



Ústav Experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.
Základní výzkum a Inovační biomedicínské centrum



*Kmenové buňky a biomateriály
v regenerativní medicíně*

Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.



Kmenové buňky a regenerativní medicína

REPLACEMENT
náhrada buněk
(ESC, iPS)

RESCUE podpůrný a
antiapoptotický
účinek (MSC)

Kmenové buňky

farmaka

orgánová výměna

Regenerativní medicína

umělé biomateriály
tkáňové náhrady

nanotechnologie

zvýšení
regenerace
(růstové faktory)

Cíle regenerativní medicíny

- *Zlepšit regeneraci a funkci*
- *Využít kmenové buňky (dospělé, fetální nebo embryonální) k léčbě pacientů s onemocněními, která dnes neumíme léčit*
- *Charakterizovat kmenové buňky a jejich bezpečnost*
- *Rozmnožit kmenové buňky do dostatečného množství*
- *Facilitovat migraci a diferenciaci kmenových buněk*
- *Sledovat osud a migraci kmenových buněk in vivo*
- *Přemostit tkáňové defekty kmenovými buňkami, umělými biomateriály a užitím nanotechnologií*



EMBRYO X FETUS X DOSPĚLÝ JEDINEC

Embryonální kmenové buňky (*největší potenciál, zdroj embrya z in vitro fertilizace nebo přenos jader, nádory, etický problém*)

Fetální neurální kmenové buňky (*používají se, zdroj potraty, netvoří nádory etický problém, nedostatečné množství*)

Indukované pluripotentní buňky (*není etický problém, nežádoucí přenos genetické informace, špatně se rozmnožují*)

Z dospělých jedinců:

Kmenové buňky kostní dřeně, tukové a čichové buňky (*používají se, zdroj pacient sám, dobře se rozmnožují*)

Kmenové buňky pupečnickové krve (*event. KB plodové vody - omezené možnosti použití, malé množství, omezená tolerance*)

Zvířecí buňky – xenotransplantáty (*používají se jako přechodné náhrady nebo v bioreaktorech*)



Kmenové buňky a regenerativní medicína



- Popáleniny, kožní defekty
- Hematopoetická onemocnění, nádory krevní řady
- Ortopedie – regenerace a náhrady chrupavek, kostí atp.
- Ischemické končetiny, diabetická noha
- Kardiovaskulární onemocnění, infarkt myokardu
- Diabetes
- Zánětlivá a autoimunitní onemocnění
- Plicní onemocnění, idiopatická fibróza, asthma
- Onemocnění ledvin
- Selhání jater
- Revmatoidní artritida a.j.

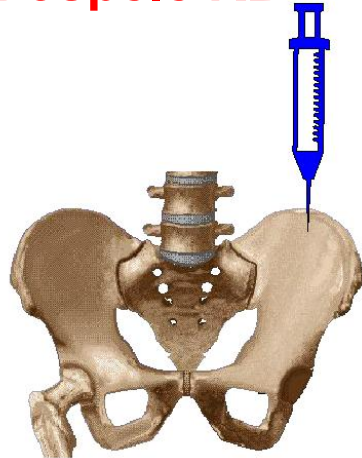


Užití kmenových buněk pro léčbu v CNS

- Poranění mozku a míchy – klinické studie
- Ischemické léze, iktus – klinické studie
- Parkinsonova ch. – klinické studie
- Alzheimerova ch.
- Roztroušená skleroza – klinické studie
- ALS – klinické studie
- Huntingtonova chorea
- Psychiatrická onemocnění a j.

Kmenové buňky a jejich užití pro léčbu

RESCUE
Dospělé KB



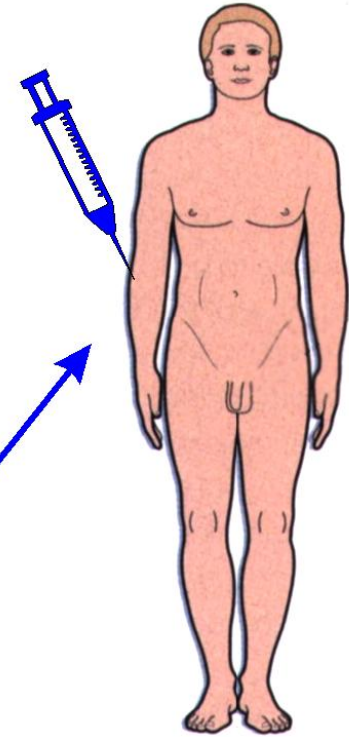
Kostní dřeň



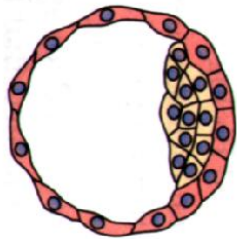
Mononukleární buňky



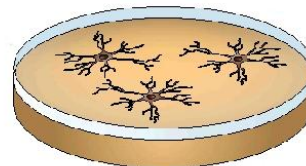
Mesenchymální buňky
Expanze



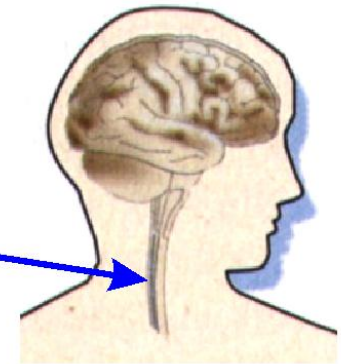
REPLACE
Embryonální, fetální KB,
přenos jader - iPS



blastocysta

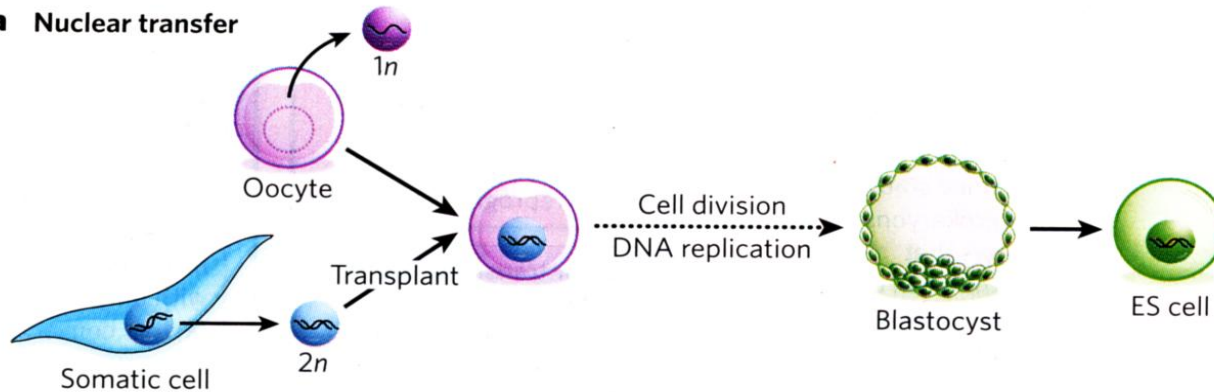


Neurální kmenové buňky
Expanze, selekce, diferenciacce

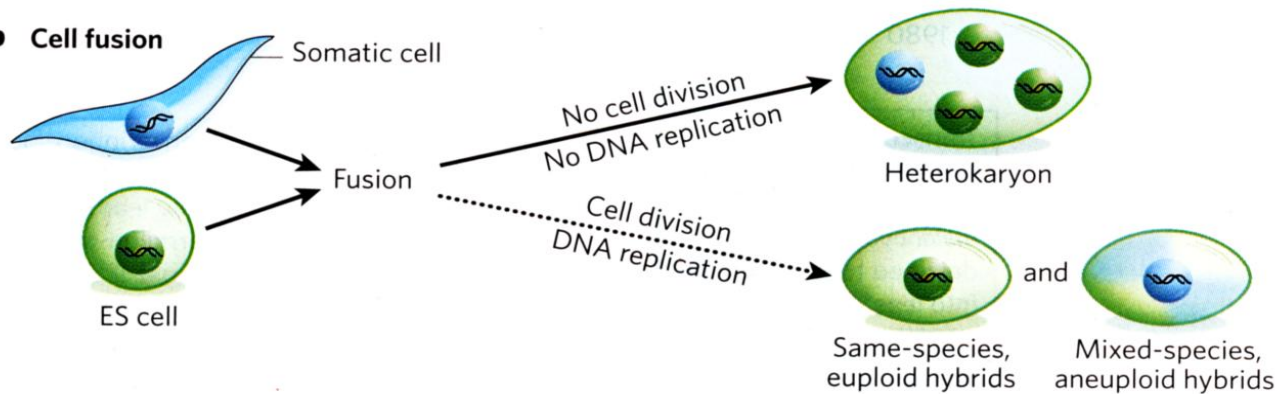


Metody jak získat ESCs a iPSCs

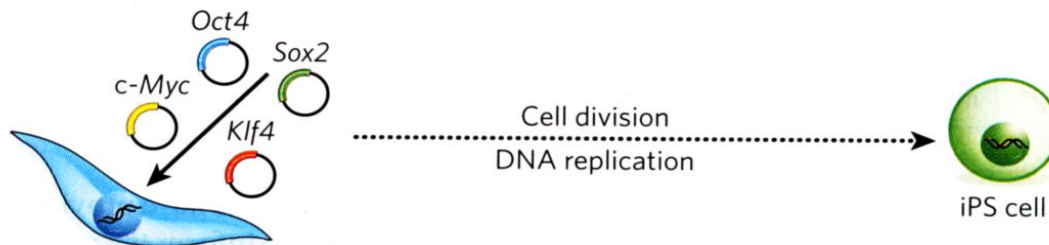
a Nuclear transfer



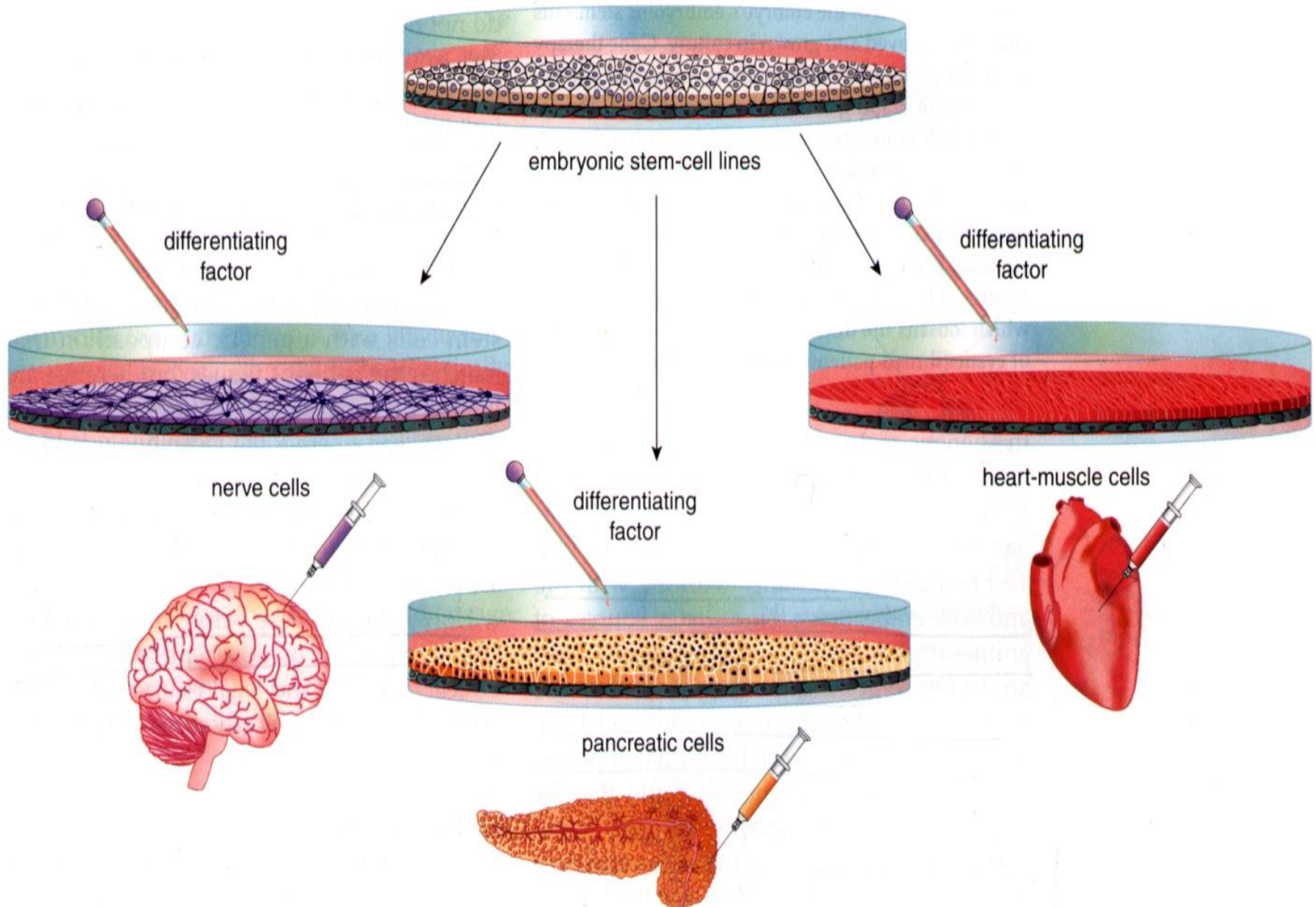
b Cell fusion



c Transcription-factor transduction



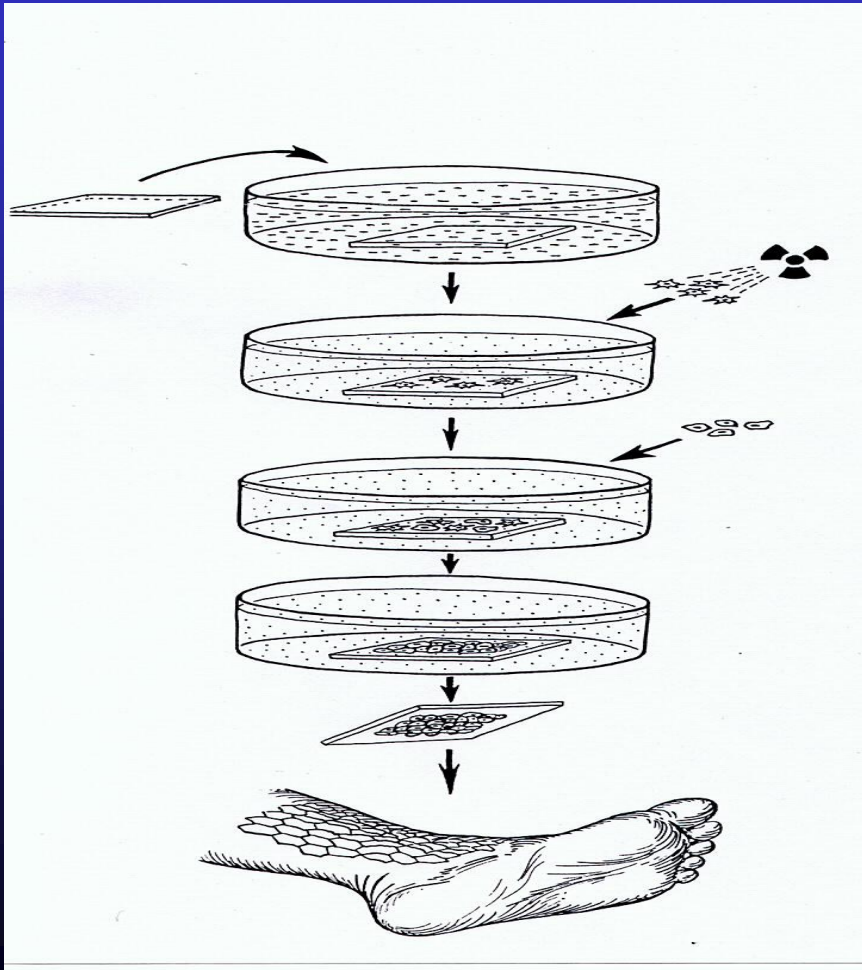
Příprava diferencovaných buněk pro tkáňové inženýrství



Kožní defekty: Kmenové buňky - kerationocyty na umělých transplantačních podložkách

Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad (Smetana et al.)

Diabetická noha



Popáleniny



Separace buněk získaných pomocí kožní biopsie pomocí technologie

ReCell®

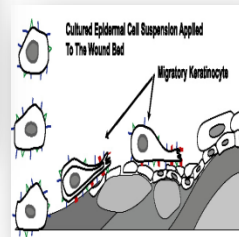


ReCell suspense je nastříkána na poraněný povrch



Výsledek: nová kůže s plným obsazením základních buněčných typů, včetně melanocytů, keratinocytů, fibroblastů a bazálních buněk ve správných poměrech

Lože rány je osázeno aktivovanými buňkami které adherují na spodinu rány



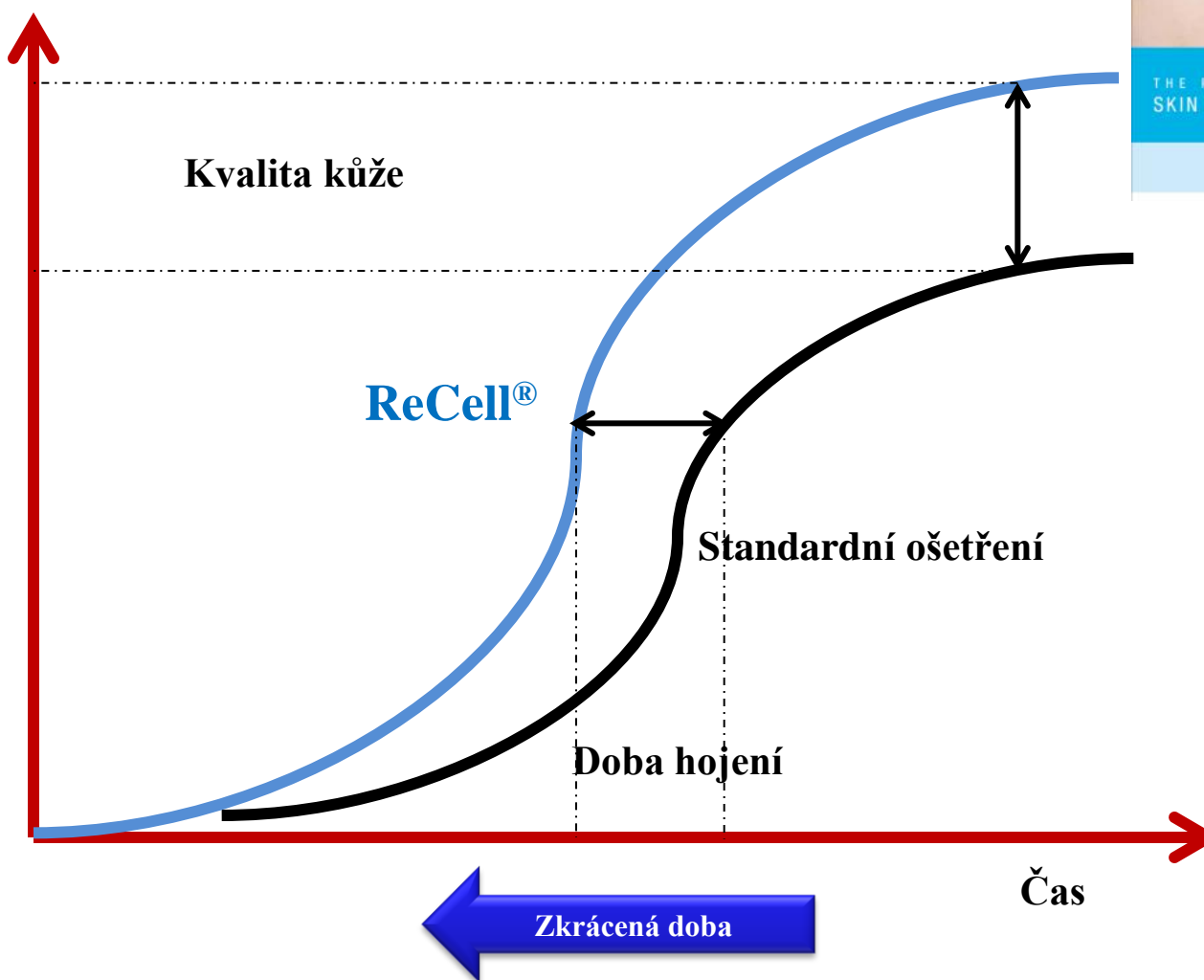
Buněčné signály podporují a řídí proliferaci, vaskularizaci a inervaci

Aktivované progenitorové buňky procházejí obdobím vysoké mitotické aktivity s rychlou proliferací a diferenciací

ReCell® - přednosti použití



Výsledek



Kvalita kůže

ReCell®

Standardní ošetření

Doba hojení

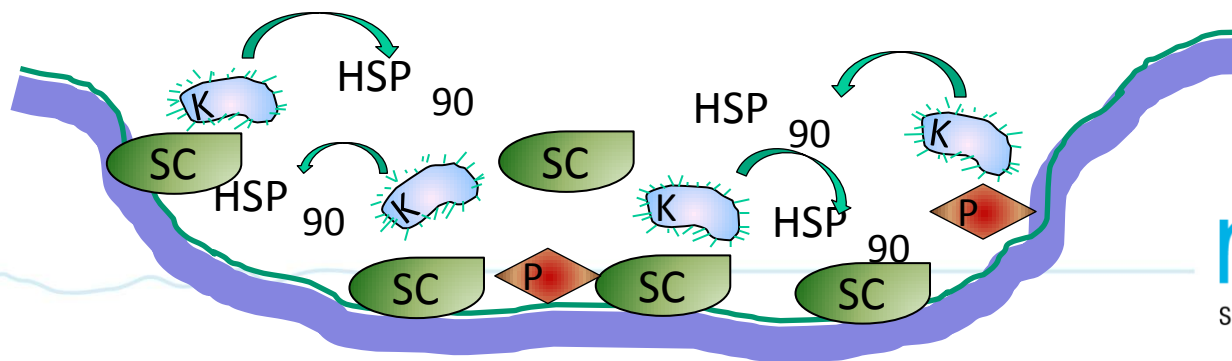
Čas

Zkrácená doba

Dvanácti měsíční batole po opaření – popáleniny smíšeného stupně na hřbetní straně pravé ruky a prstů. Po čtyřech dnech byly patrný jen malé známky hojení, byl aplikován ReCell®. Tři až dvanáct měsíců po zákroku bylo poranění zcela zhojeno a bez infekce.



Po **ReCell®** je regenerace regulována a kontrolována přítomností “pozitivně stresovaných” bazálních keratinocytů (**K**), což vede ke zvýšenému uvolňování klíčových proteinů (**HSP₉₀**), destiček (**P**), uvolňujících PDGF, stimulujících kmenové buňky (**SC**) a uvolňování cytokinů (imunomodulátorů) a chemokinů (migrátorů).



Popáleniny elektrickým proudem

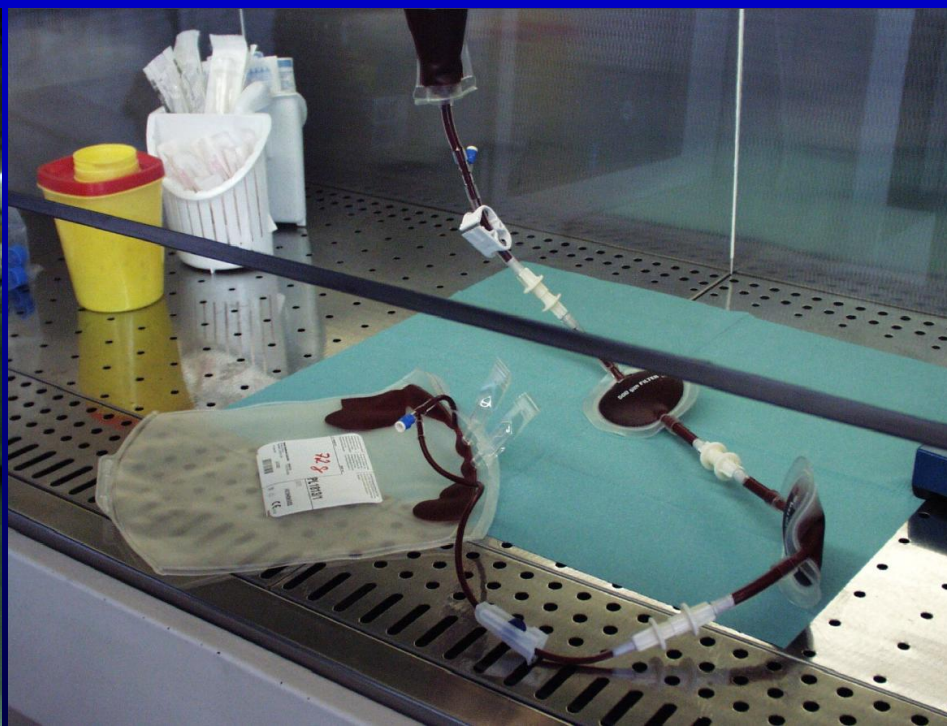
30 letý muž utrpěl popáleniny elektrickým proudem různého stupně na pravé ruce. Vzhledem k povaze popáleniny a vysokému riziku vzniku jizev, bylo rozhodnuto provést léčbu pomocí ReCell®. Primární obvaz byl odstraněn po 1 týdnu, rána nejevila známky infekce a byla plně epitelizována. Po 2 týdnech byla rána plně zhojena a vykazovala normální strukturu a pigmentaci.



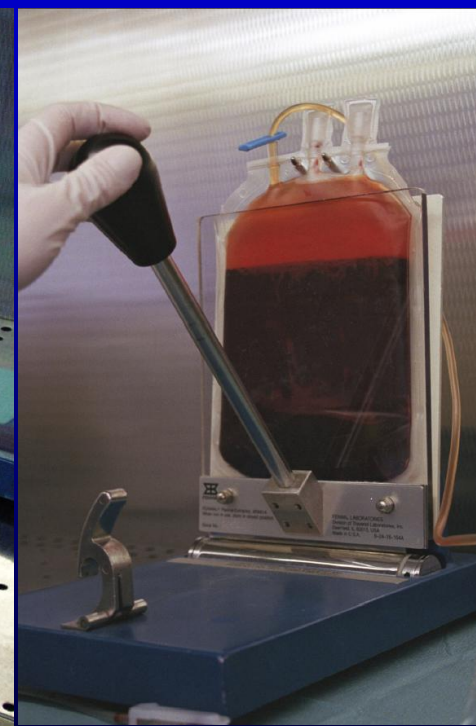
I. Příprava implantátu autologních mononukleárních buněk kostní dřeně



BM harvest



Sedimentation, Filtration



Adjusted volume

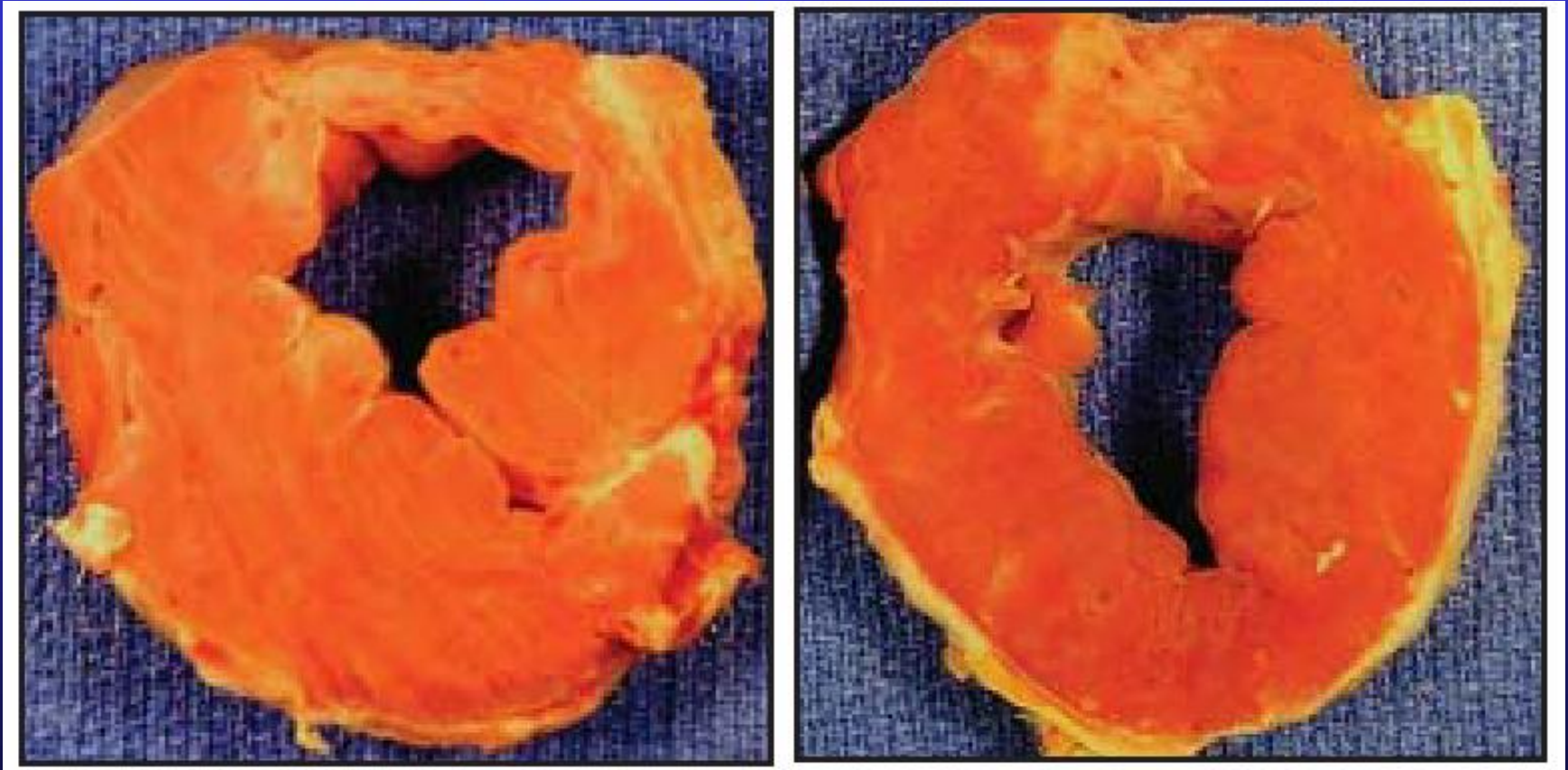
II. Expanse a příprava MSCs v GMP prostorách



**Máme povolení výroby MSCs z
kostní dřeně pro klinické studie od r.
2011**

Nemocné a zdravé srdce morčete

léčené mesenchymálními KB



Časopis: Science, April 2004

Předpokládané výsledky působení BMSCs jsou založeny na těchto zjištěných výsledcích:

- MSCs se zachytí v poškozené zóně
- MSCs zvýší neovascularizaci a angiogenezi
- MSCs produkují cytokiny a růstové faktory
- MSCs se diferencují např. do chrupavek a kostí, ale jen zřídka v neurony
- MSCs pomáhají vytvořit přemostění léze
- MSCs nevyvolávají imunitní reakce, nevytvářejí nádory
- MSCs u zvířat i v některých klinických studiích signifikantně zlepšily regeneraci a funkci

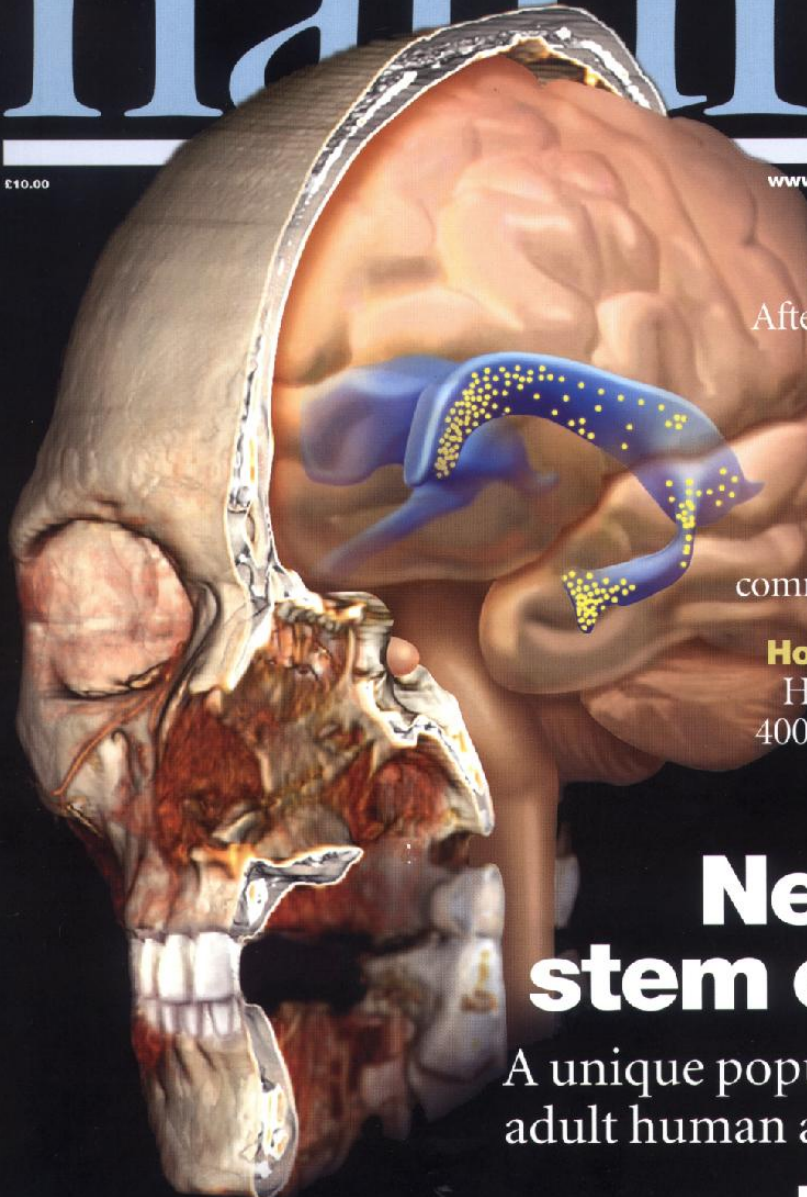
19 February 2004

International weekly journal of science

nature

£10.00

www.nature.com/nature



The Assisi earthquake

Aftershocks were fluid driven

My name is LUCA

Unveiling the last universal common ancestor

Homokaryosis

How to survive 400 million years without sex

Neural stem cells

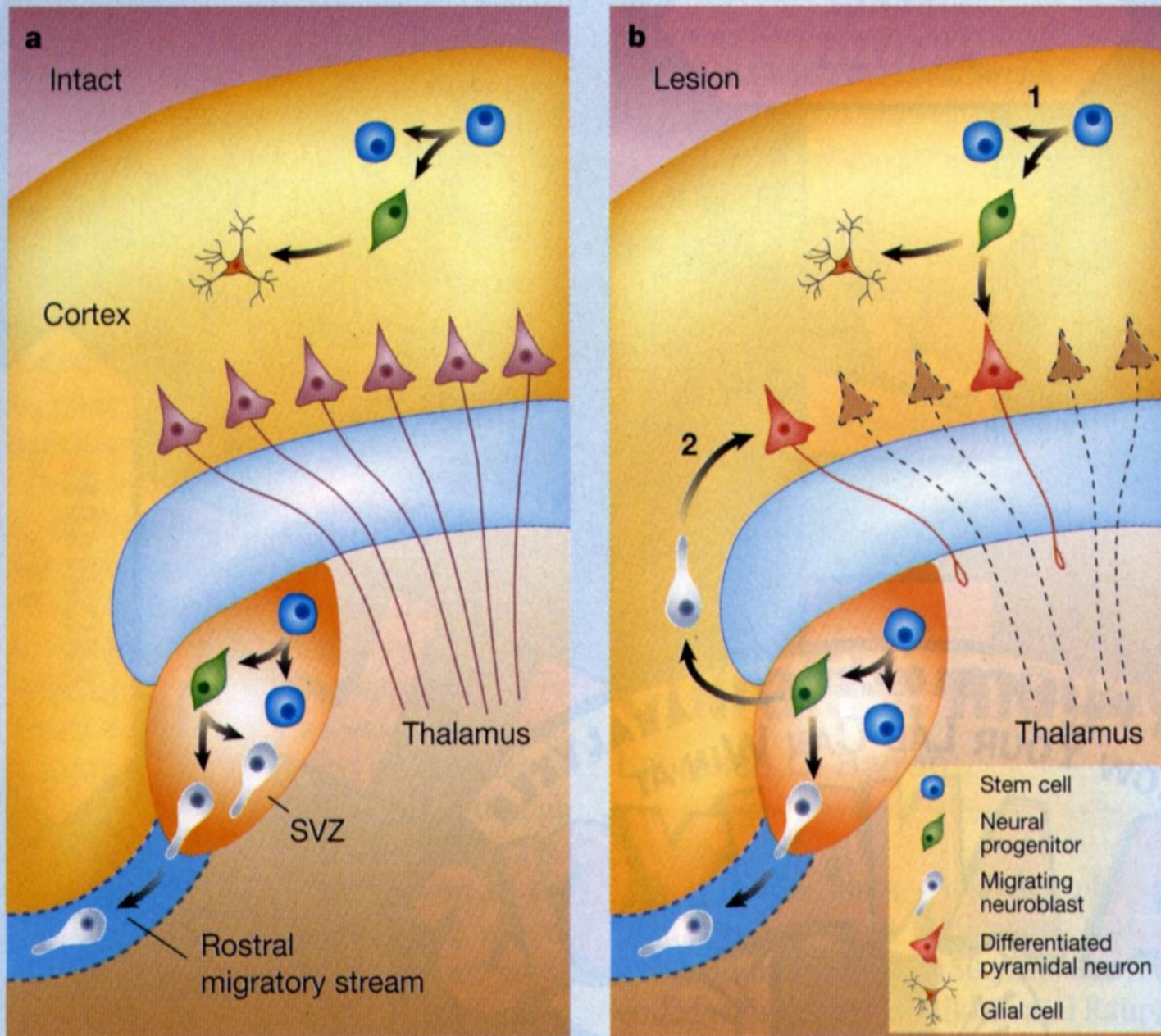
A unique population of adult human astrocytes

naturejobs so little time...



Migrace kmenových buněk

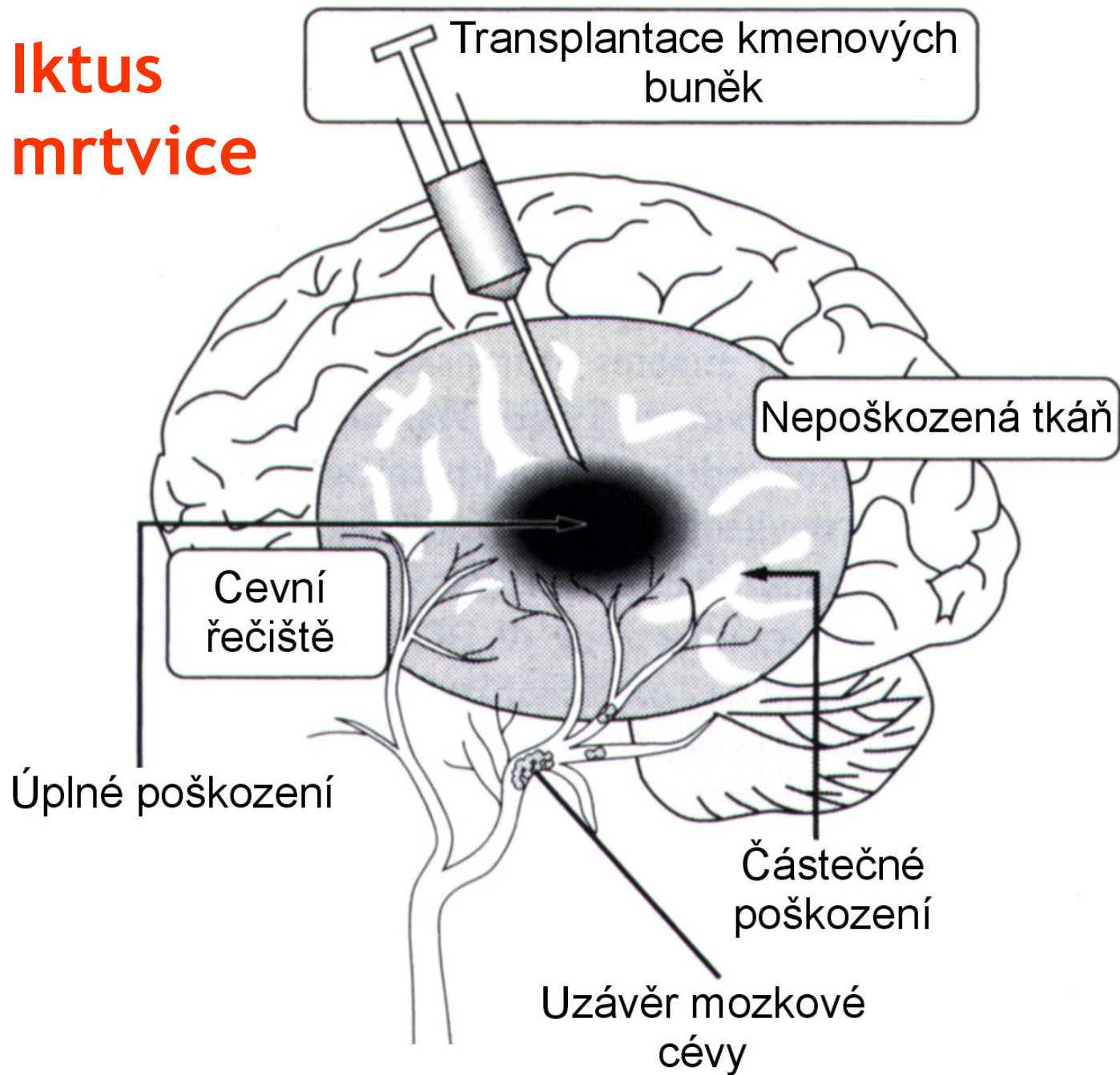
NEUROGENEZA



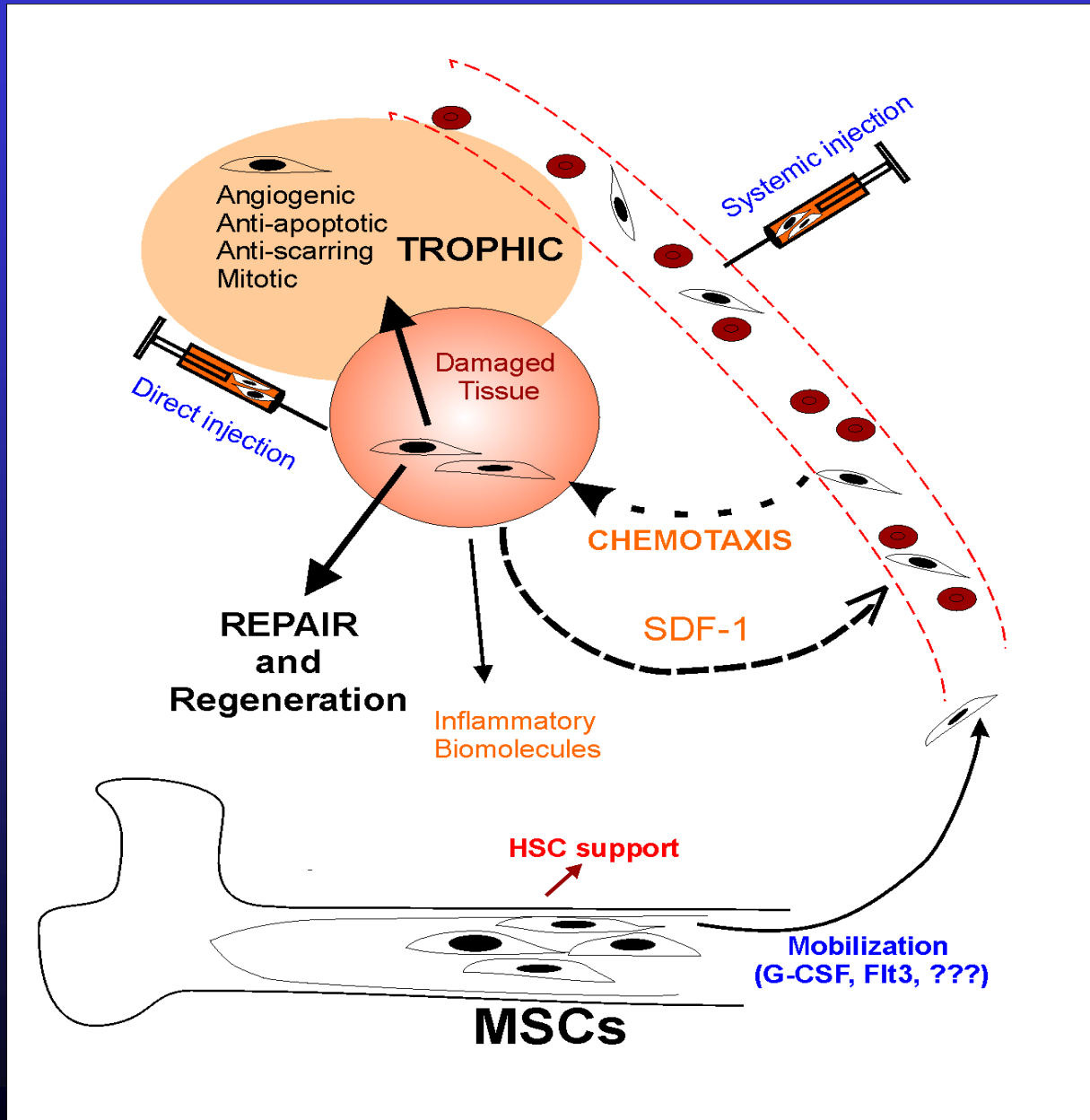
IKTUS

Brain Facts

Iktus mrtvice

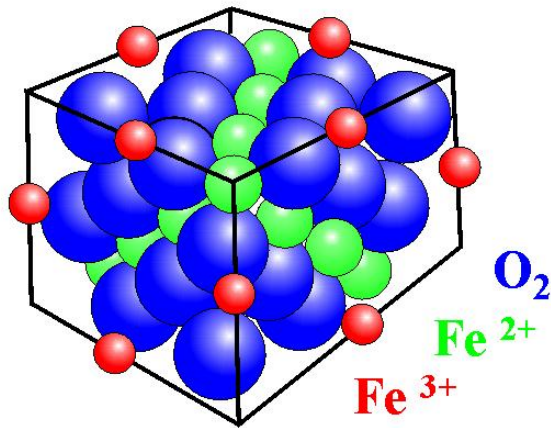


BMSCs a jejich (rescue) efekt v organizmu

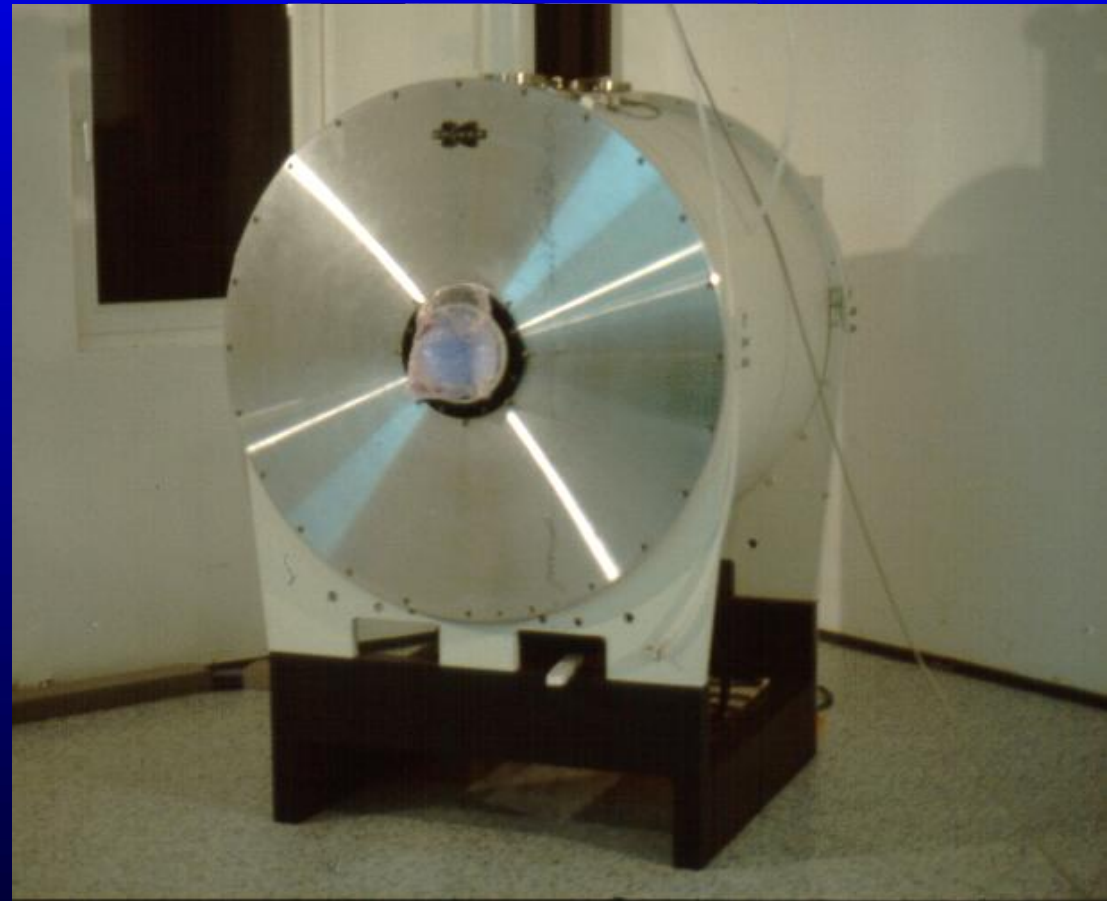
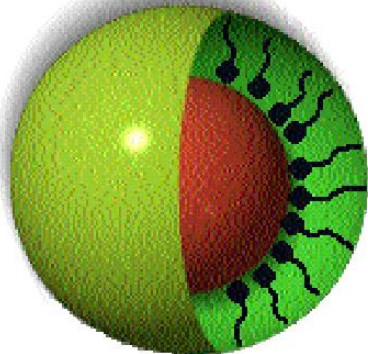


Sledování KB in vivo pomocí NMR

Fe_3O_4 nanoparticles

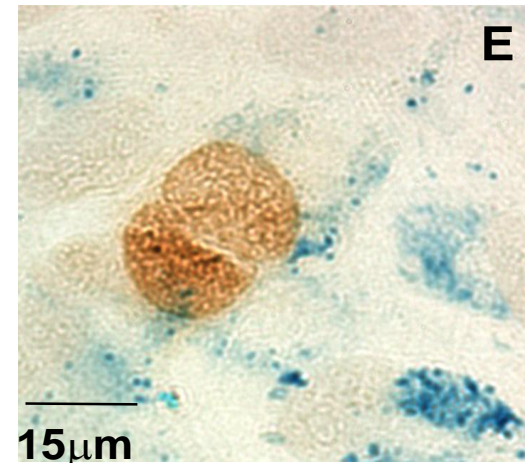
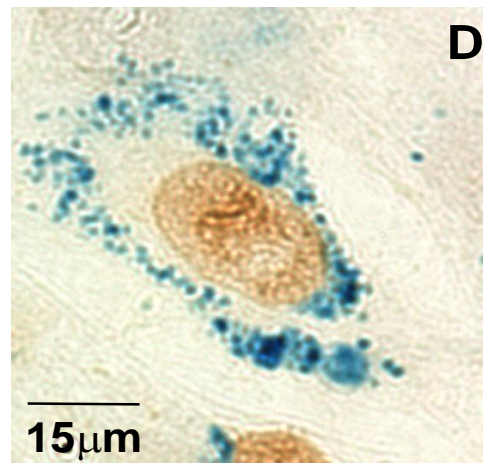
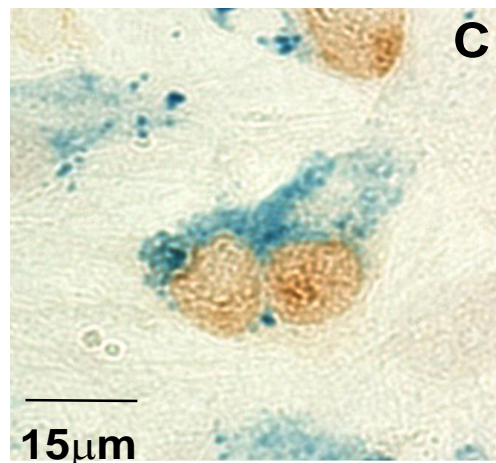
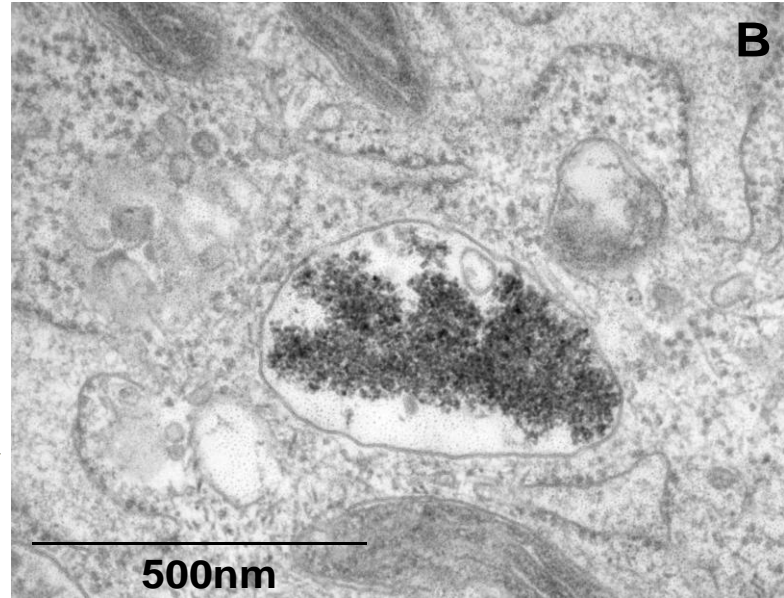
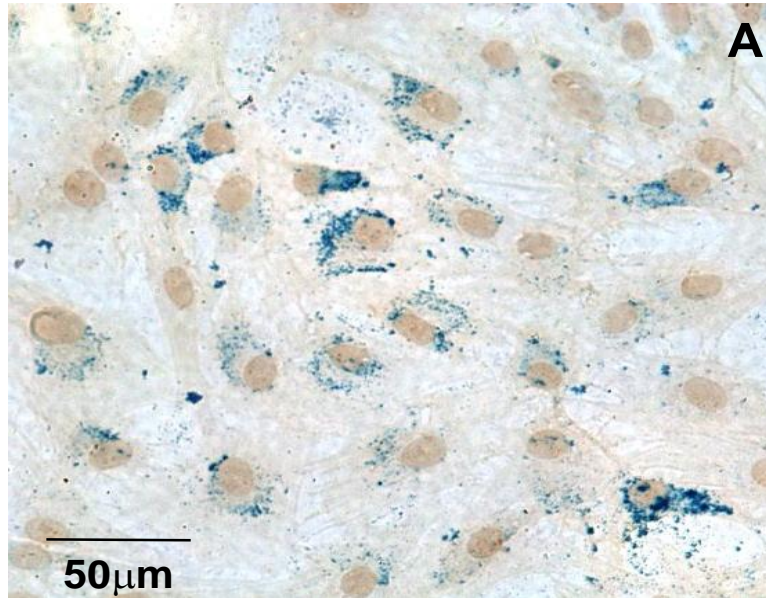


Nanoparticle coated with a surfactant monolayer shell (stabilised and soluble)

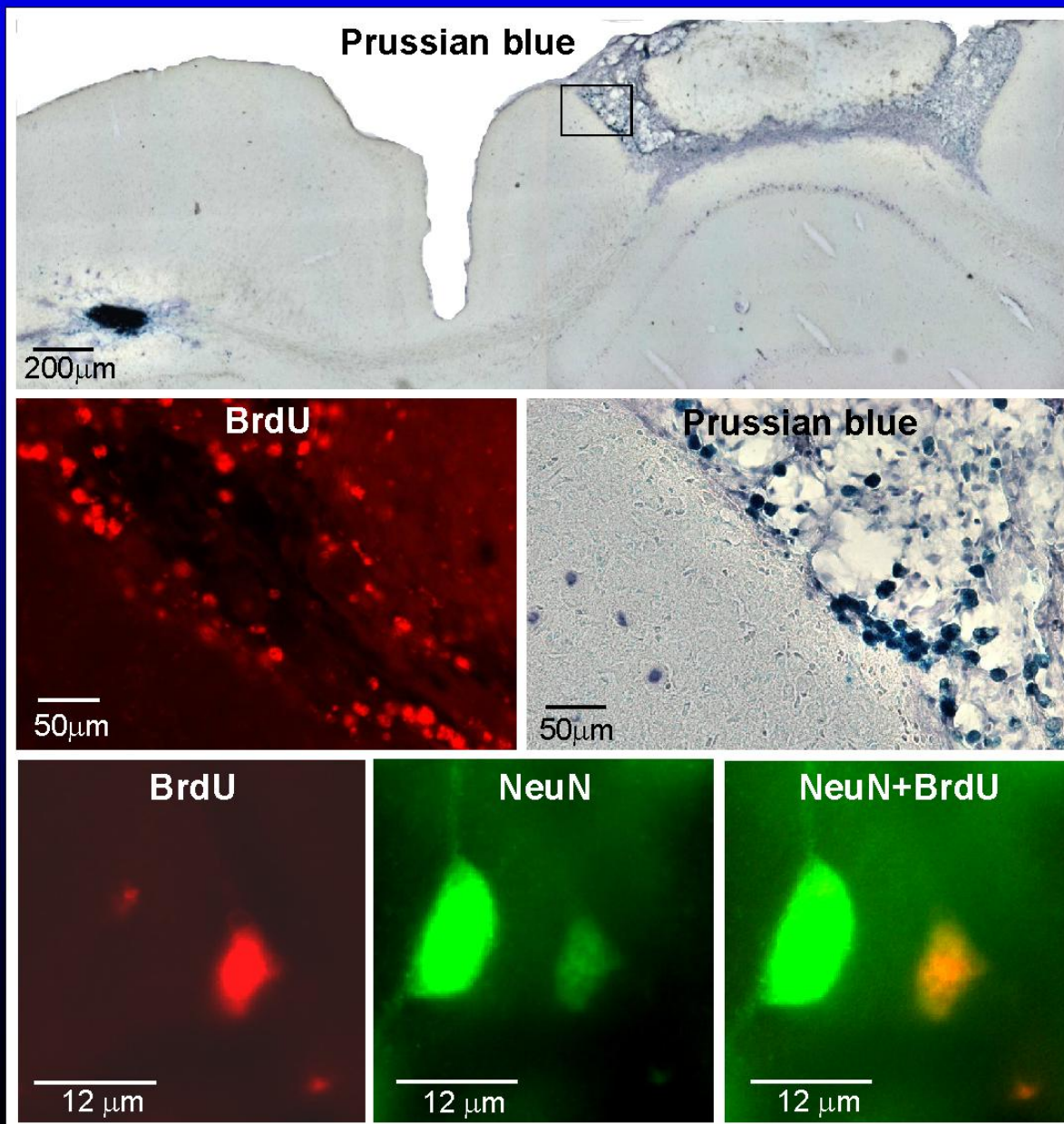


BRUKER 4,7 T experimentální magnet pro magnetickou rezonanci u experimentálních zvířat

Mesenchymální buňky kostní dřeně označené BrdU a nanočásticemi oxidu železa



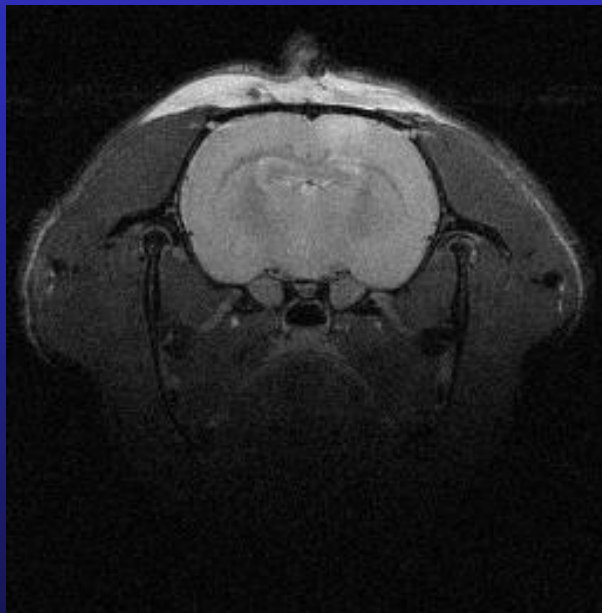
MSCs označené pomocí nanočástic železa implantované do mozku potkan s mozkovou lézí



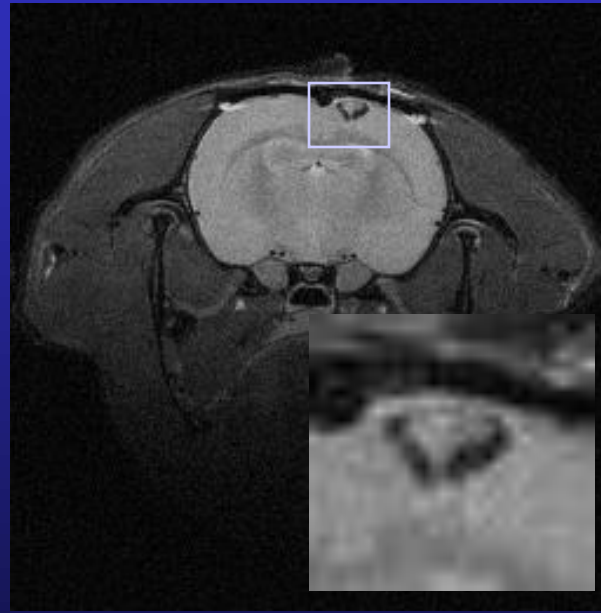
*Jendelová, et al.
MRM 2003*

MRI – model iktu

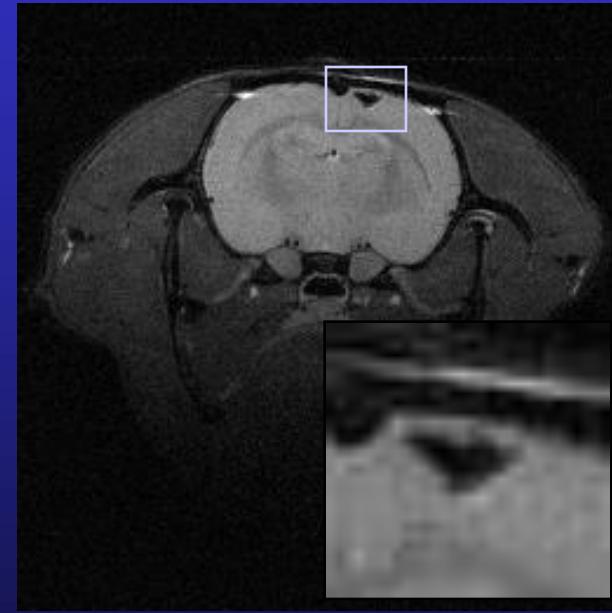
MSC označené pomocí nanočástic železa se také po intravenósní aplikaci výlučně uchytí v místě poškození



léze



7 dní po implantaci

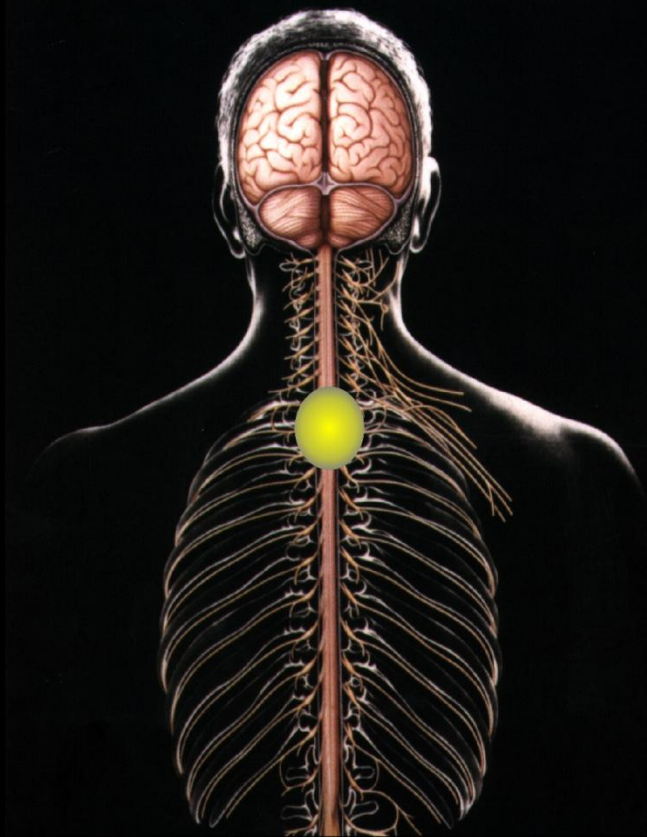


14 dní po implantaci

Mišní poranění

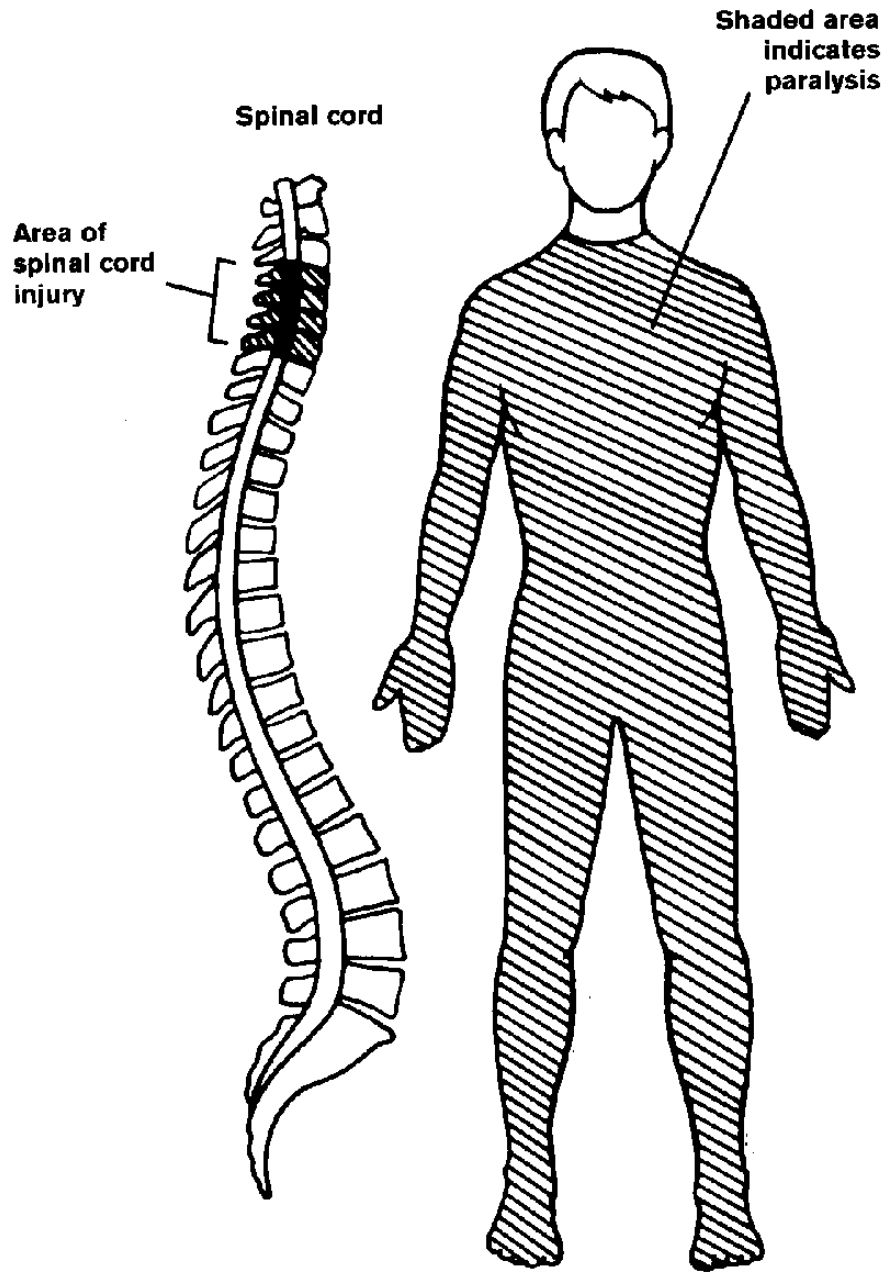
3000 B.C.

2013

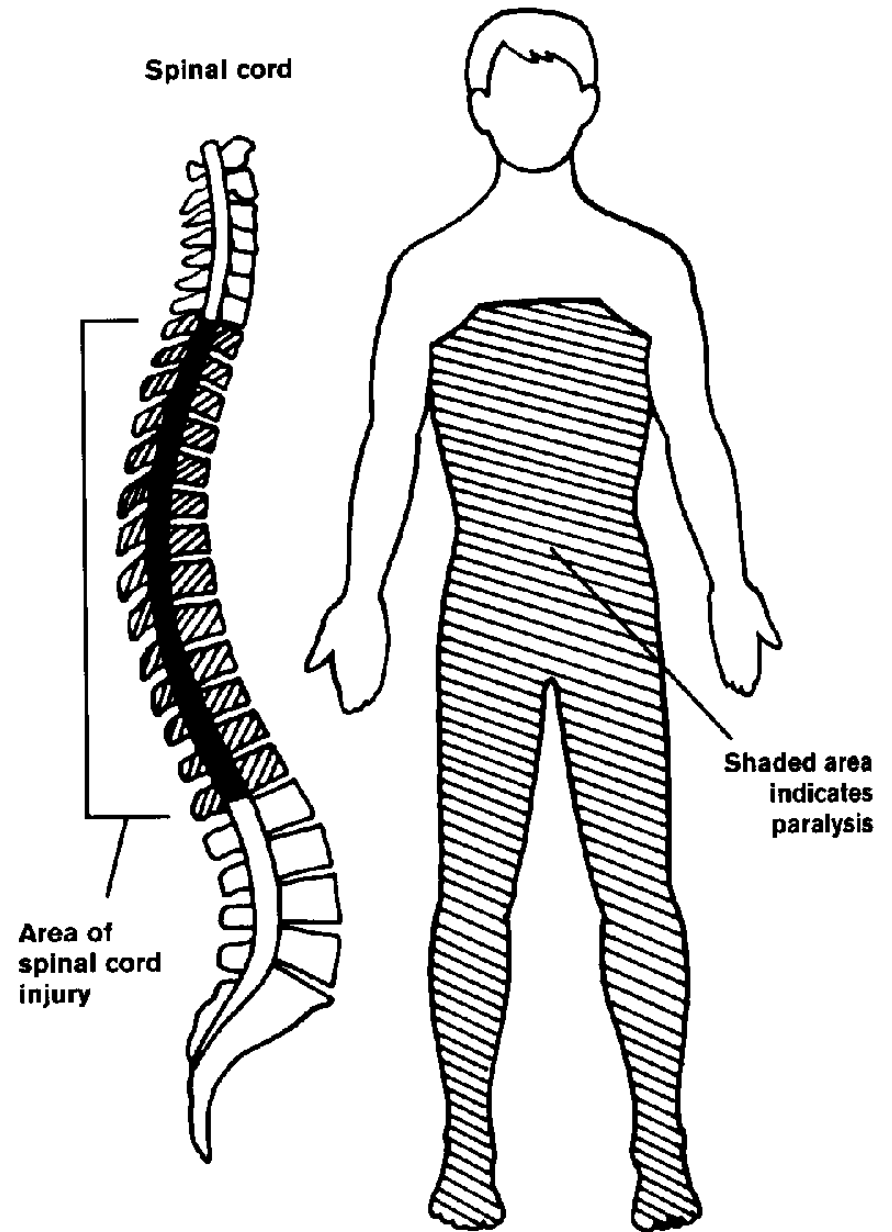


Ani dnes nemáme léčbu!
Pacienti jsou ochrnuti
Kvalita jejich života je snížena

Quadriplegia

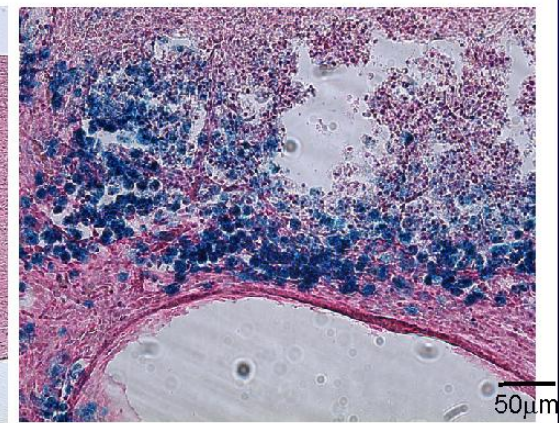
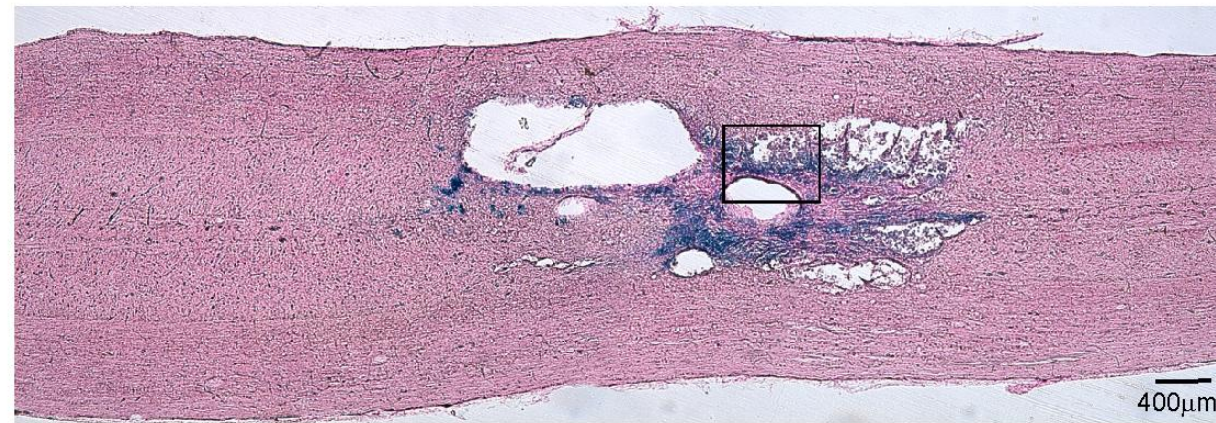
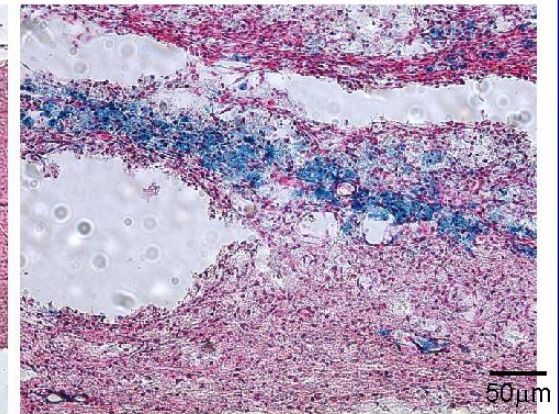


Paraplegia



Úplná míšňí léze u laboratorního potkana a výsledek léčby pomocí kmenových buněk kostní dřene

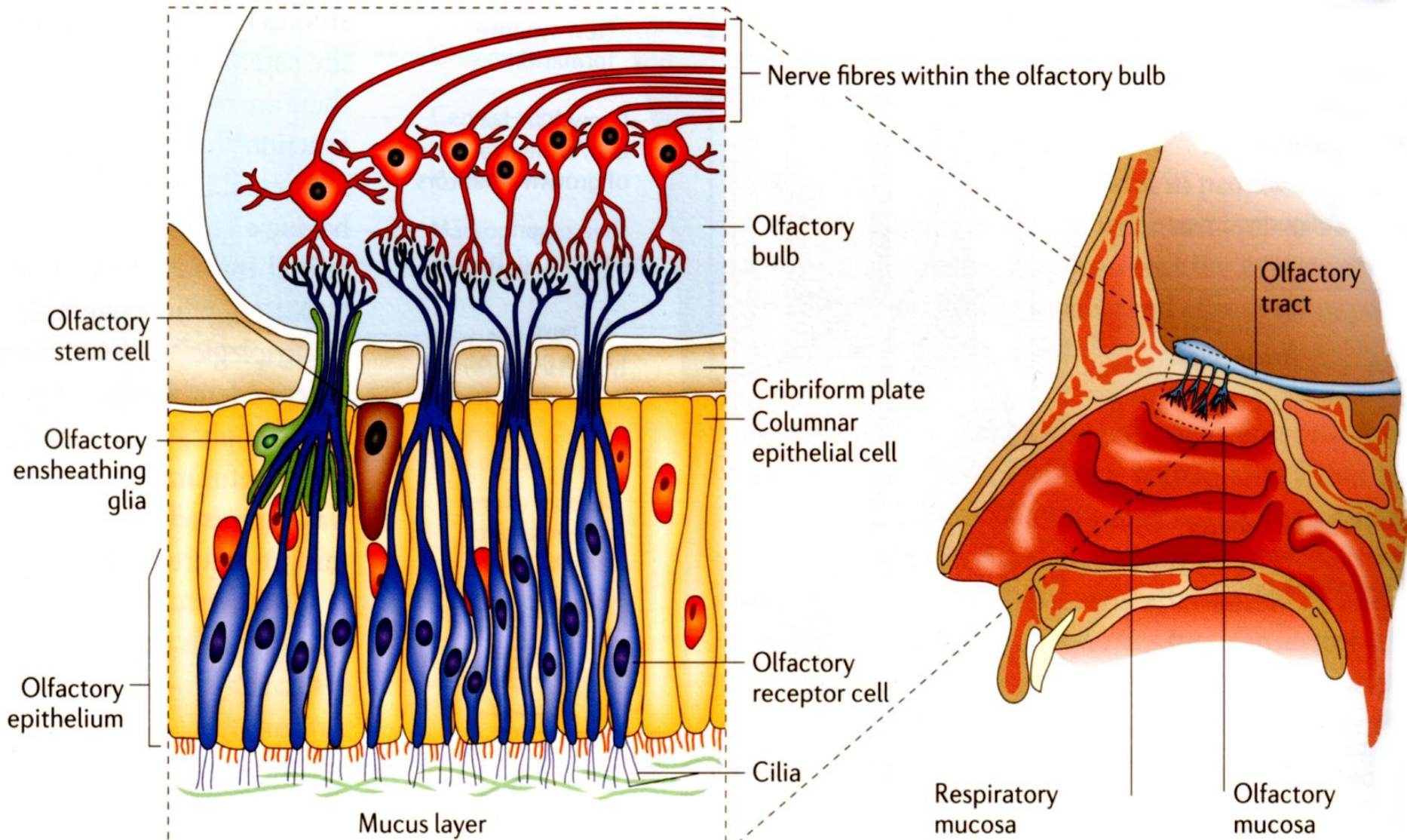
lesion only



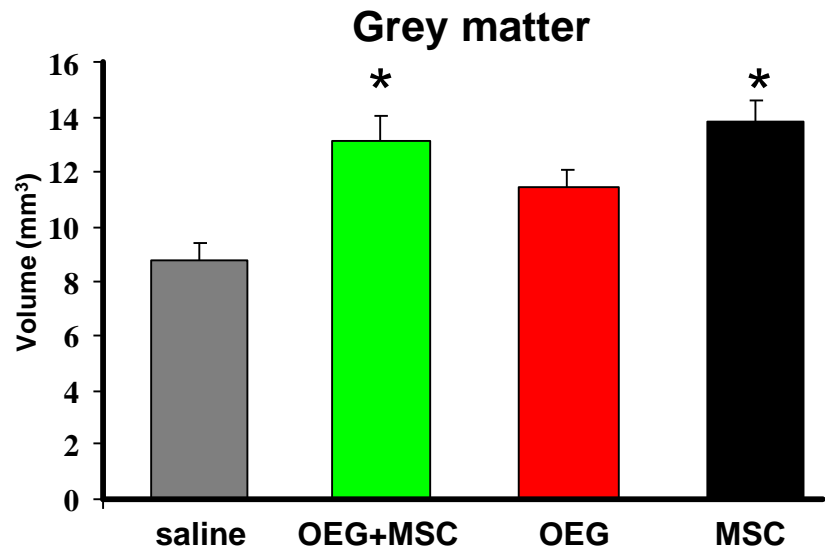
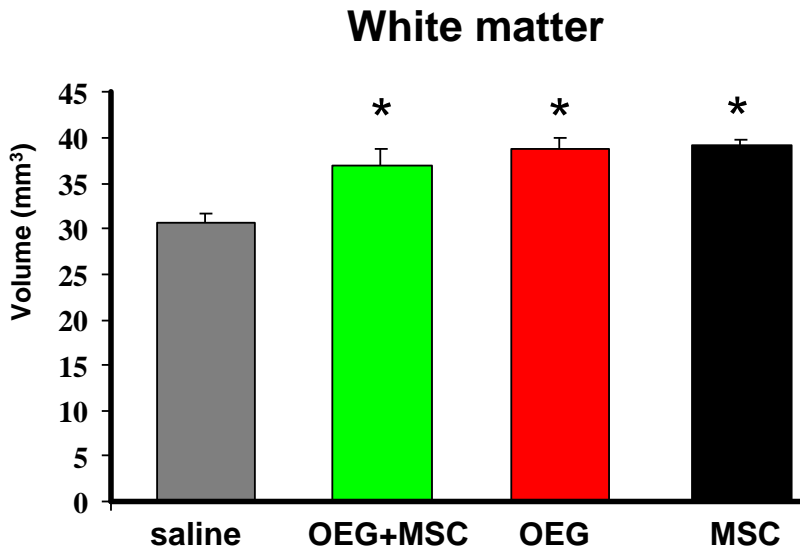
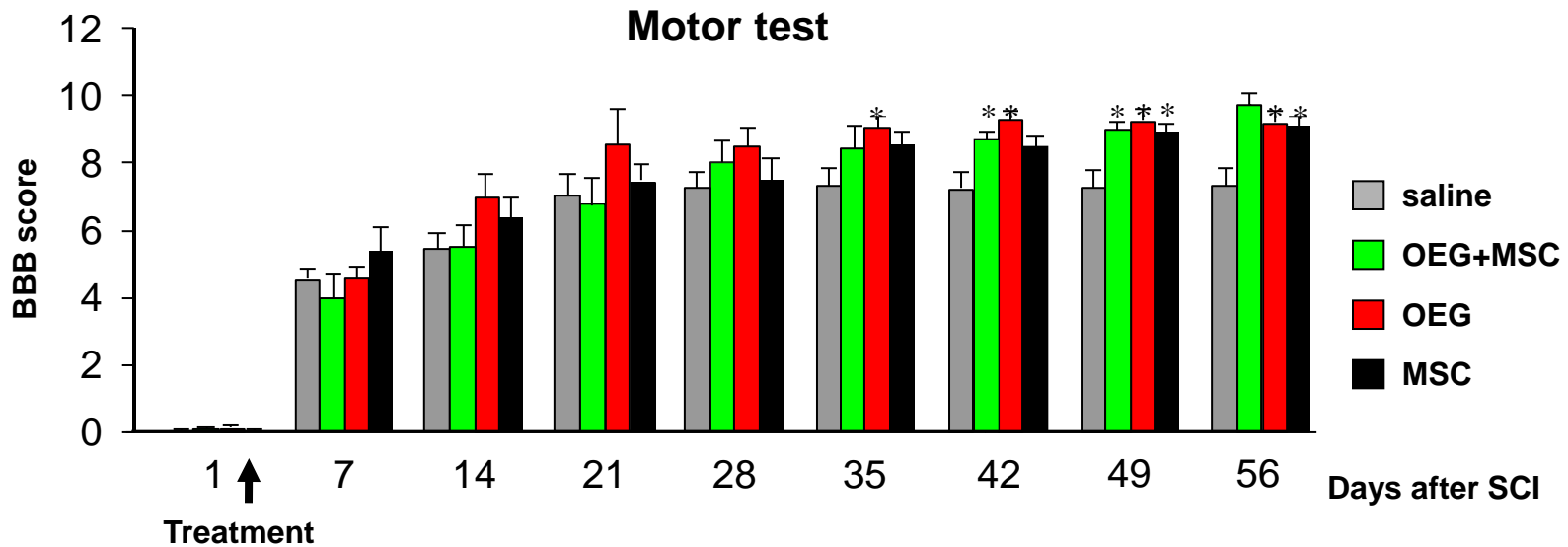
intravenous injection of labeled BMSCs

OECs

Olfactory stem cells

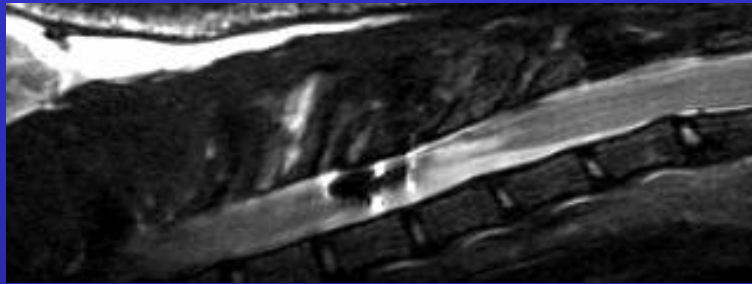


MSCs a OEGs mají podobný efekt, který není synergistický

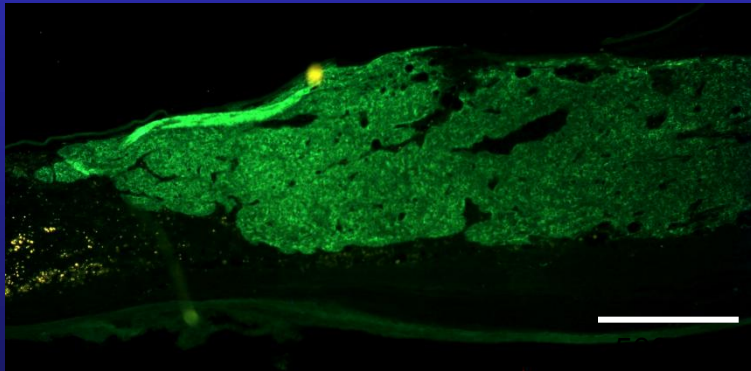
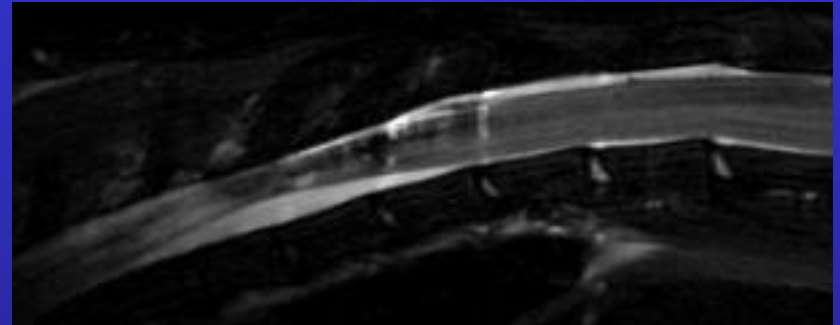


Lidská fetální linie imortalizovaných míšních buněk.

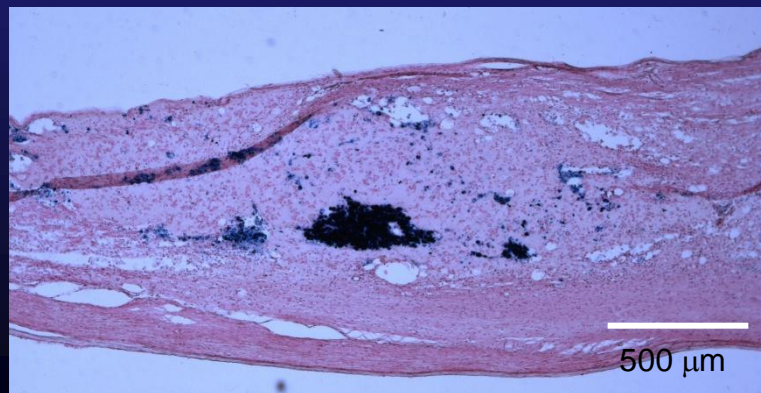
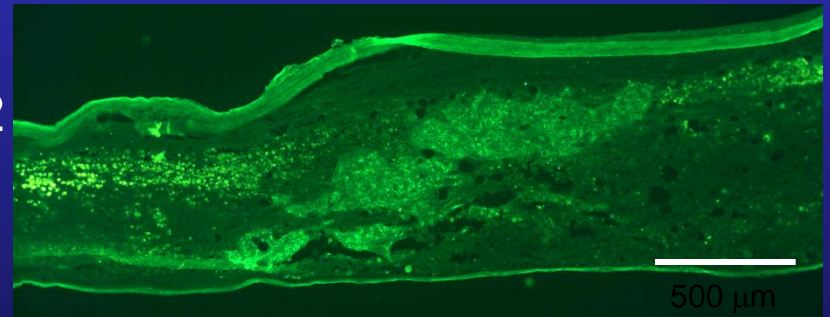
Buňky SPC-01 jsou označeny PLL-SPIO nanočásticemi před implantací do míšní léze



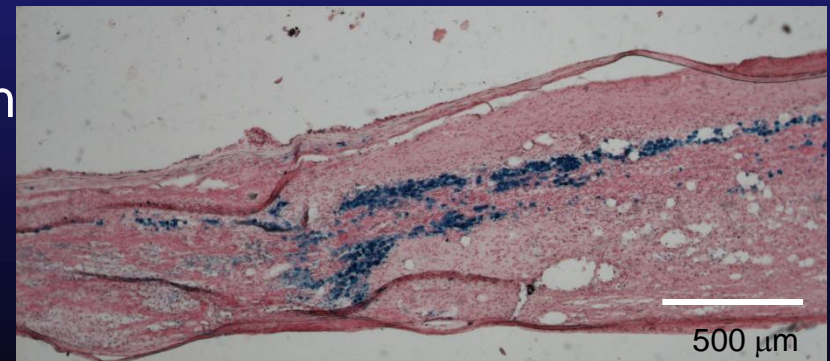
T2W



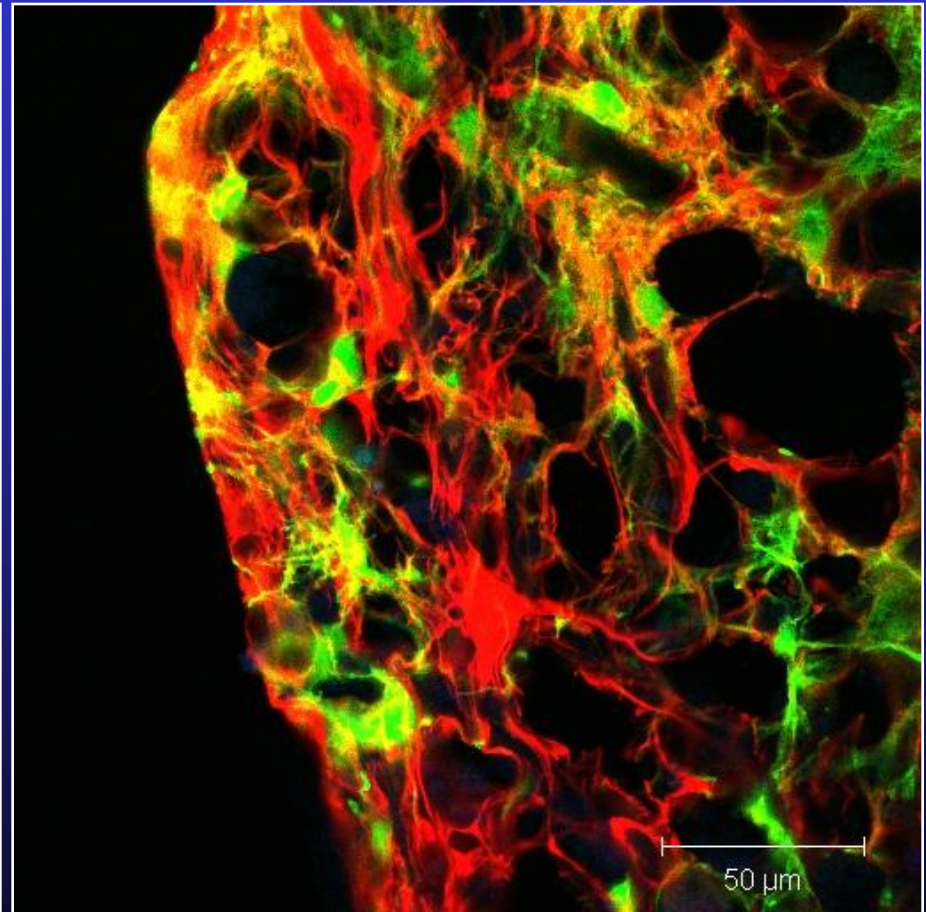
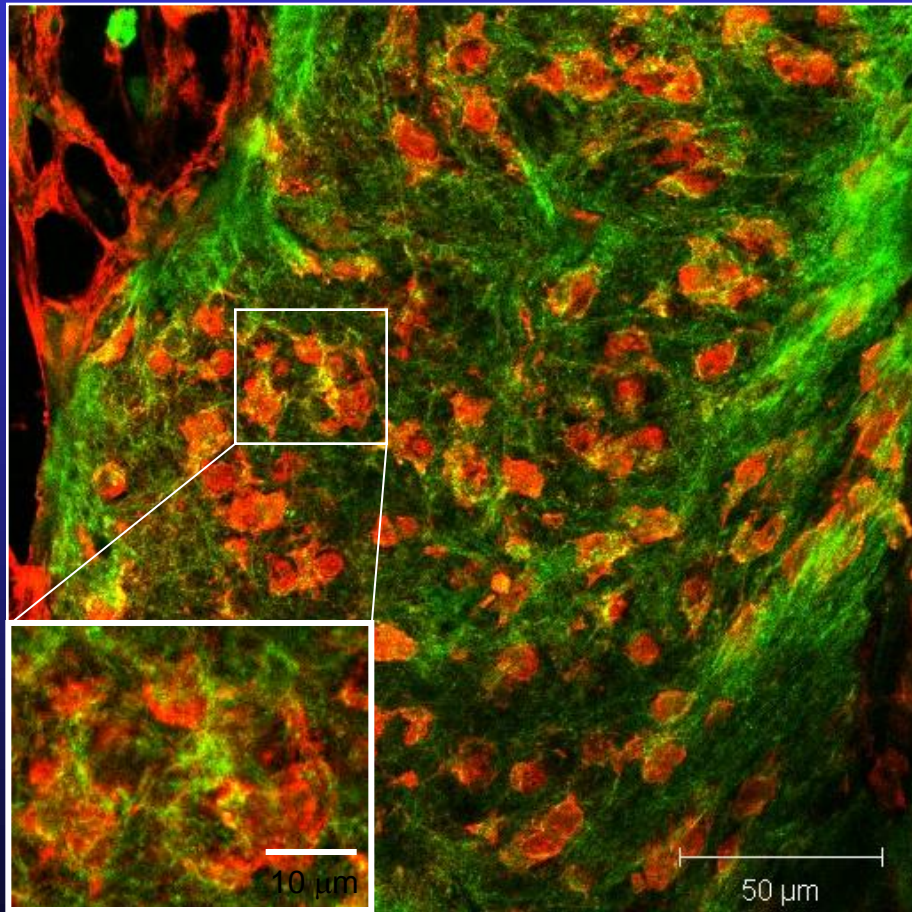
MTCO2



Prussian
Blue



**Transplantace SPC-01 do míšní léze potkana .
Buňky se diferencují již 8 týdnů po implantaci do
motoneuronů a astrocytů**



SPC-01
(MTCO2/ChAT)

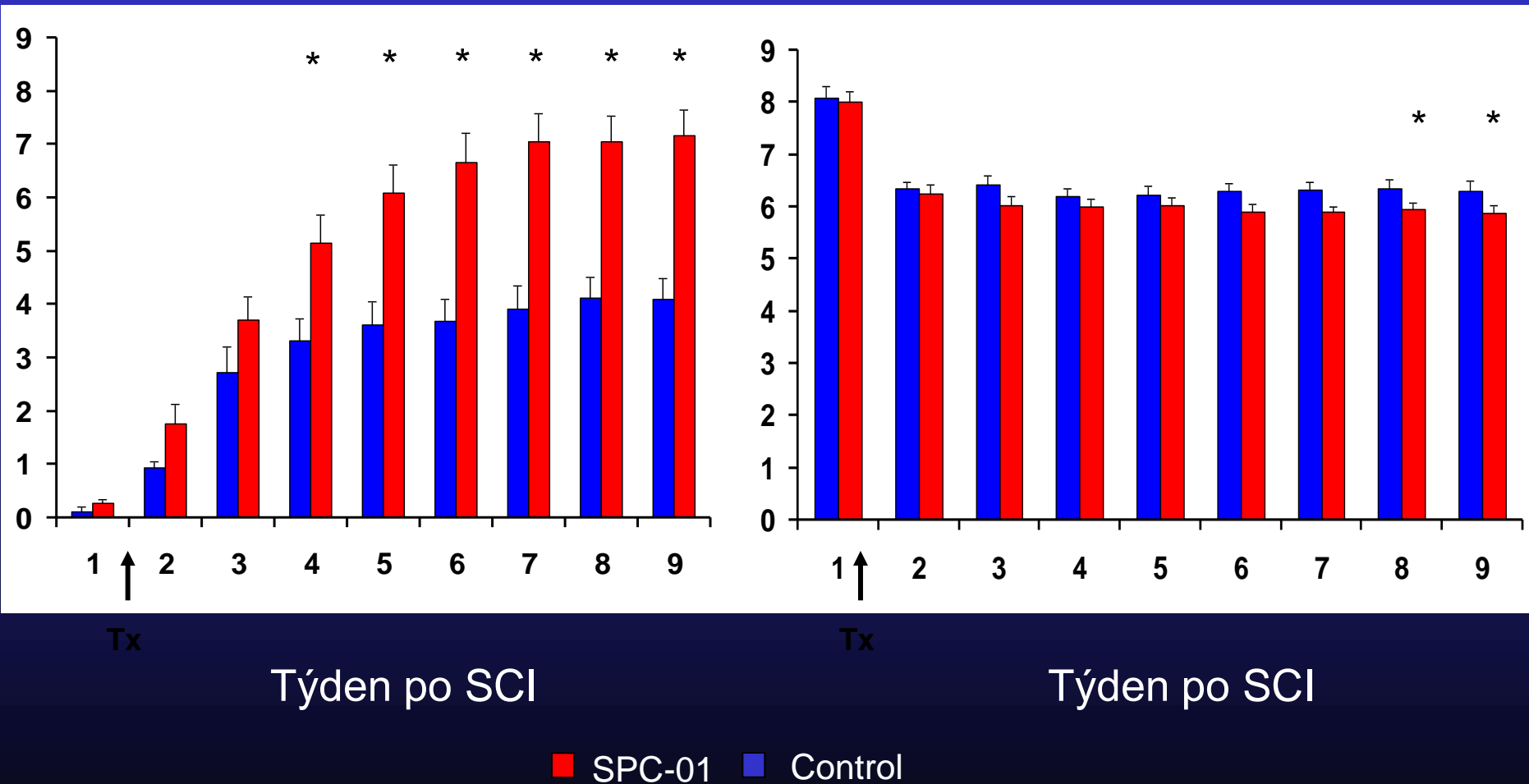
SPC-01 (GFP, GFAP)

Funkční zlepšení míšních funkcí po transplantaci lidských prekursorových buněk SPC-01

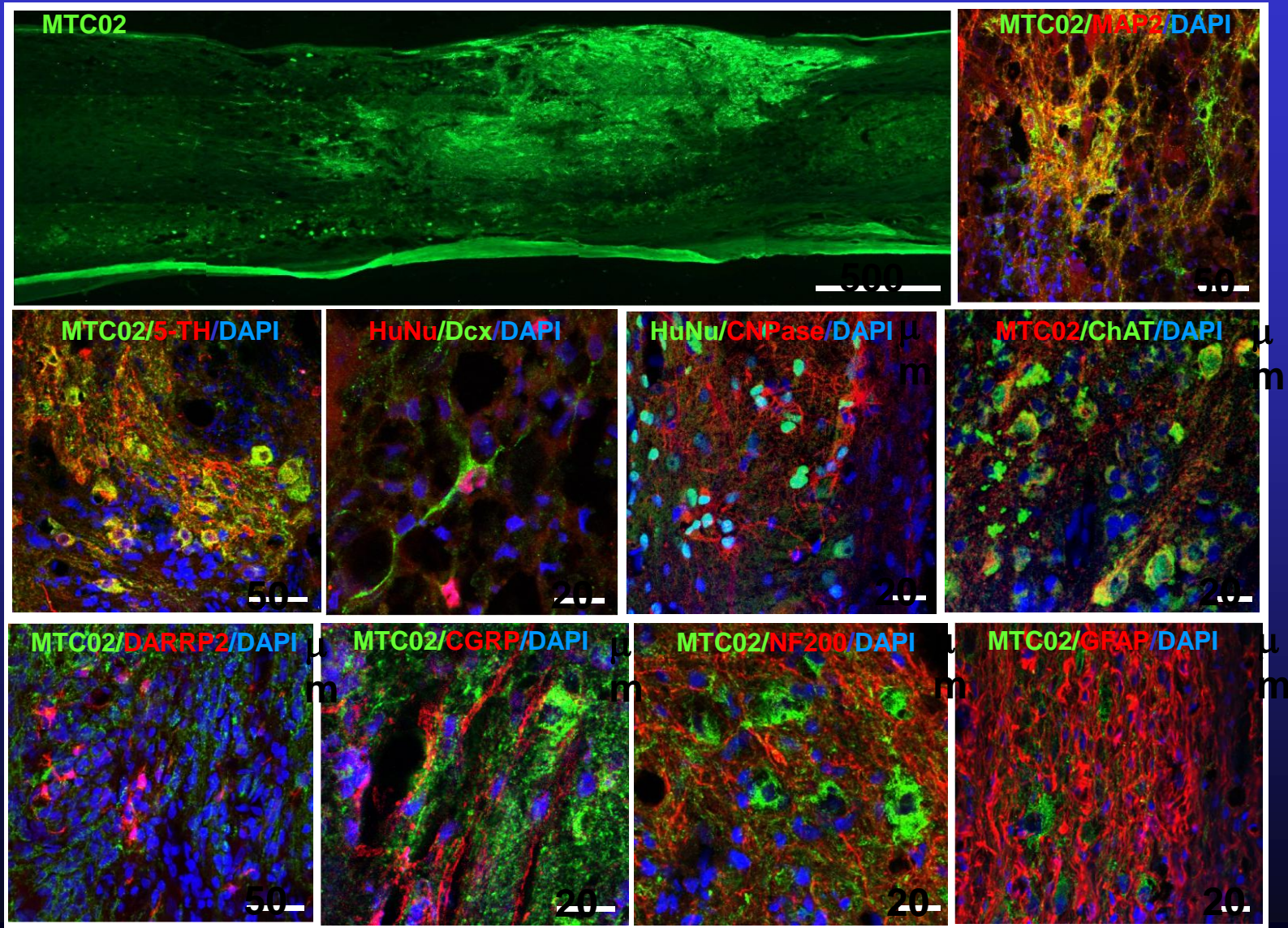
Buňky Jack Price UCL, EU FP6 project Rescue

BBB motorický est

Plantární test citlivosti

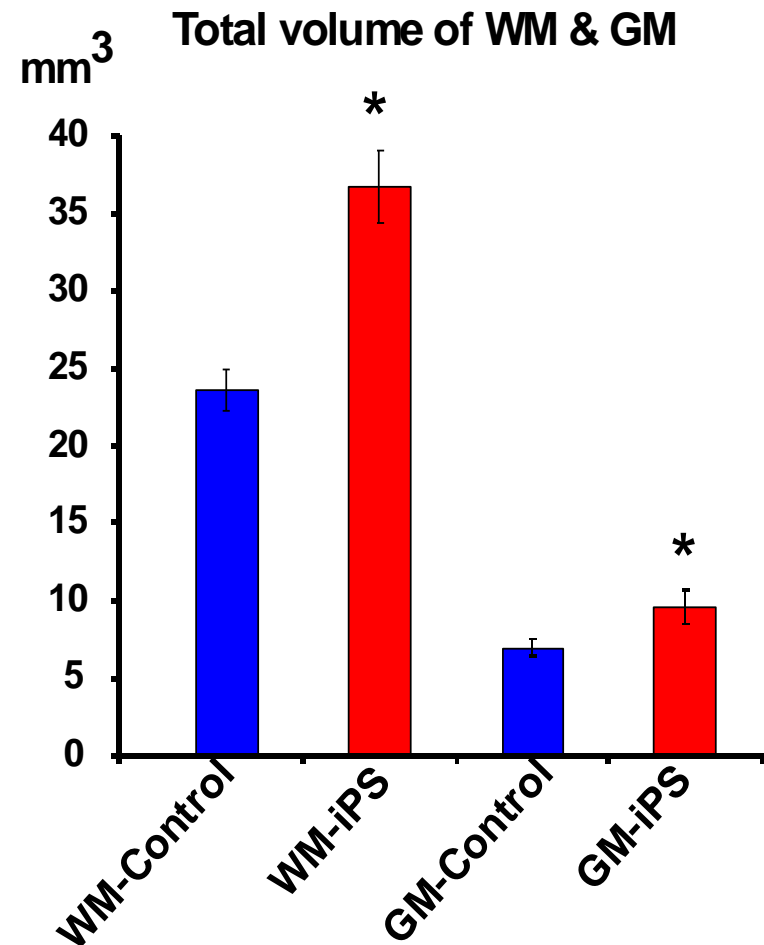
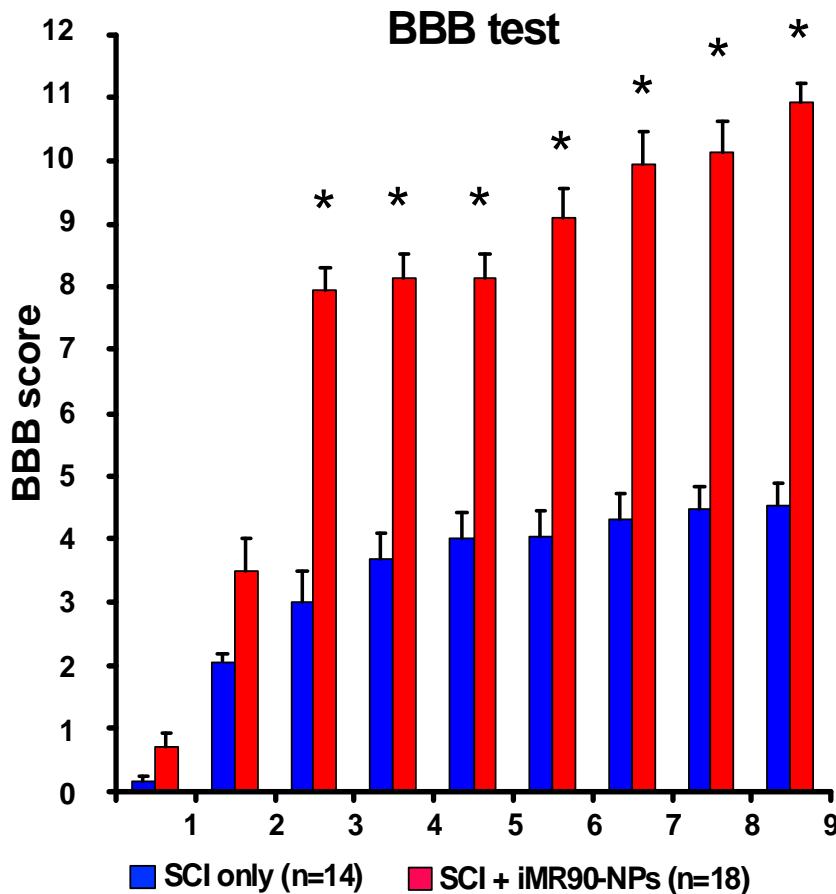
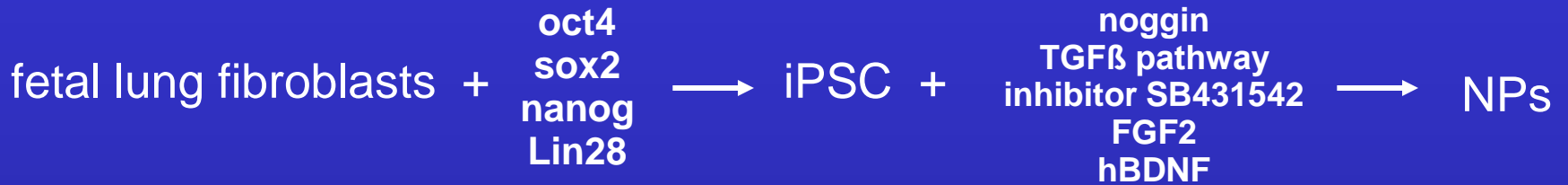


Lidské iPS-NPs transplantované potkanům s míšní lézí. 4 týdny po transplantaci buňky přežívají a diferencují se



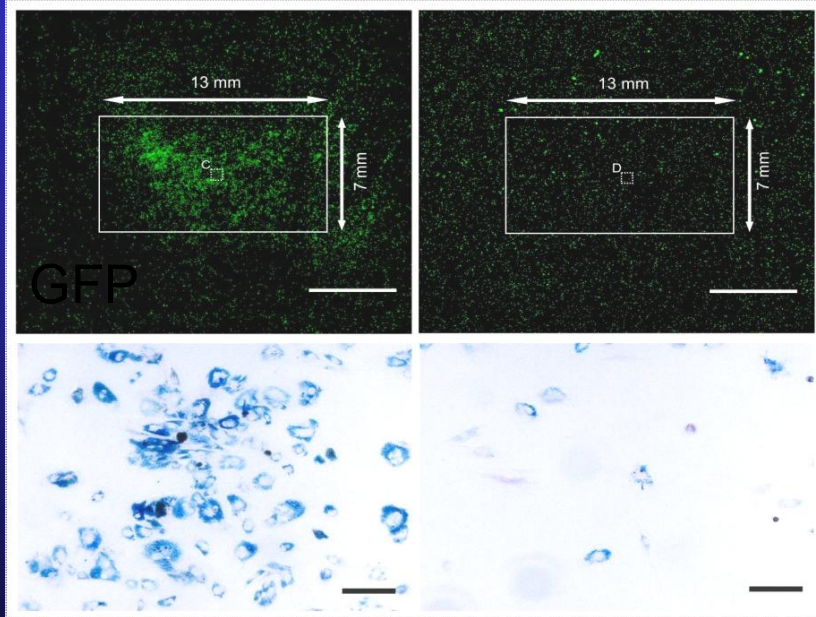
iPSC-NPs

Funkční zlepšení po transplantaci iPSC-NPs do míšní léze

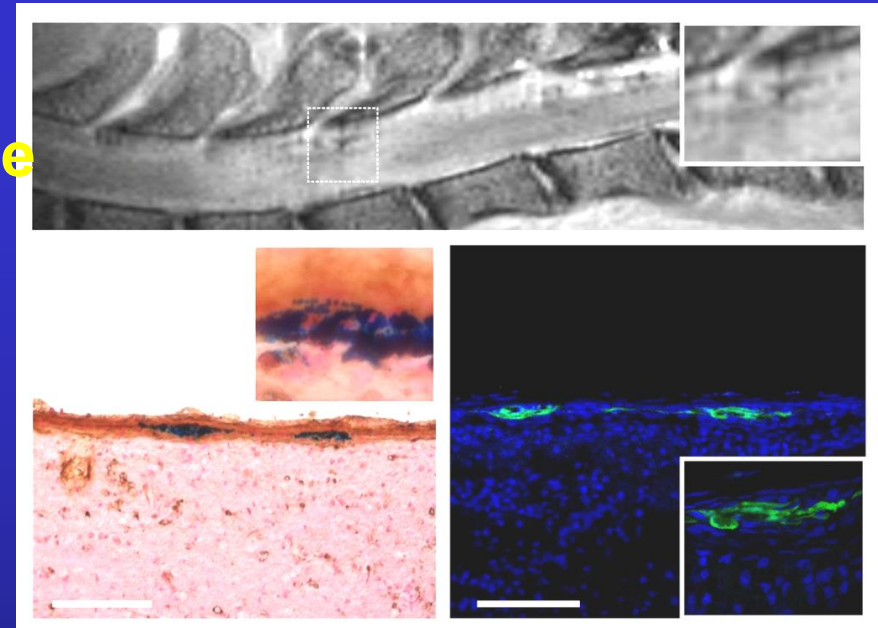


Vysoce účinná koncentrace GFP-SPIO-MSCs do míšní léze pomocí magnetického pole

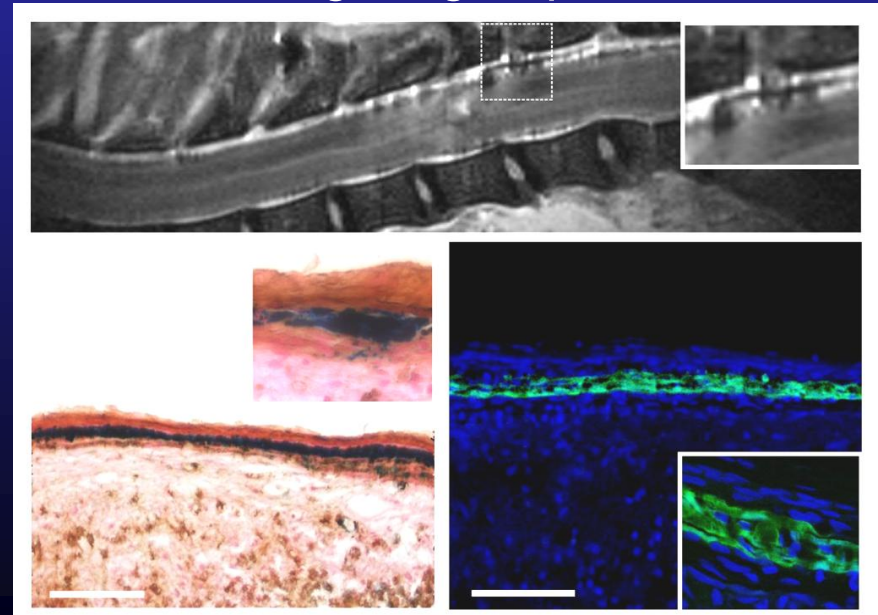
MSCs in vitro



Control



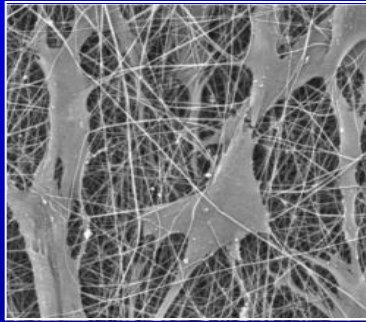
Magnet group



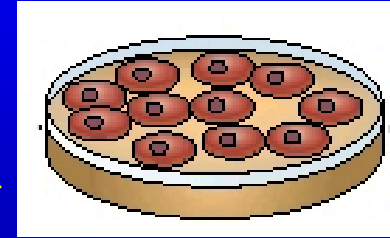
Přemostění defektů



Tkáňové inženýrství



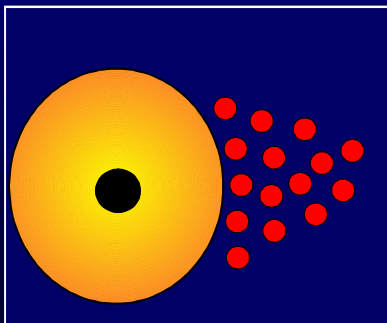
Nosič (Scaffold)



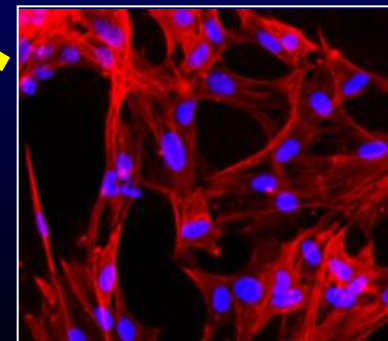
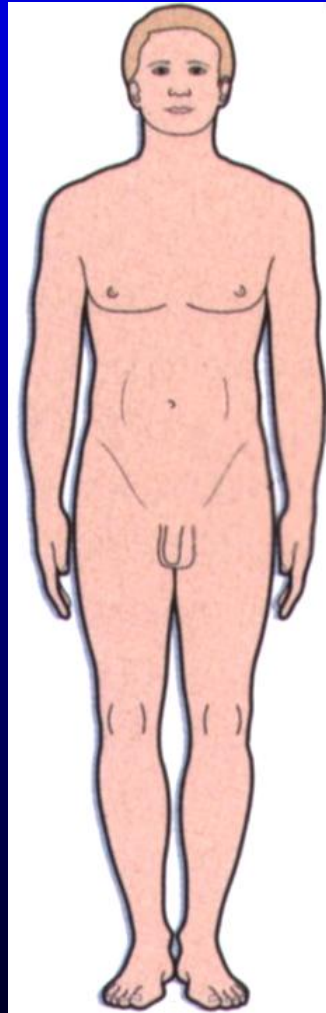
Kultivované buňky



Enkapsulované buňky



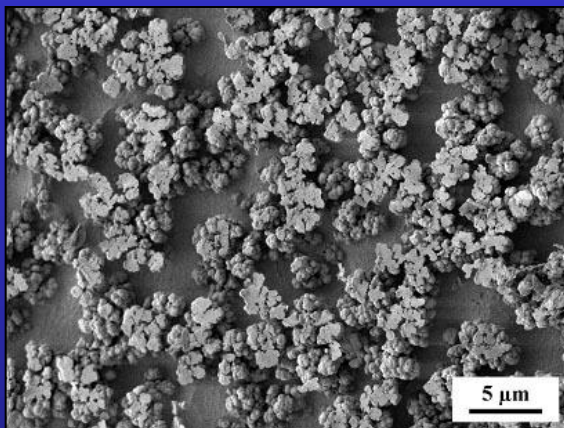
Růstové faktory/
Kontrolované uvolňování



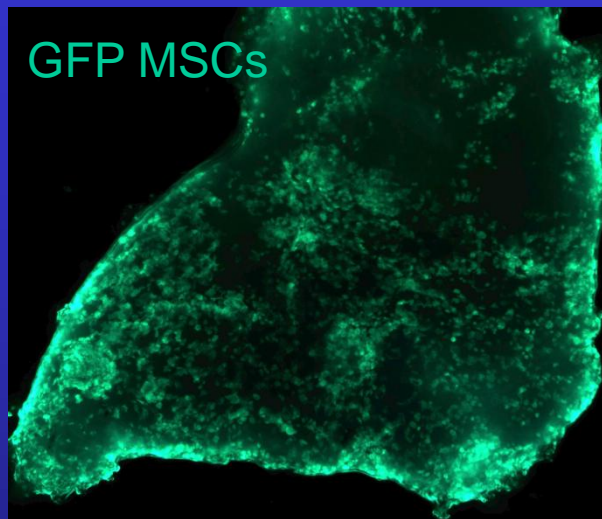
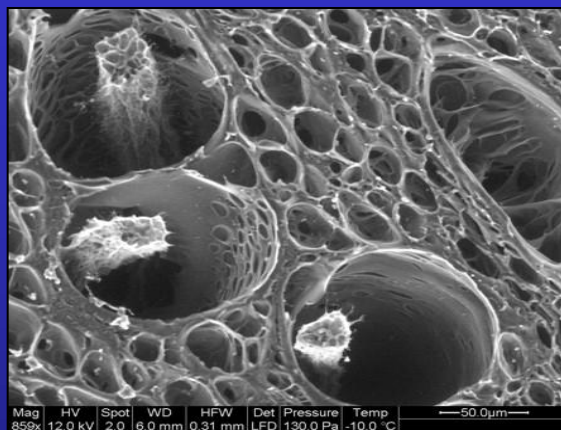
Buňky na nosiči

Biokompatibilní superporézní hydrogely a nanovlákná (spolupráce ÚMCH AVČR, ÚEM AVČR a Technické Univ. v Liberci)

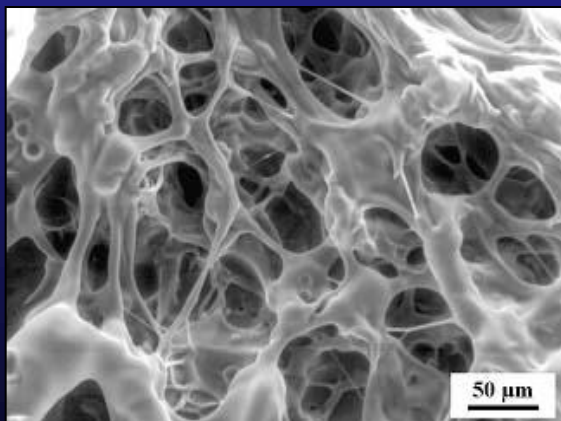
polyHEMA



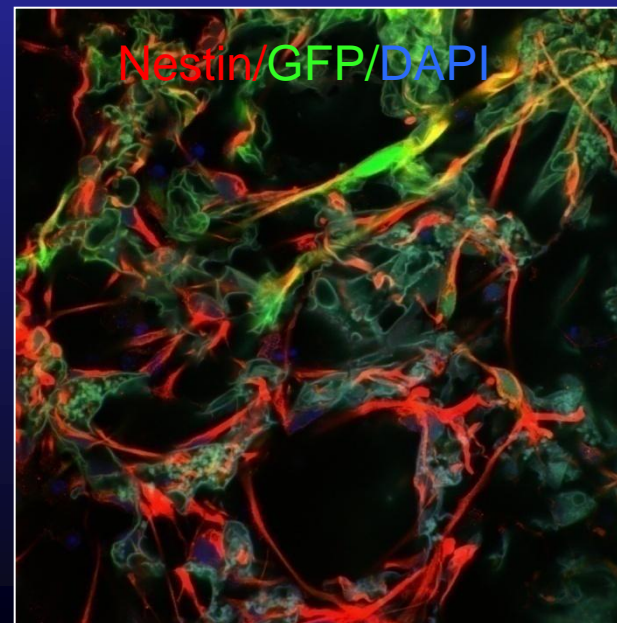
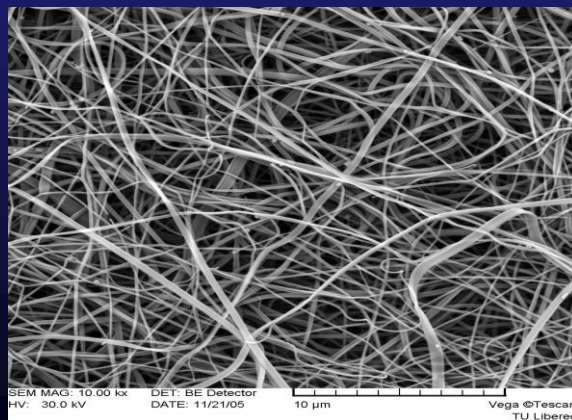
biodegradable



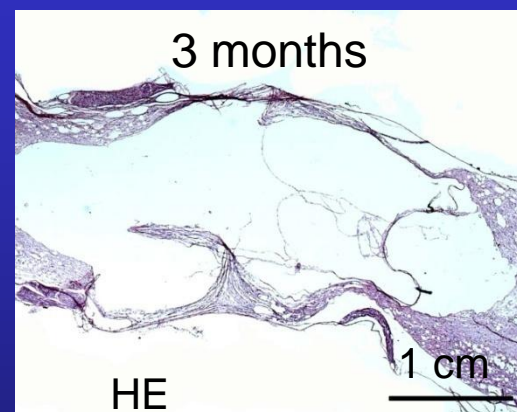
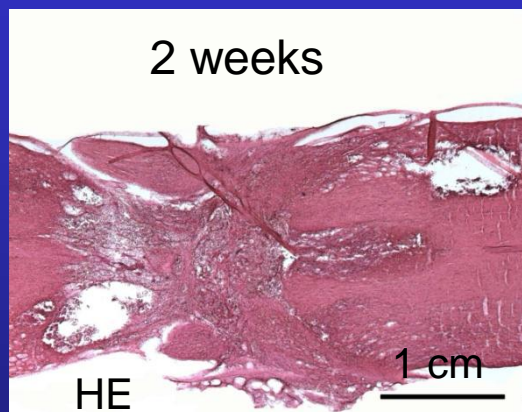
poly[HEMA-co-MANa(11.3%)



Nanofibres
HEMA/EOEMA copolymer



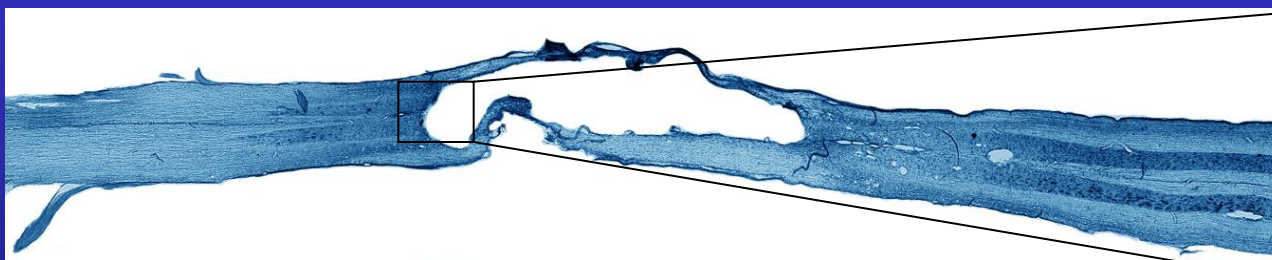
Balónková kompresní léze míchy potkana – rozvoj kavitace v čase



Chronické míšní poranění

PHPMA-RGD hydrogel + MSCs implantované 5 týdnů po SCI. Evaluace za 6 měsíců po SCI.

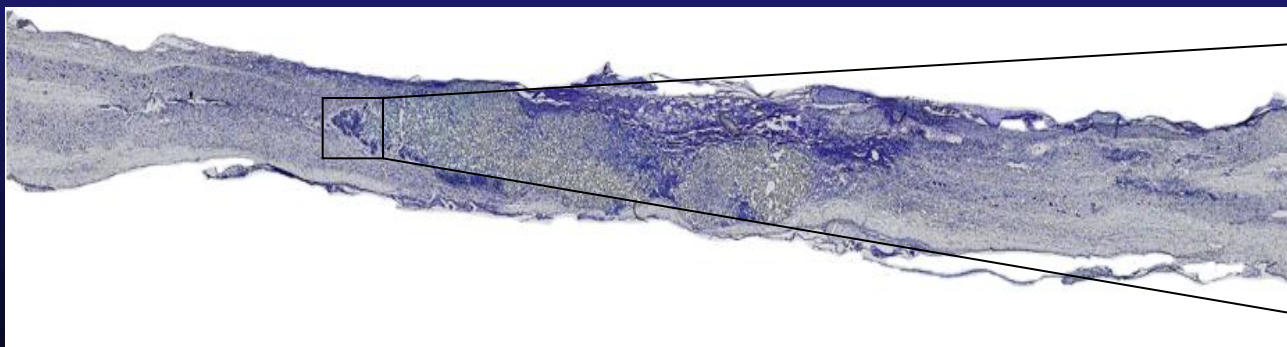
1. Míšňí kavita 6 měsíců po přerušení míchy



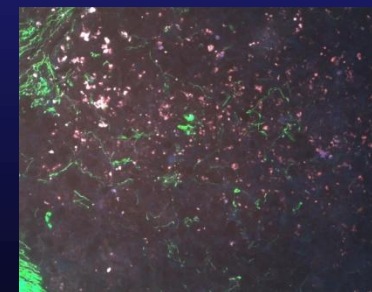
NF160



2. Mícha 6 měsíců po implantaci HPMA-RGD hydrogelu osázeného MSC



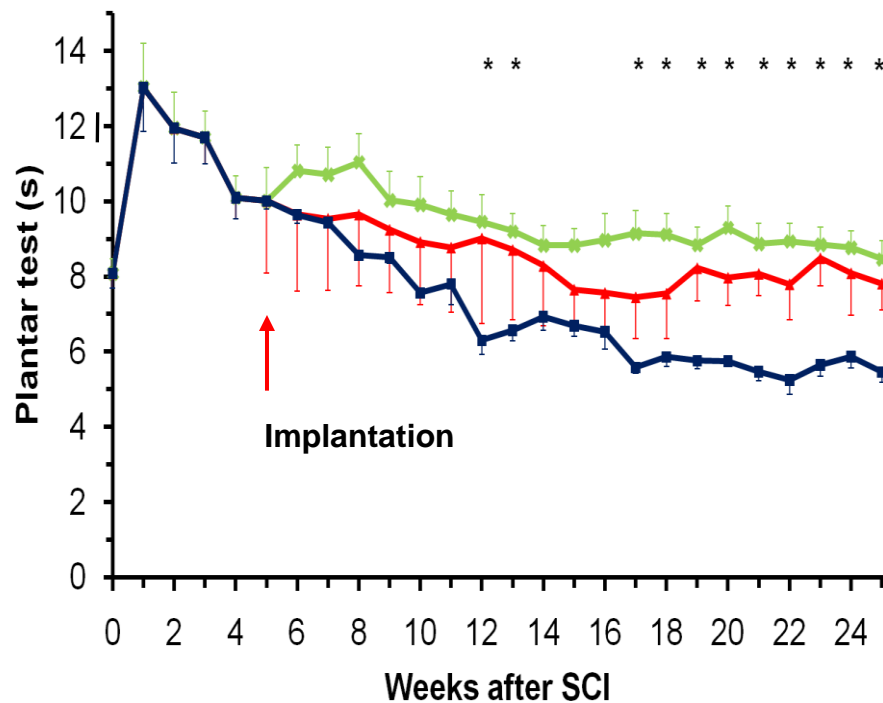
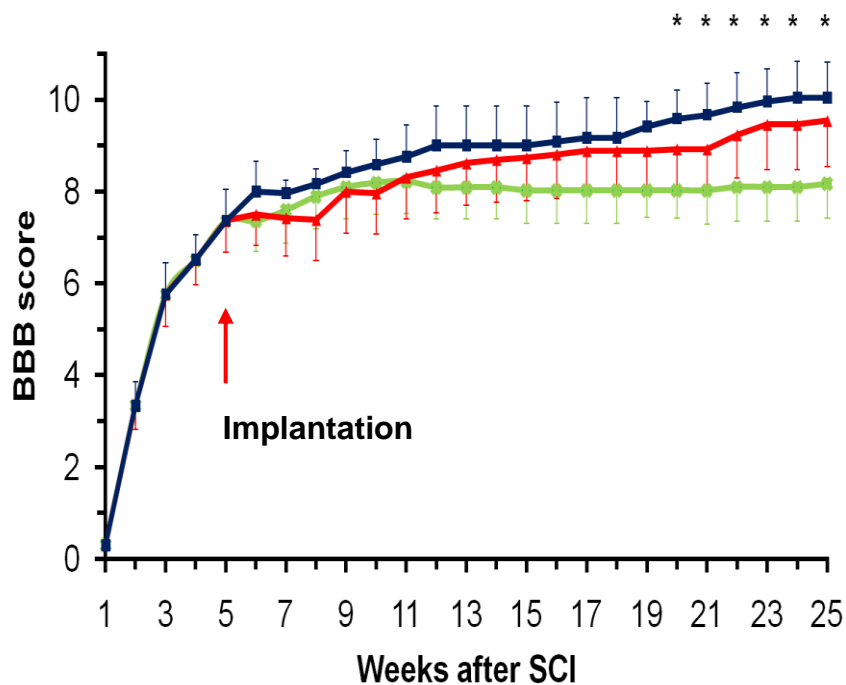
NF160



Funkční evaluace po implantaci u potkanů s chronickou míšní lézí

Motorický test

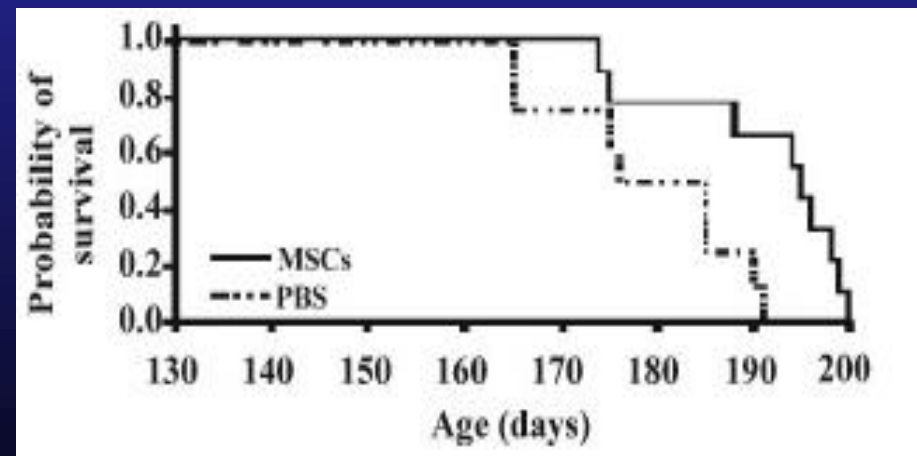
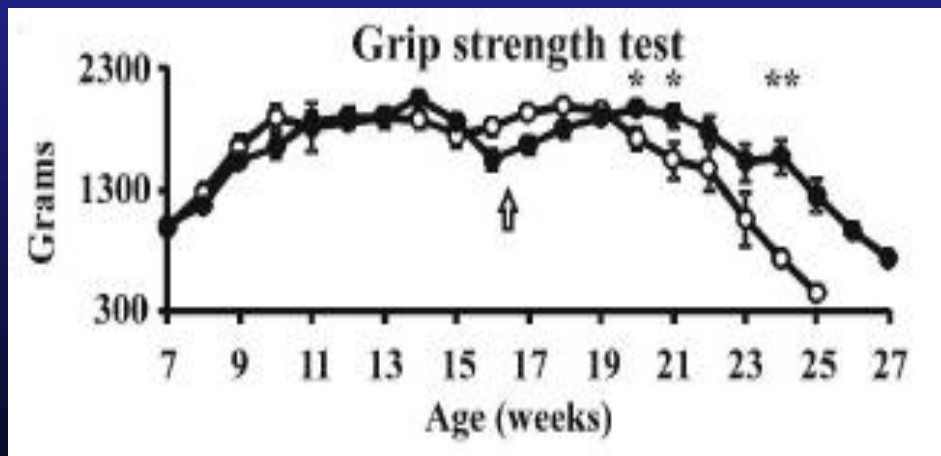
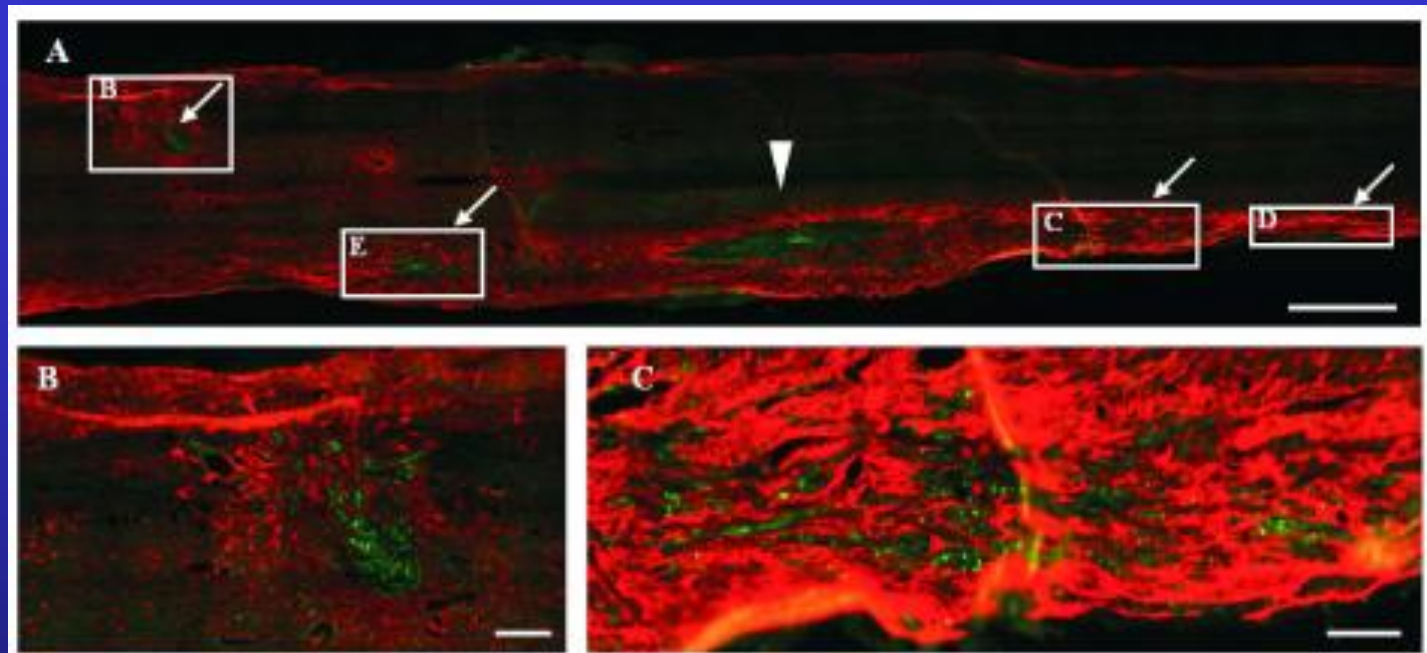
Citlivost



- SCI + Hydrogel + MSCs
- ▲ SCI + Hydrogel
- ✖ SCI only

p<0.05

ALS – migrace, přežívání a funkční efekt MSCs v míše SOD1-G93A transgenických potkanů



Autologous Bone Marrow Transplantation in Patients With Subacute and Chronic Spinal Cord Injury

Eva Syková,*† Aleš Homola,*† Radim Mazanec,‡ Hynek Lachmann,‡
Šimona Langkramer Konrádová,§ Petr Kobylka,§ Radek Pádr,¶ Jíří Neuwirth,¶
Vladimír Komrská,# Vladimír Vávra,# Jan Štulík,** and Martin Bojar‡

*Center for Cell Therapy and Tissue Repair and Department of Neuroscience, 2nd Medical Faculty,
Charles University, Prague, Czech Republic

†Institute of Experimental Medicine, ASCR, Prague, Czech Republic

‡Department of Neurology, University Hospital Motol and 2nd Medical Faculty, Charles University, Prague, Czech Republic

§Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic

¶Department of Pediatric Hematology and Oncology, University Hospital Motol and 2nd Medical Faculty,
Charles University, Prague, Czech Republic

#Department of Imaging Methods, University Hospital Motol and 2nd Medical Faculty,
Charles University, Prague, Czech Republic

**Department of Spindylosurgery, University Hospital Motol, Prague, Czech Republic

Není nic silnějšího než myšlenka,
která přijde v pravý čas.

Victor Hugo

Čas pro buněčnou terapii a
tkáňové inženýrství právě nastal!