

MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Brno 2012

Rumíšková Gabriela



MASARYKOVA UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE
ODDĚLENÍ GENETIKY A MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE



NÁPRAVA ENDOKRINNÍ FUNKCE
PANKREATU METODAMI BUNĚČNÉ TERAPIE

Bakalářská práce

Gabriela Rumíšková

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.

Brno 2012

Bibliografický záznam

Autor:	Gabriela Rumíšková Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
Název práce:	Náprava endokrinní funkce pankreatu metodami buněčné terapie
Studijní program:	Biologie
Studijní obor:	Molekulární biologie a genetika
Vedoucí práce:	doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.
Akademický rok:	2012/2013
Počet stran:	42
Klíčová slova:	pankreas, diabetes mellitus, kmenové buňky, řízená diferenciací, buněčná terapie

Bibliographic Entry

Author: Gabriela Rumíšková
Faculty of Science, Masaryk University
Department of experimental biology

Title of Thesis: Correction of endocrine function of pancreas by cell therapy

Degree Programme: Biology

Field of Study: Molecular biology and genetics

Supervisor: doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.

Academic Year: 2012/2013

Number of Pages: 42

Keywords: pancreas, diabetes mellitus, stem cells, directed differentiation , cell therapy

Abstrakt

Současné poznatky o biologii kmenových buněk ukazují na reálnost využití těchto unikátních buněk v klinické medicíně, zejména v podobě takzvané buněčné terapie. Cílem bakalářské práce je sumarizovat současné pokroky v diferenciaci různých typů kmenových buněk do endokrinních buněk pankreatu, s cílem využít jich spolu s transplantacemi slinivky a ostrůvků k léčbě diabetu. Součástí bakalářské práce je také přehled vývoje endokrinních buněk pankreatu včetně molekulárních mechanismů a faktorů, které tento proces řídí.

Abstract

Current knowledge about the biology of stem cells show the feasibility of using these unique cells in clinical medicine, especially in the form of so-called cell therapy. The aim of this bachelor thesis is to summarize the current advances in the differentiation of different types of stem cells into pancreatic endocrine cells, in order to use them along with the pancreas and islet transplantation in the treatment of diabetes. The work is also an overview of the development of pancreatic endocrine cells, including the molecular mechanisms and factors that control this process.



Vysoká škola: Masarykova univerzita

Ústav: Ústav experimentální biologie

Fakulta: přírodovědecká

Akademický rok: 2011/2012



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Bakalářský studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární biologie a genetika

Student(ka): Gabriela Rumíšková

Vedoucí bakalářské práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto bakalářskou práci:

Název tématu: Náprava endokrinní funkce pankreatu metodami buněčné terapie.

Název tématu anglicky: Correction of endocrine function of pancreas by cell therapy.

Vedoucí bakalářské práce: doc. MVDr. Aleš Hampl, CSc.

Odborný konzultant:

Jazyk práce: český (slovenský jazyk jen na základě přiložené žádosti)

Zásady pro vypracování

Anotace:

Současné poznatky o biologii kmenových buněk ukazují na reálnost využití těchto unikátních buněk v klinické medicíně, zejména v podobě takzvané buněčné terapie. Cílem bakalářské práce je sumarizovat současné pokroky v diferenciaci různých typů kmenových buněk do endokrinních buněk pankreatu, s cílem využít jich k léčbě diabetu. Součástí bakalářské práce bude také přehled vývoje endokrinních buněk pankreatu včetně molekulárních mechanismů, které jej řídí.

Časový harmonogram řešení (postup):

1. Seznámení se s biologickou podstatou/principy uplatňujícími se v regulaci diferenciacce (prosinec 11 - leden 12)
2. Seznámení se s konceptem kmenových buněk, jejich kategorizace, pochopení jejich významu a funkcí (prosinec 11 - leden 12)
3. Sumarizace současných poznatků o vývoji pankreatu (leden 12 - únor 12)
4. Sepisování bakalářské práce (leden 12 - březen 12)
5. Předložení první verze BP vedoucímu (31. březen 12)
6. Finalizace BP (15. duben 2012)

Studium původních vědeckých prací - průběžně

Rozsah bakalářské práce: 30 stran

Rozsah grafických příloh: 10

Seznam odborné literatury:

1. původní vědecké práce

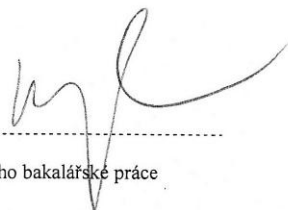
Datum zadání bakalářské práce: 3.11.2011

Termín odevzdání bakalářské práce: dle harmonogramu akademického roku

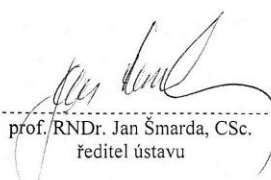
V Brně dne 3.11.2011.



podpis studenta



podpis vedoucího bakalářské práce



prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.
ředitel ústavu

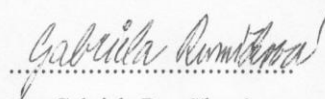
Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce doc. MVDr. Aleši Hamplovi, CSc. za odborné konzultace, věcné rady a pomoc při vypracování práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 14. května 2012

Handwritten signature of Gabriela Rumišková in cursive script, written over a dotted line.

Gabriela Rumišková

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	PANKREAS	12
2.1	Vývoj	12
2.1.1	Transkripční faktory	14
2.2	Stavba a funkce	16
2.2.1	β buňky	18
2.2.2	Inzulín	19
2.3	Poruchy funkce	20
2.3.1	Diabetes mellitus	20
3	BUNĚČNÉ TERAPIE POMOCÍ TRANSPLANTACÍ	21
3.1	Transplantace slinivky	21
3.2	Transplantace ostrůvků	22
4	BUNĚČNÉ TERAPIE KMENOVÝMI BUŇKAMI	23
4.1	Kmenové buňky	24
4.2	Embryonální kmenové (ES) buňky	25
4.2.1	Protokoly přímé diferenciaci	26
4.2.2	Selekce buněčných linií	29
4.2.3	Problémy spojené s ES buňkami	30
4.3	Dospělé kmenové buňky	31
4.4	Indukované pluripotentní kmenové (iPS) buňky	33
5	ZÁVĚR	36
6	LITERATURA	38

SEZNAM ZKRATEK

DM1	diabetes mellitus 1. typu
ES buňky	embryonic stem cells; embryonální kmenové buňky
FGF	fibroblast growth factor; fibroblastový růstový faktor
iPS buňky	induced pluripotent stem cells; indukované pluripotentní kmenové buňky
Ngn3	neurogenin 3
Pdx1	pancreatic and duodenal homeobox 1 (nemá český ekvivalent)
Pax4	paired box 4 (nemá český ekvivalent)
Pax6	paired box 6 (nemá český ekvivalent)
H1xb9	homeobox transcription factor (nemá český ekvivalent)
Hnf1 β	hepatocyte nuclear factor β ; hepatocytární nukleární faktor 1 β
Hnf3 β	hepatocyte nuclear factor 2 β ; hepatocytární nukleární faktor 3 β
Hnf4 α	hepatocyte nuclear factor 4 α ; hepatocytární nukleární faktor 4 α
Hnf6	hepatocyte nuclear factor 6; hepatocytární nukleární faktor 6
TGF- β	transforming growth factor β ; transformující růstový faktor β

ÚVOD

Slinivka břišní patří mezi důležité orgány se schopností sekrece. Správná funkce hraje významnou roli pro zdraví člověka a její poruchy vážně ohrožují život jedince. Nejčastějším onemocněním pankreatu zasahující do endokrinní funkce je diabetes mellitus, který se vyskytuje stále častěji, někdy se dokonce hovoří o světové epidemii. Diabetes se řadí na 4. místo ve světovém žebříčku na seznamu chorob, jež jsou příčinou úmrtí. Odhaduje se, že náklady na komplikace spojené s cukrovkou se pohybují mezi 5 – 10 % celkových světových nákladů na zdravotní péči. Z těchto a mnoha dalších důvodů jsou intenzivní snahy objevit způsoby, jak tuto nebezpečnou nemoc vyléčit.

Buněčné terapie se nabízí jako nejvhodnější řešení. První úspěšná transplantace slinivky před několika desítkami let nabídla poprvé reálnou možnost definitivního vyléčení cukrovky. Bohužel tento složitý zákrok doprovází i v současné době řada komplikací, a proto se výzkum ubíral směrem k méně invazivním postupům, což je například transplantace samotných Langerhansových ostrůvků. Ale i zde se vyskytlo několik problémů a to především nedostatečného množství dárcovského materiálu. Z toho důvodu se vědci pokoušejí vytvořit zcela nové β buňky, konkrétně za využití kmenových buněk

Kmenové buňky se díky svým schopnostem sebeobnovy a možnosti dát vzniknout různým buněčným typům staly hlavním kandidátem v buněčné terapii při léčbě diabetu. Experimentuje se s odlišnými druhy kmenových buněk, jako jsou buňky embryonální, dospělých tkání či buňky uměle indukované.

Hlavním cílem této práce je sumarizovat přehled pokroků v diferenciaci vybraných typů kmenových buněk do endokrinních buněk pankreatu včetně několika konkrétních postupů. Kromě tohoto přístupu k léčbě diabetu jsou v práci stručně nastíněny transplantace slinivky i samostatných Langerhansových ostrůvků. Práce rovněž obsahuje popis stavby slinivky, jejího vývoje včetně souvisejících faktorů a blíže se zabývá mechanismem funkce β buněk.

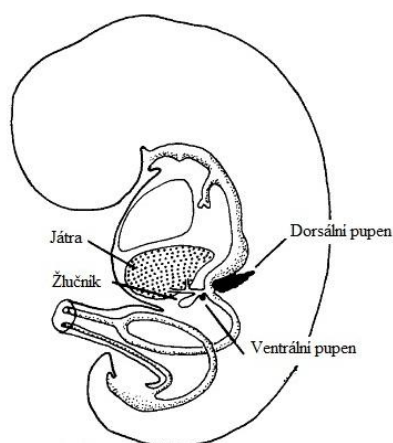
1 PANKREAS

Pankreas neboli slinivka břišní je nepárový orgán, který se skládá ze dvou odlišných buněčných populací - exokrinní buňky, které vylučují enzymy do trávicího traktu a buňky endokrinní, které uvolňují hormony do krevního oběhu (Slack, 1995). Pro dobré porozumění funkcí slinivky je důležité znát její původ a průběh vzniku.

1.1 Vývoj

Gastrulace je definována jako hlavní buněčná reorganizace do tří zárodečných vrstev ektodermu, mezodermu a endodermu, během níž jsou také generovány zárodečné buněčné linie (Best *et al.*, 2008). Z endodermu vzniká primitivní trubice střeva, která se člení na přední, střední a zadní střevo. Většina orgánů se vyvíjí z předního střeva. Je tomu tak i u jater a slinivky břišní, jež vznikají ze společného souboru prekursorových buněk na distálním konci předního střeva, kde střevní trubice vytváří proximální část dvanáctníku (Deutsch *et al.*, 2001).

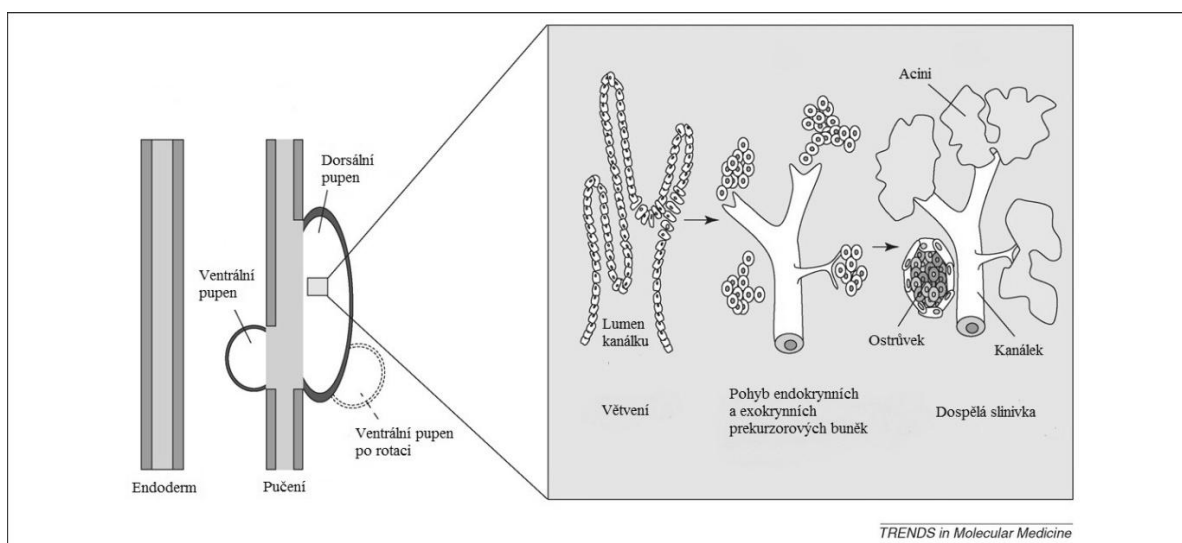
Charakteristická organizace pankreatu se formuje poté, kdy již vznikla střevní trubice z endodermu (Shanti *et al.*, 2007). Slinivku je možné poprvé identifikovat 26 dní od početí (dpc) jako ventrální a dorsální zhuštění epiteliálních buněk koncové části primitivního střeva v podobě dvou pupenů (Piper *et al.*, 2002a, 2004) (obrázek č. 1). Dorsální pupen se objevuje jako první, ventrální pupen vzniká o méně než jeden den později (Shanti *et al.*, 2007). Oba pupeny pučí z endodermálního epitelu.



Obrázek č. 1: Umístění dorsálních a ventrálních pankreatických pupenů v lidském embryu starém přibližně 36 dnů. (Slack, 1995; upraveno)

Během pátého týdne lidského vývoje migruje ventrální pupen kolem primitivního střeva, dokud se nedostane do kontaktu s dorsálním pupenem (Shanti *et al.*, 2007). Začátkem šestého týdne dochází k splynutí pupenů a ty začnou vrůstat do okolního mesodermu a tvořit hlavní kanálek. Zatímco se tento hlavní kanálek prodlužuje, sekundární kanál se formuje a větví. Na začátku devátého týdne se na zakončeních kanálků shlukují buňky, které dají vzniku acinům.

Během desátého týdne se objevují α buňky, δ buňky v jedenáctém týdnu a o dva týdny později vznikají β buňky. Do konce dvanáctého týdne vznikají interlobulární kanálky formující základ budoucích lobulárních struktur pankreatu. V šestnáctém týdnu se vytvářejí první zralé aciny a tento proces pokračuje až do narození. Během dalšího prodlužování a rozšiřování kanálků dochází k pučení shluků buněk ze stěn menších větví. Tyto buňky jsou odlišné od shluků na terminálních částech, které dávají vzniknout acinům a jsou základem ostrůvků. Shluky buněk potenciálních ostrůvků migrují pryč z tubulů do stromatu rozvíjejících se žláz, zatímco se průběžně tvoří a pučí další shluky. Ostrůvky se rozšiřují díky proliferaci prekurzorových buněk a splýváním buněčných shluků v těsné blízkosti.



Obrázek č. 2: Schéma vývoje pankreatu. (Slack *et al.*, 200; upraveno)

Expresе hormonů, pozorovatelná jako nepatrný výskyt epiteliálních buněk imunoreaktivních na inzulin, je poprvé patrná 52 dnů od početí, což je téměř až o 4 měsíce později od prvního náznaku pankreatických pupenů (Piper *et al.*, 2004)

1.1.1 Transkripční faktory

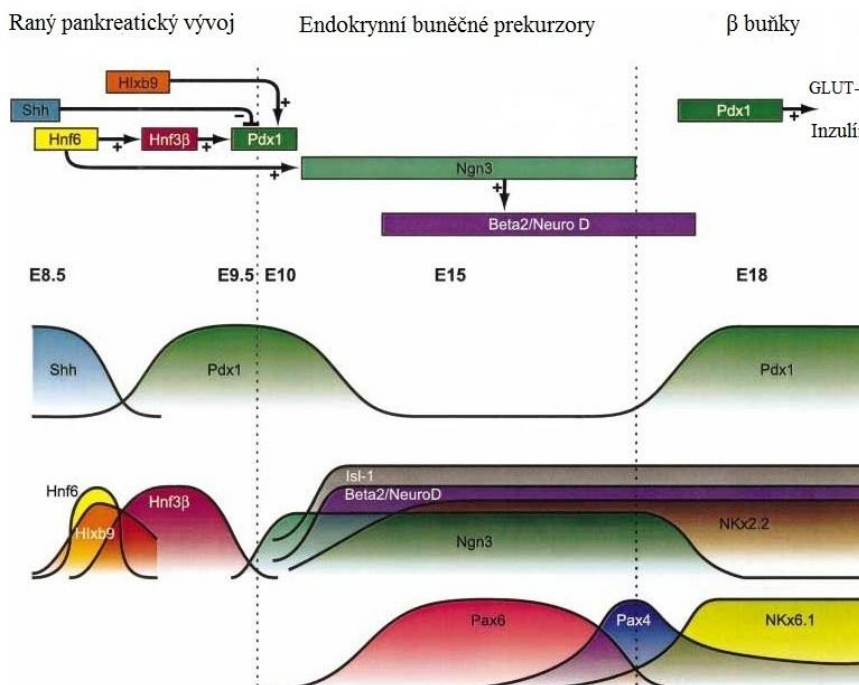
Do seznamu doposud identifikovaných transkripčních faktorů účastnících se vývoje pankreatu patří nejznámější: Pdx1, Pax4 a Pax6, Isl-1, Beta2/ NeuroD, Nkx2.2, Nkx6.1, Ngn3, Hnf6, H1xb9 a Hnf3 β (Soria et al., 2000a).

Pdx1 (z anglického Pancreatic and duodenal homeobox 1) je jedním z klíčových homeotických transkripčních faktorů (Soria, 2001). Je důležitý nejen při regulaci exprese inzulinového genu, ale je také nezbytný pro diferenciaci slinivky. Ta začíná v epiteliálních buňkách expresí Hnf6, H1xb9, Hnf3 β a Pdx1. Hnf6 je homeoboxový gen přítomný v epiteliálních buňkách, které jsou prekuzory exokrinních a endokrinních buněk. H1xb9 je potřebný pro pankreatické pučení, kdy epiteliální buňky mění svůj tvar, tvoří vrstvy a migrují. Hnf3 β je kritickým faktorem vývoje endodermálních buněčných linií a navíc reguluje transkripci Pdx1.

Po tomto počátečním období raného vývoje pankreatu, které končí vznikem buněk pozitivních na Pdx1, se objevuje skupina transkripčních faktorů, které charakterizují prekuzory endokrinních buněk. Do této skupiny patří Isl-1, Pax6, Nkx2.2, Beta2/NeuroD, a Ngn3. Isl-1 byl prokázán jako nezbytný pro diferenciaci buněk ostrůvků (Ahlgren *et al.*, 1997). To bylo potvrzeno pokusem na myších, které po vyřazení funkce Isl-1 genu zcela postrádaly endokrinní buňky. Kromě toho je exprese Isl-1 také důležitá pro vývoj exokrinní tkáně dorsálního pupenu, což naznačuje, že signály spouštějící morfogenezi dorsálního a ventrálního pupenu jsou odlišné. Pax4 a Pax6 jsou dva homeotické proteiny s expresí ve vyvíjejícím se střevě a v dospělé slinivce, jsou nepostradatelné při tvorbě různých buněčných typů (Soria, 2001). Zatímco Pax6 je nezbytný pro generování α buněk sekretujících glukagon (St-Onge *et al.*, 1997), Pax4 je klíčovým faktorem pro diferenciaci β buněk produkujících inzulin a δ buněk potřebných pro tvorbu somatostatinu (Sosa-Pineda et al, 1997). Pro Ngn3 bylo nedávno prokázáno, že se podílí na vývoji všech čtyř typů endokrinních buněk (Jensen *et al.*, 2000a) a předpokládá se, že Ngn3 pozitivní buňky jsou prekuzory ostrůvků. Ngn3 dále indukuje expresi transkripčního faktoru Beta2/NeuroD, podílejícího se na expresi genu pro inzulin a na diferenciaci buněk ostrůvků (Naya *et al.*, 1997). Tato fáze vývoje končí spolu s buňkami, které právě exprimují Ngn3, Beta2/NeuroD, Isl-1, Nkx2.2, a Pax6 (Soria, 2001). Tyto populace buněk obsahují endokrinní prekuzory, které se mohou dále vyvinout v kompletní ostrůvky.

Diferenciace β buněk s největší pravděpodobností začíná se zvýšenou expresí faktoru Pax4 (zatímco Pax6 udržuje pod kontrolou buňky produkující glukagon). V již

diferencovaných β buňkách Pdx1 indukuje expresi inzulinu a GLUT-2 (glukózový transportér). Jak je znázorněno na obrázku č. 3, většina z těchto faktorů je exprimována postupně a přechodně během vývoje.



Obrázek č. 3: Sekvenční exprese transkripčních faktorů během diferenciace β buněk. E – embryonální den. (Soria, 2001; upraveno)

Mezi další důležité transkripční faktory kritické pro přežití a proliferaci pankreatických progenitorů patří také Sox9 (Best *et al.*, 2008). Ten je regulován spolu s postupující endokrinní diferenciací (Best *et al.*, 2008). U slinivky dospělého jedince se Sox9 zachovává pouze v epiteliálních buňkách pankreatického vývodu.

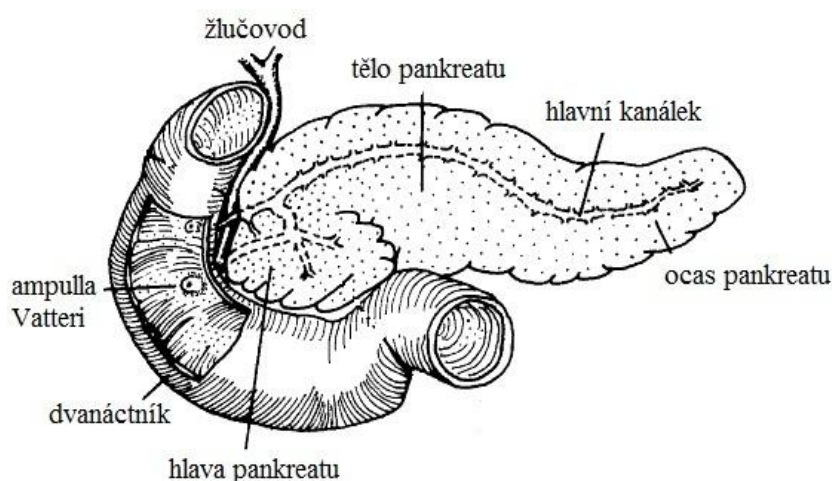
V pozdějších stádiích vývoje, kdy již dochází k rotaci pupenů, je důležitou složkou regulace tohoto procesu snížení exprese genů rodiny Hedgehog kódující signální molekuly. Geny sonic hedgehog (Shh) a indian hedgehog (Ihh) mají svůj podíl při vývoji střeva. Jakmile dojde k jejich regulaci, dorsální a ventrální pupeny začnou růst. Předpokládá se, že k represi genu Shh dochází vlivem působení faktorů z rodiny TGF- β , především aktivin- β B a FGF-2, které sekretuje notochord (Hebrok *et al.*, 1998).

Ačkoliv jsou tyto transkripční faktory vyžadovány pro organogenezi slinivky, stále se ještě přesně neví, jak je jejich exprese regulována, zda fungují společnou cestou, jestli je možné změnit pořadí aktivace a které jsou klíčové faktory potřebné během organogeneze

(Soria 2001). Identifikace charakteristického „menu“ faktorů spojených s prekurzorovými buňkami v různých fázích by mohla pomoci definovat genetickou kaskádu pro produkci ostrůvků a stanovit tak protokoly pro řízení buněčné diferenciaci konkrétními cestami.

1.2 Stavba a funkce

Celý orgán u člověka váží 70-150 gramů a měří 15-25 centimetrů (Slack, 1995). Je napojen na dvanáctník přes „ampulla Vatter“, kde se hlavní pankreatický vývod připojuje na žlučovod. Pro označení částí lidské slinivky od proximální k distální části se používají termíny hlava, krk, tělo a ocas (obrázek č. 4). Funkčně se pankreas rozděluje na exokrinní a endokrinní část.



Obrázek č. 4: Anatomie pankreatu dospělého člověka. (Slack, 1995; upraveno)

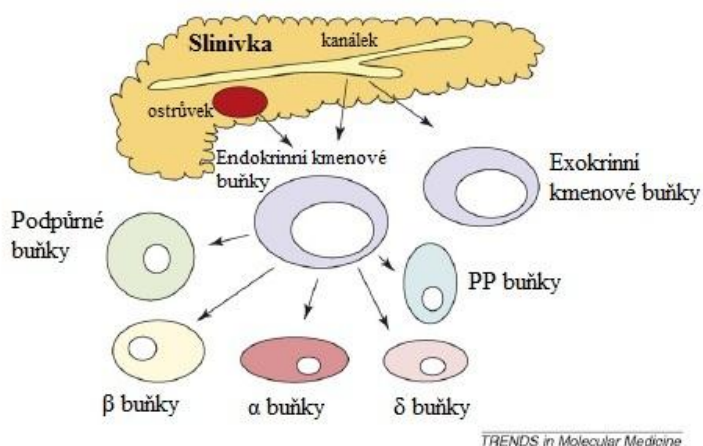
Exokrinní část pankreatu tvoří laločnaté rozvětvené acinární žlázy (Slack, 1995) (obrázek č. 5). Jejich sekretující buňky seskupené do acinů mají pyramidální tvar s jádrem, pravidelným seskupením drsného plazmatického retikula, napadným Golgiho komplexem a četnými sekrečními granuly obsahujícími trávicí enzymy, kterých je nejméně 22 včetně proteáz, amyláz, lipáz a nukleáz. Většina z nich je vylučována ve formě inaktivních prekurzorů, které se stávají aktivními poté, co vstoupí do dvanáctníku. Lumina acinů jsou malá a mohou být terminální nebo inkterkalární. V místě, kde se setkávají aciny s kanálkem, se nachází ploché centroacinózní buňky krychlovitého tvaru bohaté na mitochondrie, které sekretují neenzymatické složky pankreatických šťáv, včetně bikarbonátu. Sekrece pankreatických šťáv je regulována hormonální stimulací, hlavně sekretinem, cholecystokininem, gastrinem a také nervovými podněty.



Obrázek č. 5: Histologie pankreatického acinu. (Slack, 1995, upraveno)

Endokrinní buňky jsou organizovány zcela jiným způsobem. V roce 1896 Paul Langerhans na slinivce pozoroval mikroskopické ostrůvky odlišné struktury oproti buněčné masě produkující trávicí enzymy (Calne, 2005). Slinivka obsahuje přibližně jeden milión Langerhansových ostrůvků. Tyto ostrůvky mají na starost endokrinní funkci pankreatu. V rámci ostrůvku existuje jemné a bohaté kapilární a nervové propojení připomínající glomerulus ledvin. Každý ostrůvek se skládá z přibližně tisíce buněk čtyř různých typů s vlastní sekreční funkcí:

- α buňky produkují glukagon (antagonista inzulínu - působí proti jeho účinku)
- δ buňky produkují somatostatin
- PP buňky produkují pankreatický polypeptid
- β buňky produkují inzulín, tvoří 60 - 80 % všech buněk ostrůvků, což činí 6000 - 8000 buněk/ostrůvek



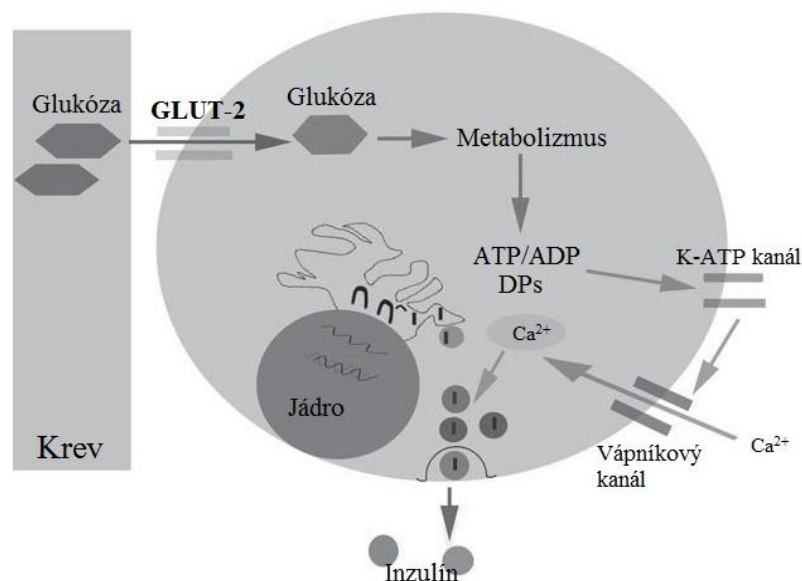
Obrázek č. 6: Buněčné typy pankreatu. (Shanti *et al.*, 2007; upraveno)

1.2.1 β buňky

Pankreatické β buňky slouží k syntéze, zpracování, ukládání a uvolňování inzulínu (Soria *et al.*, 2008). Potravou indukované uvolňování inzulínu je velice přesný proces, při kterém β buňky rozpoznají koncentraci glukózy v krvi a uvolní přesné množství inzulínu potřebné k normalizaci glukózy v krvi. Odpovědi a reakce β buněk propojují různé intracelulární mechanizmy.

Exocytotický systém je podobný jako u jiných sekrečních buněk, ale odpovídá na integrované propojení signálů, jako jsou pochody vápníku, metabolismem glukózy indukované posly či jaderné změny. To vše společně s extracelulárními posly. Dále na rozdíl od ostatních endokrinních buněk je inzulín uvolňován rychlým procesem, ve kterém intra- a extracelulární signály vytváří plynulou odpověď (ve tvaru S křivky), která udržuje hodnotu krevní glukózy kolem 5 mM. Populace β buněk jsou propojeny navzájem do funkčního syncytia (Soria *et al.* 2000a). Z fyziologického hlediska lze říci, že správnou odpověď poskytují agregované ostrůvky, zatímco jednotlivé β buňky nikoliv. Interakce cytokinů mezi jednotlivými buněčnými typy může být důležitým atributem, který by byl ztracen u samostatně oddělených ostrůvků (Calne, 2005).

Kontrola glukózy β buňkami je zprostředkována jejím transportem přes buněčnou membránu pomocí glukózového transportéru GLUT-2 a následným „zachycením“ glukózy uvnitř buňky její fosforylací pomocí glukokinázy (Best *et al.*, 2008) (obrázek č. 7). Tento nárůst intracelulární glukózy stimuluje tvorbu adenosintrifosfátu (ATP), který uzavře ATP-senzitivní draslíkové kanály měnící membránový potenciál. To způsobí depolarizaci, vzrůst intracelulární hladiny draslíku a koordinovanou exocytózu inzulínových granul. Sekreční produkty ostrůvků vstupují do portální krve a prvním orgánem, který potkávají, jsou játra (Calne, 2005). Inzulín je částečně metabolizován právě v játrech, které změni glukózu na glykogen.



Obrázek č. 5: Spřažení stimulů sekrece pankreatických β buněk. (Soria *et al.*, 2008; upraveno)

1.2.2 Inzulín

Molekulární struktura tohoto složitého proteinu byla odhalena v Cambridge roku 1950 v laboratořích molekulární biologie Frederikem Sangerem (Calne 2005). Inzulín je dimerický protein spojený disulfidickou vazbou (Slack 1995).

Při vzniku aktivní formy inzulínu je neaktivní proinzulín rozštěpen na aktivní inzulín a molekulu C-peptidu (Calne, 2005). Tento peptid je sledovaným znakem probíhající syntézy inzulínu. Fyziologie inzulínu a kontrola metabolismu glukózy tvoří propojený komplex. Kromě důležité bazální sekrece je inzulín uvolňován v závislosti na příjmu potravy. Efekt inzulínu na cílovou tkáň je jak metabolický, a to především v podpoře vychytávání glukózy, tak mitogenní (Slack, 1995). Inzulínová granula, uložená v β buňkách, jsou v pulzech uvolňovány souběžně z velkého počtu β buněk v přesném množství a s přesným načasováním v závislosti na okolní koncentraci glukózy (Calne, 2005). β buňky mají ve své funkci značnou rezervu, takže i po příjmu velké porce potravy ne všechny buňky uvolní své zásoby inzulínu. Dochází rovněž k pomalé obnově β buněk (přibližně 5 % za rok) z buněk progenitorových umístěných na ostrůvcích nebo ve vývodu exokrinní části pankreatu.

1.3 Poruchy funkce

Onemocnění slinivky se mohou dotýkat jak její endokrinní, tak exokrinní části. S touto jsou nejčastěji spojeny akutní nebo chronické záněty neinfekčního původu. Dalším mnohem závažnějším onemocněním, které se v poslední době vyskytuje častěji, je nádor pankreatu. Tyto rakoviny mají velice agresivní průběh a pacienti nedostávají často příznivou prognózu. Nicméně nejčastějším onemocněním, které zasahuje do endokrinní funkce slinivky, bývá diabetes mellitus.

1.3.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus neboli cukrovka je heterogenní metabolické onemocnění postihující 2-5 % dospělé populace rozvinutých zemí (Berná *et al.*, 2001). Podle světových prevalenčních údajů se odhaduje, že v roce 2000 bylo 130 milionů nemocných a v roce 2025 se předpokládá nárůst na 300 milionů pacientů.

Snaha porozumět příčinám, které vyvolávají tuto chorobu, zaměstnala mnoho výzkumných skupin po desetiletí (Murtaugh, 2007). Jejich výzkumné studie naznačují, že nahodilá kombinace změn v genových predispozicích spolu s rizikovými faktory životního prostředí vyvolávají vznik cukrovky. Existuje několik typů tohoto onemocnění, ale mezi dvě nejrozšířenější a nejznámější patří diabetes mellitus prvního (DM1) a druhého typu (DM2).

Typ jedna je autoimunitní onemocnění spojené s určitou konfigurací genetickou HLA (human leukocyte antigens) komplexu, nejčastěji přítomnou u dětí a dospívajících, ale může se také vyskytnout u dospělých (Calne, 2005). DM1 je multifaktoriální onemocnění vyvíjející se od komplikovaných interakcí mezi genetickými a environmentálními rizikovými faktory (Kabelitz *et al.*, 2007). Často, ale ne nezbytně, onemocnění propukne po prodělané virové infekci. β buňky pankreatických Langerhansových ostrůvků jsou vybrány k imunitní destrukci aktivovanými T lymfocyty, které ještě nemají definovaný molekulární cíl (Calne, 2005). K obnově masy β buněk nemůže dojít kvůli pokračující autoimunní aktivitě a nedostatku progenitorových buněk. Zničení β buněk má za následek nedostatek inzulínu, což vede k vysokým hodnotám glykémie (koncentrace glukózy v krvi). Tyto nepřírozené hyperglykémie akutně vedou k otravě ketony a dlouhodobě k dalším komplikacím jako je neuropatie, retinopatie, nefropatie a mohou u špatně kompenzovaného pacienta vést až k předčasnému úmrtí. Jediný současný způsob, kterým lze DM1 kontrolovat je exogenní aplikace inzulínu, přísný dietní režim a častá sebekontrola glykemií. Před zavedením inzulínu

v roce 1920 pacienti umírali v bolestivém vyhublém stavu v pubertálním věku dříve, než mohli mít vlastní děti (Calne, 2005). Zlepšením inzulínové terapie a dietou se navrátili pacienti k relativně normálnímu životu, ale i s dobrou kompenzací se mohou rozvinout sekundární komplikace.

Diabetes druhého typu je běžný zvláště u obézních lidí. Zpočátku jejich léčbu představuje dieta a perorální antidiabetika. V tomto případě je cukrovka typická inzulínovou rezistencí ve tkáních a následným zvýšením produkce velkého množství inzulínu zřejmě ve snaze překonat rezistenci. Nakonec dojde k selhání β buněk a přibližně polovina pacientů potřebuje exogenní injekce inzulínu a také se vyskytují stejné sekundární komplikace jako u DM1.

I když léčba inzulínem již zachránila bezpočet diabetiků od předčasné smrti, představuje spíše vylepšenou léčbu než skutečný lék (Murtaugh, 2007). Opravdový lék pro diabetes, především prvního typu, by mohl být dosažen nahrazením zničených buněk.

2 BUNĚČNÉ TERAPIE POMOCÍ TRANSPLANTACÍ

Transplantace pankreatické tkáně, neporušené celé slinivky nebo izolovaných pankreatických ostrůvků se staly klinickou možností, kterou je třeba brát v potaz v případě léčby pacientů s cukrovkou prvního typu (Meloche 2007).

2.1 Transplantace slinivky

Transplantací slinivky lze dosáhnout, bohužel ne vždy, stálé hladiny krevní glukózy potřebné pro snížení rizika vzniku sekundárních diabetických komplikací, ale vystaví pacienta pooperačním obtížím, nežádoucím efektu imunosuprese a riskuje se případná výrazná ztráta funkce štěpu, což vyžaduje návrat k exogennímu inzulínu (Meloche, 2007). První transplantace byla provedena v roce 1966, avšak v této době byly zákroky provázeny mnoha obtížemi. Se zdokonalením technik, imunosupresivní léčby a pooperačním monitorováním pacientů se snížila jejich úmrtnost a zvýšilo se přežití transplantované tkáně.

Transplantace pankreatu lze rozdělit na tři různé klinické subjekty: Simultánní transplantace slinivky a ledvin (SPK z anglického simultaneous pancreas and kidney transplant), transplantace ledvin následovaná transplantací slinivky (PAK z anglického pancreas after kidney transplant) a samotná transplantace pankreatu (PTA z anglického

pankreas transplant alone). Každá z těchto transplantací má své vlastní charakteristické indikace, rizika a výsledky.

Simultánní transplantace představuje nejběžnější typ, jelikož ledviny bývají často poškozeny v důsledku špatné kompenzace diabetu. Výhodou je, že pacient prodělá pouze jednu operaci a následující léčba může být řízena stejnými, nebo velmi podobnými, imunosupresivními léky.

Zatímco SPK transplantace je omezena na použití ledvin z mrtvého dárce, v případě oddělených transplantací PAK lze jako dárce vybrat živého jedince, což zvyšuje počet potenciálních kandidátů. Ačkoliv musí pacient prodělat dva rozdílné zákroky, následná pooperační léčba je obdobná jako u simultánní transplantace.

Transplantace samotné slinivky je nejméně častá a provádí se právě u pacientů, kteří nemají důvody pro transplantaci ledvin. K jejímu provedení musejí být závažné indikace, jako jsou opakované akutní a těžké metabolické komplikace (npř. hypoglykémie, ketoacidóza), klinické a psychické problémy spojené s exogenní inzulínovou terapií a celkově nízká kvalita života způsobená chronickým onemocněním (Robertson *et al.*, 2000).

Přestože úspěšně provedená transplantace vede k dlouhodobě zlepšeným hodnotám glukózy a kvalitě života, pacient podstupuje vysoké riziko pooperačních komplikací – například trombóza cév štěpu, nitrobršíšní krvácení či sepse, zánět štěpu nebo dokonce jeho funkční ztrátu (Meloche, 2007). Mimo to je navíc nutné podstoupit dlouhodobou imunosupresivní léčbu, která je spojena s řadou vedlejších efektů a problémů. Proto se upřednostňují méně rizikové způsoby léčby.

2.2 Transplantace ostrůvků

Transplantace ostrůvků je méně invazivní alternativa než transplantace celé slinivky a byl prokázán nižší výskyt následných komplikací (Meloche, 2007).

Průlomovou studii s největším přínosem v této oblasti představil Saphiro se svým týmem (2000). Provedli transplantaci ostrůvků sedmi pacientům za použití následné imunosupresivní terapie bez glukokortikoidů. Ostrůvky byly získány od dárců s odumřelým mozkem a byly ihned bez nutné kultivace použity k zákroku. Jejich spotřeba byla kolem 11 000 ostrůvků na kilogram hmotnosti pacienta. Ostrůvky rozsuspendované v roztoku lidského albuminu a heparinu byly vpraveny infuzním katetrem přes portální žílu do jater. Po

transplantaci byli pacienti sledováni a u všech sedmi jedinců již několik dnů po zákroku nebyla potřebná exogenní inzulínová léčba. Někteří pacienti sice museli podstoupit druhou infúzi ostrůvků, ale u žádného z nich nedošlo k úmrtí ani akutnímu odmítnutí transplantovaného materiálu. V rámci imunosupresivní léčby musí však užívat sirolimus, takrolimus a daklizumab zatěžující organizmus. Navíc dlouhodobé sledování pacientů po zákroku přineslo výsledky, kdy po prvním roce si 80% z nich udrželo nezávislost na exogenním inzulínu, po dvou letech to bylo 70% a po pěti letech pouhá polovina (Calne, 2005). Příčinu tohoto poklesu nelze jednoznačně označit, ale mohlo by se jednat o kombinaci pomalé rejekce, opětovným nástupem autoimunní destrukce a vyčerpání transplantovaných buněk.

Tyto komplikace inspirovaly vědce k vylepšení stávající metody. Nový postup spočívá v umístění izolovaných ostrůvků do speciálních kapslí z polopropustné membrány agarózového původu (Teramura a Iwata, 2010). Tato membrána by měla z buněk propouštět potřebný inzulín a odpadní látky, naopak do ostrůvku proniknou potřebné živiny včetně kyslíku a glukózy. Ale především zabrání rozpoznání transplantované tkáně imunitním systémem a odstraní se tak nutnost dodávat imunosupresiva. Vědci plánují kromě ostrůvků od dárců vyzkoušet postup i na β buňky diferencované z kmenových buněk. Výzkum je však zatím v začátcích a bude několik let trvat, než bude moci být běžně použitelný v praxi.

Ačkoliv se tedy transplantace ostrůvků zatím jeví jako nepřijatelnější způsob vyléčení cukrovky, nutnost imunosuprese a především nedostupné množství potřebné tkáně dárců pro velké množství pacientů nutí výzkumníky hledat jiné alternativní zdroje léčby, konkrétně kmenové buňky. (Soria *et al.* 2008).

3 BUNĚČNÉ TERAPIE KMENOVÝMI BUŇKAMI

β buňky mají kromě produkce inzulínu řadu dalších funkcí, proto před samotným zvážením možných zdrojů nahrazujících buněk nesmí být opomenuty některé ze základních rysů takovýchto buněk (Halban *et al.*, 2011). Za prvé musí být schopny syntetizovat, zpracovat a ukládat inzulín, a to vše v dostatečném množství v závislosti na metabolismu (Wu *et al.*, 2011). Je často opomíjeno, že primární β buňky kromě přímé sekrece také uschovávají velké množství inzulínu v sekrečních granulech vázaných v membráně, s tímto uloženým

inzulínem tvoří až 10% z celkového množství proteinů v buňkách. Ale zatím velmi málo uveřejněných protokolů se u klinických náhrad β buněk přiblížilo k dosažení těchto hodnot.

Dále by buňky měly být schopny uvolňovat inzulín v dostatečném množství k udržování hladiny glukózy v plazmě v úzkém rozsahu 5-7 mM, aniž by docházelo k nadměrnému uvolňování vedoucího k hypoglykémii. Zdravé buňky využívají složité mechanismy k monitorování a následné odpovědi v závislosti na změnách metabolických signálů. Také nahrazující β buňky budou potřebovat podobné mechanismy, kterými budou schopny přesně regulovat produkci hormonu jako odpověď na okolní podmínky.

A v neposlední řadě originální β buňky mají regulovanou nízkou proliferační kapacitu, díky které nehrozí nekontrolovatelné dělení a zmnožení buněk, které by mohlo vést k rozvoji hyperinzulinemické hypoglykémie (Parnaud *et al.*, 2008). Proto zajištění omezené a důsledně kontrolované proliferace je důležitým úkolem při pokusech generovat *in vitro* inzulín exprimující buňky z vysoce proliferujících kmenových buněk nebo prekursorových populací (Wu *et al.*, 2011).

Mnoho navrhovaných výchozích buněčných typů pro tvorbu náhradních β buněk muselo být zavrhnuto, jelikož nesplňovaly právě některé z těchto kritérií, a byly tak klinicky nepřijatelné. Například je poměrně snadné připravit buňky produkující, což se doposud povedlo z různých typů buněk, jako jsou fibroblasty, kosterní svalstvo, ledvin nebo vaječnickové buňky (Shaw *et al.*, 2002). Nicméně tyto vyprodukované buňky postrádaly prvky spojující stimulaci podnětem a následnou reakce, jak je tomu u originálních β buněk, a tak jejich sekreční odpovědi inzulinu nebyla regulována a neodpovídala na fyziologicky příslušné signály (Wu *et al.*, 2011).

A právě kmenové buňky se díky svým schopnostem jeví jako nejvhodnější kandidáti, ze kterých by bylo možno vytvářet dostatečné množství buněk potřebných k transplantaci, při zachování své diferencované podoby/funkce.

3.1 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou sebeobnovující se buňky, které se mohou diferencovat do jednoho nebo více specializovaných buněčných typů (Shanti *et al.*, 2007). Kmenové buňky mají mnoho znaků, které je kvalifikují jako potenciální nevyčerpatelný zdroj ostrůvkových

buněk. Teoreticky mají kapacitu pro neomezenou replikaci a v případě přiměřené diferenciaci se mohou stát plně zralými a funkčními pankreatickými buňkami.

Kmenové buňky mají tedy dvě základní vlastnosti: sebeobnovu a schopnost diferencovat se do jiných buněčných typů (Soria *et al.*, 2008). Potenciálně mají tyto buňky schopnost začlenit se do tkáně. *In vitro* diferenciaci ukázaly, že kmenové buňky různého původu mohou být nasměrovány do buněk produkujících inzulin.

Populace kmenových buněk, které byly použity při experimentálních studiích na produkci takových buněk lze rozdělit na (Wu *et al.*, 2011):

- embryonální kmenové buňky, popisované jako pluripotentní nediferenciované buňky izolované z embryoblastu vyvíjející se blastocysty.
- tkáňové kmenové buňky, definované jako multipotentní progenitorové buňky vyskytující se ve fetální a dospělé tkáni.
- indukované pluripotentní kmenové buňky, získané reprogramováním diferencovaných dospělých buněk pomocí nucené exprese genů pro pluripotenci.

3.2 Embryonální kmenové (ES) buňky

Objev pluripotentních kmenových buněk (pluripotence - schopnost dát vzniknout buňkám všech tří zárodečných listů) jakožto nevyčerpatelného zdroje prekurzorových buněk, které mohou být teoreticky diferencovány v jakýkoliv buněčný typ, vedl k možnosti nahrazení inzulin produkujících buněk pomocí tkáňového inženýrství (Kabelitz *et al.*, 2007). V současné době je zastupován názor, že právě ES buňky mají největší klinický potenciál coby zdroj materiálu pro buněčnou substituční terapii při léčbě diabetu, a to především díky svým dvěma důležitým vlastnostem – teoreticky neomezená kapacita množit se *in vitro* a tím možnost poskytnout velké množství buněk vyžadované pro transplantaci a dále jejich vývojová plasticita jim v zásadě umožňuje vytvářet libovolný buněčný typ lidského těla včetně β buněk (Wu *et al.*, 2011).

První studie popisující diferenciaci myších embryonálních kmenových buněk v buňky exprimující inzulin byly publikovány před více než deseti lety a využívaly strategii, při které

gen pro rezistenci k antibiotikům řízený inzulinovým promotorem umožňoval selekci spontánně diferenciovaných buněk produkujících inzulin (Soria *et al.*, 2000a). Po *in vitro* diferenciaci byl jeden transgenní ES buněčný klon transplantován do myši s diabetem, u které došlo k normalizaci glykémie. Brzy poté se ukázalo, že i lidské ES buňky jsou schopny takovéto spontánní diferenciaci, avšak s velmi nízkou frekvencí – pouze 1 % buněk bylo schopno exprimovat požadovaný inzulin (Assady *et al.*, 2001). Ačkoliv tyto studie poskytly důležitá data dokazující funkčnost takového postupu, nebyly dále přejaty jinými vědeckými skupinami právě kvůli nízké výnosnosti inzulin produkujících buněk při spontánní diferenciaci (Wu *et al.*, 2011).

Proto se brzy pozornost upřela na řízenou diferenciaci ES buněk pomocí různých protokolů. Studie na ranou řízenou diferenciaci přizpůsobily protokol, který byl původně navrhnut pro generování neurálních buněk z myších ES buněk, a přinesly výsledky s vysokou hladinou produkce inzulinu u získaných buněk *in vitro*, ale nedokázaly po vpravení do laboratorních zvířat kontrolovat jejich hladinu glukózy (Lumensky *et al.*, 2001). Také následující aplikace podobných protokolů na myši a lidské ES buňky prokázaly, že vzniklé buňky často podléhaly apoptóze, naměřené hodnoty mRNA pro inzulin byly nízké a buňky spíše absorbovaly značné množství inzulinu z média, než aby jej samy syntetizovaly *de novo* (Rajagopal *et al.*, 2003). Ale i přes to, že tyto protokoly nemusí být zcela přesné, zaměřily se na experimentální přístup řízení pluripotentních nediferenciovaných ES buněk směrem k fenotypu β buněk skrz sérii vývojových stádií (Wu *et al.*, 2011). Paralelní pokroky v chápání vývojové biologie endokrinní části pankreatu v uplynulých deseti letech, při kterých byly také často použity myši s funkčně vyřazenými geny, poskytly detailní znalosti sledu událostí a vývojových signálů během její formace (Jørgensen *et al.*, 2007). Tyto získané poznatky byly využity v nedávných studiích navrhujiících diferenciační protokoly založené na sekvenčním vystavení lidských ES buněk růstovým faktorům a mitogenům (Wu *et al.*, 2011).

3.2.1 Protokoly přímé diferenciaci

Tyto protokoly jsou navrženy tak, aby při *in vitro* manipulaci byly zastoupeny důležité signály, které v organismu řídí pluripotentní buňky nejdříve do stádia konečného endodermu, poté formují pozdní buňky předního střeva, následně endoderm pankreatu, endokrinní progenitorové buňky a nakonec vedou ke vzniku plně diferenciovaných pankreatických endokrinních buněk (Soria *et al.*, 2008). Protokoly přímé diferenciaci jsou tedy založeny na

identifikaci vnějších (npř. aktivin, butyrát sodný, sonic hedgehog, růstový fibroblastový faktor, glukóza, peptid podobný glukagonu, noggin) a vnitřních (Pax4) signálů, které řídí ES buňky skrz právě touto vývojovou cestou (Blyszczuk *et al.*, 2003). Analýza exprese genů (markerů) specifických pro jednotlivé vývojové fáze umožňuje posoudit účinnost protokolů řízené diferenciaci do příslušných linií.

Konkrétně D'Amour se svou skupinou (2006) vytvořil protokol o pěti krocích pro diferenciaci lidských ES buněk do pankreatických buněk exprimujících hormony. Protokol byl upraven především pro buněčnou linii CyT203. Autoři se zaměřili na generování definitivního endodermu, následně buněk exprimujících Pdx1 a nakonec buněk exprimujících inzulin. Díky znalostem o vývojové biologii slinivky se soustředily na pokusy zaměřené na použití různých faktorů jako například aktivin, TGF- β 1, TGF- β inhibitory, FGF a jejich inhibitory, nikotinamid, hedgehog inhibitory. Empirický postup zahrnoval především testování různých použitých koncentrací, délky aplikace a kombinace těchto faktorů a také nejrozumnější úpravy médií, ve kterých byly faktory použity.

V prvním kroku použité lidské ES buňky přešly přes mesoderm do fáze definitivního endodermu pod vlivem vysoké koncentrace 100 ng/ml aktivinu A po dobu tří dnů v kombinaci s nízkou dávkou výživy v podobě fetálního bovinního séra. Skupina vyzorovala, že zisk inzulin pozitivních buněk z kultury s přidáním aktivinu A v dávce 100 ng/ml se pohyboval kolem 7,3% v 16tém dni diferenciaci. Oproti tomu při dávce 30 ng/ml zisk činil pouhých 0,3%. Navíc byl během prvního dne přidán protein Wnt3a, což zvýšilo účinnost tvorby mesodermu jakožto mezikroku.

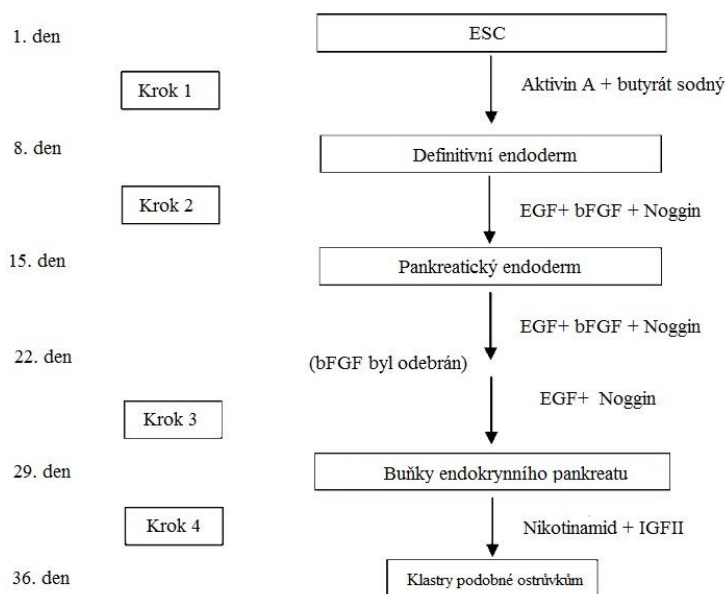
V druhé fázi byl aktivin A odstraněn, což se v dané kultuře jeví jako zásadní krok, který umožnil posun definitivního endodermu do stádia připomínajícího primitivní střevní trubici. Což potvrdila i přítomnost faktorů Hnf4a a Hnf1b. Pro zvýšení efektivity procesu byl ještě přidán růstový fibroblastový faktor 10 (FGF-10) a inhibitor hedgehog signalizace KAAD-cyclopamin.

Třetí krok se sestává z vystavení buněk endodermu střevní trubice působení kyseliny retinové spolu s výše zmíněným FGF-10 a KAAD-cyclopaminem. Po přidání kyseliny začaly buňky exprimovat vysoké hladiny Pdx1 a Hnf6 spolu s udržující se nebo také vzrůstající hladinou Hnf1b a Hnf4a. Kombinace těchto genových expresí vypovídá o přítomnosti buněk pozdního předního střeva.

Během čtvrtého stádia byly tyto buňky produkující Pdx1 převáděny do linií pankreatických a endokrinních buněk. Na kultivačních miskách byly pozorovány rozsáhlé oblasti buněk se společnou expresí Pdx1 a Nkx6.1 nebo Hnf6 a Nkx6.1, což je charakteristické pro pankreatický epitel. Mezi nimi byly rozptýlené buňky koexprimující Nkx2.2 spolu s Pdx1 nebo řídčeji s Nkx6.1, což je charakterizuje jako buňky, které bývají běžně odvozené ze slinivky. Navíc mnoho Nkx2.2 pozitivních buněk také produkovalo Ngn3, čímž se prokazuje jejich příslušnost k endokrinním liniím.

Během poslední páté fáze kolem patnáctého dne diferenciace již endokrinní buňky produkovaly pankreatické hormony inzulin, glukagon, somatostatin a pankreatické polypeptidy. Část buněk produkovala společně inzulin a glukagon nebo inzulin a somatostatin, nejmenší byl výskyt buněk tvořící všechny tři hormony najednou.

O rok později Jiang se svým týmem (2007) publikovali práci, ve které z lidských ES buněk vygenerovali ostrůvkům podobné klastry produkující inzulin za použití jiného čtyřfázového protokolu. Postup je znázorněn na obrázku č. 8.



Obrázek č. 6: Schéma diferenciace lidských ES buněk do klastrů podobných pankreatickým ostrůvkům. (Jiang *et al.*, 2007; upraveno)

V prvním kroku buňky rostly na vrstvě myších embryonálních fibroblastů v médiu a působil na ně přidáný aktivin A a butyrát sodný. Po jednom dni byla jejich koncentrace snížena a tím došlo k aktivaci endodermální diferenciace a vzniku definitivního endodermu.

Během druhého kroku, kdy byly buňky kultivovány za nízkoadherentních podmínek, došlo k tvorbě agregátů a ty již byly pěstovány v médiu s přidavkem epidermálního růstového faktoru (EGF), bazického fibroblastového růstového faktoru (bFGF) a nogginu. Došlo k formování pankreatického endodermu.

Indukce buněk směrem k endokrinnímu pankreatu byla způsobena odebráním bFGF z média a kultivace agregátů probíhala dále bez něj.

Následně došlo k jejich přenosu do média, kde byl přidán nikotinamid a inzulinu podobný růstový faktor 2 (IGF-II) v němž došlo k dozrání buněčných klastrů.

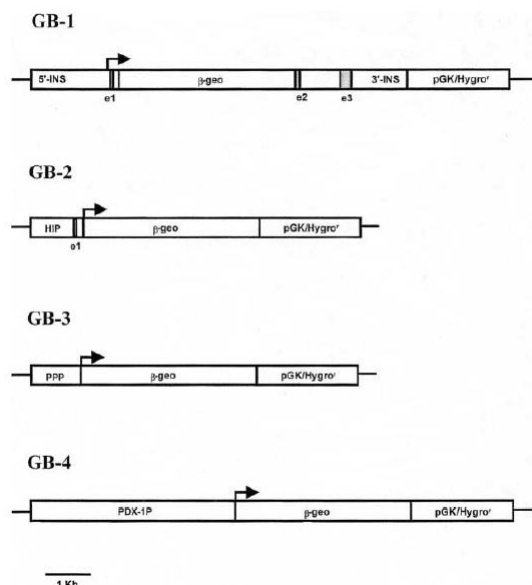
Na základě konečného vyhodnocení získaných buněk a průběhu diferenciací lze říci, že obě vědecké skupiny úspěšně vytvořily z lidských ES buněk buněčnou populaci podobnou pankreatické, ale bohužel takto vytvořené buňky nedostatečně odpovídaly na stimulaci glukózou, a proto je při vylepšování protokolů je nutné se zaměřit na tento nedostatek spolu se zvýšením výtěžku diferencovaných buněk.

Častým problémem u všech diferenciačních procesů *in vitro* je přítomnost ostatních buněčných typů v získaném vzorku výsledných buněk, a to včetně buněk nediferencovaných (Soria *et al.*, 2008). Ty mohou být vysokým rizikem pro vznik teratomu. Jedním z možných řešení této komplikace je použít vhodné selekční metody, zajišťující zisk čisté požadované buněčné kultury.

3.2.2 Selekce buněčných linií

Soria se skupinou vyvinuli systém genetické selekce buněčných linií pro pankreatické β buňky založený na expresi inzulinu (Soria 2001). Ve zkratce se jedná o transfekci buněk s genem, který spojuje regulační oblast genu pro inzulin s β geo, což je chimerický gen kódující β -galaktosidázovou aktivitu a rezistenci na neomycin. Pomocí tohoto „inteligentního“ transgenu (obrázek č. 9, GB-1), který spojuje gen pro inzulin s genem pro rezistenci k neomycinu, je možný výběr inzulin produkujících buněk na základě jejich antibiotické rezistence (Berná *et al.*, 2001) a kromě toho exprese β -galaktosidázy umožňuje histochemicky identifikovat transplantované buňky (Soria, 2001). Tento systém buněčné selekce umožňuje více variant, jako je využití regulační promotorové oblasti (obrázek č. 9, GB-2), pankreatického polypeptidového promotoru (obrázek č. 9, GB-3) nebo promotorové oblasti genu kódujícího transkripční faktor Pdx1 (obrázek č. 9, GB-4) (Berná *et al.*, 2001). Pdx1 a PP pozitivní buňky byly stanoveny jako prekurzory β buněk (Herrera, 2000). Navíc tyto

prekurzory mohou být spojeny s GFP genem a díky fluorescenci produkovaného proteinu lze identifikovat a oddělit požadované buněčné linie.



Obrázek č. 9: Struktura transgenů používaných v selekčních strategiích buněčných linií. GB-1: lidský inzulinový gen- β -geo/pGK-hygro; GB-2: lidský inzulinový promotor- β -geo/pGK-hygro; GB-3: pp promotor- β - geo/pGK-hygro; GB-4: Pdx1 promotor- β -geo/pGK-hygro. (Berná *et al.*, 2001; upraveno)

3.2.3 Problémy spojené s ES buňkami

Před tím, než bude moci být provedena transplantace buněk diferencovaných z ES buněk do lidského organismu, je nutné překonat několik teoretických a experimentálních problémů (Soria *et al.*, 2001).

Za prvé musí být dosaženo rovnováhy mezi proliferační kapacitou a diferenciačním potenciálem. Platí, že pokud jsou buňky donuceny k proliferaci, ztrácejí svůj diferencovaný fenotyp a naopak při omezení výživy vede k zastavení množení buněk a iniciuje buněčnou diferenciaci (Soria, 2001). Tudíž je velice obtížné v praxi stanovit rovnováhu mezi těmito dvěma odlišnými procesy, navíc když toto pravidlo neplatí v přirozených podmínkách *in vivo* (během vývoje slinivky se velikost tkáně zvyšuje tisícinásobně a schopnost proliferace existuje společně s proliferací u nových buněčných typů). Proto bude velice užitečné charakterizovat faktory, které nejen podporují zvlášť proliferaci a zvlášť diferenciaci, ale také za jakých podmínek může daný faktor ovlivňovat oba účinky (například faktor FGF-2). Dále

některé látky jako růstový hormon či prolaktin podporují oba děje, navíc mohou být za tímto účelem použity některé specifické kombinace dvou různých faktorů (gastrin a extracelulární matrix) nebo sekvenční expozice vnějším faktorům v konkrétním pořadí (růstový faktor IGF-1 a poté nikotinamid nebo aktivin A). Je tedy obtížné nastavit vyhovující podmínky, jelikož jsou ovlivněny nejen typem faktorů, ale i jejich koncentrací, dobou působení, jejich kombinací a řadou dalších okolností.

Dále je důležité předcházet imunitní rejekci (Soria *et al.*, 2001). Každá buňka použitá k transplantaci by měla být imunologicky ošetřena. Imunitní destrukce transplantovaného štěpu byla příčinou zvrácení normálních glykemií u pokusných myší s transplantovanými buňkami odvozených od ES buněk, které nahrazovaly chybějící β buňky.

V neposlední řadě nesmíme zapomínat na způsob získání embryonálních kmenových buněk, k čemuž se váže složitá bioetická otázka. Avšak kromě ES buněk se vědcům nabízí možnost získat kmenové buňky také z jiných zdrojů.

3.3 Dospělé kmenové buňky

Multipotentní dospělé kmenové buňky (mohou z nich vznikat různé buněčné typy dané buněčné řady) se nacházejí v tkáních, kde udržují a obnovují tkáň i orgány. Zdá se, že tyto buňky mohou mít větší plasticitu, než se původně předpokládalo (Soria *et al.*, 2008). Transdiferenciace dospělých buněk v inzulin produkující buňky tedy nabízí další možnost pro získání náhradních β -buněk.

Přímo pankreatické kmenové buňky se jeví jako nejvhodnějším kandidátem (Wu *et al.*, 2011). Ačkoliv proliferační kapacita dospělých β buněk je velmi nízká, tak během vývoje, těhotenství či obezity byl prokázán nárůst jejich buněčné hmoty. Původ těchto nových buněk není doposud zcela objasněn, ale studie provedené na myších naznačují, že mohou vznikat vlastní obnovou již existujících β buněk, α buněk a z proliferujících progenitorových buněk lokalizovaných na exokrinní části pankreatu, ostrůvkách a kanálcích, se kterými bylo doposud provedeno největší množství pokusů. Peck se svým týmem (2004) pomocí čtyř krokového postupu z SC buněk kanálků připravil endokrinní buňky a ostrůvkům podobné klastry, které exprimovaly různé endokrinní hormony a faktory typické právě pro ostrůvky.

Kmenové buňky kostní dřeně (hematopoetické i mezenchymální) se nabízí jako další možný zdroj tkáňových kmenových buněk využitelných pro tvorbu náhradních β buněk (We

et al., 2011). Nedávné *in vivo* studie využívající geneticky označenou kostní dřev prokázaly, po jejím začlenění mezi ostrůvky slinivky a začala exprimovat markery typické právě pro β buňky (Ianus *et al.*, 2003). Rovněž studie zaměřené na *in vitro* pokusy přinesly výsledky, které popisují schopnost kultivovaných stromálních buněk kostní dřevě diferencovat se s nízkou frekvencí do buněk exprimujících inzulin (Jahr a Bretzel, 2003). Také nedávné době Soria s týmem (2008) publikovali svou práci zabývající se buňkami podobnými β -buňkám získaných z bílých krvinek pomocí reprogramování krevních makrofágů v přítomnosti faktoru stimulujícího kolonie makrofágů a interleukinu 3. Následně probíhala inkubace s epidermálními a jaterními růstovými faktory a nikotinamidem. Tyto buňky prokázaly *in vitro* glukózo-dependentní inzulinovou sekreci a normalizovaly glykémii u diabetických myší (Ruhnke *et al.*, 2005).

Vědci se snaží pracovat i s dalšími typy tkání, jako je tkáň tuková. Současná studie prokázala, že mezenchymální kmenové buňky získané z lidské tukové tkáně jsou schopny přijmout pankreatický endokrinní fenotyp (Timper *et al.*, 2006). Buňky neprodělaly žádnou genetickou modifikaci, pouze byly vystaveny definovaným kultivačním podmínkám.

Dalším zajímavým možným materiálem jsou také játra mající stejný embryonální původ jako slinivka (Jones *et al.*, 2004). Navíc dokážou stejně jako β buňky monitorovat změny hladin cirkulující glukózy pomocí vysokokapacitního glukózového transportéru a specifické glukokinázy. Experimentální zvýšená exprese Pdx1 faktoru, který je nezbytný pro vývoj slinivky a následné udržování zralých β buněk, poskytla důkaz možné transdiferenciace jaterních buněk do fenotypu β buněk. Nicméně i když populace jaterních buněk mají tento potenciál, nebylo doposud prokázáno, že mohou být *in vitro* reprodukovatelně rozšířené do požadovaného množství nutného k transplantaci při léčbě diabetu.

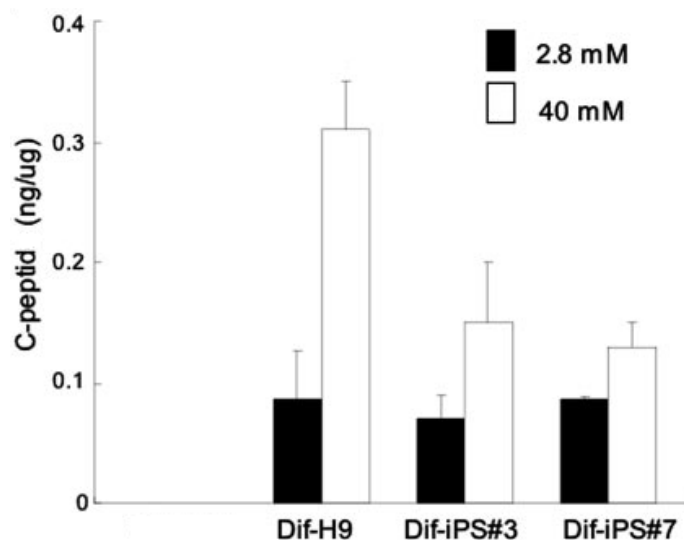
A proto nejen u jaterních, ale u všech dospělých kmenových buněk různých tkání bude jejich případné potenciální využití záležet na schopnosti rozrůst se při *in vitro* experimentech do požadovaného množství použitelného pro transplantaci (Jones *et al.*, 2004).

3.4 Indukované pluripotentní kmenové (iPS) buňky

Indukované pluripotentní kmenové buňky generované z fibroblastů nebo jiných buněčných typů poskytují alternativní výchozí materiál pro diferenciaci funkčních β buněk s obrovskou výhodou autologní buněčné populace (Wu *et al.*, 2011). Aplikace diferenciací protokolů podobných těm, které byly použity u lidských ES buněk, vedla ke vzniku inzulin exprimujících buněk z iPS buněk získaných z běžných fibroblastů, ale také z fibroblastů pacientů již s onemocněním DM1.

Keisuke Tateishi se se svým vědeckým týmem pokusil vytvořit lidské iPS buňky pomocí retrovirové exprese lidských faktorů Oct4, Sox2, Klf4, a c-Myc u lidských předkožkových fibroblastů HFF-1 (Tateishi *et al.*, 2008). Za tímto účelem exprimovali u HFF-1 buněk výše zmíněné čtyři transkripční faktory pomocí specifické retrovirové transdukce. První kolonie buněk byly viditelné devět dní od provedení druhé transdukce a přibližně 80-100 kolonií bylo pozorováno v šestnáctý den po té, kdy bylo vyseto 5×10^4 buněk na deseticentimetrové misky. Celkem 26 kolonií vybraných v šestnáctý, dvacátý třetí a třicátý den po transdukci, bylo pěstováno v médiu pro lidské ES buňky na vrstvě primárních myších embryonálních fibroblastů a byly ručně pasážovány každých 5-6 dnů. Z těchto 26 kolonií skupina úspěšně získala devět kolonií iPS buněk. Čtyři náhodně vybrané kolonie podstoupily spolu s linií H9 lidských ES buněk další, tentokrát čtyř fázový, diferenciací postup. Během něj přežily pouze ES buňky a dvě kolonie iPS buněk (kolonie 3 a 7), které prodělaly morfologické změny vedoucí k vzniku agregátů a po jejich spojení následně klastry (shluky?) buněk podobné pupenům. Pro ověření, zda tyto změny odrážejí úspěšnou diferenciaci buněk v pankreatické buněčné linii, byla provedena analýza genové exprese v jednotlivých stádiích pomocí kvantitativní polymerázové reakce v reálném čase (RT-PCR). Ta prokázala přítomnost například Pdx1, Nkx6.1, C peptidu, inzulinu či glukagonu.

Dále byly získané klastry podrobeny funkční analýze – měření inzulinové sekrece po předchozí stimulaci glukózou (o koncentracích 2.8 mM a 40 mM) pomocí metody C-peptid ELISA (z angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), neboli se jednalo o enzymatickou imunoanalýzu pro kvantitativní měření hladiny C-peptidu. Výsledky měření lze vidět na obrázku č. 10.



Obrázek č. 10: Naměřené hodnoty C peptidu u diferenciovaných ES buněk (linie H9) a diferenciovaných iPS buněk (linie 3 a 7). (Tateshi *et al.*, 2008; upraveno)

I když lidské ES buňky a iPS buňky mají srovnatelnou účinnost diferenciaci v inzulin produkující klastry, celkově je u obou typů extrémně nízká. Kromě toho hladiny vylučovaného C peptidu byly mnohem menší, než je tomu u přirozených β buněk. Nízká účinnost těchto dvou aspektů je však pravděpodobně způsobená spíše omezením současného diferenciačního protokolu než vnitřními vlastnostmi samotných buněk. Proto jestli má být tato metoda využívána prakticky, je nutno zlepšit postupy, které zvýší počet získaných diferenciovaných buněk a jejich reakci na glukózu.

Jiná vědecká skupina s René Maehrem včele se pokusila využít specifické iPS buňky (DiPS) odvozené přímo od pacientů s DM1 a snažili se zjistit, zda je mohou diferencovat do požadovaného buněčného typu – pankreatických β buněk (Maehr *et al.*, 2009). Kožní vzorky byly získané od dvou mužů s DM1. Pacient 1 měl onemocnění 11 let diagnostikované ve 21 letech, pacient 2 s onemocněním již 27 let od svých 3 roků. Získané fibroblasty byly kultivovány a infikovány kombinací retrovirů kódujícími transkripční faktory Oct4, Sox2, podobně jako u Tateishiho skupiny. Čtyři týdny po infekci buněk byly vybrány kolonie na základě jejich morfoloické podobnosti k lidským ES buňkám a dále se rozrůstaly. Pomocí testů se potvrdila přítomnost znaků pluripotence u vzniklých buněk – reprogramované buňky byly pozitivní na aktivitu alkalické fosfatázy a také reagovaly na protilátky proti všem testovaným markerům pluripotence (protilátky například k Oct4, Nanog, Sox2). Na získané DiPS buňky výzkumníci použili protokol o přímé diferenciaci (obdobný jako u klasických ES

buněk), aby zjistili, zda tyto buňky mohou diferencovat na inzulín produkující / glukózu reagující buňky. Protokol byl založen na principu postupné diferenciace skrz již známé stádia definitivního endodermu, střevní trubice, pankreatických progenitorů až k závěrečným buňkám podobným beta. Tyto získané buňky sice do jisté míry reagují na glukózu, ale dokud nedojde k vylepšení použitého diferenciačního protokolu, nelze je plně srovnávat s originálními β buňkami.

Stále však zůstávají překážky pro klinické využití iPS buněk. Buňky z nich odvozené mají nízké diferenciační kapacity a špatnou reakci na glukózu. Navíc u samotných iPS buněk existují důkazy o epigenetických modifikacích závislých na prostředí. Nedávné studie využívající celogenomového profilování epigenetických modifikací prokázaly, že zkoumané iPS buňky obsahovaly oblasti v genomu, které byly aberantně modifikované, což způsobovalo změny v genové expresi (Lister *et al.*, 2011).

4 ZÁVĚR

Pankreas je orgán s důležitou exokrinní a endokrinní sekrecí. Během jeho vývoje se odehrává sekvence složitých procesů, kterou kontroluje velké množství transkripčních faktorů. Endokrinní část slinivky tvoří čtyři různé buněčné typy, z nichž β buňky díky své produkci inzulínu kontrolují hladinu glukózy v krvi. Pokud dojde k jejich destrukci T-lymfocyty v důsledku imunitního selhání, ztrácí organismus schopnost regulovat koncentraci glukózy v krvi a propukne onemocnění diabetes mellitus prvního typu.

Prvním, klinicky úspěšným zákrokem, jenž vedl k normalizaci hodnot glykémie a vyléčení cukrovky, byla transplantace celého pankreatu. I přes pokroky v postupu operace a následné pooperační léčbě je však v současné době tato metoda doprovázena řadou komplikací, například nutností podávat imunosupresivní léčiva. Méně nebezpečná a invazivní varianta, kdy se transplantují pouze Langerhansovy ostrůvky, přinesla u pacientů nezávislost na podávání exogenního inzulínu, avšak s postupem let dochází u velkého počtu jedinců k odumírání transplantované tkáně. Vedle nezbytných imunosupresiv je však nejvíce limitujícím kritériem nedostatek specifických dárců ostrůvků. Proto vědci začali hledat nové zdroje buněk, které by mohly být použity k nahrazení zničených β buněk.

Jako nejvhodnější možnost se jeví díky svým vlastnostem kmenové buňky. Postupně vznikaly různé protokoly přímé diferenciaci, které byly aplikovány na embryonální kmenové buňky. Působením faktorů v *in vitro* podmínkách ES buňky prošly několika vývojovými stádii, podobných těm v přirozeném prostředí. Přestože vědecké skupiny získaly buňky připomínající β buňky, jejich hormonální sekrece dostatečně neodpovídala na okolní koncentrace glukózy. Při použití dospělých kmenových buněk získaných přímo ze slinivky, z kostní dřeně, tukové tkáně či jater se rovněž podařilo získat buňky fenotypově podobné endokrinním buňkám slinivky, nicméně celkové výtěžky diferencovaných buněk byly nízké, a proto nejsou prozatím klinicky použitelné. Poslední uvedené indukované pluripotentní kmenové buňky generované z fibroblastů předkožky byly také diferencovány do buněk produkujících inzulín a dokonce v malé míře reagovaly na glukózu, ale opět v míře příliš nízké na to, aby mohly být použity jako náhrada chybějících β buněk u pacientů s DM1.

Přestože všechny tyto metody stále provází problémy omezující jejich praktické využití k definitivnímu vyléčení cukrovky, věda pokročila správným směrem a hledá vhodné alternativy nových β buněk. Pokud by se podařila transplantace β buněk diferencovaných z kmenových buněk vybavených membránou zabraňující autoimunitním reakcím organismu, mohl by se vyřešit celosvětový problém diabetu.

5 LITERATURA

- Assady S., Maor G., Amit M., Itskovitz-Eldor J., Skorecki K. L., Tzukerman M.** (2001) Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50: 1691–7.
- Ahlgren U., Pfaff S.L., Jessell T.M., Edlund T., Edlund H.** (1997) Independent requirement for ISL1 in formation of pancreaticmesenchyme and islet cells. *Nature* 385: 257–260.
- Berná G., León-Quinto T., Enseñat-Waser R., Montanya E., Martín F., Soria B.** (2001) Stem cells and diabetes. *Biomed Pharmacother* 55: 206-12.
- Best M., Carroll M. ., Hanley N. A., Piper Hanley K.** (2008) Embryonic stem cells to beta-cells by understanding panceras development. *Mol. Cell. Endocrinol.* 288: 86–94.
- Blyszczuk, P., Czyz J., Kania G., Wagner M., Roll U., St-Onge L., Wobus A. M.** (2003) Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 998–1003.
- Calne R.** (2005) Cell transplantation for diabetes. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 360: 1769–1774.
- D’Amour K., Bang A.G., Eliazar S., Kelly O.G., Agulnick A.D., Smart N.G, Moorman M.A., Kroon E., Carpenter M.K., Baetge E. E.** (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat. Biotech.* 11: 1392–1401.
- Deutsch G., Jung J., Zheng M., Lórá J., Zaret K. S.** (2001) A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. *Development* 128: 871-881.
- Halban P. A., Kahn S. E., Lernmark A., Rhodes Christopher J** (2001) Gene and Cell-Replacement Therapy in the Treatment of Type 1 Diabetes. How High Must the Standards Be Set? *Diabetes* 50: 2181–91.
- Hebrok M., Kim S. K., Melton D. A.** (1998) Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pankreas development. *Genes Dev.* 12: 1705-1713.
- Herrera P. L.** (2000) Adult insulin- and glucagons-producing cells differentiate from two independent cell lineages. *Development* 127: 2317-22.

- Ianus A., Holz G. G., Theise N. D., Hussain M. A.** (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* 111: 843–850.
- Jahr, H. a Bretzel, B.** (2003) Insulin-positive cells in vitro generated from rat bone marrow stromal cells. *Transplant. Proc.* 35: 2140–2141.
- Jensen J., R., Heller S., Funder-Nielsen T., Pedersen Erna E., Lindsell C., We i n m a s t e r G., Madsen Ole D. and Serup P.** (2000) Independent development of pancreatic α - and β -cells from neurogenin3-expressing precursors: A Role for the Notch pathway in repression of premature differentiation. *Diabetes* 49: 163-176.
- Jones P. M., Burns Ch. J., Persaud S. J.** (2004) Beta-cell replacement technologies: the potential of stem cells. *Drug Discov. Today* 1: 213-217.
- Jørgensen M. C., Ahnfelt-Rønne J., Hald J., Madsen O. D., Serup P., Hecksher-Sørensen J.** (2007) An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr. Rev.* 28: 685–705.
- Kabelitz D., Geissler Edward K., Soria B., Schroeder Insa S., Fändrich F., Chatenoud L.** (2008) Toward cell-based therapy of type I diabetes. *Trend. Immunol.* 29: 68-74.
- Lister R., Pelizzola M., Kida Y. S., Hawkins R. D., Nery J. R., Hon G., Antosiewicz-Bourget J., O'Malley R., Castanon R., Klugman S., Downes M., Yu R., Stewart R., Ren B., Thomson J. A., Evans R. M., Ecker J. R.** (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471: 68–73.
- Lumelsky N., Blondel O., Laen P., Velasco I., Ravin R., McKay R.** (2001) Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 292: 1389–94.
- Maehr R., Chen S., Snitow M., Ludwig T., Yagasakia L., Gollandc R., Leibelc R. L., Melton D. A.** (2009) Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 106: 15768–73.
- Meloche Mark R.** (2007) Transplantation for the treatment of type 1 diabetes. *World J. Gastroenterol.* 13: 6347-6355.

Murtaugh L. Charles (2007) Pancreas and beta-cell development: from the actual to the possible. *Development* 134: 427-438.

Naya F. J., Huang H. P, Qiu Y., Mutoh H., DeMayo F. J., Leiter A. B., Tsai M. J. (1997) Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/NeuroD-deficient mice. *Genes. Dev.* 11: 2323-34.

Parnaud G., Bosco D., BerneyT., Pattou F., Kerr-Conte J., Donath M. Y., Bruun C., Mandrup-Poulsen T., Billestrup N., Halban P. A. (2008) Proliferation of sorted human and rat beta cell. *Diabetologia* 51: 91–100.

Peck A. B. , Ramiya V. (2004) In vitro-generation of surrogate islets from adult stem cells. *Transpl. Immunol.* 12: 259-72.

Piper K., Ball S.G., Keeling J.W., Mansoor S., Wilson D.I., Hanley N.A. (2002a) Novel SOX9 expression during human pancreas development correlates to abnormalities in Campomelic dysplasia. *Mech.Develop.* 116: 223–226.

Piper K., Brickwood S., Turnpenny L. W., I T Cameron I. T., Ball S. G., Wilson D. I., Hanley N. A. (2004) Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J. Endocrinol.* 181: 11–23.

Rajagopal J., Anderson W. J., Kume S., Martinez O. I., Melton D. A. (2003) Insulin Staining of ES Cell Progeny from Insulin Uptake. *Science* 299: 363.

Robertson R.P. , Davis C., Larsen J., Stratta R., Sutherland D. E. (2006) Pancreas and islet transplantation in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 29: 935.

Ruhnke M., Ungefroren H., Nussler A., Martin F., Brulport M., Schormann W., Hengstler J. G., Klapper W., Ulrichs K., Hutchinson J. A., Soria B., Parwaresch R. M., Heeckt P., Kremer B., Fändrich F. (2005) Differentiation of in vitro–modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte–like and pancreatic islet-like cells.

Shamblott M. J., Axelman J., Littlefield J. W., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Cui Y., Cheng L., Gearhart J. D. (2001) Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 98: 113-8.

- Shanti T. Gangaram-Panday, Marijke M. Faas, Paul de Vos** (2007) Towards stem-cell therapy in the endocrine pancreas. *Trends Mol. Med.* 13: 164-173.
- Shaw J. A. M., Delday M. I., Hart A. W., Docherty H. M., Maltin C. A., Docherty K.** (2002) Secretion of bioactive human insulin following plasmid-mediated gene transfer to non-neuroendocrine cell lines, primary cultures and rat skeletal muscle *in vivo*. *Journal of Endocrinology* 172: 653–672.
- Slack J. M. W.** (1995) Developmental biology of the pancreas. *Development* 121: 1569-1580.
- Soria B., Roche E., Berná G., León-Quinto T., Reig J. A., Martín F.** (2000a) Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 49: 157–62.
- Soria B., Skoudy A., Martín F.** (2001) From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia* 44: 4407-415.
- Soria B.** (2001) In-vitro differentiation of pancreatic β -cells. *Differentiation* 68: 205–219.
- Soria B., Bedoya F. J., Tejedo J. R., Hmadcha A., Ruiz-Salmerón R., Lim S., Martín F.** (2008) Cell Therapy for Diabetes Mellitus: An Opportunity for Stem Cells? *Cells Tissues Organs* 188: 70–77.
- Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Torres M., Oliver G., Gruss P.** (1997) The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature* 386: 399-402.
- St-Onge L., Sosa-Pineda B., Chowdhury K., Mansouri A., Gruss P.** (1997) Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. *Nature* 387: 406-9.
- Tateishi K., He J., Taranova O., Liang G., D'Alessio A. C., Zhang Y.** (2008) Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 283: 31601–7.
- Teramura Y., Iwata H.** (2010) Bioartificial pancreas: Microencapsulation and conformal coating of islet of Langerhans. *Adv. Drug Deliver. Rev.* 62: 827–840.

Timper K., Seboek D., Eberhardt M., Linscheid P., Christ-Crain M., Keller U., Muller B. Zulewski H. (2006) Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 341: 1135–1140.

Wu Y., Persaud Shanta J., Jones Peter M (2011) Stem cells and the endocrine pancreas. *Br. Med. Bull.* 2011: 1–13.