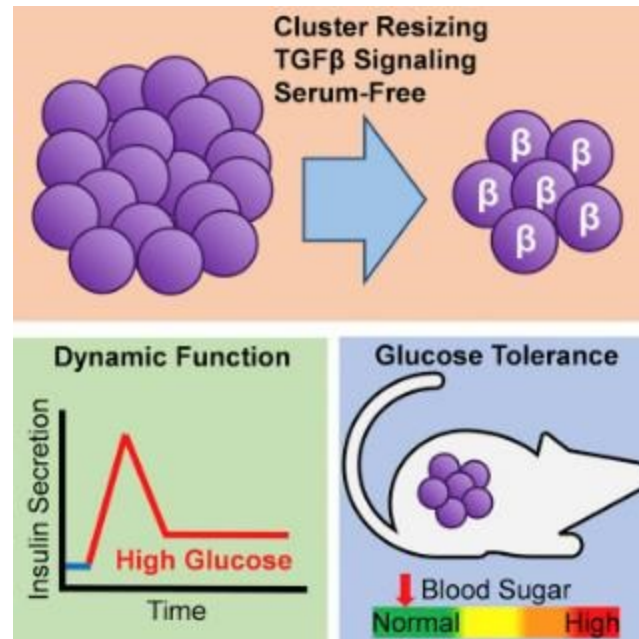
IWR inhibuje Wnt signál – zabrání neurodiferenciaci atp.

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

Kardiomyocyty začínají spontánně bít



Příklad: léčba diabetu – transplantace insulin sekretujících buněk

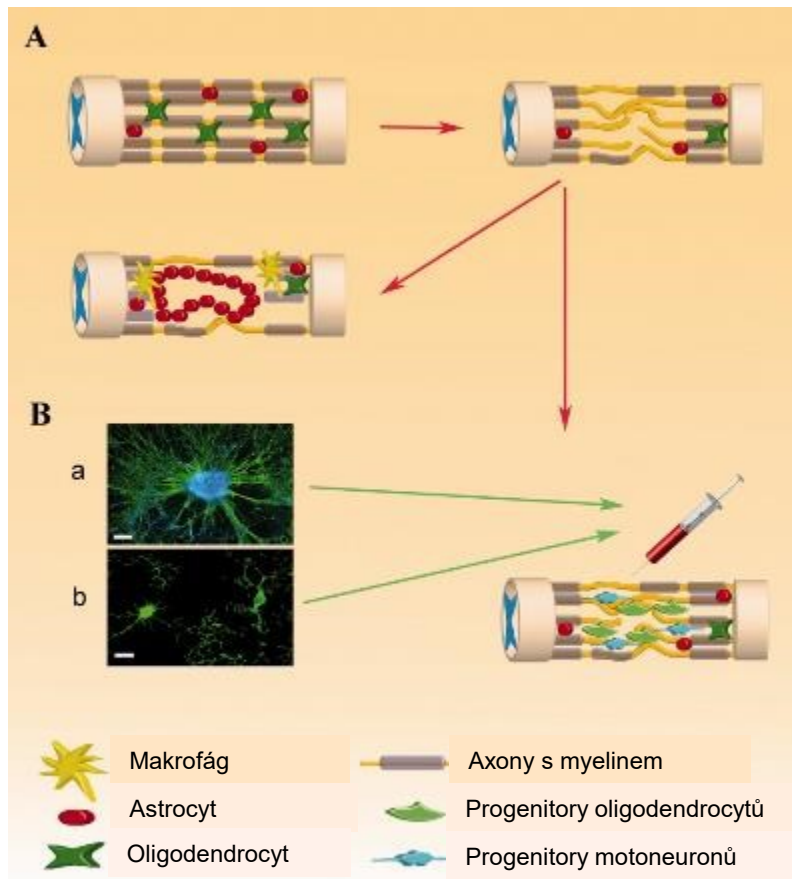


Valasco-Cruz, 2019 Cell

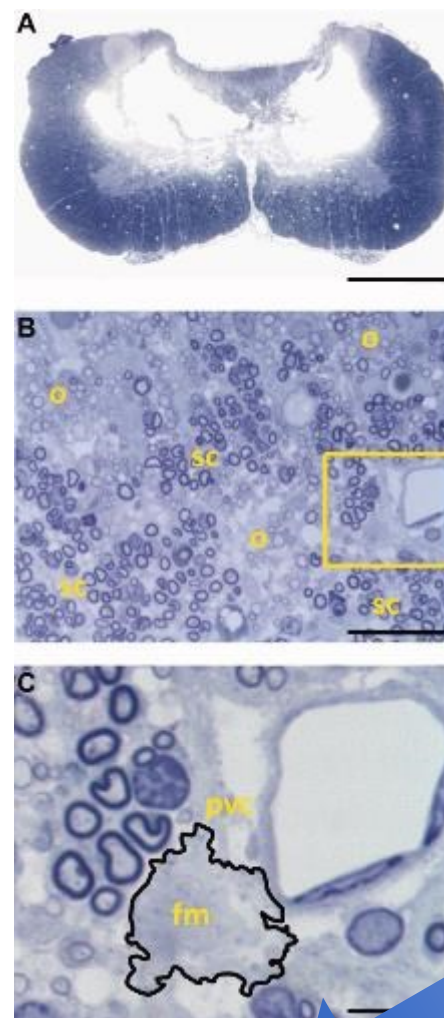
- beta-buňky pankreatu vytvořené z iPSC and ESC odpovídají na hladinu glukózy
- Po transplantaci nastolí glukóзовou toleranci u myšního modelu diabetes
- Probíhají klinické zkoušky na lidech

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

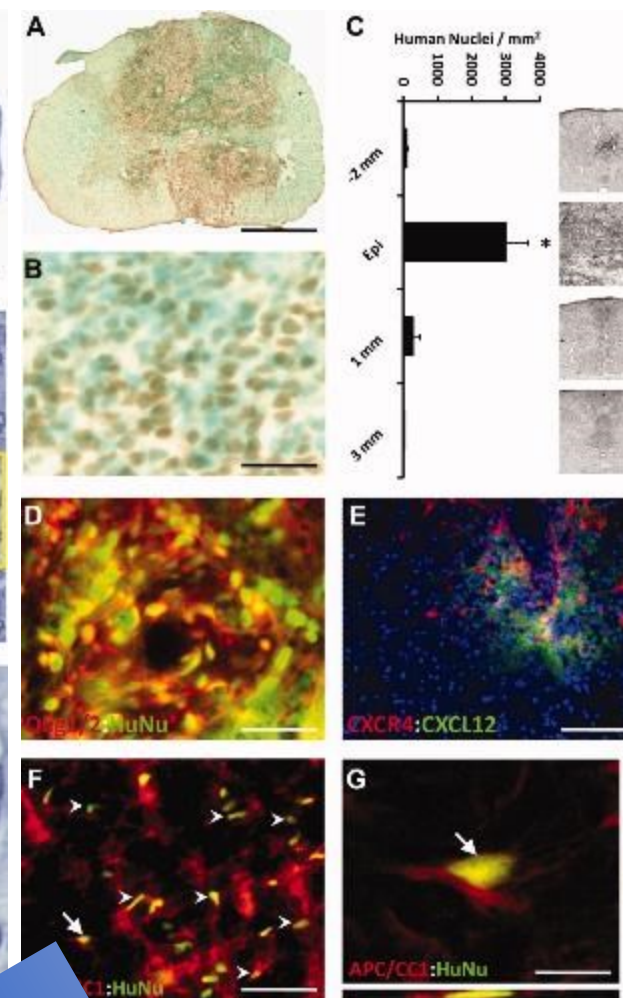
Patofyziologie a strategie léčby KB



Anatomie poškození



Stav po transplantaci



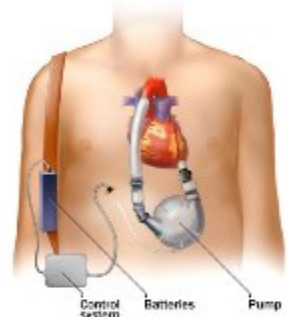
Výsledek: obnovení bílé a šedé hmoty v místě poškození
obnovení funkčnosti motorických neuronů
obnovení pohybových funkcí

Model: laboratorní potkan

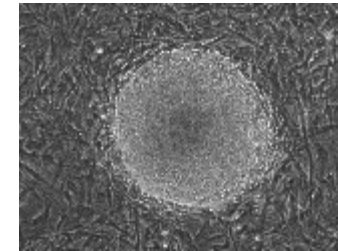
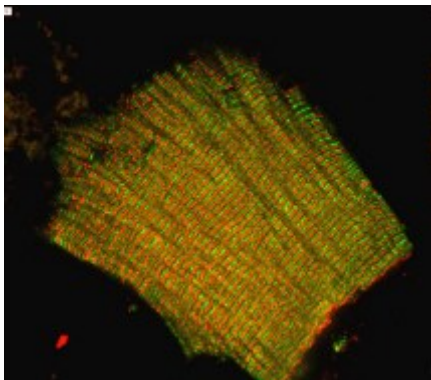
Adaptováno ze *Stem Cells*, 2010

Úspěchy: Indukované pluripotentní KB

...Srdeční záplaty...

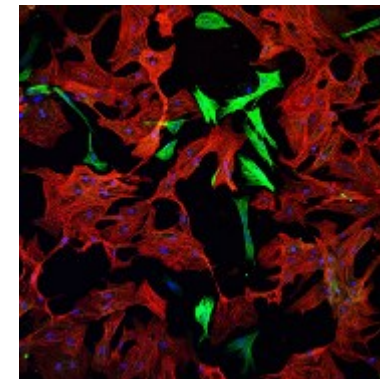


Pacient s akutním
srdečním selháním



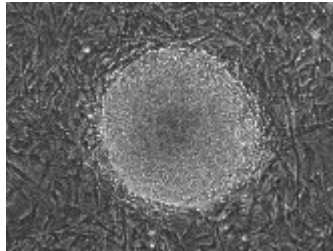
5% ejekční frakce

30% ejekční frakce
... pacient odchází z JIP

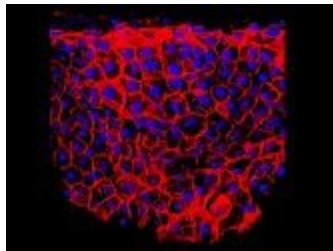


Úspěchy: Embryonální kmenové buňky

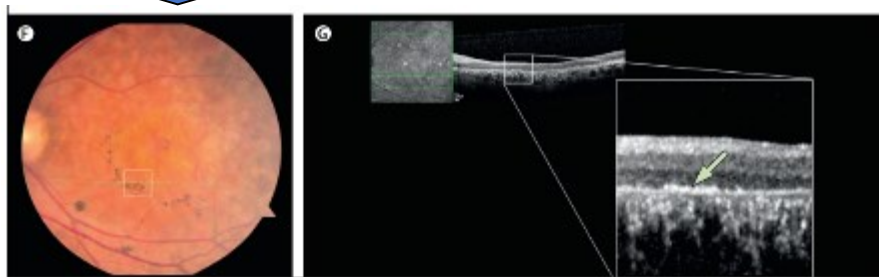
...Regnerace RPE...



Lidské embryonální kmenové buňky



Diferenciace do pigmentového epitelu



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

"Dry"
Macular
Degeneration



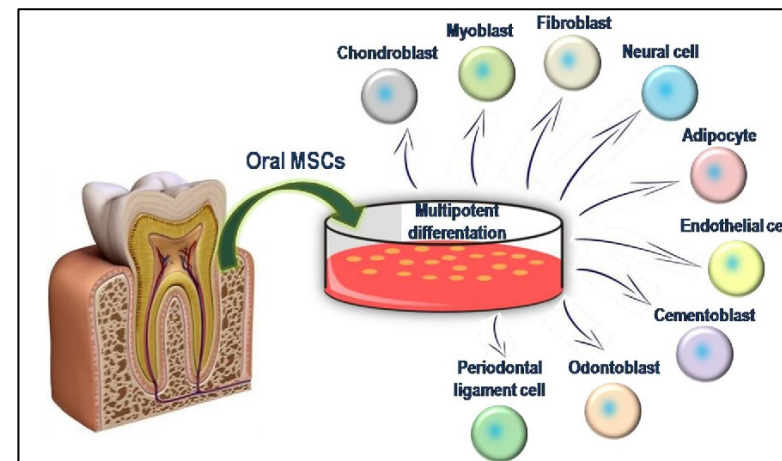
	BCVA	ETDRS (number of letters)
Fellow eye		
Baseline	Hand motion	0
1 week	Hand motion	0
2 weeks	Hand motion	0
3 weeks	Hand motion	0
4 weeks	Hand motion	0
6 weeks	Hand motion	0
8 weeks	Hand motion	0
12 weeks	Hand motion	0
Operated eye		
Baseline	Hand motion	0
1 week	Counting fingers	0
2 weeks	Counting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

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

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

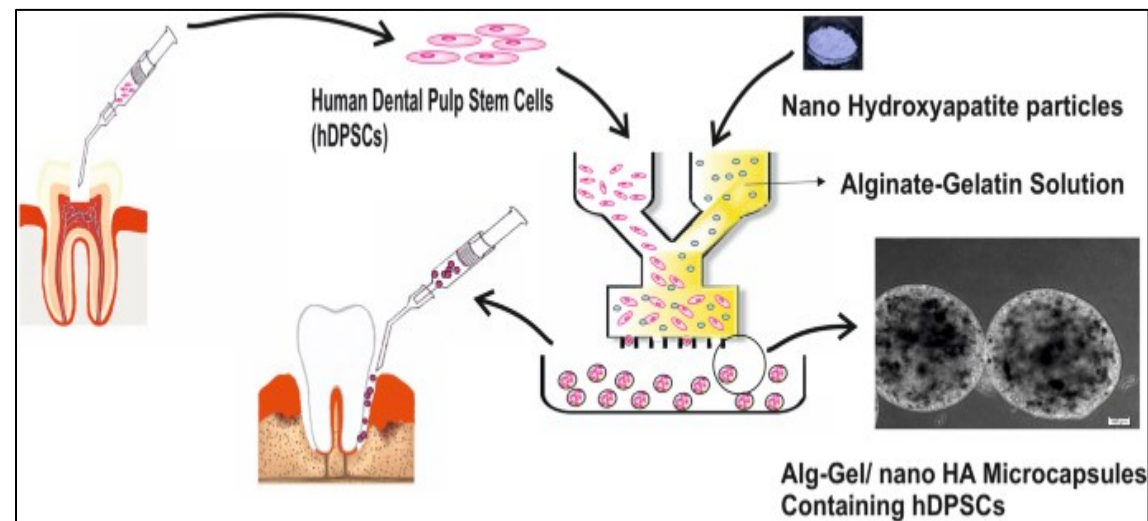
Příklad tkáňového inženýrství: Kmenové buňky dentální pulpy

- jednoduchá izolace mezenchymálních kmenových buněk ze zubní pulpy
- dentální MSC jsou multipotentní (mají velký diferenciační potenciál)



•DOI:[10.1007/s12015-016-9661-9](https://doi.org/10.1007/s12015-016-9661-9)

- Možná mikroenkapsulace MSC do nanočástic a aplikace stabilizovaných buněk k zubnímu krčku
- Enkapsulované buňky budují deposity Ca^{2+}

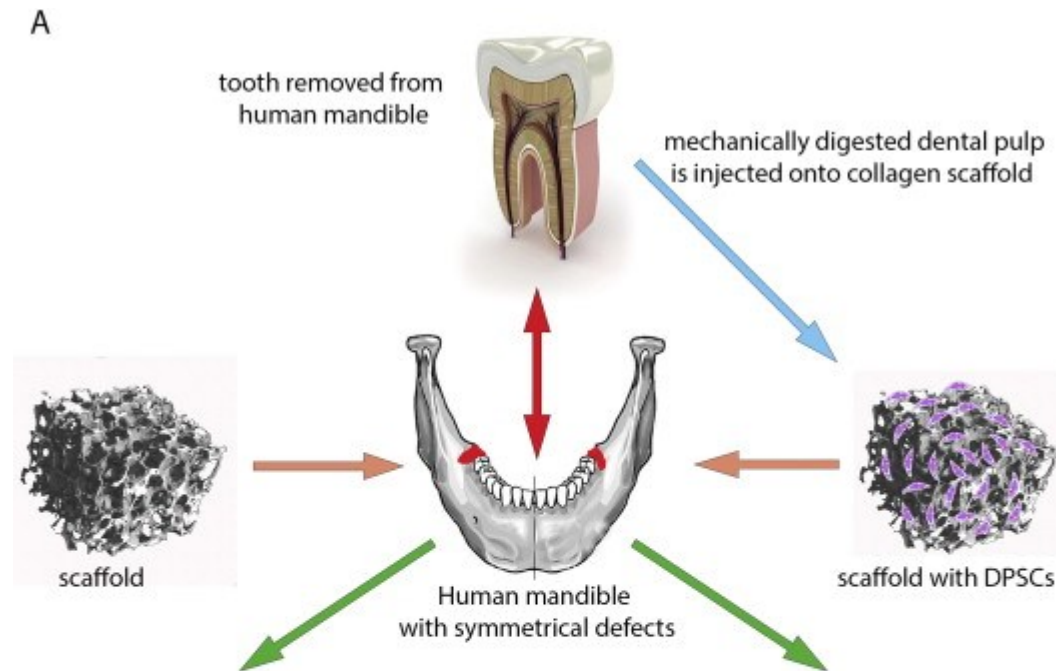


Alipour, BMC Biotechnology 2021, <https://doi.org/10.1186/s12896-020-00666-3>

Příklad tkáňového inženýrství: Kmenové buňky dentální pulpy

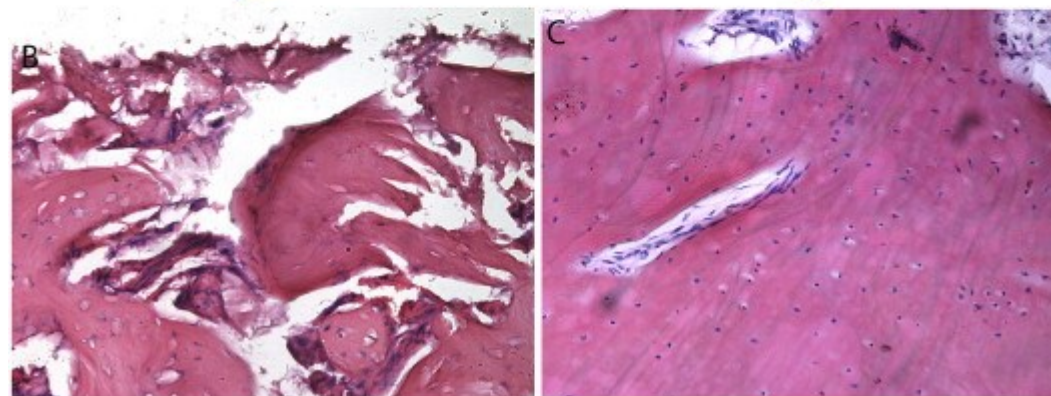
- jednoduchá izolace mezenchymálních kmenových buněk ze zubní pulpy
- dentální MSC jsou multipotentní (mají velký diferenciační potenciál)

La Noce, J Dentistry 2014













Regenerace čelisti

- *in vitro* propagace MSC izolovaných z dentální pulpy
- 3D tisk matrice z kolagenu
- Repopulace 3D matrice
- Implantace do čelisti
- Histologické vyšetření po 3 letech



regenerated bone three years after graft

Výběr recentních aplikací kmenových buněk zubní pulpy

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

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Trounson, 2016

2021 (Clinicaltrials.gov):

31 studií s použitím kmenových buněk z dentální pulpy (9 ve druhé fázi klinického testování) periodontal disease, alveolární štěpení, ale také revaskularizace, diabetes, COVID-19, Huntington, stroke, Lupus Erythematosus, osteoartritida)

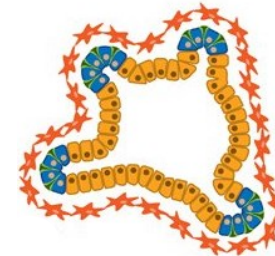
Organoidy

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



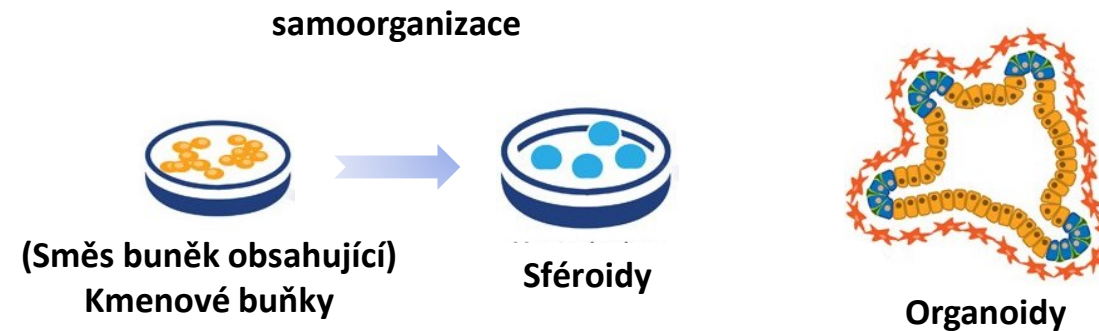
(Směs buněk obsahující)
Kmenové buňky



Organoidy

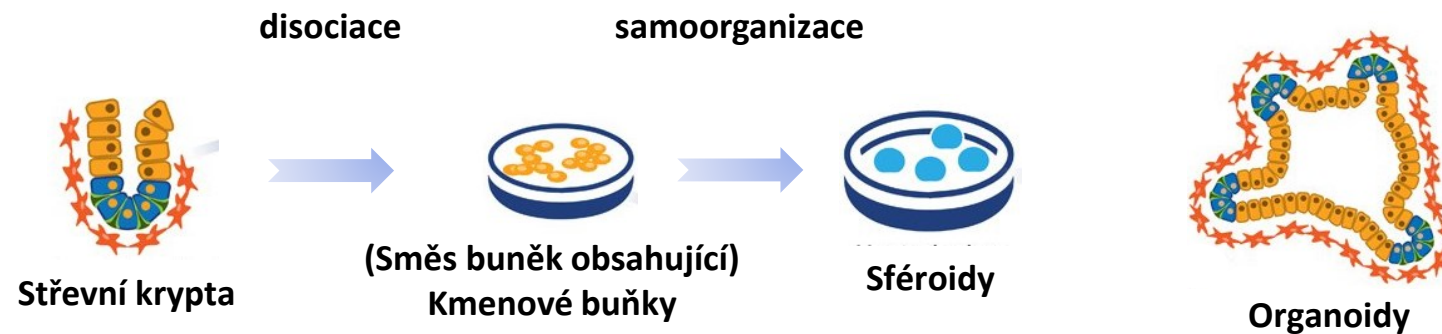
Co nazýváme organiodem

- 3D struktura odvozená z kmenových buněk
- **Vyazuje 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



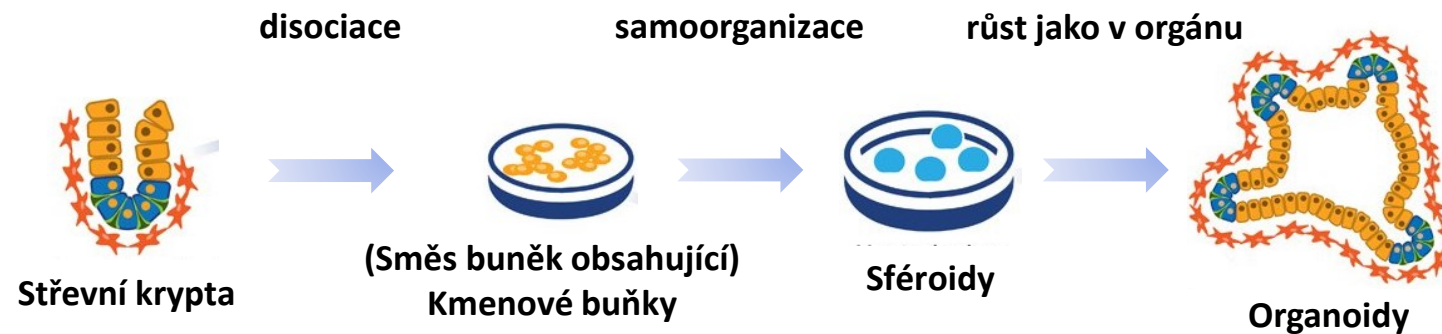
Co nazýváme organiodem

- 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

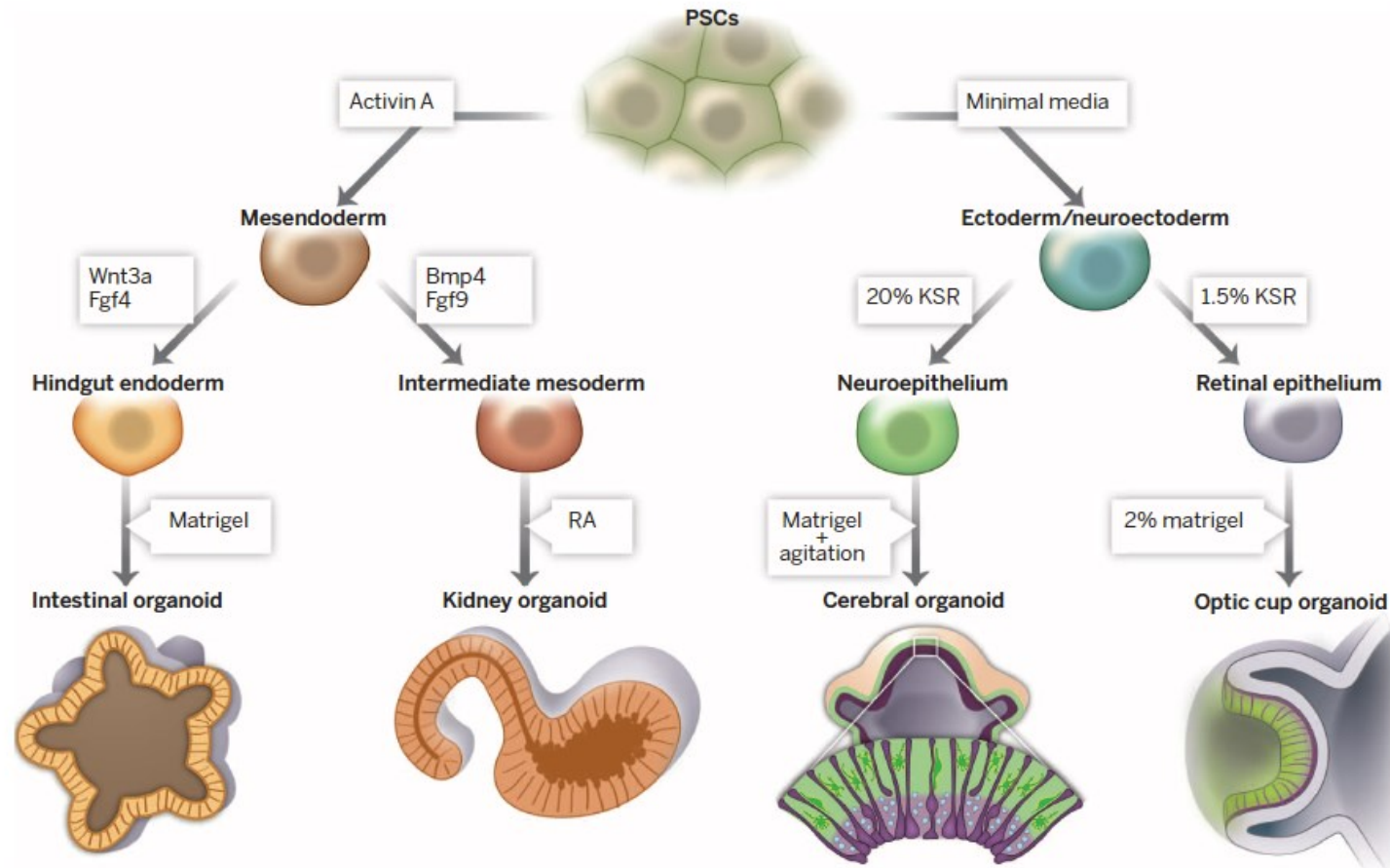
- 3D struktura odvozená z kmenových buněk
- Vykazuje schopnost „samoorganizace“ na základě stejných principů, jako modelovaný orgán
- Obsahuje více buněčných typů (stejných jako modelovaný orgán)
- **Struktura získá a uchovává (alespoň některé) specializované funkce modelovaného orgánu**



Tkáňové kultury – tvorba organoidů..

Faktory mikroprostředí kopírují mikroprostředí cílového orgánu, případně jeho embryonálního vývoje

Signální dráhy řídící tvorbu embrya – použití pro
diferenciaci organoidů 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

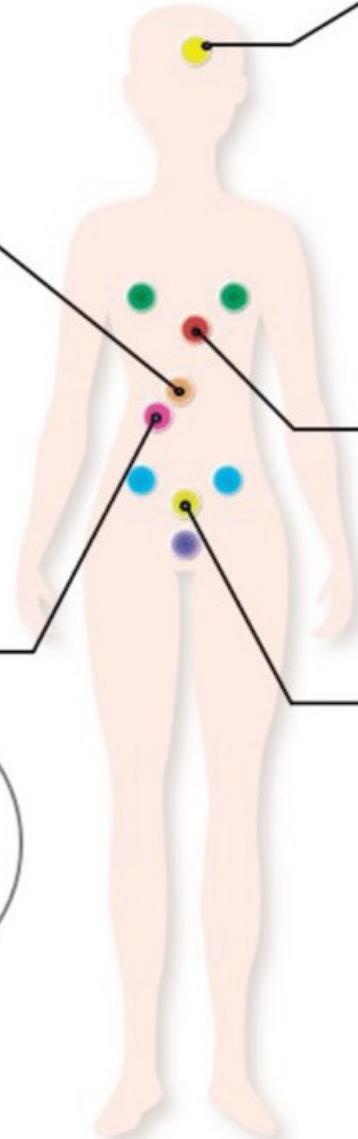
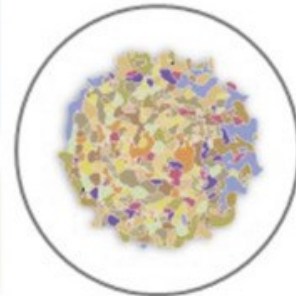
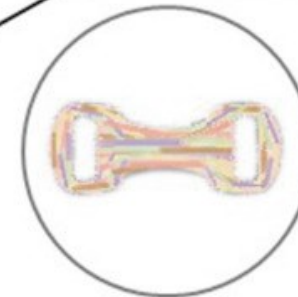
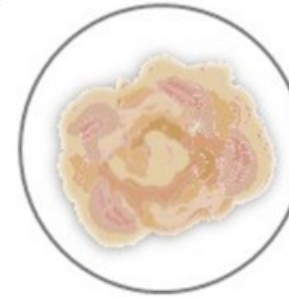
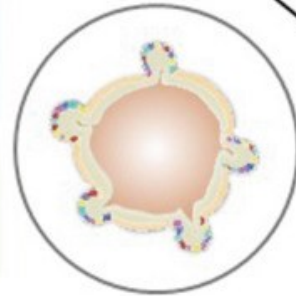
Liver organoid

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

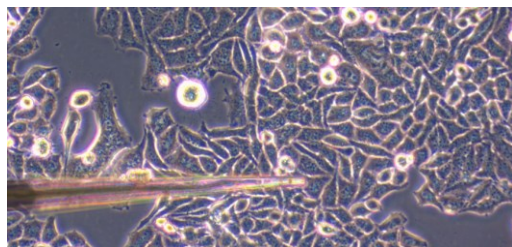
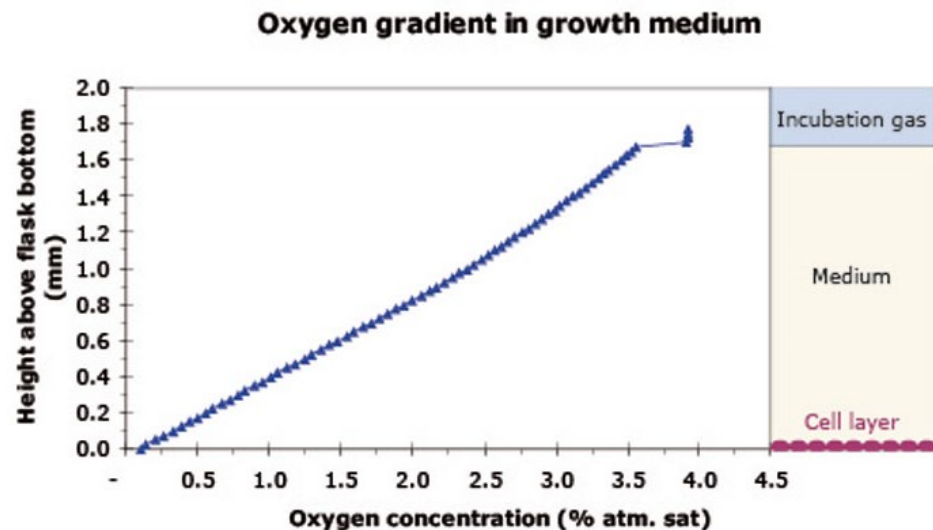
Tissue stem cells

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

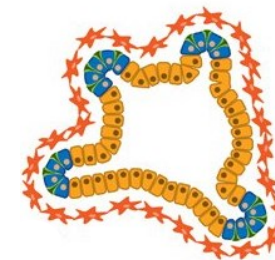


Co nazýváme organiodem

- 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

Tkáňové kultury – tvorba organoidů..

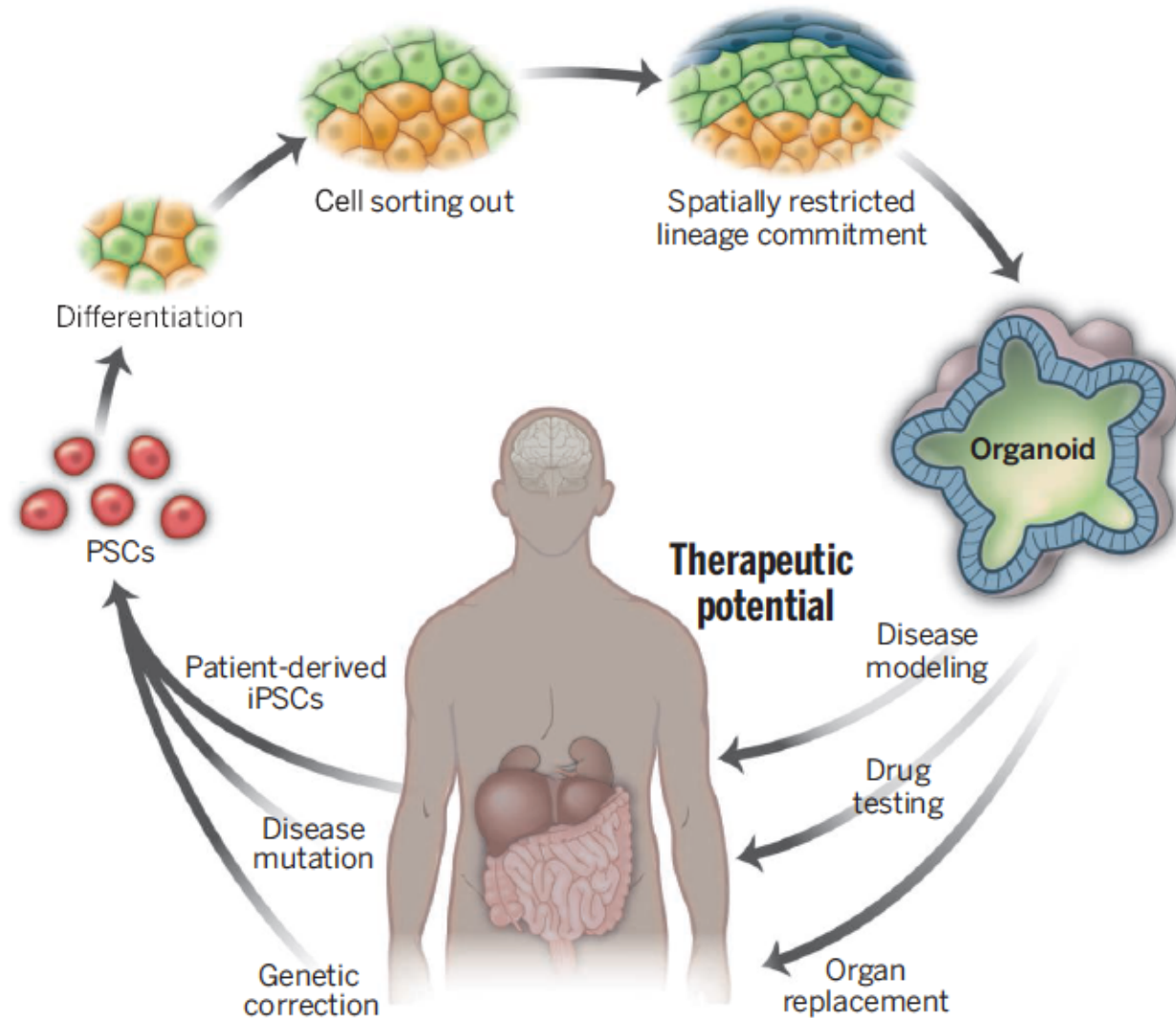
Využití organoidů

Modelování chorob

Testování léčiv

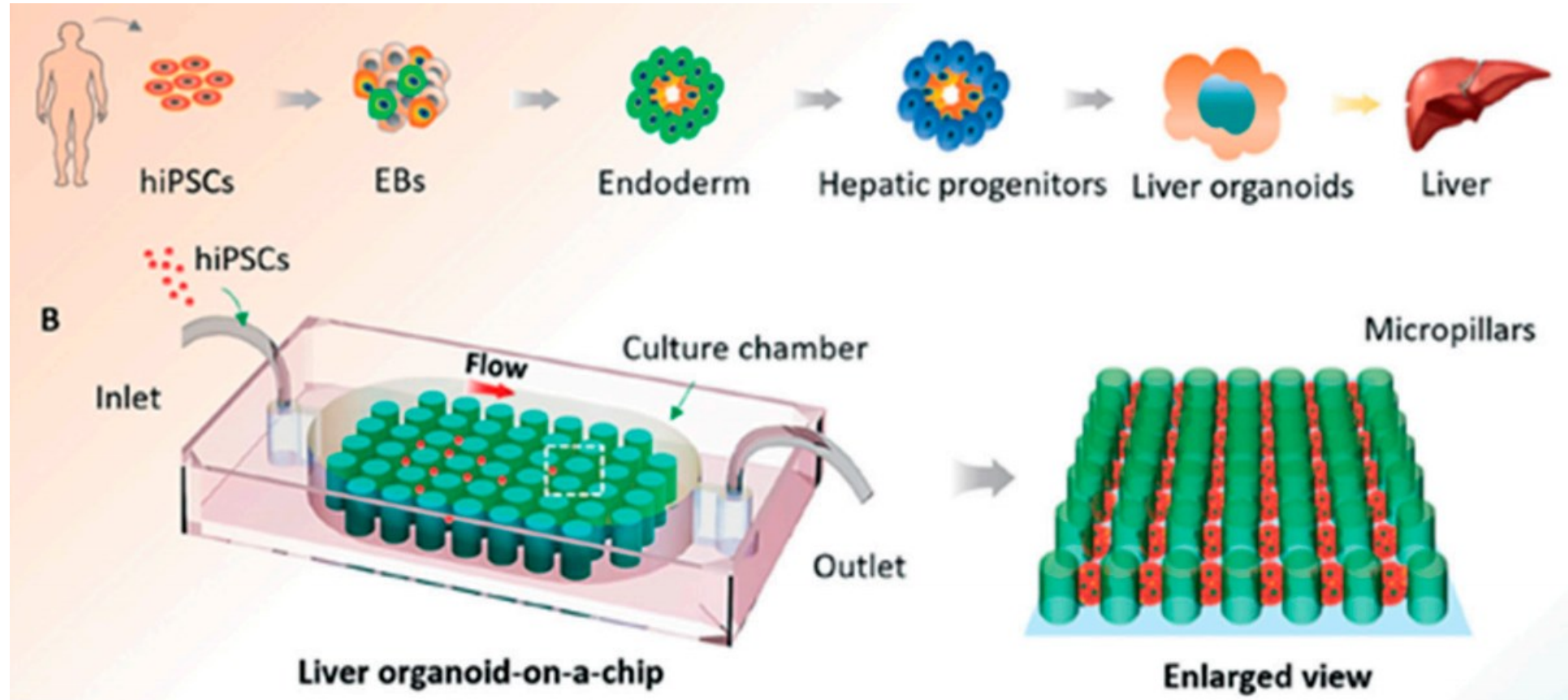
Transplantační medicína

Genová léčba



Od organoidu k orgánu: nutné překonat problém perfuze

Kombinace technologie tvorby organoidů a mikrofluidiky – orgán na chipu



Biologické a syntetické buněčné nosiče

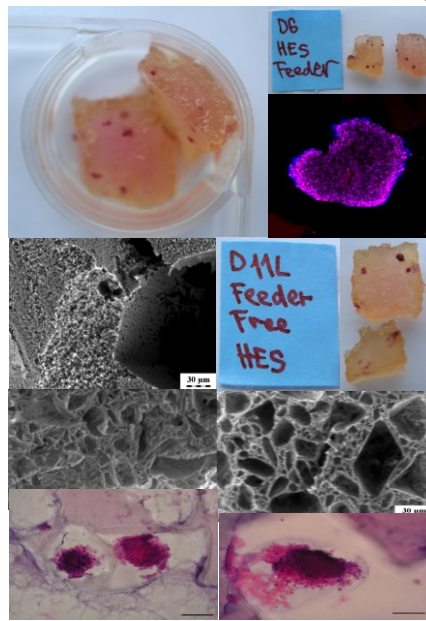
Biokompatibilní nosiče jsou důležité pro funkce buněk v uměle vytvořených orgánech

Umělé (chemické) nosiče a kmenové buňky

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

Biologické bezbuněčné nosiče a zdravé funkční buňky

- Limitace podobné jako s orgány
- + Klinicky použitelné

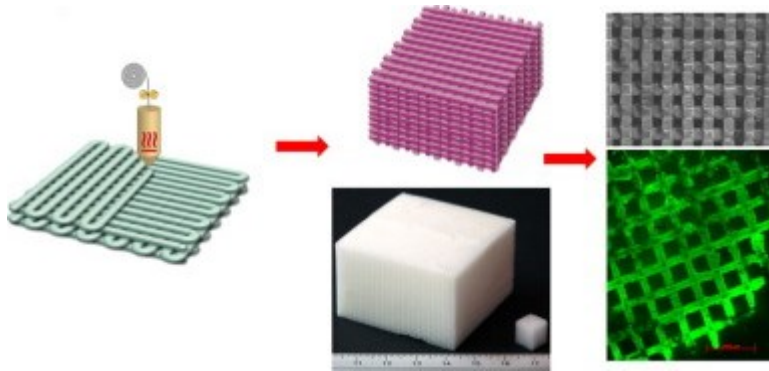


Lidské orgány ve zvířatech

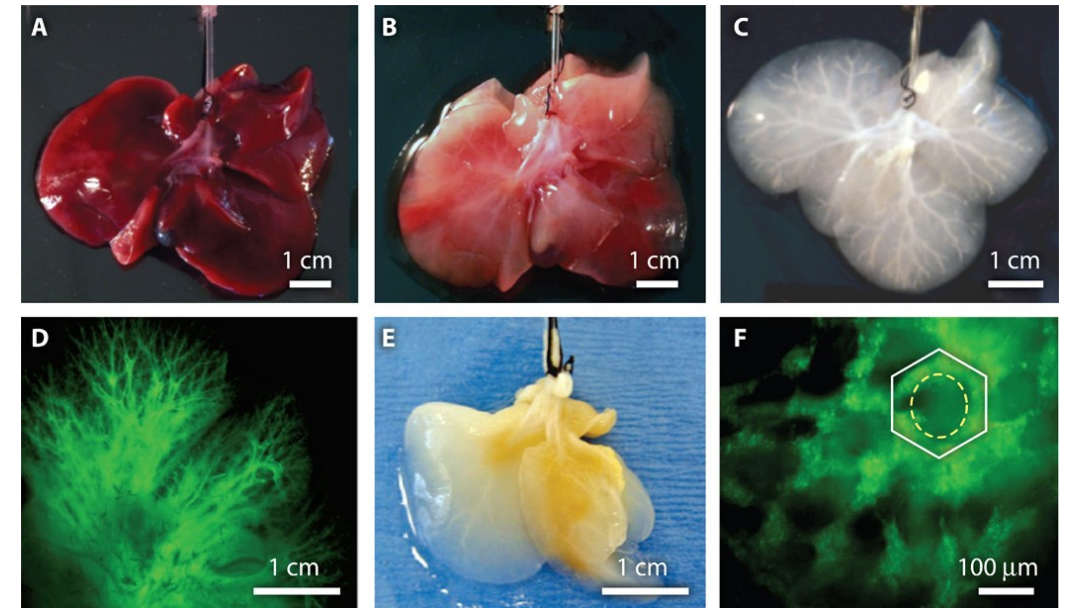
- + Perspektivní
- Legislativní a etické bariéry
- Nejasná biologie

3D kultivace tkáňových kultur: kultivační nosiče (scaffoldy)

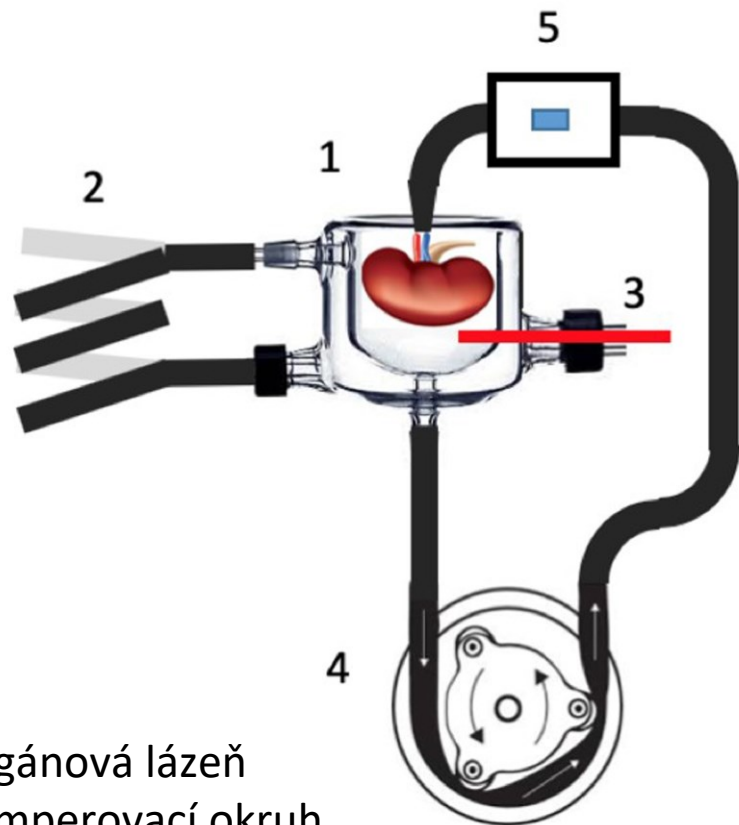
3-D tisk:



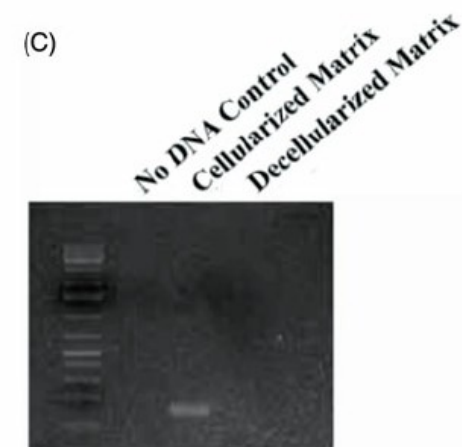
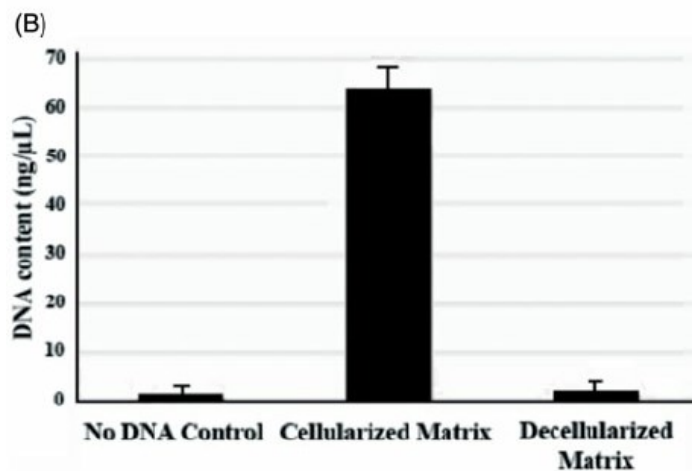
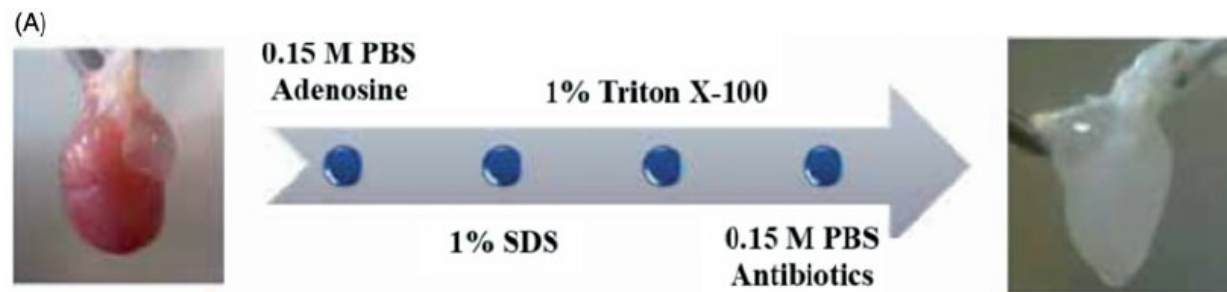
Decelularizovaná tkáň/orgán:



Perfuze orgánu



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



Decelularizace srdce

Repopulace decelularizovaného srdce



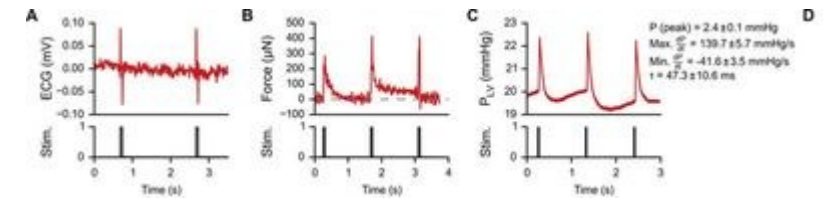
500 mil. srdečních buněk

Lidské indukované pluripotentní buňky



Při elektrické stimulaci viditelné kontrakce

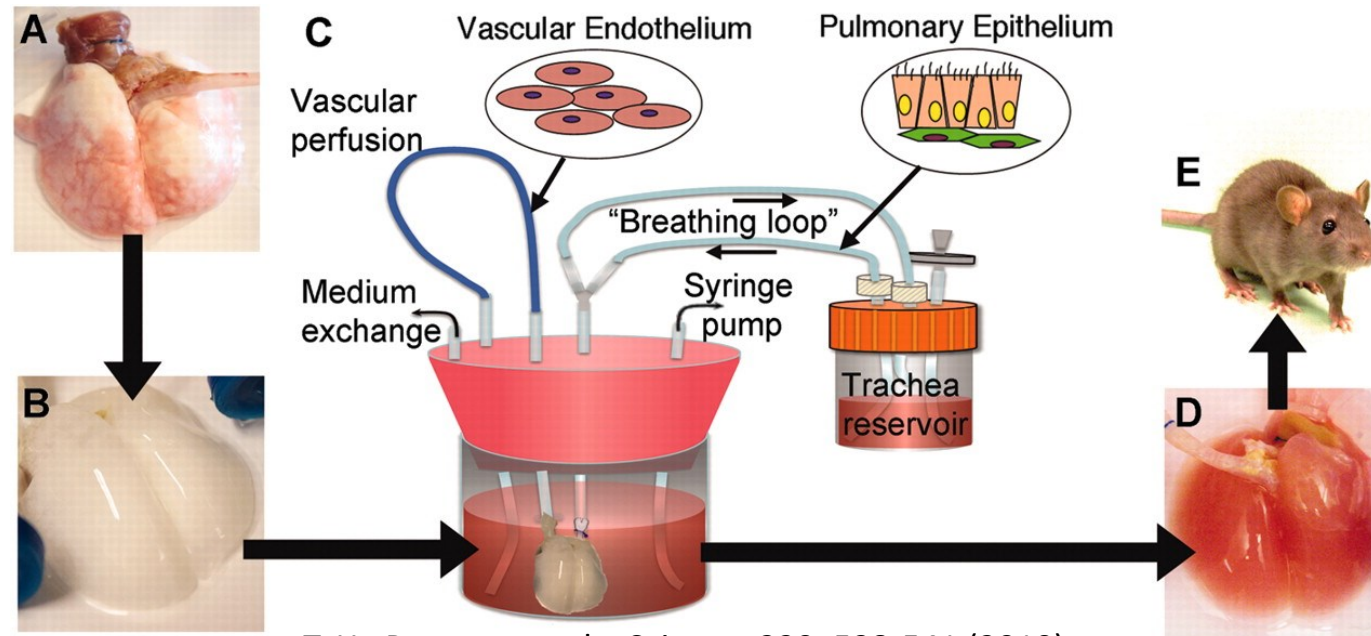
(..až 139mm Hg)



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

Indukované pluripotentní kmenové buňky

diferenciace in vitro



T. H. Petersen et al., Science 329, 538-541 (2010)

Pokrok (2014) – plíce participovaly 140 minut na výměně kyslíku (myš)

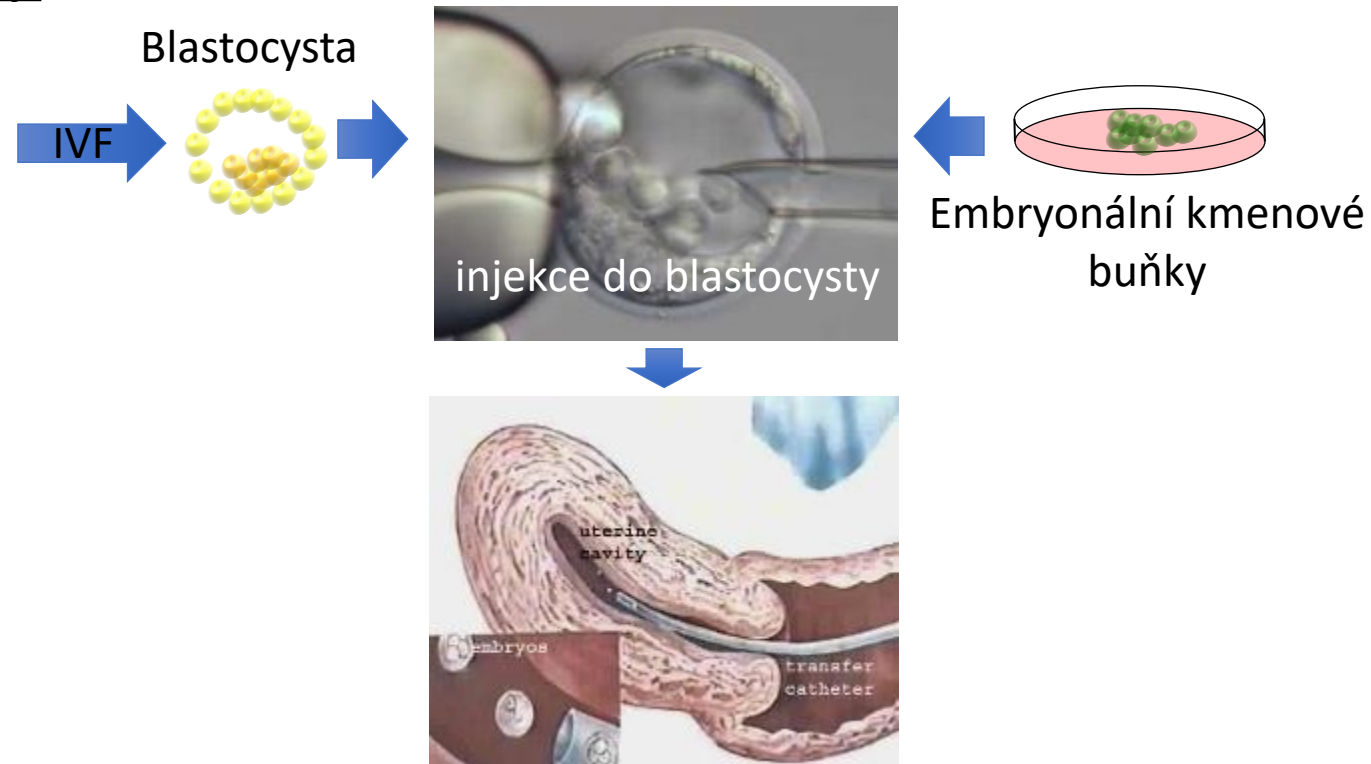
Orgány chiméry

Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

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

Komplementace blastocysty:

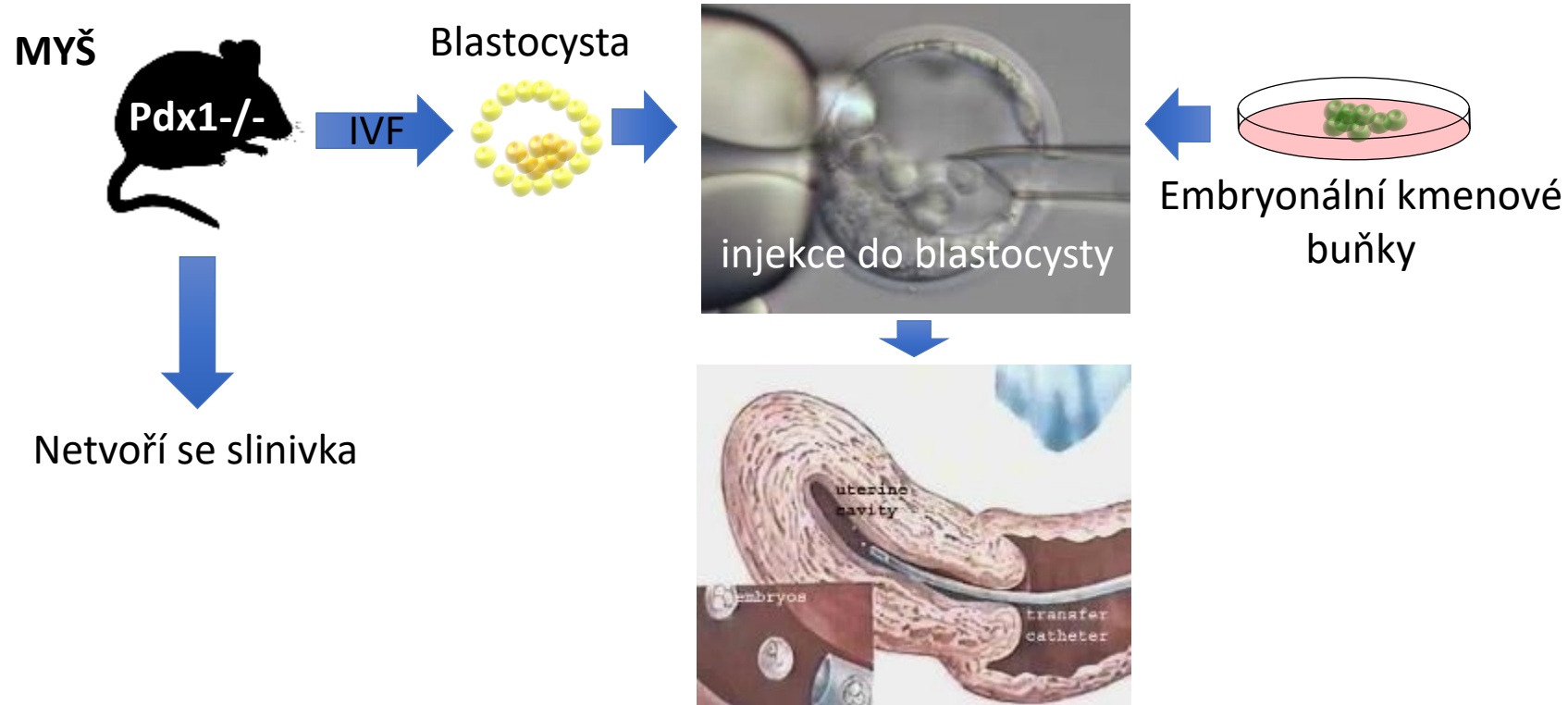


Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

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)

Komplementace blastocysty:

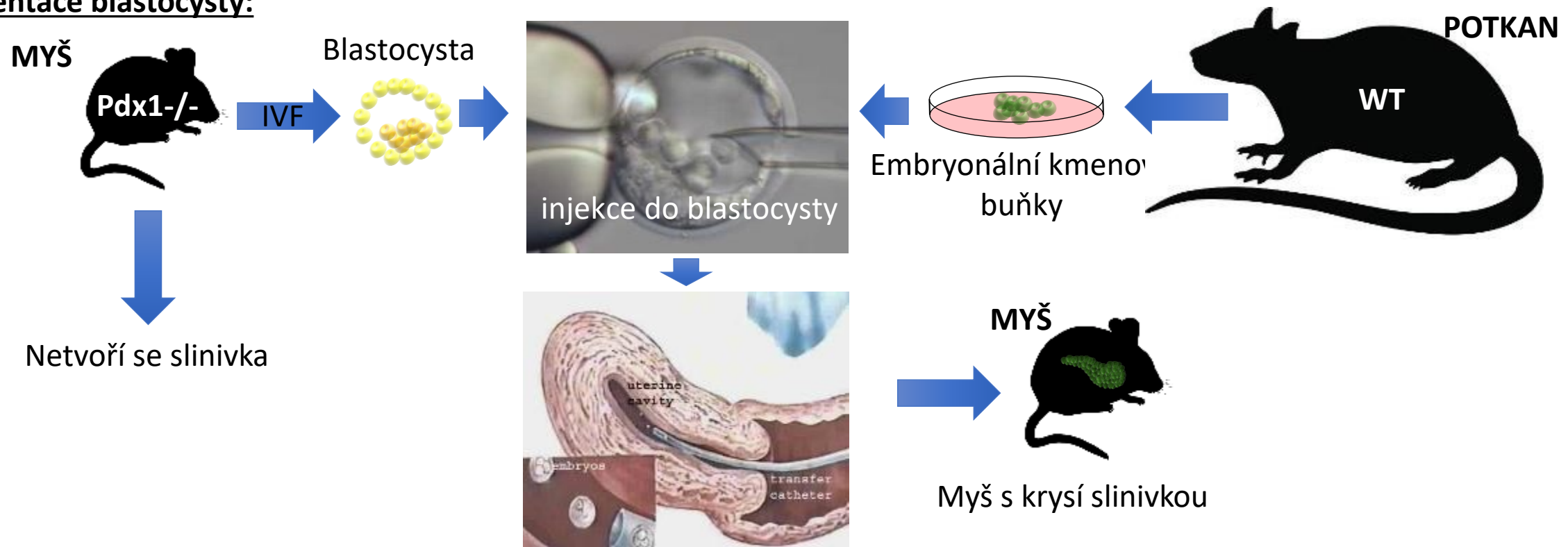


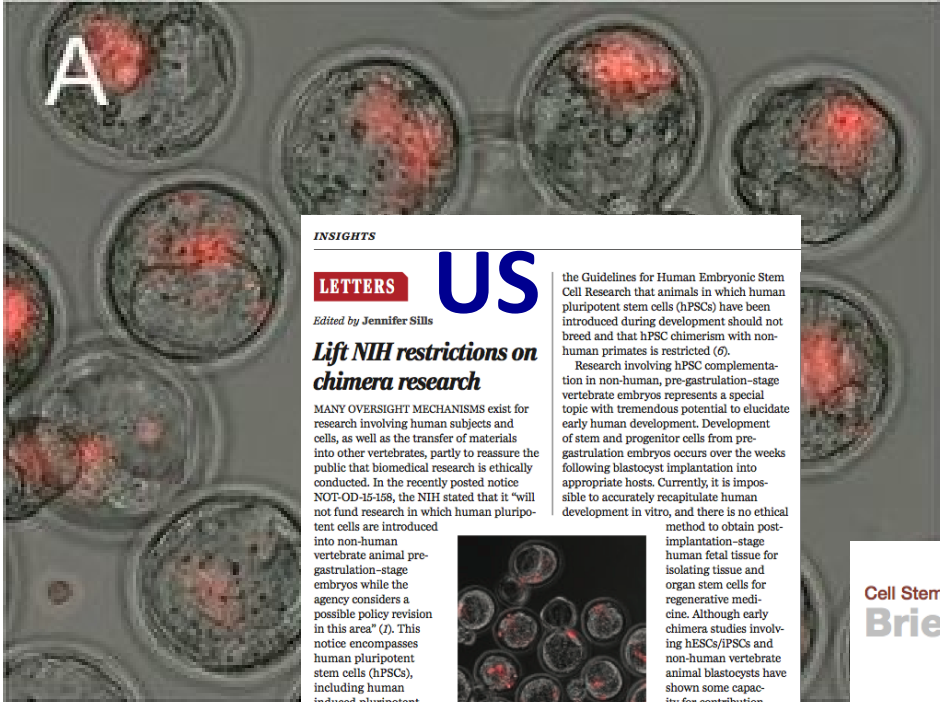
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

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)

Komplementace blastocysty:





INSIGHTS

LETTERS

US

Edited by Jennifer Sills

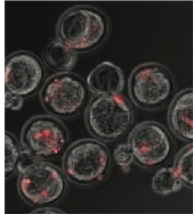
Lift NIH restrictions on chimera research

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

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

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

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



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

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

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

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

Cell Stem Cell
Brief Report

UK

CellPress

Human-Mouse Chimerism Validates Human Stem Cell Pluripotency

Victoria L. Mascetti^{1,*} and Roger A. Pedersen¹

¹The Anne McLaren Laboratory, Wellcome Trust-Medical Research Council Cambridge Stem Cell Institute, Department of Surgery and British Heart Foundation Centre of Regenerative Medicine, University of Cambridge, Cambridge, CB2 0SZ, UK

*Correspondence: vlm37@cam.ac.uk

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2015.11.017>

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

Mezidruhové chiméry pro výzkum a transplantační medicínu

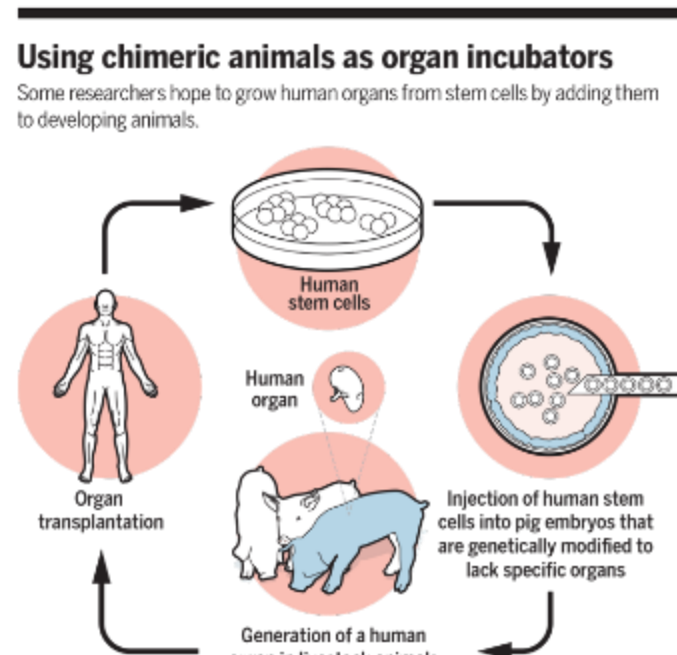
Živočišné tkáňové kultury – Tvorba chimérních embryí

Tvorba chimér:

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



Juan Carlos Izpisua Belmonte



Human – Pig Chimera



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

Děkuji za pozornost...



Vladimír Rotrekl
vrotrekl@med.muni.cz

Bilogický ústav Lékařské fakulty Masarykovy univerzity