

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

**Aktuální možnosti terapeutického využití kmenových buněk**  
Bakalářská práce

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

**Current Possibilities of Therapeutic Use of Stem Cells**  
Bachelor Thesis

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2021/2022

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Heřmánková**  
Osobní číslo: **C21392**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Aktuální možnosti terapeutického využití kmenových buněk**  
Téma práce anglicky: **Current Possibilities of Therapeutic Use of Stem Cells**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

- 1) Vypracujte bakalářskou práci na téma aktuální možnosti terapeutického využití kmenových buněk. V úvodní části popište základní charakteristické vlastnosti kmenových buněk. Charakterizujte mikroprostředí kmenových buněk a definujte jejich základní členění.
- 2) Hlavní část bakalářské práce zaměřte na shrnutí aktuálních možností využití kmenových buněk. Popište způsob a možnosti transplantace kmenových buněk. Zaměřte se také na transplantaci kostní dřeně. Shrňte zároveň hlavní rizika transplantace kmenových buněk včetně možnosti vzniku maligní transformace.
- 3) Jako zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jana Báčová**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2021**

Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2022**

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc. v.r.**  
děkan

L.S.

**prof. Mgr. Roman Kand'ár, Ph.D. v.r.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Prohlašuji:

Práci s názvem „**Aktuální možnosti terapeutického využití kmenových buněk**“ jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách) ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30.6.2022

Kateřina Heřmánková v. r.

### **Poděkování:**

Touto formou bych velmi chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. za ochotu a trpělivost při konzultacích, za cenné rady a připomínky a za odbornou pomoc, která vedla k dokončení této práce.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce se zabývá problematikou aktuálních možností využití terapeutického účinku kmenových buněk v medicíně. Nejprve je popsán úvod do problematiky kmenových buněk a jejich základní charakteristika. Dále je uvedeno jejich rozdělení a charakteristické mikroprostředí. Hlavní část práce je zaměřena na aktuální využití kmenových buněk, na způsoby terapeutického využití a aplikace v medicíně. Dále jsou v práci shrnuty možnosti transplantace kmenových buněk a transplantace kostní dřeně pomocí nich. Závěrečná část práce pojednává o překážkách ve využívání kmenových buněk a jejich maligních transformacích.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kmenové buňky, niche, terapie, transplantace kostní dřeně, transformace kmenových buněk

## **TITLE**

Current Possibilities of Therapeutic Use of Stem Cells

## **ANNOTATION**

This bachelor's thesis deals with the issue of current possibilities of using the therapeutic effect of stem cells in medicine. First, an introduction to the issue of stem cells and their basic characteristics is described. The following are their distribution and characteristic microenvironment. The main part of the work is focused on the current use of stem cells, the methods of therapeutic use, and application in medicine. Furthermore, the work summarizes the possibilities of stem cell transplantation and bone marrow transplantation using them. The final part of the thesis deals with obstacles in the use of stem cells and their malignant transformations.

## **KEYWORDS**

stem cells, niche, therapy, bone marrow transplantation, stem cell transformation

# Obsah

Seznam ilustrací a tabulek .....	
<b>Seznam zkratk:</b> .....	<b>11</b>
<b>Úvod</b> .....	<b>13</b>
<b>1. Úvod do problematiky kmenových buněk</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Charakteristika kmenových buněk</b> .....	<b>16</b>
2.1 Totipotentní kmenové buňky .....	19
2.2 Pluripotentní kmenové buňky .....	19
2.3 Multipotentní kmenové buňky .....	19
2.4 Unipotentní kmenové buňky .....	19
<b>3. Niche kmenové buňky</b> .....	<b>20</b>
3.1 Embryonální kmenové buňky .....	22
3.2 Mesenchymální kmenové buňky.....	22
3.3 Hematopoetické kmenové buňky .....	23
3.4 Indukované pluripotentní kmenové buňky.....	23
<b>4. Organoidy a kultivace kmenových buněk</b> .....	<b>25</b>
4.1 Organoidy.....	26
<b>5. Využití kmenových buněk v medicíně</b> .....	<b>29</b>
5.1 Transplantace mesenchymálních buněk při léčbě Diabetu Mellitu I. a II. stupně .....	30
5.2 Kmenové buňky pro transplantaci jater při rozdílných krevních skupinách.....	31
5.3 Využití kmenových buněk při těžkém průběhu Covid-19 .....	32
5.4 Využití kmenových buněk v dermatologii a při popáleninách II. stupně .....	33
5.5 Kmenové buňky při léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy nemoci .....	35
5.6 Použití kmenových buněk ve stomatologii .....	35
5.7 Transplantace kostní dřeně a využití kmenových buněk .....	38
5.8 Využití kmenových buněk při procesech regenerace kostí, šlach, vazů a svalů .....	40



5.9	Využití kmenových buněk při léčbě infarktu myokardu a ischemických chorob.....	41
<b>6.</b>	<b>Překážky ve využívání kmenových buněk .....</b>	<b>43</b>
	<b>Závěr .....</b>	<b>45</b>
	<b>Použitá literatura .....</b>	<b>46</b>

## Seznam ilustrací a tabulek

Obrázek 1: <b>Popis dělení kmenových buněk</b> .....	18
Obrázek 2: <b>Mikroprostředí kmenové buňky</b> .....	21
Obrázek 3: <b>Mikroskopické snímky lidských pluripotentních kmenových buněk</b> .....	24
Obrázek 4: <b>Vznik organoidů z pluripotentních kmenových buněk</b> .....	28
Obrázek 5: <b>Strategie aplikace kmenových buněk v regenerativní medicíně</b> .....	29
Obrázek 6: <b>Makroskopický vzhled neošetřené a ošetřené popáleniny pomocí kmenových buněk</b> .....	34
Obrázek 7: <b>Lokalizace kmenových buněk v zubní tkáni</b> .....	37
Obrázek 8: <b>Schématické znázornění buněčné transformace specifických tkáňových kmenových buněk na rakovinné kmenové buňky</b> .....	44
Tabulka 1: <b>Vlastnosti mesenchymálních kmenových buněk a jejich kultivační média</b> .....	26
Tabulka 2: <b>Porovnání zdrojů kmenových buněk</b> .....	40

## **Seznam zkratek:**

**3D** – trojdimenzionální struktura

**ARDS** – syndrom akutní respirační tísně

**bFGF** – základní fibroblastový růstový faktor

**CD105** – transmembránový protein 105

**CD20** – transmembránový protein 20

**CD29** – transmembránový protein 29

**CD34** – transmembránový protein 34

**CD73** – transmembránový protein 73

**CD90** – transmembránový protein 90

**C-Myc** – *multifunctional transcription factor*

**CSC** – nádorové kmenové buňky

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**DPSC** – kmenové buňky zubní dřeně

**DPSCS** – kmenové buňky zubní dřeně

**EDTA** – kyselina ethylendiamintetraoctová

**FAD** – familiární forma Alzheimerovy choroby

**GFAP** – gliální fibrilární kyselý protein

**GVHD** – reakce štěpu proti hostiteli

**HBC** – virus hepatitidy C

**HBV** – virus hepatitidy B

**HIV** – *human immunodeficiency virus*

**HSC** – hematopoetické kmenové buňky

**Hsp90** – *heat shock protein 90*

**iPSC** – indukované pluripotentní kmenové buňky

**Klf4** – *kruppel-like factor 4*

**MSC** – mesenchymální kmenové buňky

**Oct4** – *octamer-binding transcription factor 4*

**PBS** – fosfátový pufovaný fyziologický roztok

**PDLSC** – kmenové buňky paradontálních vazů

**SAD** – sporadická forma Alzheimerovy choroby

**SCAP** – kmenové buňky z apikální papily

**SHED** – kmenové buňky mléčných zubů

**SOx2** – *sex determining region Y*

**TGF- $\beta$**  – *transforming growth factor  $\beta$*

**TNF- $\alpha$**  – *tumor necrosis factor  $\alpha$*

## Úvod

Využití kmenových buněk v medicíně se v současné době řadí mezi slibné možnosti terapie řady onemocnění. Aktuálně se kmenové buňky testují a využívají k léčbě degenerativních onemocnění, chronických onemocnění, k léčbě rakoviny a poškozených tkání. Kmenové buňky jsou hojně využívány v medicíně, ale i v genovém inženýrství. Dominantní vlastností kmenové buňky je schopnost její sebeobnovy, diferenciací v jiné buněčné typy a plasticita. Kmenové buňky se dělí dle diferenčního potenciálu na buňky totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. Mezi první kmenové buňky, které vzniknou po splnutí vajíčka a spermie řadíme buňky embryonální. Následně se v organismu vyskytují i buňky mesenchymální (MSC), které mají v medicíně jeden z největších potenciálů a často se o ně vědci a lékaři při studiích opírají. Dalšími buňkami jsou hematopoetické kmenové buňky, které se podílí na tvorbě krevních elementů a indukované kmenové buňky, které jsou hojně využívány v genovém inženýrství.

Historická data dokazují, že terapie pomocí kmenových buněk se stále vyvíjí a má slibný potenciál. Velké problémy působí vědcům a lékařům zvyšující se počet neregulovaných pracovišť, která pracují s kmenovými buňkami a dávají tím falešné přísliby ohledně terapie pomocí kmenových buněk. Řada studií, které se zabývají touto problematikou, je prováděna především na zvířatech a trvá roky, než mohou být zahájeny klinické studie na lidech. Terapie pomocí kmenových buněk je regulována etickými otázkami a zákony. V České republice byl regulační zákon zaveden v roce 2006. Tato práce je zaměřena především na využívání terapeutického účinku mesenchymálních kmenových buněk a popisuje jejich využívání v medicíně. Terapeutických účinků kmenových buněk se aktuálně využívá například v neurologii, dermatologii ortopedii, stomatologii, při transplantacích kostní dřeně a jater, při léčbě Diabetu mellitu a existují tendence o jejich využití i v léčbě pacientů po prodělaném onemocnění Covid-19.

# 1. Úvod do problematiky kmenových buněk

Kmenové buňky a jejich využití jsou v současnosti velmi probíraným tématem v medicíně či vědeckých výzkumech. Kmenové buňky jsou schopny se přeměnit na jiný typ buňky a díky těmto buněčným transformacím lze případně opravit vzniklé poškození v organismu. Regenerativní medicína pomocí těchto schopností využívat a manipulovat kmenovými buňkami zapříčinila mnohé technické pokroky. Mezi tyto technické pokroky řadíme analýzu transkriptomu napomáhající vědcům porozumět kmenovým buňkám na molekulární úrovni. Transgenní modely umožnily sledování kmenových buněk při proliferaci a diferenciaci do specifických somatických linií (Alexander et al., 2015). Jako jedny z prvních hojně využívaných kmenových buněk pro vědecké účely můžeme označit buňky hematopoetické. Povaha kmenových buněk spolu s regenerační a obnovující funkcí vyvolávají myšlenky o možných léčbách pomocí kmenových buněk, kde současně dostupná léčba selhává. Tyto otázky vedly k založení institutů, které se zabývají otázkou vývoje kmenových buněk a zahájení klinických zkoušek na zvířecích modelech a postupem času i klinických studií na lidech. Je reálné, že v budoucnu by mohla být vyvinuta reprodukční technika, která by vytvořila lidi s podobnými vnějšími charakteristikami, což se morálně jeví jako velmi chybné (Charitos et al., 2021).

Využití a výzkum kmenových buněk je spjat se spoustou etických otázek a problémů. Jsou dva různé úhly pohledu, jak lze na danou problematiku nahlížet. Z jedné strany se jedná o velmi inovativní a úspěšné metody pro léčbu onemocnění, což činí výzkum kmenových buněk zcela nepostradatelný. Na druhé straně jsou etické otázky například při využívání embryí, zneužití v genovém inženýrství, tvorba teratomů a celkově bezpečnost kmenových buněk v medicíně. Mezinárodní společnosti pro výzkum kmenových buněk (ISSCR) byly vytvořeny směrnice, které výše uvedené regulují. Jeden z možných zdrojů kmenových buněk je kadaverózní embryonální tkáň vzniklá po spontánním či dobrovolném potratu, kde je samozřejmě nutné, aby žena podepsala souhlas se zpracováním tohoto materiálu, avšak vytváření embryí pro výzkumné účely je zakázáno (Charitos et al., 2021).

Z historického hlediska kmenové buňky procházely různými milníky. V roce 1981 došlo k identifikaci embryonálních kmenových buněk u myši (Coghlan, 2014). V roce 1997 byl představen první umělý klon zvířete ovce Dolly, který vznikl procesem fúze ovčího vejce s buňkou vemene a implantací hybridu do náhradní matky. Na základě těchto poznatků pomocí fúze z lidských embryonálních kmenových buněk spolu s buňkami od dospělé osoby, by mohli zapříčinit vznik geneticky totožné tkáně a orgánů. V roce 1998 v Baltimoru došlo k izolaci

embryonálních buněk a následné kultivaci v laboratoři. V roce 2001 bylo omezeno federální financování výzkumu lidských embryonálních kmenových buněk z důvodu zničení embrya, bylo však umožněno dokončit výzkum pomocí získaných buněk před tímto oznámením. V roce 2006 v Japonsku byl ukázán způsob, jak získat embryonální kmenové buňky z dospělých buněk, aniž by muselo dojít k poškození embrya. Pomocí přeprogramování dospělé buňky a vložení do ní čtyř genů byly získány indukované pluripotentní kmenové buňky (Coghlan, 2014). Ernst Haeckel (1834-1919) při uplatnění mendelovského koncepčního myšlení uvedl do praxe fenogenetiku a tvrdil, že u mnohobuněčných bytostí existuje takzvaná první linie a označil tuto linii jako kmenové buňky, kterou nazval *Stammzellen*, což vedlo k fylogenezi a následně představil teorii hematopoézy (Charitos et al., 2021).

## 2. Charakteristika kmenových buněk

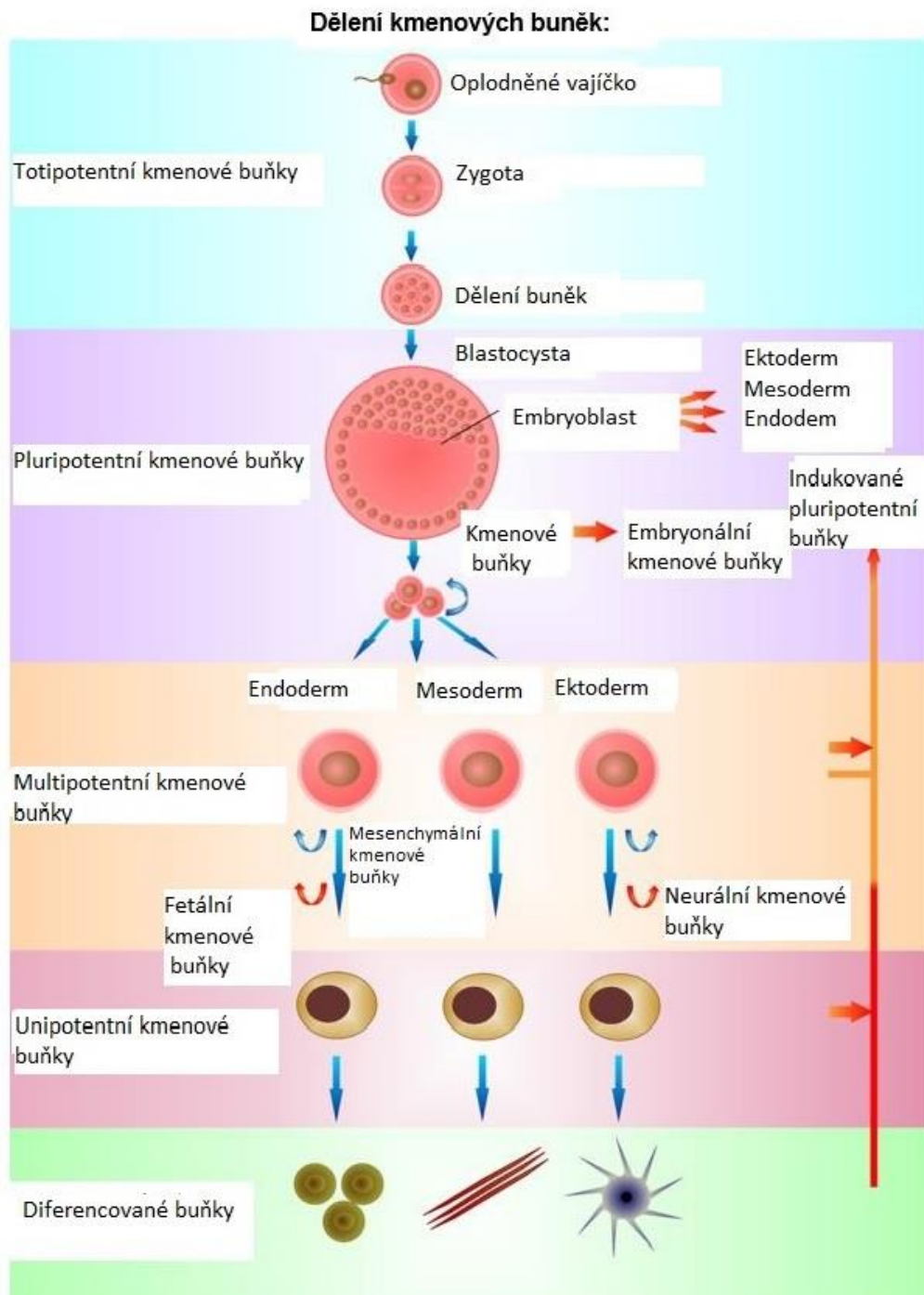
Jedná se o nesespecializované buňky lidského těla bez proteinů, jejichž hlavní rys je neomezená schopnost sebeobnovy a diferenciaci v dospělé buněčné typy. Další podstatnou funkcí kmenových buněk je plasticita, která se využívá pro buněčnou terapii (Smetana et al., 2010). Plasticitu, či též transdiferenciaci lze definovat jako vzájemnou zastupitelnost orgánově specifických buněk. Orgánově specifická kmenová buňka v tkáni produkuje diferenciované elementy, které jsou specifické pro danou tkáň. Díky tomu jsou kmenové buňky za specifických podmínek schopny tvořit části, které se v původní tkáni nenachází. Jedná se tedy o fenotypový potenciál těchto buněk, který je daleko rozsáhlejší než fenotyp buněk již diferenciovaných ve výchozích tkáních. Mezi buňky, které podléhají transdiferenciaci, řadíme buňky neurální, které jsou schopny produkovat hematopoetické kmenové buňky, dále také stromální buňky kostní dřeně, které mohou tvořit buňky gliové, kardiomyocyty, hepatocyty nebo pneumocyty (Yamanaka et al., 2020). Nervové kmenové buňky jsou vědci hojně využívány právě kvůli jejich plasticitě. Mohou se přeměnit do různých fenotypů uvnitř i vně nervového systému, mají schopnost sebeobnovy. Nervové kmenové buňky díky plasticitě lze využít pro testování neurotoxicity, buněčné terapie pro léčbu centrální nervové soustavy. Další využití má plasticita při validaci a testování léčiv (Ottoboni et al., 2020).

U dospělých kmenových buněk probíhá dělení asymetricky, které zajišťuje nekonečnou zásobu kmenových buněk v tkáních. Pomocí mitotického dělení vznikají dvě buňky dceřiné, které mají stejné vlastnosti jako buňka mateřská. Vlivem asymetrického dělení je druhá buňka dceřiná více diferenciována se schopností tvořit specifické struktury. Oproti tomu první buňka dceřiná je fenotypově shodná s mateřskou. Samozřejmě vždy záleží na podmínkách a potřebě daného organismu, a proto si kmenové buňky zachovávají schopnost dělit se i symetricky, a to ve fázi embryonálního vývoje. To znamená, že z buňky mateřské vzniknou dvě typově stejné buňky dceřiné, které mohou být o stupeň více diferenciované, než byla buňka mateřská. Buňky lidského těla vznikly z buněk kmenových. Následně kmenové buňky vytvářejí tkáň a podílí se na udržení homeostázy (Smetana et al., 2010). Kmenové buňky najdeme ve fetální, embryonální ale i dospělé fázi života, kde jdou plně diferenciované a využity jako stavební kameny orgánů a následně mohou sloužit i k obnově orgánů (Kolios et al., 2013). Dospělé kmenové buňky v organismu přežívají po celý život jedince a zůstávají v neproliferativním stavu, tedy v klidu. Toto stádium chrání DNA buněk před různými mutacemi, které mohou získávat po několika sobě následujících děleních.



Dospělé kmenové buňky v klidovém stádiu nalezneme hlavně ve tkáních s nízkou buněčnou obnovou jako jsou svaly a mozek. Opakem jsou střeva a kůže kde dochází k časté obnově (Úrban et al., 2021). Buňky dělíme dle diferenčního potenciálu. Vznik první kmenové buňky nastává po splynutí spermií a vajíčka a následně začíná okamžité dělení (**obr. 1**). Na základě diferenčního potenciálu rozdělujeme kmenové buňky do tříd na totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní. Dále rozlišujeme embryonální a dospělé kmenové buňky a jejich typy (Smetana et al., 2010).

Zobrazení kmenových buněk různými metodami poskytuje o kmenové buňce důležité informace, a to například její umístění, úroveň exprese proteinů, životaschopnost, stav diferenciace a interakce mezi buňkami a přilehlou tkání. Kmenová buňka musí být označena přímo či nepřímo kontrastně. Označené buňky jsou purifikované od neoznačených, aby se získal buněčný produkt o vysokém signálu. Doručení kmenových buněk do příslušné tkáně přesně a hlavně efektivně může být obtížné, proto jsou cíle jasné. Buňky se musí dostat do poraněných míst, musí se zamezit poškození hostitelské tkáně a udržet proliferaci a životaschopnost kmenových buněk, a to především zamezit vzniku teratomu (Wang et al., 2016).



Obrázek 1: **Popis dělení kmenových buněk** – od splynutí vajíčka se spermií, po plně diferencované buňky, (upraveno dle, Forostyak et al., 2016).

## **2.1 Totipotentní kmenové buňky**

Totipotentní kmenové buňky mají schopnost se rozdělit a diferenciovat do buněk celého organismu. Buňky s nejvyšším diferenciacním potenciálem umožňující tvořit embryonální a extraembryonální struktury (placenta, pupečník a embryonální obaly). Jako příklad totipotentní buňky lze označit zygotu, která vzniká po splynutí vajíčka a spermie. Totipotentní buňky se následně mohou vyvinout do zárodečných listů ektoderm, mezoderm a endoderm. Tyto kmenové buňky najdeme u plodu do 4. dne od splynutí vajíčka a spermie (Zakrzewski et al., 2019). Buňky ranných stádií embrya jsou jediné totipotentní buňky a nejsou klinicky využívány z důvodu etických obav (Maniar et al., 2015).

## **2.2 Pluripotentní kmenové buňky**

Pluripotentní kmenové buňky jsou určeny pro regenerativní medicínu. Mají neomezenou schopnost sebeobnovy a diferenciacce do všech buněčných typů procesem pluripotence. Dávají vznik tkání u potenciálního embrya a umí se diferencovat do všech tří zárodečných vrstev, z nichž se vyvíjí tkáně a orgány. Pluripotentní buňky jsou hojně využívány pro výzkum, jako je například studium a modelace nemocí, vývoj léčiv a v neposlední řadě genová terapie (Barati et al., 2021).

## **2.3 Multipotentní kmenové buňky**

Multipotentní kmenové buňky jsou tkáňové specifické buňky, které umí tvořit jen některé tkáně, přesněji jsou to buňky odvozené z jedné zárodečné vrstvy. Tyto buňky jsou schopny setrvat v organismu celý život a regulovat ho. Typickým příkladem je hematopoetická kmenová buňka, která se podílí na vzniku krevních elementů, jako jsou krevní destičky nebo krvinky (Zakrzewski et al., 2019). I mesenchymální kmenové buňky jsou označovány jako multipotentní (Kolios et al., 2013).

## **2.4 Unipotentní kmenové buňky**

Unipotentní kmenové buňky se vyznačují schopností opakovaného dělení, ale jejich schopnost diferenciacce je pouze velice úzká. Příkladem unipotentní kmenové buňky je spermatogonie, což je samčí prapohlavní buňka. Potenciál tyto buňky nachází v regenerativní medicíně (Zakrzewski et al., 2019).

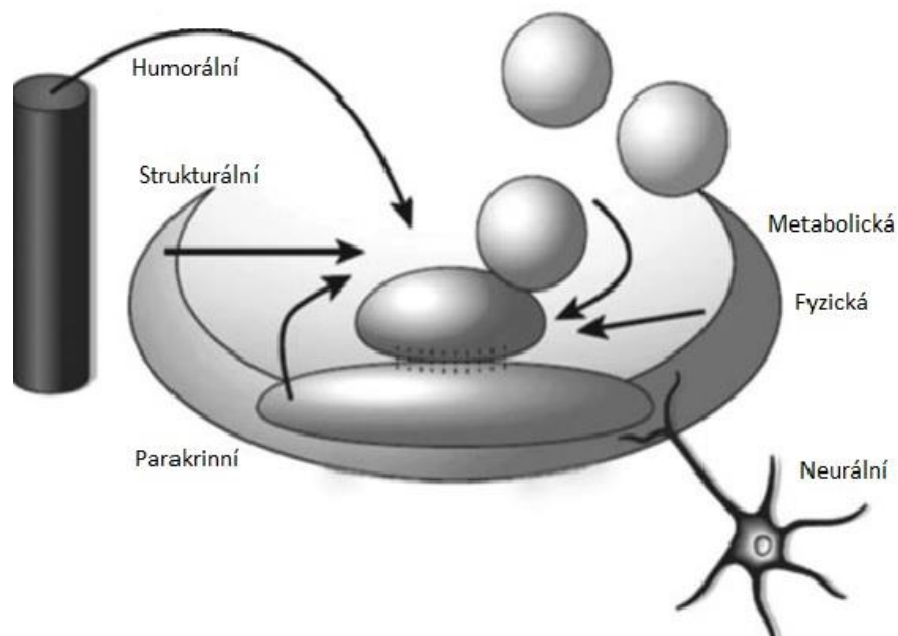
### 3. Niche kmenové buňky

Mikroprostředí buňky takzvané „niche“ hostí kmenové buňky a reprezentuje podstatnou složku homeostázy organismu. Při poruchách homeostázy dochází v organismu k dysfunkcím a k možnému vzniku nádorového bujení. Při izolaci a vložení buněk do tradičních kultur dochází u buněk ke ztrátě funkčních diferenciací. Díky ovlivňování mikroprostředí v buněčné kultuře lze buňkám navrátit pomocí paměti jejich původní specifické tkáňové znaky. Na složení mikroprostředí se podílejí podpůrné, vazivové a endotelové buňky. Následně se na organizaci podílí i extracelulární komponenty jako jsou bazální membrána, extracelulární matrix a vazivová vlákna. Složení „niche“ je závislé na typu tkáně, ve které se nachází. U buněk z „niche“ dochází k produkci signálních molekul, které ovlivňují lokální kmenové buňky, a to pomocí vložení se do buněčné membrány a navázání přímého buněčného kontaktu pomocí integrity a adhezních molekul nebo signální molekuly mohou být uvolňovány do okolí díky cytokinům a růstovým faktorům. Soubory výše zmíněných faktorů ovlivňují „niche“, sebeobnovu kmenových buněk, produkci potomstva a diferenciaci (Ansougrová et al., 2009).

Mezi pevnou součástí mikroprostředí řadíme buňky stromální podpůrné, včetně adhezivních faktorů, které se nachází blízko kmenových buněk. Dále proteiny extracelulární matrice, které lze označit jako „kotvy“ tvořící mechanické lešení pro přenos signalizace kmenových buněk. Další součástí jsou krevní cévy, které přenášejí živiny a signály do „niche“ z jiných orgánů. V neposlední řadě jsou to i nervové vstupy, které podporují mobilizaci kmenových buněk a jejich mikroprostředí a integrují signály z různých orgánových systémů. Mikroprostředí (**obr. 2**) kmenové buňky je prostředí, kde na sebe vzájemně působí humorální, neurální, lokální, fyzické a metabolické podmínky. Všechny tyto podmínky mají na starost regulaci kmenové buňky (Ferraro et al., 2010).

Při mitotickém dělení zůstává v mikroprostředí jedna buňka kmenová a dceřiná buňka putuje mimo toto prostředí, kde následně podléhá diferenciaci. Kmenová buňka, která zůstala v „niche“, má schopnost sebeobnovy. Při uvolnění kmenové buňky z „niche“ nedochází k vymezování buněk pomocí lokálních faktorů. Prázdné „niche“ je schopno přijmout jiné exogenní kmenové buňky. Množství „niche“ ve tkáni se mění, lze jej vyvolat nebo může zaniknout. Při dlouhodobém dráždění, které by mělo vést ke změnám v mikroprostředí buňky a následnému narušení homeostázy, může zapříčinit rakovinové bujení (Ansougrová et al., 2009).

Značná část specifického mikroprostředí byla identifikována v různých savčích tkáních. V trabekulární kostní dřeni se hematopoetické kmenové buňky nachází blízko endosteálního povrchu u osteoblastických buněk a krevních cév. V kůži se epiteliální kmenové buňky nacházejí v oblasti vyboulených vlasových folikul, které jsou důležité pro regeneraci vlasového folikulu. Zatímco bazální keratinocyty, což jsou kmenové buňky připojené k bazální membráně, se podílí na výměně interfolikulární epidermis. U centrální nervové soustavy byly neurální kmenové buňky popsány v subventrikulární zóně a v subgranulární zóně *gyrus dentatus* v hippocampu. V těchto oblastech dochází k tomu, že neurální kmenové buňky exprimují astrocytový marker gliální fibrilární kyselý protein (GFAP). GFAP pozitivní astrocyty v subgranulární a subventrikulární zóně dávají vznik neuroblastům a zralým neuronům. Střevní kmenové buňky jsou uloženy ve spodní části střevní krypty mezi Panethovými buňkami. Okolí krypt je bohaté na střevní neurony a krevní cévy. V blízkosti krypt najdeme též specializované mesenchymální kmenové buňky známé jako myofibroblasty. Ve svalech jsou kmenové buňky označeny jako satelitní buňky a jsou umístěny podél svalových vláken připojených k plazmatické membráně, která obléhá každický svazek svalových vláken (Ferraro et al., 2010).



Obrázek 2: **Mikroprostředí kmenové buňky** – vzájemné působení humorálních, neurálních, lokálních, fyzických a metabolických podmětů, (upraveno dle Ferraro et al., 2010).

Mezi typy kmenových buněk řadíme dospělé kmenové buňky jako jsou například mesenchymální kmenové buňky a dále embryonální kmenové buňky, kam například řadíme indukované pluripotentní kmenové buňky. Při získání správného signálu se kmenová buňka diferencuje. Klasifikace se provádí na základě původu kmenových buněk (Kolios et al., 2013).

### **3.1 Embryonální kmenové buňky**

Embryonální kmenové buňky pocházející z časné fáze vývoje embrya. Jsou odvozeny z vnitřní buněčné hmoty blastocysty, a to ještě před tím, než se zabudují do děložní stěny. Tyto sebeobnovující se buňky jsou původem totipotentní a jsou schopny produkovat buňky zárodečných listů (Klabusay et al., 2005). Po splnutí vajíčka a spermie dochází k vytvoření blastocysty, která se skládá z vnitřní buněčné hmoty a trofektodermu. Vnitřní strana blastocysty obsahuje embryonální kmenové buňky. Blastocysty regulují mikroprostředí vnitřní buněčné hmoty, oproti tomu trofektoderm se nadále vyvíjí a tvoří extraembryonální podpůrné struktury, například placentu. Následně, když se embryonální kmenové buňky diferencují na jednu ze zárodečných vrstev, stávají se z nich multipotentní kmenové buňky (Zakrzewski et al., 2019).

### **3.2 Mesenchymální kmenové buňky**

Mesenchymální multipotentní sebeobnovující se buňky jsou zkoumány díky svému skvělému buněčnému potenciálu v oblastech tkáňového inženýrství. Dominují schopností se diferenciovat do myoblastů, chondroblastů, fibroblastů, adipocytů, stromálních buněk a osteoblastů. Lehce rostou v kultivačních miskách a produkují různé růstové faktory, cytokiny i mikroRNA, která může signalizovat jiným buňkám a tkáním a mohou působit imunopresivně (Pittenger et al., 2019). Zdroj mesenchymálních kmenových buněk může být například pupečník, kostní dřev, tuková tkáň, menstruační krev a polypy endometria. U ženy za celý její život proběhne zhruba 400 cyklů menstruace. Bylo zjištěno, že mesenchymální kmenové buňky (MSC) se dají zcela neinvazivně získat z menstruační krve. Tyto buňky mají schopnost se po většině diferenciovat na svaly, a to především na srdeční sval, protože buňky disponují myogenní schopností. Následně se tyto buňky umí *in vitro* diferenciovat na neurony (Ding, 2011). Mesenchymální kmenové buňky lze snadno získat z tkání, mají schopnost samovolné migrace do poškozených tkání, když jsou zavedeny do těla a vylučují faktory nezbytné pro neuroprotektci. Za vhodných podmínek jsou schopné diferenciaci na neuronální

fenotypy. Používání mesenchymálních kmenových buněk není eticky regulováno. Experimenty prokázaly možnost transplantace autologních MSC u pacientů s mozkovou mrtvicí, mozkovou obrnou, roztroušenou sklerózou. Mesenchymální kmenové buňky mají výjimečné schopnosti a jednou z nich je například migrace díky chemotaxi do tkání, které vykazují známky poškození a zánětu (Boika et al, 2020).

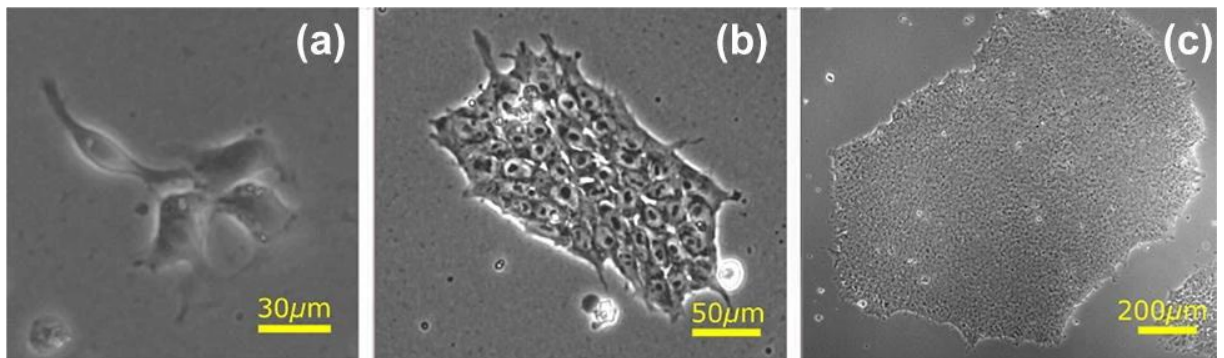
### 3.3 Hematopoetické kmenové buňky

Jedná se o tkáňově specifické sebeobnovující se multipotentní buňky, které lze izolovat z kostní dřeně. Nachází se v krevních tkáních, kde mohou tvořit krevní buňky jako jsou erytrocyty, leukocyty a trombocyty, které jsou schopny samoobnovy a vyšší produkce hematopoetických kmenových buněk. V lidské i myší populaci představují hematopoetické kmenové buňky až 0,05 % buněk v kostní dřeni (Morrison et al., 1995). Klinicky se tyto buňky využívají při transplantacích kostní dřeně, či jako kurativní léčba pro řadu hematologických onemocnění. Hematopoetické kmenové buňky si udržují díky svému mikroprostředí, ve kterém se nachází další molekulární a metabolické složky. Díky narušení metabolických drah, může dojít k různým hematologickým patologiím a ty se pak mohou projevit, jako onemocnění zvané leukémie. Při transplantacích hematopoetických kmenových buněk je schopen krevní systém zcela začlenit do sebe transplantované kmenové buňky a udržovat hematopoézu (Wilkinson et al., 2018).

### 3.4 Indukované pluripotentní kmenové buňky

Lidské indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC) byly poprvé stanoveny z kožních fibroblastů. Je snaha, aby tyto kmenové buňky byly získávány nejmenší invazivní cestou (**obr. 3**). Jako dobrý generátor těchto buněk se dá označit pupečnicková krev, která obsahuje nezralé buňky se znakem CD34 a tím pádem je vhodným zdrojem indukovaných pluripotentních kmenových buněk, a to hlavně díky dostupnosti a jistotě mimina genetických mutací. Další zdroj je periferní krev, a to zejména v ní nacházející se T-lymfocyty, které mohou být převedeny na iPSC metodou přechodné exprese (Ohnuki et al., 2015). iPSC se dají označit jako velmi přínosné pro různé buněčné terapie. Přestože se pluripotence přirozeně vyskytuje jen u embryonálních kmenových buněk, je možné přimět terminálně diferencované buňky, stát se opět pluripotentními (Zakrzewski et al., 2019).

K pluripotenci dochází vlivem přeprogramování přes indukce genů a faktorů (Ye et al., 2013). Pomocí transkripčních faktorů Oct4, SOx2, Klf4 či C-Myc, které jsou aplikovány do buňky, se dospělá diferenciovaná buňka může přeměnit na indukovanou pluripotentní buňku. Jedná se o postup zpětného vývoje buňky, kde je plně specializovaná buňka reprogramována na buňku nediferenciovanou. Tento proces zajišťuje u indukovaných pluripotentních kmenových buněk jejich molekulární a funkční podobnost s buňkami embryonálními. Po vložení specifických faktorů do kultivačních médií jsou iPSC schopny tvořit všechny třídy buněk, které člověk má (Vodičková et al., 2016). iPSC, které se generují pomocí transdukce, která je založená na retroviru obsahující čtyři transkripční faktory, může zapříčinit inserční mutagenéze, což může zároveň poukazovat na nebezpečnost těchto buněk (Tamama et al., 2016).



Obrázek 3: **Mikroskopické snímky lidských pluripotentních kmenových buněk** – nárůst z několika kolonií (a), růst stovek buněk (b), růst tisíců buněk (c), (upraveno dle Wadkin et al., 2020).



## 4. Organoidy a kultivace kmenových buněk

Správný vývoj buněčné kultury *in vivo* je podmíněn řadou vysoce citlivých monitorovacích procesů s řídicími algoritmy. Podmínky na kultivaci kmenových buněk jsou dány dle druhu kultivace kmenové buňky. Dále se kultivace kmenových buněk rozlišuje dle účelu využití. Zda-li jsou buňky určeny pro výzkum nebo buněčnou terapii. Proto je třeba parametry těchto buněčných kultur upřesnit dle konečného účelu kultury kmenových buněk. Nejčastěji využívané kmenové buňky, pěstované jako buněčné kultury, jsou buňky embryonální, pluripotentní a dospělé kmenové buňky. Kultivační médium je vybráno tak, aby napomáhalo ke vzniku, co možná největšího množství buněk, které jsou třeba pro biochemické výzkumy (**tab. 1**). Vzhledem k různorodosti kmenových buněk, neexistuje jedno optimální univerzální médium pro jejich pěstování. Na optimalizaci kultivačních médií se podílí též růstové faktory, či cytokiny. Jeden z těchto faktorů je základní fibroblastový růstový faktor (bFGF), který je do média vložen pro regulaci diferenciaci kmenových buněk. Následně jsou buňky obvykle pasážovány pod digestoří s laminárním prouděním a uloženy v inkubátorech pod atmosférickým parciálním tlakem kyslíku, který má vyšší hodnoty, než hodnoty uvnitř buněčné kultury (Sanden et al., 2010).

Kultivace mesenchymálních kmenových buněk je založena na adhezi jednotlivých buněk k plastovému povrchu misky. MSC jsou homogenní populace, která na svém buněčném povrchu nese znaky transmembránových proteinů CD105, CD73, CD90 a CD29. Tyto znaky jsou detekovány průtokovým cytometrem (Oswald et al., 2004).

Průběh kultivace a izolace mesenchymálních kmenových buněk má následující postup. Před zahájením kultivace je potřeba odebrat 5-7 ml aspirátu kostní dřevě. Tento aspirát je následně třeba zředit fosfátovým pufovaným fyziologickým roztokem (PBS). Dále je přidán do této suspenze 0,5% roztok lidského sérového albuminu. 20 ml roztoku je třeba navrstvit přes roztok *Percoll*. Následuje centrifugace po dobu 30 minut. Buňky monomolekulárního rozhraní jsou získány a protlačeny přes nylonové síto a následně 2x promyty v PBS. Dále jsou tyto buňky nasazeny do baňky o obsahu 72 cm<sup>2</sup>, která obsahuje *Dulbecco's-modified Eagle's Medium Low Glucose*. V baňce se nachází i antibiotika a *GlutaMAX I* (Oswald et al., 2004).

Buněčné kultury MSC rostou při 37 °C v 5 % CO<sub>2</sub>. Buňky, které neadherovaly, jsou odstraněny po 24 hodinách při promývání roztokem PBS. Médium těchto buněk je měněno každé 4 dny. Po dvou týdnech již kultura dosáhne 90 % svého nárůstu. MSC jsou izolovány roztokem 0,25 % trypsinu EDTA a znovu nanášeny v hustotě 5000-6000 buněk na cm<sup>2</sup>.

Následně se buňky kultivují na požadované kultury v prostředí daného média. Poté probíhá diferenciaci na osteocyty, adipocyty a endoteliální buňky (Oswald et al., 2004).

V buněčné terapii lze využít pro růst a diferenciaci kmenových buněk i grafen a jeho deriváty. Vzhledem k tomu, že grafen má aromatickou i uhlíkovou síť, tak může fungovat kovalentně, nebo nekovalentně s biomolekulami. Grafen vykazuje biokompatibilitu s buňkami a napomáhá adhezi, diferenciaci a proliferaci. Jeho schopnosti se využívají při transplantacích mesenchymálních kmenových buněk díky  $\pi$ - $\pi$  vazbám grafenu. Též bylo zjištěno, že grafen může sloužit, jako plocha pro navázání růstových faktorů (Zakrzewski et al., 2019).

Tabulka 1: **Vlastnosti mesenchymálních kmenových buněk a jejich kultivační média,**  
(upraveno dle Tekkatte et al., 2010)

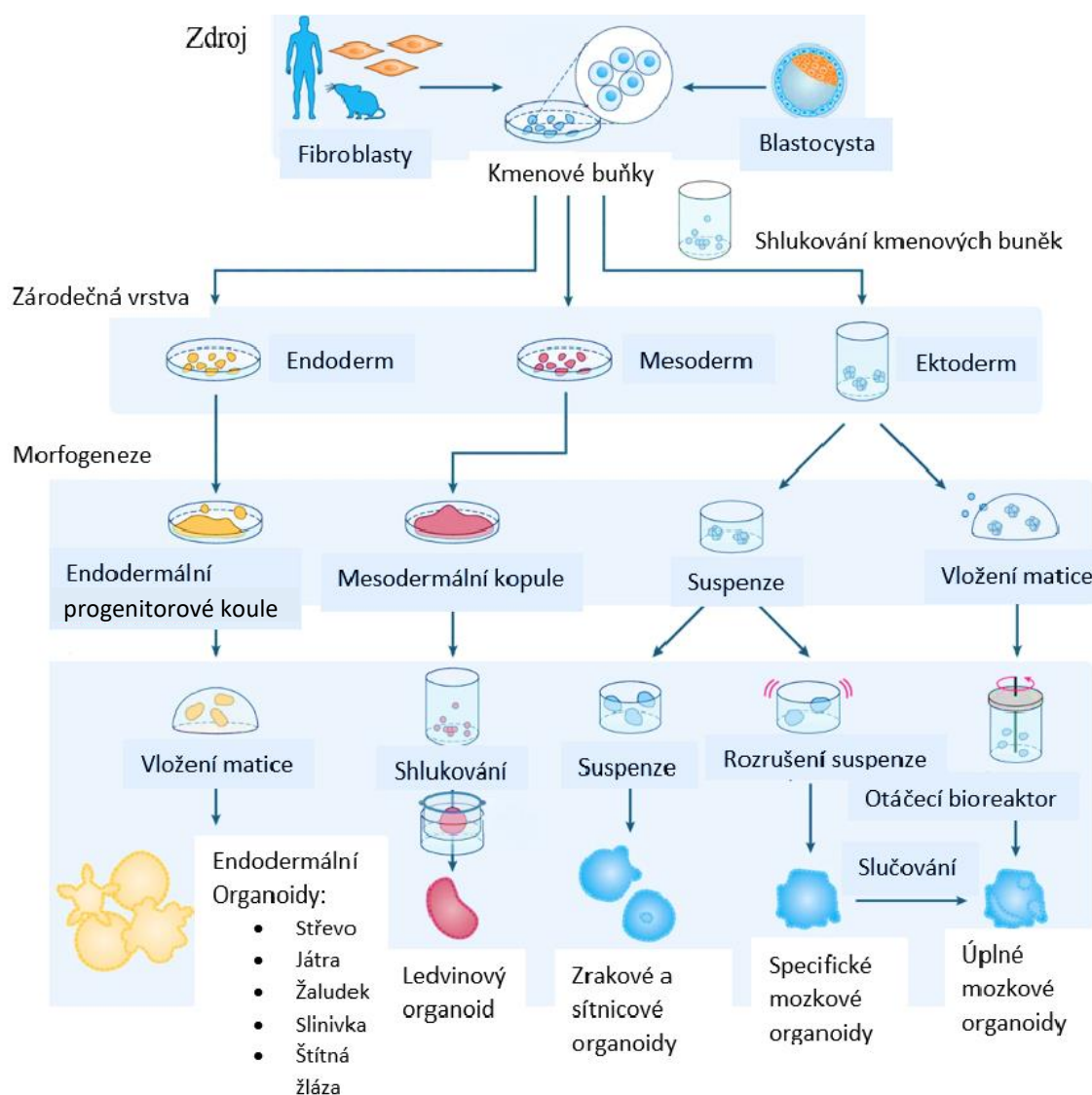
Vlastnosti MSC/ kultivační média	Fetální hovězí sérum	Chemicky definovaná média	Lidské sérum	Sérum z pupečnickové krve	Lyzát lidských krevních destiček (HPL)/plazma bohatá na krevní destičky (PRP)
<b>Přilnavost k plastru</b>	+	+	+	+	+
		Nutnost přidat adhezivní faktory	V pozdějším pasážování se snižuje		
<b>Morfologie</b>	Vřetenovité	Více vřetenovité	Menší a více vřetenovité	Protáhlé a více vřetenovité	Protáhlé a více vřetenovité (HPL). Menší buňky v (PRP)
<b>Cena a dostupnost</b>	Dostupnost v některých zemích	Komerčně dostupné, drahé	Dostupné, levnější	Dostupné, levnější	Dostupné, levnější

## 4.1 Organoidy

Organoidy jsou trojrozměrné struktury odvozené z dospělých kmenových buněk, které jsou vázány na specifickou buněčnou linii, tkáň, či orgán. Jsou hojně využívány pro pěstování *in vitro* jako zjednodušený minimalizovaný orgán. Na těchto modelech dochází k demonstracím onemocnění, testování léčiv a v neposlední řadě k testování buněčné terapie. Organoidy doplňují, či zcela nahrazují experimenty na zvířatech při různém vývoji léčiv, jsou schopny demonstrovat orgán při různém testování léčby například u pacientů s rakovinou. Jeden z velkých cílů práce s orgánoidem je vytvořit samostatně fungující orgán, který bude moci být transplantován člověku a fungovat zcela plnohodnotně (Bock et al., 2021).

Organoid vzniká naočkováním jednotlivých kmenových buněk nebo jejich shluků do matice, jako je hydrogel „Matrigel“, která představuje jejich prostředí, v němž se přirozeně nachází. Pomocí signálních drah dochází u buněk k jejich proliferaci, diferenciaci, migraci a růstu do trojrozměrné struktury (**obr. 4**). Například střevní organoidy, které pochází z dospělých kmenových buněk rostou do jednovrstvých koulí, kde následně dochází k vývinu kryptovitých výčnělků představující žlázový epitel. Střevní organoidy jsou schopny produkovat hlen, absorbovat a vylučovat biomolekuly a udržovat integritu bariéry epitelu (Hofer et al., 2021).

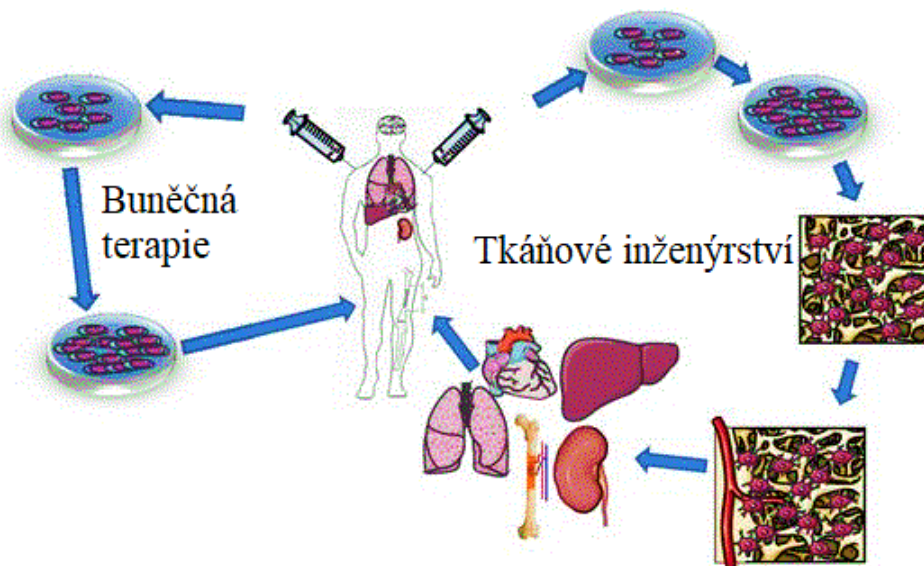
Organoidy tvořené z dospělých kmenových buněk mohou být donekonečna rozšiřovány, a proto je můžeme považovat za velmi bohatou zásobárnu netransformovaných primárních buněk. Organoidy vzniklé z pluripotentních kmenových buněk jsou možností pro modelování vývojových stádií organogeneze nebo orgánů, jako je například mozek, ze kterého nelze jednoduše získat vzorek tkáně. *In vivo* organoidy rostou, diferencují se a získávají požadovanou funkci zvoleného orgánu. Pluripotentní kmenové buňky agregují a tvoří embryoidní těla, která jsou následně vložena do extracelulární matrice a umístěna do bioreaktoru, což je zařízení simulující umělé prostředí vhodné ke kultivaci buněk (**obr. 4**). V tomto zařízení dochází k diferenciaci buněk a postupné tvorbě samoorganizovaných neuroepiteliálních struktur obsahující napodobeniny částí mozku. Z indukovaných kmenových buněk lze tvořit organoidy odvozené od endodermu, a to gastrointestinální a respirační organoidy. Indukované kmenové buňky se diferencují na endodermální progenitory, které se vloží do matrice bohaté na proteiny, kde dochází ke zrání a tvorbě struktur připomínající jednotlivé orgány, taktéž obsahují mesenchymální epitel a jsou větší. Při jejich zavedení je následně nelze snadno rozšiřovat jednoduchým pasážováním (Hofer et al., 2021).



Obrázek 4: **Vznik organoidů z pluripotentních kmenových buněk** – kmenové buňky jsou nasazeny do matrice, která napodobuje jejich „niku“ ve které se buňky přirozeně vyskytují. Za vhodných signalizačních podmínek dochází k proliferaci, diferenciaci, migraci a selekci. Buňka vyvine svůj tvar a následně charakteristicky zraje. Tento proces vede ke konečné 3D struktuře v podobě organoidu (upraveno dle Hofer, 2021).

## 5. Využití kmenových buněk v medicíně

V roce 1992 Leland Kaiser zavedl termín „regenerativní medicína“ s vizí, že se vyvine nový obor medicíny, který bude usilovat o změny léčby v průběhu chronických onemocnění a bude se snažit regenerovat unavené selhané orgány (Schmitt et al., 2012). Terapie pomocí kmenových buněk je už reálně hojně využívána pro léčbu řady onemocnění. Přínos pro medicínu bude ještě jednoznačně velký. Je však ještě potřeba dlouhého bádání a testování na zvířecích modelech, organoidech a následně na člověku. Cílem je vyvinout samostatně pracující a fungující orgán nebo aspoň ulevit pacientovi od nákladných farmakologických léčebných procesů, či zmírnit případné projevy onemocnění (Zakrzewski et al., 2019). Kmenové buňky do organismu můžeme vpravovat pomocí intravenózních, intraarteriálních a intratekálních aplikací nebo naopak je možnost tyto buňky aplikovat do poškozených tkání (Neckař et al., 2015).



Obrázek 5: Strategie aplikace kmenových buněk v regenerativní medicíně.

(upraveno dle Schmitt et al., 2012).

Kmenové buňky jsou buď izolované od pacienta – tento proces označujeme jako autologní transplantace nebo od jiných dárců, což je proces alogenní transplantace, buňky jsou expandovány a aplikovány přímo do pacienta a nahrazují ztracené buňky, to můžeme označit jako „buněčnou terapii“, nebo dochází k naočkování do 3D struktur, což definujeme jako „tkáňové inženýrství“ (**obr. 5**) (Schmitt et al., 2012).

Transplantace buněk, které pochází z pluripotentních kmenových buněk, nabízí příslib účinné léčby, avšak i takováto transplantace s sebou může nést řadu rizik. Řada terapií pomocí

kmenových buněk se ukázala jako přínosná a bezpečná, jako například transplantace kostní dřeně pomocí hematopoetických kmenových buněk. Řada klinik po celém světě nabízí účinky terapie pomocí kmenových buněk za horentní sumy peněz, a to bez důvěryhodného vědeckého zdůvodnění, transparentnosti, dohledu a ochrany pacienta. Mezinárodní společnost pro výzkum kmenových buněk podporuje lékařské inovace v této oblasti, ale neprokázané transplantace odsuzuje (Lo et al., 2009).

Rozdíl mezi kmenovou a diferencovanou buňkou se odráží v DNA buněk. V původní buňce je DNA uspořádaná volně s pracovními geny. Při vstupu signálu do buňky, když začne proces diferenciaci, dojde k vypnutí genů, které již nejsou potřeba, zatímco geny, které jsou potřeba pro specializovanou funkci, zůstávají aktivní. Takovéto pluripotence lze dosáhnout interakcí v genových sekvencích. Mnoho zdravotních problémů, jako jsou vrozené vady, či rakovinové bujení, je způsobeno nesprávnou diferenciací nebo dělením buněk (Zakrzewski et al., 2019).

## **5.1 Transplantace mesenchymálních buněk při léčbě Diabetu mellitu I. a II. stupně**

Diabetes mellitus se řadí mezi civilizační onemocnění, která mají vzestupný charakter. Předpokládá se, že v roce 2045 dosáhne tohoto onemocnění až 6,93 milionů lidí z celého světa. Diabetes dělíme na dvě formy. První forma je Diabetes mellitus I. stupně. Jedná se o autoimunitní onemocnění, které má za následek poškození Langerhansových ostrůvků pankreatu s následkem snížené, až zastavené tvorby inzulínu. Diabetes II. stupně je běžnější. Poškozené beta buňky Langerhansových ostrůvků pankreatu nedokážou v dostatečném množství uvolňovat inzulín. Diabetes mellitus nelze vyléčit substitučně, avšak hladinu inzulínu jsme schopni regulovat pomocí léků (Rybka et al., 2007). Langerhansovy ostrůvky pankreatu lze transplantovat, ale díky nedostatku dárců a hlavně mnohdy vznikající negativní imunitní odpovědi organismu, není transplantace vždy možná. Jako alternativu transplantační léčby lze využít transplantaci mesenchymálních kmenových buněk. Tyto buňky nejsou tumorigenní a nerozporují etickým kodexům (Li et al., 2021).

Mesenchymální kmenové buňky jsou první volbou díky svému jednoduchému způsobu získání, schopnosti sebeobnovy a malé imunitní odpovědi s multidiferenčním potenciálem. Z dosavadních výzkumů vyplývá, že mesenchymální kmenové buňky mohou zajišťovat kontrolu a krátkodobou léčbu především Diabetu mellitu I. stupně. Studie (Li et al., 2021) ukazuje, že u Diabetu II. stupně transplantace kmenových buněk snížila potřebu

inzulinu a zvýšila C-peptid – tedy molekulu proinzulinu, která se odštěpuje ještě před sekrecí samotného inzulinu. Léčba pomocí mesenchymálních buněk byla účinná jak na zvířatech, tak i na lidech. Terapeutický účinek potvrzuje regulace glukózy v krvi pacientů s cukrovkou, a to především u diabetu I. stupně. Dochází k poklesu glykovaného hemoglobinu, postprandiální krevní glukózy a též k poklesu glukózy na lačno. Následně byla prokázána zvýšená funkce sekrece inzulinu z ostrůvků slinivky břišní do krve a tím došlo ke zvýšení hodnot C-peptidu na lačno. Jedná se tedy o vědecký experiment prováděný několika pracovišti bez jednotného principu léčby (Li et al., 2021).

Diabetes způsobuje různé poruchy, mezi které můžeme zařadit Alzheimerovu chorobu, deprese, atrofie kosterního svalstva, poruchy energetického metabolismu. Při diabetu dochází k porušení satelitních buněk. Satelitní buňky jsou specifické kmenové buňky kosterního svalu, které napomáhají postnatální údržbě, růstu, regeneraci a opravě kosterního svalu. Z hlediska anatomie tyto buňky najdeme mezi bazální laminou a plazmatickými membránami svalových vláken. Za klidového stavu jsou tyto buňky nereaktivní. K procesu množení, sebeobnovy a diferenciaci dochází při poranění svalových vláken (Fujimaki et al., 2015).

## **5.2 Kmenové buňky pro transplantaci jater při rozdílných krevních skupinách**

Transplantování jater, tedy jejich štěpů s rozdílným AB0 systémem, se řadí mezi léčebné procesy u nemocných, kterým selhávají z různých důvodů játra. Tyto transplantace se provádí za použití léku Rituximab. Rituximab je monoklonální protilátka užívající se k léčbě hematologických malignit. Jedná se o látku, která se váže na povrch lymfocytů-B, obsahující na povrchu antigen CD20 (Syravá et al., 2015). Rituximab značně snižuje riziko odmítnutí štěpu způsobené působením protilátek. Nová naděje v těchto případech je v podobě mesenchymálních kmenových buněk (Syravá et al., 2015).

Studie (Zhang et al., 2021) popisuje, že byly vytvořeny dvě skupiny pacientů, které se dělily dle užívání Rituximabu a příjemce mesenchymálních kmenových buněk. Sledování probíhalo po dobu dvou let. Během této studie nenastaly žádné významnější problémy s přijetím mesenchymálních kmenových buněk. Uvádí se, že léčba pomocí mesenchymálních buněk měla skoro shodné účinky jako léčba pomocí léku. Výsledky ukazují, že léčba pomocí mesenchymálních kmenových buněk měla menší výskyt komplikací v podobě infekcí či žlučových komplikací. Lze tedy říci, že aplikace mesenchymálních kmenových buněk

předcházejí pooperačním komplikacím a jsou schopny regulovat farmakologickou imunosupresi.

Průběh získu mesenchymálních buněk pro tuto studii byl následující. Od zdravých dárců se získaly z pupeční šňůry mesenchymální kmenové buňky. Dárci se pohybovali ve věkovém rozmezí 18-35 let a celý proces odběru kmenových buněk byl samozřejmě schválen etickou komisí (Zhang et al., 2021).

Promyté pupeční šňůry byly uloženy do fosfátového pufru při teplotě 4 °C. Následně se provedly řezy o velikosti 10 mm<sup>3</sup>, tyto řezy byly naloženy do 0,1% kolagenázy I. typu s CaCl<sub>2</sub> obsahující 0,1 % hyaluronidázy. Následovala inkubace na třepačce při 37 °C po dobu 4 hodin. Poté byly izolované buňky kultivovány na Dulbeccově modifikovaném Eaglově médiu. Toto médium obsahuje velmi nízký obsah cukru a obsahuje 10% fetální hovězí sérum. Kultivace probíhá ve vlhkém prostředí s 5% CO<sub>2</sub> ve 37 °C. Médium se obnovuje každé tři dny pro odstranění neadherentních buněk (Zhang et al., 2021).

Následně se posuzuje fenotyp pomocí průtokové cytometrické analýzy na znaky: CD105, CD73, CD44, CD90, CD45, CD34, CD166 a CD29. Před samotným podáním byly mesenchymální kmenové buňky znovu testovány na nepřítomnost HIV, HBV, HCV, syfilis, mykoplazmat, hub a endotoxinů. Při allogenní transfúzi mesenchymálních kmenových buněk se buňky suspendují do 0,9% roztoku chloridu sodného v hustotě 1x 10<sup>6</sup> buněk/kg. Pacienti dostávají 9 dávek infuze mesenchymálních kmenových buněk. První dávka byla podaná portální žilou a zbylých osm dávek bylo podáno přes žílu na předloktí. Příjemci byli ještě dvě hodiny po transfúzi kontrolováni, aby se mohlo předcházet případným nežádoucím účinkům (Zhang et al., 2021).

### **5.3 Využití kmenových buněk při těžkém průběhu Covid-19**

Syndrom akutní respirační tísně (ARDS) se řadí mezi komplikace, která může vzniknout v průběhu onemocnění Covid-19. Covid-19 se řadí mezi pandemická onemocnění způsobující vážné respirační problémy. Při syndromu akutního respiračního selhání dochází k rozpadu alveolárních a endoteliálních buněk. Dávky kmenových buněk ve studii (Hashemian et al., 2021) pocházely z pupečníku nebo z placenty a jsou nadějí pro regeneraci poškozené tkáně. 11 pacientů zařazených do studie trpěli nedostatkem kyslíku v krvi a museli být připojeni na umělou plicní ventilaci. Mesenchymální kmenové buňky se podílí na regeneraci organismu a podílí se na opravě tkání. Díky intravenóznímu podání těchto buněk dochází prakticky k okamžitému zachycení buněk na poškozené plicní tkáně. Tato studie je primární fáze,



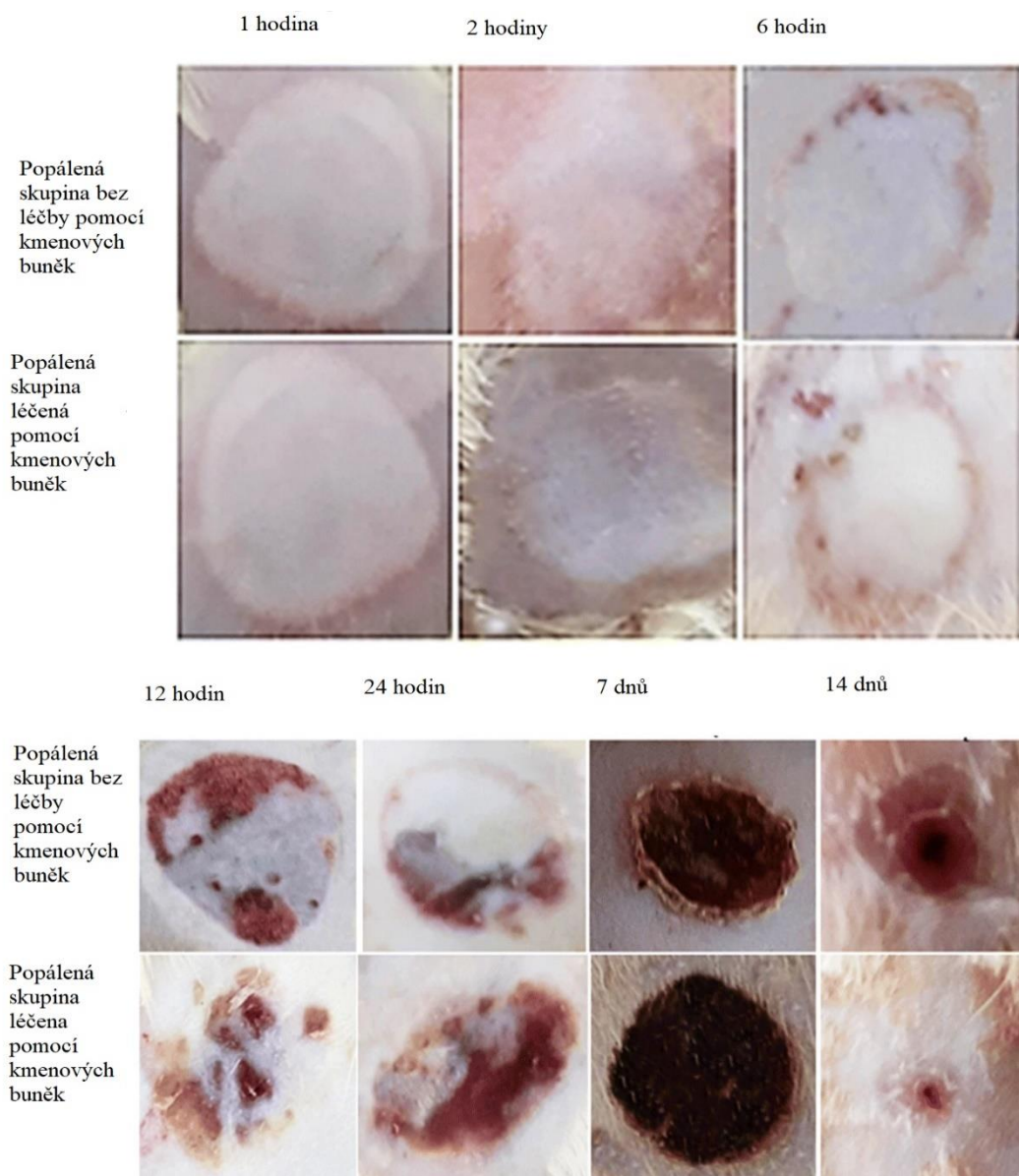
kde se především testuje pravidelnost, snášenlivost a množství dávky mesenchymálních kmenových buněk. Pacientovi byly podány tři infuze s mesenchymálními kmenovými buňkami a reakce nastala v rozmezí 48-96 hodin. Přesný postup, jak mesenchymální kmenové buňky napomáhají při léčbě Covid-19, nebyl dosud popsán. Jisté však je, že tyto buňky snižují sekreci prozánětlivých cytokinů z infiltrovaných imunitních buněk a jsou schopny ochránit endoteliální buňky před zánětem a oxidačním stresem. Mesenchymální kmenové buňky vylučují vysoké dávky růstových faktorů, které hrají důležitou roli při regeneraci tkání a podílí se na regulaci buněčné smrti. Ve velkém vylučují keratinocytový faktor, což je růstový faktor důležitý pro hojení ran (Hashemian et al., 2021).

#### **5.4 Využití kmenových buněk v dermatologii a při popáleninách II. stupně**

Vystavování kůže mechanickému a chemickému namáhání v prostředí vyžaduje trvalou sebeobnovu epidermis, dermis a adnex. Do adnex řadíme vlasové folikuly, mazové a potní žlázy. Tuto vlastnost sebeobnovy řídí kožní kmenové buňky. Tyto buňky se řadí mezi multipotentní s pomalým cyklem. V případě poranění se začnou množit a dochází k regeneraci tkáně (Prodinger et al., 2017). Kožní kmenové buňky byly experimentálně zkoumány na několika zvířecích modelech *in vitro*, aby se mohla prokázat jejich plasticita a potenciál. Zejména protože kůže je nevyčerpatelný zdroj kmenových buněk a tyto buňky se dají lehce získat. Kožní kmenové buňky se mohou využít jako alogenní buňky, čímž se lze vyhnout komplikacím v podobě reakce štěpu proti hostiteli (Ogliari et al., 2012).

Využití účinku mesenchymálních kmenových buněk na poraněnou tkáň při popáleninách II. stupně se zabývala studie (Abdel-Gawad et al., 2021). Experiment byl prováděn na myších. Myši byly popáleny rozehřátou hliníkovou tyčí a následně usmrceny. Kůže jim byla odebrána pro histopatologické, imunohistochemické vyšetření a analýzu mediátorů pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce. Pro tento experiment byly použity multipotentní progenitorové mesenchymální kmenové buňky z kostní dřeně. Při aplikaci těchto buněk do rány došlo ke snížení rychlosti kontrakce rány. Následně došlo k redukci růstového faktoru TGF- $\beta$ , interleukinu-6, nádorového nekrotického faktoru TNF- $\alpha$ , metaloproteinázy-9 a mikroRNA-21, které mohou tvořit zánět. Naopak nárůst byl zaznamenán u proteinu HSP-90a, což je protein podporující hojení, a to zejména v pozdních stádiích. Z experimentu vyplynulo, že mesenchymální kmenové buňky mají silnou hojivou vlastnost.

Pomocí mediátorů na hojení ran dochází k obnově normálních struktur kůže (**obr. 6**). Docházelo též ke snížené tvorbě jizev a ovlivnění velikosti zranění (Abdel-Gawad et al., 2021).



Obrázek 6: **Makroskopický vzhled neošetřené a ošetřené popáleniny pomocí kmenových buněk**– světlá kruhová léze způsobená rozžhavenou tyčí byla pozorována u obou skupin. Po 2 hodinách se vytvořil puchýř, který po 6 hodinách zbledl. Po 12 hodinách byl již puchýř zcela vyvinut. Po 24 hodinách puchýř výrazně vzrostl u myši, které se léčily pomocí kmenových buněk. Po 7 dnech byla léze pokryta načervenalou tuhou krustou, která se zmenšila a zůstala připojená k ráně po dobu 14 dnů u skupiny myši, které nedostaly léčbu kmenovými buňkami. Zatímco u léčených zvířat měla rána ostrý vzhled a kůže vypadala již zcela normálně, (upraveno dle Abdel-Gawad et al., 2021).

## 5.5 Kmenové buňky při léčbě Parkinsonovy a Alzheimerovy nemoci

Parkinsonova nemoc se řadí mezi neurodegenerativní onemocnění, při kterém dochází k poškození neuronů ve středním mozku. Příznaky mohou být motorické i nemotorické, a však nejtypičtější je třes (Beitz et al., 2014). V tomto experimentu (Boika et al., 2020) byly dvanácti pacientům s tímto onemocněním intravenózně podány mesenchymální kmenové buňky. Účinnost této terapie byla kontrolována jeden až tři měsíce po podání. Bylo zjištěno, že v potransplantačním období došlo k poklesu závažnosti motorických i nemotorických symptomů. V této studii bylo prokázáno, že léčba pomocí MSC modifikuje onemocnění (Boika et al., 2020).

Alzheimerova nemoc je též neurodegenerativní onemocnění, které zodpovídá za 60-70 % z padesáti milionů případů demence po celém světě. Při tomto onemocnění dochází k usmrcení neurálních buněk a zmenšování mozkové tkáně, což má za následek progresivní kognitivní, motorické a behaviorální poškození. Toto poškození výrazně snižuje kvalitu života a může vést až k smrti. Obecně studie ukazují, že mesenchymální kmenové buňky mají schopnost stimulovat neuroregeneraci a inhibovat progresi onemocnění. Mnoho preklinických studií hodnotí léčbu pomocí mesenchymálních kmenových buněk na transgenních myších modelech, jako velmi přínosnou a úspěšnou se slibnými terapeutickými výsledky. Toto však už neplatí na klinických studiích na lidech, a to z důvodů, že transgenní myši nedokážou dostatečně simulovat patogenezi Alzheimerovy choroby. Alzheimerova choroba je popsána ve dvou hlavních formách. Ve formě familiární (FAD) a sporadické (SAD). Většina preklinických studií na myších se provádí na expresi mutací FAD, ale klinické studie jsou pak reálně na pacientech s formou SAD, což působí problém v převodu poznatků z preklinické studie na klinickou. Řešení pro úspěšné klinické studie a terapie pomocí mesenchymálních kmenových buněk je vyvinutí modelu pro simulaci patologie Alzheimerovi choroby (Hernández, 2021).

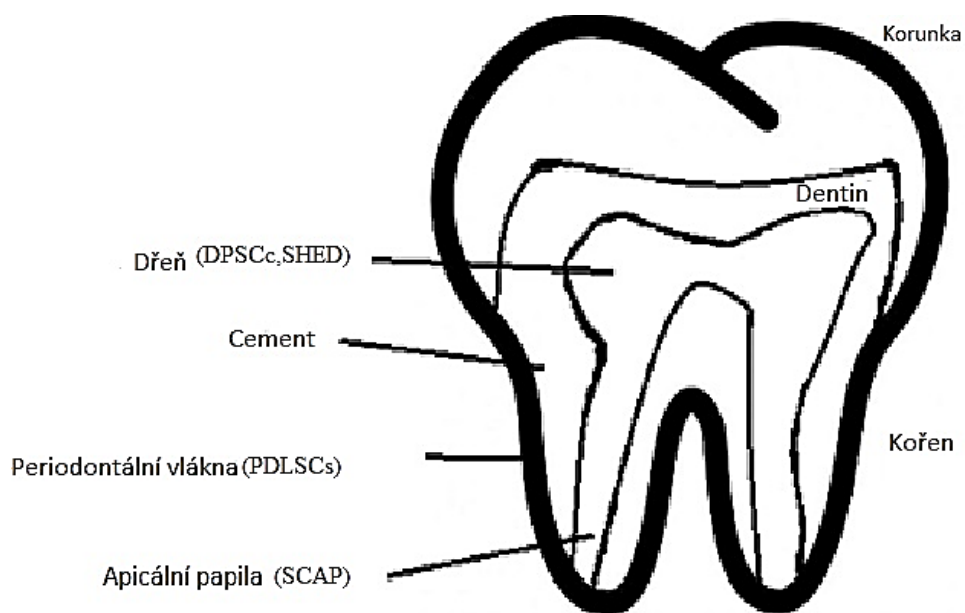
## 5.6 Použití kmenových buněk ve stomatologii

Identifikace dentálních kmenových buněk (**obr. 7**) proběhla na začátku 20. století, kdy byly nalezeny v zubní dřeni. Jsou odvozené z neurálních buněk s možností diferenciací na neurony. Kmenové buňky zubní dřene (DPSC) slouží k homeostáze dřeni a napomáhají hojení zranění pomocí vnějších a vnitřních faktorů. Zubní dřeň je měkká tkáň uprostřed mineralizované struktury. DPSC mají obdobné vlastnosti jako buňky mesenchymální a na svém povrchu mají znaky CD90. MSC odvozené z kostní dřene nejsou zdaleka tak proliferativní

jako DPSC, které se dají snáze klonovat. Dentální kmenové buňky mají velkou regenerační schopnost a dostupnost, což je řadí mezi ideální adepty pro tkáňové inženýrství. Tato regenerační schopnost je hojně využívána při obnově orofaciálních tkání, zubní dřevě a neurovaskularity. Mezi další schopnosti těchto buněk můžeme zařadit silné imunomodulační vlastnosti, pomocí kterých inhibují T buňky (Sui et al., 2020). Ve zdravé zubní tkáni se pravidelně nachází určité množství kmenových buněk, které je ovlivňováno různými traumatickými změnami jako jsou například záněty. Dřevě kmenové buňky (SHED) mají rychlejší proliferaci a diferencují se na ještě větší množství buněk a jsou používány pro regenerace dentinu. Kmenové buňky parodontálních vazů (PDSCL) se používají při regeneraci periodontálních vazů a jsou schopny diferenciací, jako *in vitro* buňky produkující kolagen, cementovou tkáň, Sharpeyova vlákna a buňky podobné osteoblastům. Kmenové buňky z apikální papily (SCAP) dominují svou proliferací a tím pádem jsou vhodnější pro regenerace tkání (Zakrzewski et al., 2019).

Hojně využívány v medicíně jsou výše zmíněné kmenové buňky SCAP z apikální papily nacházející se v nezralých stálých zubech. Tyto buňky představují novou populaci mesenchymálních kmenových buněk a mají schopnost sebeobnovy a nízké imunogenicity. SCAP buňky jsou schopné diferenciací na buněčné linie: osteogenní, adipogenní, chondrogenní, hepatogenní, odontogenní a neurogenní. SCAP buňky mají vyšší míru proliferace než buňky DPSC a PDLSCs. Pomocí lyzátu z lidských trombocytů, který je stimulován proteinem epiregulinem nebo tumor nekrotizujícím faktorem  $\alpha$  vykazují SCAP mnohem rychlejší rychlost proliferace. SCAP buňky se mohou diferencovat na osteoblasty a odontoblasty. Tyto buňky byly kultivovány v osteo/odontním médiu, které obsahovalo

L-askorbát-2-fosfát, dexamethason a  $\beta$ -glycerofosfát. Následně bylo prokázáno že SCAP exprimují specifické markery odontoblastů, či osteoblastů. Tyto markery jsou: alkalická fosfatáza, osteokalcin, sialofosfoprotein a kostní sialoprotein. Lidský chrup bývá ohrožován traumaty, genetickými poruchami, kazy a periodontálními onemocněními. S pokroky ve tkáňovém inženýrství a regenerační medicíně by se kmenové buňky mohly začít aktivně využívat jako buněčný zdroj nejen pro stomatologické terapie (Kang et al., 2019)



Obrázek 7: **Lokalizace kmenových buněk v zubní tkáni** – kmenové buňky zubní dřeně (DPSCS), kmenové buňky mléčných zubů (SHED), kmenové buňky parodontálních vazů (PDLSC), kmenové buňky z apikální papily (SCAP), (upraveno dle Zakrewski et al., 2019).

## 5.7 Transplantace kostní dřeně a využití kmenových buněk

Kmenové buňky se mohou chovat abnormálně díky změně genetických či enviromentálních faktorů. Leukemie zahrnuje řadu hematologických poruch, které nejčastěji začínají v kostní dřeni a podílí se na tvorbě vysokého počtu abnormálních kmenových buněk. Tento proces je výsledek deregulace normálního vývoje hematopoetických kmenových buněk (HSC) genetickou mutací, která produkuje nádorové buněčné populace (Dessie et al., 2020). První zmínky o transplantaci kostní dřeně se objevily v roce 1957, kdy se o hematopoetických kmenových buňkách a imunitních reakcích vědělo opravdu málo. Transplantace HSC je předchůdce genové a buněčné terapie (Simpson et al., 2019). Aby transplantovaný orgán přežil, musí příjemce celý život užívat řadu imunosupresivních léků, které mohou přispívat k nádorovému bujení, toxicitě a infekcím. Od poloviny 20. století jsou používány infuze HSC, které jsou z kostní dřeně dárce nebo periferní krve. Infuze alogenní darované kostní dřeně může vést k chimérismu. Chimérismus je stav kdy se v těle vyskytují dvě buněčné populace, ale každá je od jiného jedince. Tímto následně dojde k přihojení geneticky odlišných donorních HSC a k produkci lymfocytů, které budou koexistovat s hostitelem (Elahimehr et al., 2016). Hematopoetické kmenové buňky jsou odebírány opakovanými cytaferézami po stimulaci hematopoetickými faktory. Cytaferéza je metoda mimotělního sběru a separace kmenových buněk. Dle dárce se transplantace následně dá rozdělit na syngenní transplantace krvetvorných buněk, kdy dárce je jednovaječné dvojče a je zde velký předpoklad, že nedojde k odhojovací reakci. Alogenní transplantace krvetvorných buněk probíhá pomocí HLA kompatibility sourozence, rodiče nebo nepříbuzných dárců vyhledaných pomocí registru dárců kostní dřeně. Autologní transplantace krvetvorných buněk, kdy si pacient daruje buňky sám. Buňky jsou v období remise cytaferézou odebrány, zakonzervovány a zmrazeny, až do doby darování (Slováček, 2005). Počet léčebných výkonů pomocí terapie hematopoetických buněk bylo celosvětově v roce 2017 až 50 000 (Liso et al., 2017).

Při autologní transplantaci může dojít ke kontaminaci materiálu nádorovými buňkami, přesto že množství nádorových buněk je regulováno a zničeno chemoterapií. Pomocí transplantace HSC se může léčit řada krevních onemocnění. A to například: akutní myeloidní leukémie, akutní lymfoblastická leukémie, chronická myeloidní leukémie, myelodysplastický syndrom, Hodgkinův lymfom a aplastická anémie. Při transplantaci hematopoetických kmenových buněk je důležitý předtransplantační režim, který spočívá ve velké dávce chemoterapie, která eliminuje zbytky nádorové populace v kostní dřeni. Příjemce se následně připravuje k přijetí transplantátu potlačením vlastních imunologických reakcí pomocí

imunosupresivní léčby. Odběr se provádí z dřevěné krve lopaty kosti kyčelní při narkóze. Punktát je uložen do heparinovaného kultivačního média a případně zamražen tekutým dusíkem. Další odběr je z periferní krve a získání periferních kmenových buněk prováděn pomocí krevních separátorů. Odběr se provádí na základě výskytu koncentrace znaku CD34+. Poslední fáze je posttransplantační, kdy se může vyskytnout zvýšená náchylnost k infekcím, snížené množství leukocytů, anémie, krvácivé projevy, mukozitida, průjmy a jaterní dysfunkce. K připojení transplantátu k hostiteli dochází obvykle mezi 7 až 14 dnem od transplantace (Slováček, 2005).

Při transplantacích hematopoetických kmenových buněk jsou použity různé zdroje buněk, prekursorové buňky a řada kondičních vyšetření, které pacientům usnadňovaly přijetí štěpu. Řada pacientů se z onemocnění vyléčila, ovšem část z nich trpěla reakcí štěpu proti hostiteli (GVHD). Tato reakce značně omezila užívání hematopoetických kmenových buněk k léčbě dalších imunologických problémů. Farmakologie zajistila případné regulace a zlepšení v přijímání štěpu hostitelem. Hematopoetické kmenové buňky se dají získat z pupečnickové krve (**tab. 2**), tyto buňky jdou použít jen pro dětské příjemce, protože neobsahují velké množství k vytvoření štěpu (Simpson et al., 2019). Při použití pupečnickové krve je nízké riziko kontaminace viry a následnou reakcí GVHD. Ovšem nedostatečné množství hematopoetických kmenových buněk z pupečnickové krve může způsobit též neuchycení štěpu. Při použití periferních kmenových buněk, je připojení neutrofilů a destiček kratší, což může mít za následek snížený výskyt infekčních problémů, snížení doby hospitalizace a snížení množství potřebných transfúzí (Simpson et al., 2019).

Tabulka 2: **Porovnání zdrojů kmenových buněk**, (upraveno dle Sirinoglu, 2012)

	<b>Pupečníková krev</b>	<b>Periferní buňky</b>	<b>Kostní dřeň</b>
<b>Riziko pro dárce</b>	Ne	Ano	Ano
<b>Doba hledání dárce</b>	<1 měsíc	3-6 měsíců	3-6 měsíců
<b>Faktory omezující připojení</b>	Množství buněk	HLA systém	HLA systém
<b>Dominantní faktor ovlivňující výsledek</b>	Zpomalené připojení způsobené zotavením imunity	GVHD	GVHD
<b>Minimální shoda HLA</b>	4/6	9/10	9/10
<b>Možnost imunoterapie</b>	Ne	Ano	Ano
<b>Riziko potransplantační infekce</b>	Vyšší	Vysoké	Vysoké

## 5.8 Využití kmenových buněk při procesech regenerace kostí, šlach, vazů a svalů

Jedná se o tkáň, které mají omezený regenerační potenciál. To žene lékaře a vědce k novým objevům a aplikaci kmenových buněk například pomocí nosiče s charakteristikou nativní matrix nebo aplikací kmenových buněk s kostní spongializací injekčně. Šlachy a kloubní tkáň nemají neomezenou možnost regenerace. Při léčbě poranění těchto tkání lze využít nosiče s nativní matrix, které mají za úkol zprostředkovat adhezi a integraci použitých kmenových buněk (Neckář et al., 2015). Tyto bioaktivní látky musí splňovat řadu požadavků. Musí být imunitně kompatibilní a netoxické, přičemž i degradace těchto materiálů musí být netoxická a časově vyvážená (Schmitt et al., 2012). Injekční aplikace kmenových buněk je též z jednou možností při léčbě. V prostoru úponu šlachy nebo vazů jsou kmenové buňky spolu s kostní spongializací umístěny do organismu. Jeden ze záměrů této terapie je oprava šlachové refixace a zajištění optimálního hojení. Regenerace chrupavky prostřednictvím mesenchymálních kmenových buněk naplňuje předpoklady pro biologickou artroplastiku u zvířat a lidí. Kmenové buňky z kostní dřeně se dokážou lépe chondrogeně diferenciovat, protože produkují více kolagenu II. a glykosaminoglykanu, než buňky kmenové



získané z tukového lipoaspirátu. Při aplikaci mesenchymálních kmenových buněk dochází k souhrnnému ovlivnění homeostázy poškozeného kloubu (Neckář et al., 2015).

Při využití mesenchymálních kmenových buněk dochází k utlumení buněčné apoptózy, stimulaci angiogeneze a proliferaci endogenních buněk a následnému snížení zánětu u poškozené tkáně. Při léčbě a regeneraci kostní tkáně u hypotrofických kostních paklobů a ztrátových defektů kostí lze využít kmenové buňky též. Tyto poranění lze léčit pomocí autologních štěpů z ilické kosti či pomocí alogenního štěpu. Mesenchymální kmenové buňky mají zvýšenou schopnost diferenciaci v osteogenní tkáň. Léčba pomocí autologních mesenchymálních kmenových buněk, které pocházely z kostní dřene byla úspěšná u pacientů s pomalým kostním hojením, po osteotomiích, po osteonekrózách a spinální fúzi (Neckář et al., 2015). Při hojení ran nejen po ortopedickém zákroku může docházet ke špatnému hojení těchto ran. Většinou se tak děje u pacientů, kteří trpí nějakým chronickým onemocněním jako je diabetes. Léčba pomocí MSC u akutních a chronických ran vede k rychlejšímu uzavření rány, která má zvýšenou epitelizaci tvorbou granulační tkáně a angiogenezi (Maniar et al., 2015).

## **5.9 Využití kmenových buněk při léčbě infarktu myokardu a ischemických chorob**

Srdeční choroby se řadí mezi závažná onemocnění. Infarkt myokardu spadá mezi ně. Celoročně infarkt myokardu postihne až milion lidí na celém světě. Následek infarktu myokardu může být v podobě odumírání srdečních buněk a poškození funkčnosti srdce (Li et al., 2016). K ischemickým onemocněním konkrétně dochází při poklesu průtoku krve do orgánu nebo tkání. To může být zapříčiněno stenózou krevní cévy nebo rupturou aneurysmatu. Infarkt myokardu, ischemické cévní, mozkové příhody a ischemické choroby končetin jsou nejčastější ischemická onemocnění (Choi et al., 2022). Na zvířecích modelech a v klinických studiích bylo otestováno několik druhů buněk. Pluripotentní kmenové buňky se umí diferencovat na kardiomyocyty a regenerovat tak srdeční tkáň (Li et al., 2016).

U většiny studií jsou kmenové buňky aplikovány injekčně přímo do srdce, které je postiženo infarktem, avšak okolo 90 % buněk se neuchytí. Buď jsou ztraceny v oběhu nebo jsou vytlačeny přímo z místa vpichu. Kmenové buňky, které byly zadrženy na postižené tkáni většinou do týdne umřely. Z toho vyplývá, že celkové přihojení kmenových buněk je nízké a terapeutická účinnost je omezená. Kmenové buňky odumírají jako důsledek špatného spojení transplantovaných buněk a poškozené hostitelské tkáně. Tento jev nazýváme Anoikis,

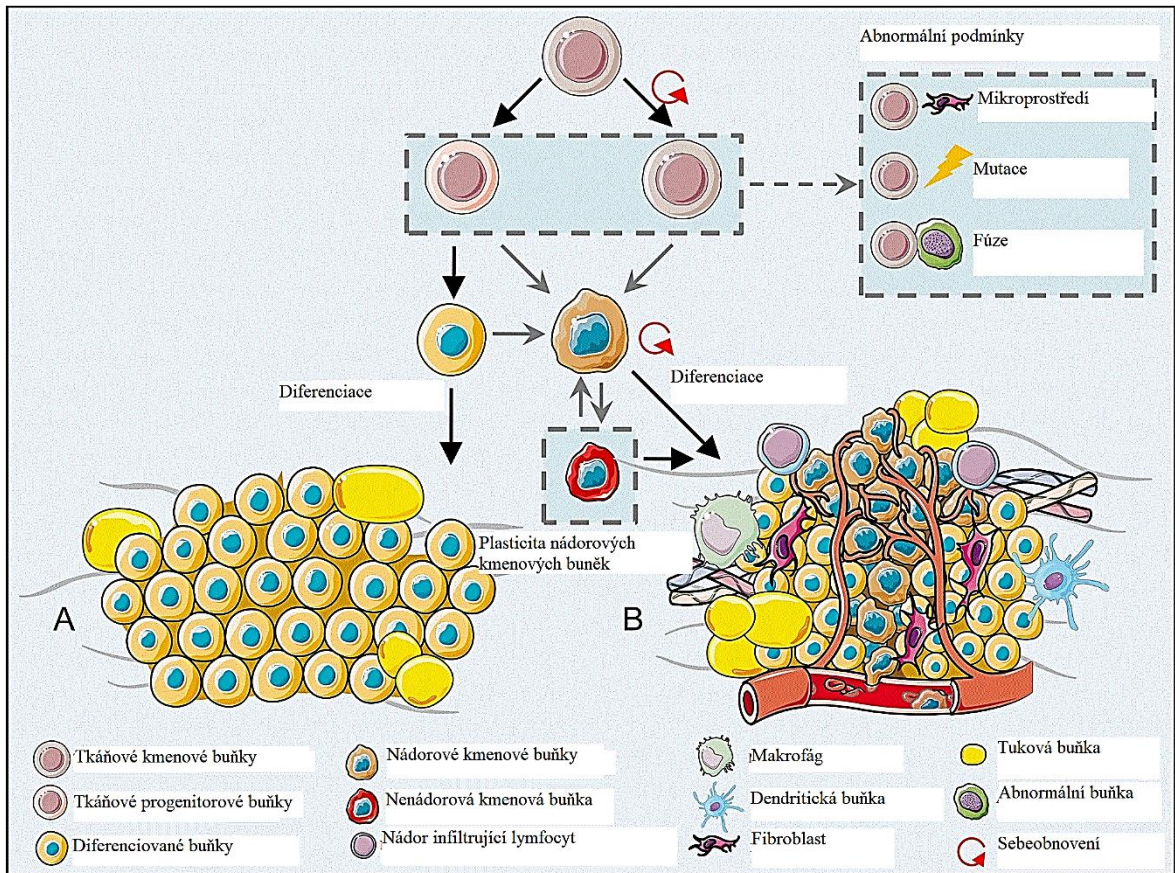
což je forma programované buněčné smrti. Další faktor ovlivňující přilhojení kmenových buněk k ischemické tkáni je napětí kyslíku ve tkáni. Aby mohly být buňky transplantované je důležité pracovat na jejich retenci. Pro zvýšení retence buněk se využívá viskózní hydrogel, který funguje jako skvělý nosič buněk (Li et al., 2016). Mesenchymální kmenové buňky prokázaly svůj velký potenciál pro léčbu ischemických chorob, a to díky své imunomodulaci, angiogenezi a parakrinní sekreci bioaktivních faktorů, avšak jejich správné využití zejména pro aterosklerózu podléhá ještě dalším výzkumům (Choi et al., 2022).

## 6. Překážky ve využívání kmenových buněk

Jako problém můžeme označit genetickou nestabilitu, která může vést ke vzniku nádorů (**obr. 8**). Nesmíme opomenout i značné etické otázky ohledně využívání kmenových buněk (Kolios et al., 2013). Imunologická odpověď může být velký problém při transplantacích kmenových buněk. Jisté typy kmenových buněk používané při transplantacích může lidský imunitní systém označit jako cizí těleso, a to vede k imunitní reakci a odmítnutí buněk, či celého orgánu (Zakrzewski et al., 2019). Pluripotentní kmenové buňky jsou schopny nekonečného dělení, což může být pozitivní pro přípravu řady buněk a orgánů. Ovšem jejich nekonečné dělení může být i velký problém, pokud tento proces probíhá i po transplantaci. V tomto momentě může docházet k rakovinovému bujení. Při použití nesprávného vzorkování mohou vznikat teratomy. Faktory, které zůstanou aktivní po přeprogramování indukovaných pluripotentních buněk mohou způsobit též rakovinové bujení. Karcinogenní bujení může být způsobené genetickými mutacemi, které vznikly při pěstování buněčné kultury *in vitro* (Yamanaka et al., 2020).

Nádorové kmenové buňky (CSC) jsou označovány jako primární iniciátory vzniku tumorů (Kuşoğlu et al., 2019). Označení nádorové kmenové buňky se začalo používat tehdy, když se zjistilo, že jistá subpopulace buněk je rezistentní vůči chemoterapii. Díky testu kolonií *in vitro* bylo možné prokázat, že se tyto buňky podobají kmenovým buňkám. Byly navrženy dvě hypotézy ohledně původu nádorových kmenových buněk. Stochastická hypotéza vysvětluje, že jakákoliv buňka, která je vystavena somatickým mutacím, může získat vlastnosti sebeobnovy, diferenciaci, což následně může vyústit v heterogenitu nádorů. Hierarchická hypotéza tvrdí, že somatické mutace mají za následek generování samo-obnovujících se progenitorových buněk rakoviny, které umí produkovat diferenciované potomstvo a tím pádem obnovovat heterogenitu nádorů. Z těchto informací vyplývá, že rakovinové kmenové buňky mají schopnost sebeobnovy, diferenciaci v nové potomstvo a splňují charakteristiku kmenových buněk (Walcher et al., 2020). Nádorové kmenové buňky mají schopnost jak symetrického, tak asymetrického dělení. Při asymetrickém dělení dochází k dělení mateřské buňky na dvě dceřiné, z níž jedna obsahuje celý mateřský genom a druhá má méně znaků kmenovosti. Díky těmto vlastnostem se tumor skládá ze směsi nádorových kmenových buněk a jejich diferenciovaného potomstva, které se podepisuje na jejich fenotypové a funkční heterogenitě. Při reakci na stres jsou nádorové kmenové buňky schopny se rekrutovat do nových tkání, kde se následně budou diferencovat a působit maligně

(Huang et al., 2017). Kmenové buňky v klidovém stádiu dokážou odolávat radioterapii a chemoterapii (Úrban et al., 2021).



Obrázek 8: Schématické znázornění buněčné transformace specifických tkáňových kmenových buněk na rakovinné kmenové buňky – A) Tkáňové specifické kmenové buňky se se normálně programují na prekurzorové buňky, které jsou schopny se diferenciovat na tkáňové buňky. B) Z rakoviny odvozené mikroprostředí, nebo epigenetické a genetické faktory či fúze s abnormální buňkou mohou zapříčinit, že tkáňové specifické buňky a jejich prekurzorové deriváty se vrátí do rakovinového stavu. V postižené oblasti dojde k potlačení imunitního systému kmenovými buňkami. Rezidentní buňky jako jsou fibroblasty se mohou změnit ve prospěch nádoru a podílet se na tvorbě jeho mikroprostředí, (upraveno dle Barati et al., 2021).

## Závěr

Kmenové buňky jsou pro medicínu a buněčnou terapii velkým potenciálem. Tyto buňky mají svůj nepostradatelný význam v organismu, kdy jsou schopny v některých případech opravit poškozenou tkáň díky své diferenciační, regenerační funkci a plasticitě. První kmenová buňka vzniká po splynutí vajíčka a spermie. Tento proces může vyústit až v plně diferenciované buňky lidského organismu. Každou kmenovou buňku obklopuje její specifické mikroprostředí, které označujeme jako „niche“ podílející se především na homeostáze. Na složení tohoto mikroprostředí se podílí řada buněčných elementů, extracelulárních komponent a cytokinů. Mezi typy kmenových buněk řadíme buňky embryonální a dospělé kmenové buňky. Terapeutických účinků kmenových buněk je využito v mnoha případech, většina studií je však pořád v preklinickém stavu. Aktuálně se využívají kmenové buňky i v podobě organoidů. Tyto 3D modely mají převážně za úkol simulovat orgán na kterém může docházet k velmi úspěšným experimentům a může to být i budoucnost transplantací. Nejvíce používané buňky pro buněčnou terapii jsou buňky mesenchymální. Terapeutických účinků kmenových buněk se využívá při transplantacích, popáleninách a v dermatologii, léčbě Diabetu Melittu I. a II. stupně, stomatologii, ortopedii. Potenciál těchto buněk byl využit i při léčbě stavů způsobených Covidem-19. Hematopoetické kmenové buňky hrají důležitou roli při transplantacích kostní dřeně. Nevýhoda kmenových buněk je jejich genetická nestabilita, která mnohdy vede ke vzniku tumorů, takovéto kmenové buňky jsou označeny jako nádorové kmenové buňky. Regenerační medicína prochází velkými milníky a úspěchy, avšak aby bylo plně využito potenciálu těchto buněk, je potřeba dalších studií.

## Použitá literatura

1. *Abdel-Gawad D.R.I., Moselhy W.A., Ahmed R.R, Al-Muzafar H.M. et al.*: Therapeutic effect of mesenchymal stem cells on histopathological, immunohistochemical, and molecular analysis in second-grade burn model. *Stem Cell Research & Therapy* volume, 2021 (12), str. 2-16. Doi: 10.1186/s13287-021-02365-y.
2. *Alexander M.S., Casar J.C., Motohashi N.*: Stem Cell Differentiation and Therapeutic Use. *Stem Cells International*, 2015, str. 1-8. Doi: 10.1155/2015/308128.
3. *Ansorgová N., Mačingová Z., Priester P., Mokrý J. at al.*: Nádorové kmenové buňky a „Niche“ jako limitující faktor karcinogeneze. *Klinická onkologie*, 2009, str.11-15. ISSN 0862-495X.
4. *Barati M., Akhondi M., Mousavi N.S., Ghodsi A. et al.*: Pluripotent Stem Cells: Cancer Study, Therapy, and Vaccination. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2021 (17), str.1-18. Doi: 10,1007/s12015-021-10199-7.
5. *Beitz J.M.*: Parkinson's disease: a review. *Front Biosci. (Schol Ed)*, 2014 (6), str. 65-74. Doi: 10.2741/s415.
6. *Bock C., Boutros M., Camp J.G., Clarke L et al.*: Human Cell Atlas ‘Biological Network’ Organoids. *The Organoid Cell Atlas. Nature Biotechnology*, 2021 (1), str. 13-17. Doi: 10.1038/s41587-020-00762-x.
7. *Boika A., Aleinikava N., Chyzhyk V., Zafranskaya M. et al.*: Mesenchymal stem cells in Parkinson's disease: Motor and nonmotor symptoms in the early posttransplant period. *Surgical Neurology International*, (2020), str. 1-32. Doi: 10.25259/SNI\_233\_2020.
8. *Coghlan A.*: Stem cell timeline: The history of a medical sensation, *New scientist*, 2014, online [5. 9. 2021]. Dostupné z: <https://www.newscientist.com/article/dn24970-stem-cell-timeline-the-history-of-a-medical-sensation/>.
9. *Dessie G., Derbew Molla M., Shibabaw T., Ayelign B.*: Role of Stem-Cell Transplantation in Leukemia Treatment. *Stem Cells Cloning*, 2020 (13), str. 67-77. Doi: 10.2147/SCCAA.S262880.
10. *Ding D.C., Shyu W.C., Lin S.Z.*: Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 2011 (1), str. 5-14. Doi: 10.3727/096368910X.

11. *Elahimehr R., Scheinok A.T., McKay D.B.:* Hematopoietic stem cells and solid organ transplantation. *Transplantation Reviews*, 2016 (4), str. 227-234. Doi: 10.1016/j.trre.2016.07.005.
12. *Ferraro F., Celso C.L., Scadden D.:* Adult stem cells and their niches. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2010 (695), str.155-168. Doi: 10.1007/978-1-4419-7037-4\_11.
13. *Filip S., Mokry J., Pudil R.:* Present View on the Stem Cell Plasticity and Cell Therapy. *Časopis lékaře českých*, 2005, str.779-782. ISSN 1805-4420.
14. *Forostyak O., Dayanithi G., Forostyak S.:* Regenerative Medicine and Stem Cells. *Opera Medica et Physiologica*, 2016, str. 1-3. Doi: 10.20388/omp2016.001.0023.
15. *Fujimaki S, Wakabayashi T, Takemasa T, Asashima M, Kuwabara T.:* Diabetes and stem cell function. *BioMed Research International*, 2015, str. 1-62. Doi: 10.1155/2015/592915.
16. *Hashemian R., Aliannejad R., Zarrabi M., Hoda M. et al.:* Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID -19- induced ARDS patients: a case series. *Stem Cell Research & Therapy*, 2021 (12), str. 1-12. Doi: 10.1186/s13287-021-02165-4.
17. *Hernández A.E., García E.:* Mesenchymal Stem Cell Therapy for Alzheimer's Disease. *Stem Cells International*, 2021, str. 1-12. Doi: 10.1155/2021/7834421.
18. *Hofer M., Lutolf M.P.:* Engineering organoids. *Natural Reviews Materials*, 2021 (5), str. 402-420. Doi: 10.1038/s41578-021-00279-y.
19. *Huang R., Rofstad E.K.:* Cancer stem cells (CSCs), cervical CSCs and targeted therapies. *Oncotarget*, 2017 (21), str. 35351-35367. Doi: 10.18632/oncotarget.10169.
20. *Charitos I.A., Ballini A., Cantore S., Boccellino M. et al.:* Stem Cells: A Historical Review about Biological, Religious, and Ethical Issues. *Stem Cells International*, 2021, str. 2-9. Doi: 10.1155/2021/9978837.
21. *Choi J.R., Yong K.W., Nam H.Y.:* Current Status and Perspectives of Human Mesenchymal Stem Cell Therapy 2020. *Stem Cells International*, 2022, str. 1-8. Doi: 10.1155/2022/9801358.

22. *Kang J., Fan W., Deng Q., He H. et al.*: Stem Cells from the Apical Papilla: A Promising Source for Stem Cell-Based Therapy. *BioMed Research International*, 2019 (29), str. 2-5. Doi: 10.1155/2019/6104738.
23. *Klabusay M., Dvořák P., Mayer P.*: Kmenové buňky: nový příslib v medicíně. *Vnitřní lékařství*, 2005 (2), str. 206-215. ISSN 1801-7592.
24. *Kolios G., Moodley Y.*: Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 2013 (1), str. 3-10. Doi: 10.1159/000345615.
25. *Kuşoğlu A, Biray Avcı Ç.*: Cancer stem cells: A brief review of the current status. *Gene*, 2019 (10), str. 80-85. Doi: 10.1016/j.gene.2018.09.052.
26. *Li X., Tamama K., Xie X., Guan J.*: Improving Cell Engraftment in Cardiac Stem Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2016, str. 2-7. Doi: 10.1155/2016/7168797.
27. *Li Y., Wang F., Liang H., Yang X et al.*: Efficacy of mesenchymal stem cell transplantation therapy for type 1 and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *Stem Cell Research & Therapy* volume, 2021 (12), str. 2-11. Doi: 10.1186/s13287-021-02342-5.
28. *Liso A., Neri M., Maglietta F., La Russa R. et al.*: Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Bioethical Lens. *Stem Cells International*, 2017, str. 1-43. Doi: 10.1155/2017/1286246.
29. *Lo B., Parham L.*: Ethical issues in stem cell research. *Endocrine Reviews*, 2009 (3), str. 204-213. Doi: 10.1210/er.2008-0031.
30. *Maniar H.H., Tawari A.A., Suk M., Horwitz D.S.*: The Current Role of Stem Cells in Orthopaedic Surgery. *Malaysian Orthopaedic Journal*, 2015 (3), str.1-7. Doi: 10.5704/MOJ.1511.016.
31. *Morrison S.J., Uchida N., Weissman I.L.*: The biology of hematopoietic stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1995 (11), str. 35-71. Doi: 10.1146/annurev.cb.11.110195.000343.
32. *Neckář P., Syková E.*: Kmenové buňky v ortopedii. *Časopis lékařů. ČLS JEP*, 2015, str. 107-109. ISSN 1805-4420.
33. *Ogliari K.S., Marinowic D., Brum D.E., Loth F.*: Stem cells in dermatology. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2014 (2), str. 286-291. Doi: 10.1590/abd1806-4841.20142530.



- 34.** *Ohnuki M., Takahashi K.:* Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2015 (1680), str.1-8. Doi: 10.1098/rstb.2014.0367.
- 35.** *Oswald J., Boxberger S., Jørgensen B., Feldmann S. et al.:* Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*, 2004 (3), str.377-384. Doi: 10.1634/stemcells.22-3-377.
- 36.** *Ottoboni L., Wunster B., Martino G.:* Therapeutic Plasticity of Neural Stem Cells. *Frontiers in Neurology*, 2020 (11), str. 1-20. Doi: 10.3389/fneur.2020.00148.
- 37.** *Pittenger M.F., Discher D.E., Péault B.M., Phinney D.G. at al.:* Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative Medicine*, 2019 (4), str. 4-22. Doi: 10.1038/s41536-019-0083-6.
- 38.** *Prodinge C.M., Reichelt J., Bauer J.W., Laimer M.:* Current and Future Perspectives of Stem Cell Therapy in Dermatology. *Annals of Dermatology*, 2017 (6), str. 667-687. Doi: 10.5021/ad.2017.29.6.667.
- 39.** *Rybka J.:* Diabetes mellitus - komplikace a přidružená onemocnění: diagnostické a léčebné postupy. Praha: Grada, 2007. ISBN 978-802-4716-718.
- 40.** *Schmitt A., van Griensven M., Imhoff A.B., Buchmann S.:* Application of stem cells in orthopedics. *Stem Cells International*, 2012, str. 2-38. Doi: 10.1155/2012/394962.
- 41.** *Simpson E., Dazzi F.:* Bone Marrow Transplantation 1957-2019. *Frontiers in Immunology*, (2019), str. 1-23. Doi: 10.3389/fimmu.2019.01246.
- 42.** *Sirinoglu Demiriz I., Tekgunduz E., Altuntas F.:* What is the most appropriate source for hematopoietic stem cell transplantation? Peripheral stem cell/bone marrow/cord blood. *Bone Marrow Research*, 2012, str 1-15. Doi: 10.1155/2012/834040.
- 43.** *Slováček L., Jebavý L., Blažek M., Kmoníček, M. et al.:* Transplantace kostní dřeně – přehled základních pojmů, typy transplantací, indikace, vlastní provedení. *Vojenské zdravotnické listy*. LXXIV 3–4. 2005. 10 p. ISSN 0372-7025.
- 44.** *Smetana K.:* Editorial.Kmenové buňky, *Kontakt*, 2010 (3), str.251-254. ISSN 1212-4117.
- 45.** *Sui B., Wu D., Xiang L., Fu Y. et al.:* Dental Pulp Stem Cells: From Discovery to Clinical Application. *Journal of Endodontics*, 2020 (46), str.46-55.Do: 10.1016/j.joen.2020.06.027.

46. *Syrová D.*: Současné uplatnění Rituximabu ve farmakoterapii. *Klinická farmakologie a farmacie*. Solen, s. r. o., 2015, str. 84-86. ISSN 1803-5353.
47. *Tamama K., McFadden K., Guan J.*: Improving Stem and Progenitor Cell Therapeutics. *Stem Cells International*, 2016, str. 1-5. Doi: 10.1155/2016/1409762.
48. *Urbán N., Cheung T.H.*: Stem cell quiescence: the challenging path to activation. *Development*, 2021 (3), str. 1-54. Doi: 10.1242/dev.165084.
49. *Van der Sanden B., Dhobb M., Berger F., Wion D.*: Optimizing stem cell culture. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010 (4), str. 801-807. Doi: 10.1002/jcb.22847.
50. *Vasei M., Baharvand H.*: Mesenchymal stem cells derived from perinatal tissues for treatment of critically ill COVID-19-induced ARDS patients: a case series. *Stem Cell Research & Therapy* volume, 2021 (12), str. 1-39. Doi: 10.1186/s13287-021-02165-4.
51. *Vodičková K., Vodička P., Motlík J.*: Buňky s velkým potenciálem 1. Historie indukované pluripotence a metody přípravy iPS buněk. *Živa*, 2016, str. 150-153. ISSN 0044-4812.
52. *Wadkin, L.E., Orozco-Fuentes, S., Neganova I., Lako M.*: The recent advances in the mathematical modelling of human pluripotent stem cells. *Sn. Applied Sciences*, 2020 (2), Doi: 10.1007/s42452-020-2070-3.
53. *Walcher L., Kistenmacher AK., Suo H., Kitte R et al.*: Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Frontiers in Immunology*, 2020 (11), str. 1-33. Doi: 10.3389/fimmu.2020.01280.
54. *Wang J., Jokerst J.V.*: Stem Cell Imaging: Tools to Improve Cell Delivery and Viability. *Stem Cells International*, 2016, str. 2-11. Doi: 10.1155/2016/9240652.
55. *Wilkinson A.C., Yamazaki S.*: The hematopoietic stem cell diet. *International Journal of Hematology* volume, 2018 (6) str. 634-641. Doi: 10.1007/s12185-018-2451-1.
56. *Yamanaka S.*: Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*, 2020 (4), str.523-531. Doi: 10.1016/j.stem.2020.09.014.
57. *Ye L., Swingen C., Zhang J.*: Induced pluripotent stem cells and their potential for basic and clinical sciences. *Current Cardiology Reviews*, 2013 (1), str. 63-72. Doi: 10.2174/157340313805076278.

- 58.** *Yeşilipek M.A.:* Hematopoetic stem cell transplantation in children. *Turk pediatri arsivi*, 2014 (2), str. 91-98. Doi: 10.5152/tpa.2014.2010.
- 59.** *Zakrzewski W., Dobrzyński M., Szymonowicz M., Rybak Z.:* Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 2019 (68), str. 10-68. Doi: 10.1186/s13287-019-1165-5.
- 60.** *Zhang Y., Zhang J., Yi H., Zheng J. et al.:* A novel MSC-based immune induction strategy for ABO-incompatible liver transplantation: a phase I/II randomized, open-label, controlled trial. *Stem Cell Research & Therapy* volume, 2021 (12), str. 244. Doi: 10.1186/s13287-021-02246-4.