

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Buněčná terapie

Kateřina Laurinová

Bakalářská práce

2017

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Laurinová**
Osobní číslo: **C14298**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Buněčná terapie**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Seznamte se s literárními údaji o regenerativní medicíně, diferenciaci kmenových buněk a jejich využití v klinické praxi. Definujte pojem buněčná terapie.
2. Vypracujte přehled přípravků pro buněčnou terapii vyrobených přímo z biologického materiálu pacientů.
3. Podrobně popište postup výroby přípravků buněčné terapie.
4. Informace přehledně zpracujte, použijte obrázky, schémata a grafy a ze získaných literárních údajů vyvoďte závěry o nebezpečnosti buněčné terapie pro pacienty.
5. Diskutujte o výhodách a nevýhodách této terapie, a zaměřte se i na nové možnosti využití buněčné terapie v blízké budoucnosti.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Lenka Brůčková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

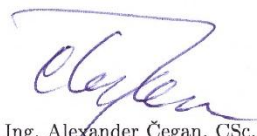
Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci 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., autorský zákon, 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 § 47 b 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 1. 6. 2017

Kateřina Laurinová

Poděkování

Ráda bych touto cestou chtěla poděkovat mé vedoucí bakalářské práce Mgr. Lence Brůčkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování věnovala.

Anotace

Bakalářská práce se věnuje novému oboru medicíny, buněčné terapii, jejímž základem jsou kmenové buňky. Ty se dají dělit podle původu a hlediska potenciálu diferencovat do různých typů tkání či orgánů. Práce se zaměřuje kromě vlastností buněk i na jejich separaci, zpracování a užití. Vždy záleží na druhu a závažnosti onemocnění, na základě těchto kritérií se dále odvíjí, jaký typ kmenových buněk bude odebrán, zpracován a jaká bude jeho aplikace do organismu. Závěr práce je věnován rizikovým faktorům buněčné terapie, které je zapotřebí před samotnou léčbou zhodnotit.

Klíčová slova

buněčná terapie, kmenové buňky, aplikace, léčba, nemoci

Title

Cell Therapy

Annotation

The final bachelor's thesis provides the analysis of the new field of medicine, cell therapy. Stem cells can be divided by origin and their potential to differentiate into different kinds of tissues or organs. The thesis focuses on characteristics of cells as well as their separation and use. The selection of the appropriate stem cells always depends on the type and severity of the disease. Based on these criteria, the right treatment is chosen. The last part is dedicated to the risk factors of cell therapy which need to be taken into consideration before the treatment itself.

Key words

cell therapy, stem cells, application, treatment, diseases

Obsah

Seznam ilustrací.....	9
Terminologie.....	10
ÚVOD.....	12
Buněčná terapie.....	13
1.1 Kmenové buňky jako důležitá součást buněčné terapie.....	13
1.1.1 Embryonální kmenové buňky.....	14
1.1.2 Fetální kmenové buňky (FSC).....	15
1.1.2.1 Z plodové vody (AFS= amniotic fluid-derived stem cells)	15
1.1.3 Mezenchymové kmenové buňky (MSCs = mesenchymal stem cell).....	16
1.1.3.1 Kmenové buňky z tukové tkáně (ASCs, adipose stem cells).....	16
1.1.3.2 Kmenové buňky z pupečnickové krve (UCB, umbilical cord blood).....	17
1.1.3.3 KB z kostní dřeně.....	18
1.1.4 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)	18
1.2 Historie.....	18
1.3 Využití.....	20
1.4 Získání kmenových buněk pro buněčnou terapii	20
1.4.1 Embryonální kmenové buňky (ESCs)	21
1.4.2 Fetální kmenové buňky (FSC).....	21
1.4.2.1 Z pupečnickové krve.....	21
1.4.2.2 Z plodové vody (AFS= amniotic fluid-derived stem cells)	22
1.4.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)	22
1.4.4 Mezenchymální kmenové buňky	23
1.4.4.1 Z kostní dřeně.....	23
1.4.4.2 Z periferní krve	23
1.4.4.3 Z tukové tkáně.....	24
1.5 Aplikace kmenových buněk do organismu	24

1.5.1	Vybrané aplikace kmenových buněk	25
1.5.1.1	Systemové podání kmenových buněk.....	25
1.5.1.2	Lokální aplikace kmenových buněk.....	26
1.6	Použití kmenových buněk u vybraných onemocnění.....	28
1.6.1	Autoimunitní onemocnění	28
1.6.1.1	Revmatoidní artritida	28
1.6.1.2	Diabetes Mellitus (DM)	30
1.6.1.3	Crohnova choroba	33
1.6.2	Kardiovaskulární onemocnění	34
1.6.2.1	Srdeční selhání	34
1.6.3	Nádorové onemocnění	36
1.6.3.1	Leukemie.....	36
1.6.4	Svalová dystrofie	38
1.7	Nebezpečí a rizika v buněčné terapii	41
ZÁVĚR	44
Použitá literatura	45

Seznam ilustrací

Obrázek 1 - Struktura kmenových buněk [2]	13
Obrázek 2 - Zdroj extra-embryonálních kmenových buněk [3]	15
Obrázek 3 - Princip využití kmenových buněk [1]	19
Obrázek 4 - Intra-artikulární aplikace	25
Graf 1 - Procentuální použití kmenových buněk u vybraných onemocnění	27
Obrázek 5 - Projevy RA na prstech ruky	28
Obrázek 6 - Porovnání svalové hmoty u zdravého těla a těla se svalovou dystrofií	38

Terminologie

- **Regenerativní medicína** = medicínské postupy, které umožňují pacientovi opravit, nahradit nebo regenerovat poškozené nebo nemocné buňky, tkáně a orgány.
- **Zygota** = vzniká po splnutí spermie a vajíčka (je totipotentní)
- **Allogenní buňky** = buňky jiného organismu téhož živočišného druhu
- **Autologní buňky** = buňky téhož organismu
- **Xenogenní buňky** = buňky jiného živočišného druhu
- **Morula** = plný kulovitý shluk buněk (tzv. blastomér), které vznikají v prvotních fázích embryogeneze, a to rychlým dělením oplodněného vajíčka
- **Indukovaná pluripotentní kmenová buňka (iPSC)** = uměle připravená kmenová buňka, vytvořená z původně zcela obyčejné buňky získané typicky z těla dospělého.
- **Somatické buňky** = označení všech buněk v organismu kromě pohlavních
- **Totipotentní buňky** = mohou se přeměnit na jakýkoliv jiný typ buněk
- **Pluripotentní buňky** = potomci totipotentních buněk, které mohou produkovat jakékoliv jiné buňky kromě totipotentní
- **Multipotentní** = mohou tvořit pouze buňky příbuzné danému typu buňky (např. krevní buňky)
- **Plasticita KB** = schopnost dospělých tkáňově specifických KB diferencovat se do několika typů somatických buněk ve tkáni, ve kterém žijí.
- **Mezenchymální stromální buňky** (mesenchymal stromal cells, MSC) = je to heterogenní populace kmenových buněk, které lze izolovat z mnoha různých tkání.
- **Embryo** = vzniká po splnutí spermie s vajíčka. U člověka jde o období od 2. do 8. (nebo 10.) týdne intrauterinního vývoje.
- **Fetus (plod)** = je nenarozený jedinec ve fetálním vývojovém období. To je obdobím mezi embryem a narozením.
- **Blastocysta** = je to několik dnů staré embryo
- **Dystrofin** = protein, který pomáhá svalové buňky, aby jejich normální tvar a funkci)
- **Apoptóza** = programovaná buněčná smrt, je mechanismus sloužící k eliminaci nepotřebných či poškozených buněk
- **Fibróza** = zmnožení vaziva, typu pojivové tkáně v důsledku hojivého procesu po zánětu, zranění či jen reparativní reakce

- **Cytokiny** = jsou produkovány buňkami imunitního systému (makrofágy, T-lymfocyty, atp.) a jsou schopné navodit například rychlé dělení a diferenciaci určitých typů buněk, které se účastní v boji proti patogenům v imunitní obraně.
- **Chemokiny** = skupina malých cytokinů s chemotaktickým účinkem, jejichž hlavní funkcí je regulace migrace buněk

ÚVOD

Buněčná terapie je v současné době rychle se vyvíjející obor, který využívá k terapii různých chorob izolované buněčné populace. V buněčné terapii se používají zejména kmenové buňky, které díky svým vlastnostem mohou být slibnou léčbou mnoha onemocněním.

Kmenové buňky jsou nediferencované buňky, které mají schopnost se dělit (proliferovat) a přeměnit se na jakýkoliv jiný buněčný typ, neboli se diferenciovat.

Kmenové buňky se nacházejí prakticky ve většině orgánů a tkání lidského těla, přesto ale představují maximálně jedno procento všech buněk organismu. Schopnost těchto buněk diferenciovat se za běžných okolností, umožňuje tělu vytvořit si nové buňky a opravit tak poškozené části těla jako jsou například tkáně, svaly, orgány, kosti, krev nebo kůže. Díky vlastnostem, které mají, by jednou mohlo být možné vyléčit spoustu nevléčitelných nebo špatně léčitelných nemocí, jako je například Crohnova choroba, revmatoidní artritida, Diabetes mellitus nebo leukemie, ale také nás mohou tyto buňky dovést k podstatě a pochopení mnoha chorob.

Buněčná terapie se provádí již několik let a prvotně byly kmenové buňky testovány a zkoumány na zvířatech. Nejznámějším příkladem je léčba leukemie za pomoci kmenových buněk z kostní dřeně. Na vybraných zahraničních klinikách využívají k léčbě určitých druhů nemocí buňky např. z pupečnickové krve, embryonálních a fetálních kmenových buněk a také buněk z tkáně tukové.

Je zde poukázáno na to, jaké má buněčná terapie využití v různých typech onemocnění. Zpracování určitých druhů buněk na konkrétní nemoci je rozdílné. Liší se zejména v druzích buněk, jejich kultivaci, zpracování a druhu podání. Kmenové buňky mají také vedlejší účinky, což má svá nebezpečí. Je proto důležité zvážit přednosti a rizika v jednotlivých případech.

Buněčná terapie

Buněčná terapie může být definována jako terapie, ve které se buněčný materiál injekčně vpravuje do těla pacienta [1]. Terapie se využívá na opravu nebo výměnu poškozených nebo nemocných lidských buněk, tkání nebo orgánů a na obnovu normální běžné funkce [2]. Buněčnou terapii můžeme rozdělit na dvě části. První část zahrnuje transplantaci lidských buněk od dárce do těla pacienta. Tato část transplantace buněk je perspektivní zejména do budoucna. Druhá část buněčné terapie zahrnuje injekční vsťikování materiálů živočišného původu k léčbě onemocnění. V uvedené praxi postrádá jakékoli lékařské důkazy o účinnosti a může mít velmi vážné následky [3]. Tento způsob léčby nemůžeme využít, pokud není ověřen na zvířatech. Nelze také využít takové terapie, které by mohly pacienta výrazně ohrozit, jak je tomu např. v některých méně rozvinutých zemích [4].

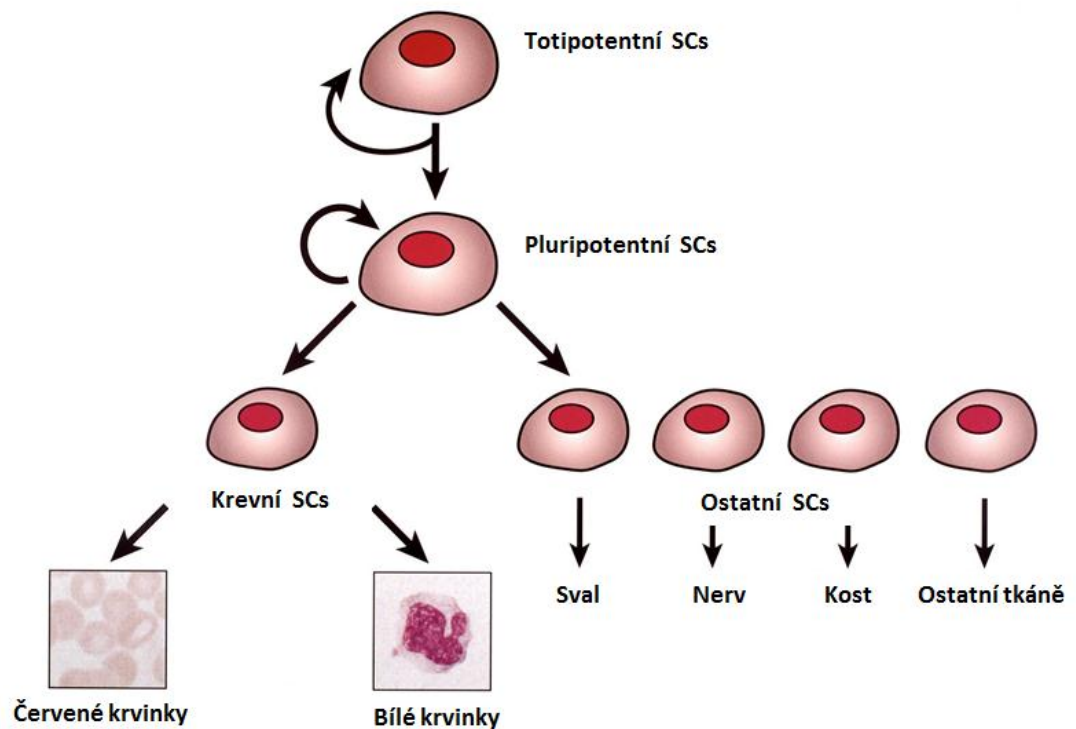
Jedním z hlavních problémů je, že na základě jejich charakteristiky neomezené sebeobnovy a rychlé proliferace jsou kmenové buňky významným rizikem maligní transformace a tvorby teratomu [5].

1.1 Kmenové buňky jako důležitá součást buněčné terapie

Základem buněčné terapie jsou kmenové buňky [6]. Ty přináší slibné výsledky při léčbě mnoha prozatím neléčitelných onemocnění [7]. Využívají se díky svým schopnostem jako je sebeobnova, diferenciací a také proto, že mají potenciál k obnově tkání [6]. Byly identifikovány téměř ve všech orgánech lidského těla a hrají důležitou roli při vývoji, homeostáze a nemoci [8]. Kmenové buňky lze využít při léčbě mnoha nevléčitelných nemocí jako je: Parkinsonova choroba, cukrovka, Alzheimerova choroba, Duchennova svalová dystrofie, infarkt myokardu, autoimunitní onemocnění, dětská mozková obrna, leukemie, aj. [6, 9].

Celý organismus vzniká z jedné buňky, zygoty, ta však není schopna sebeobnovy a vytváří buňky moruly a poté blastocyty [10]. Pro kmenové buňky je charakteristické, že mají schopnost se v buněčném dělení rozdělit na dva typy. Po každém buněčném dělení alespoň jedna ze dvou dceřiných buněk zachovává původní vlastnosti kmenových buněk. Ty mohou být rozděleny podle jejich původu nebo potence. Kmenové buňky (SCs = Stem Cell) typicky vytváří jen omezený počet buněčných typů a jsou multipotentní (mezenchymové buňky) nebo unipotentní (spermatické buňky) (obr 1). Většina SCs hematopoetických, mesenchymálních) mají omezenou schopnost zvládnout hlavní trauma nebo onemocnění,

kteřá by způsobila rozsáhlou ztrátu buněk a tkání. ESC z časného embrya mají potenciál vytvářet jakýkoliv buněčný typ, jsou pluripotentní. Podle původu kmenových buněk mohou být rozděleny do tří skupin: embryonální (ESCs = embryonic stem cells), fetální (FSCs = Fetal Stem Cell) a dospělé kmenové buňky (ASCs = Adult Stem Cell). ESC vznikají z embryoblastu blastocysty. ASCs nalezneme u dětí i dospělých ve všech tkáních těla (např. kostní dřeň, tuková tkáň, pupečníková krev, zubní dřeň, kosterní sval atd.) [10, 11, 12, 13]. Mezenchymové KB mohou měnit mikroprostředí tkáň prostřednictvím sekrece rozpustných faktorů [14].



Obrázek 1 - Struktura kmenových buněk [2]

1.1.1 Embryonální kmenové buňky

ESC mají schopnost si vybrat mezi dlouhodobou sebeobnovou a diferenciací [10]. Tyto kmenové buňky jsou tak plastické, že za určitých okolností mohou být podány i jinému živočišnému druhu [15]. Jsou schopné diferenciaci na buňky přítomné ve všech 3 embryonálních zárodečných vrstvách, a těmi jsou ektoderm, mezoderm a endoderm, kvůli tomu se nazývají pluripotentní. Čím jsou embryonální buňky starší, tím se stávají více a více omezené v jejich schopnosti diferencovat

se do několika linií. Potom se nazývají multipotentní; to znamená, že jsou schopny tvořit omezený počet typů buněk [16].

1.1.2 Fetální kmenové buňky (FSC)

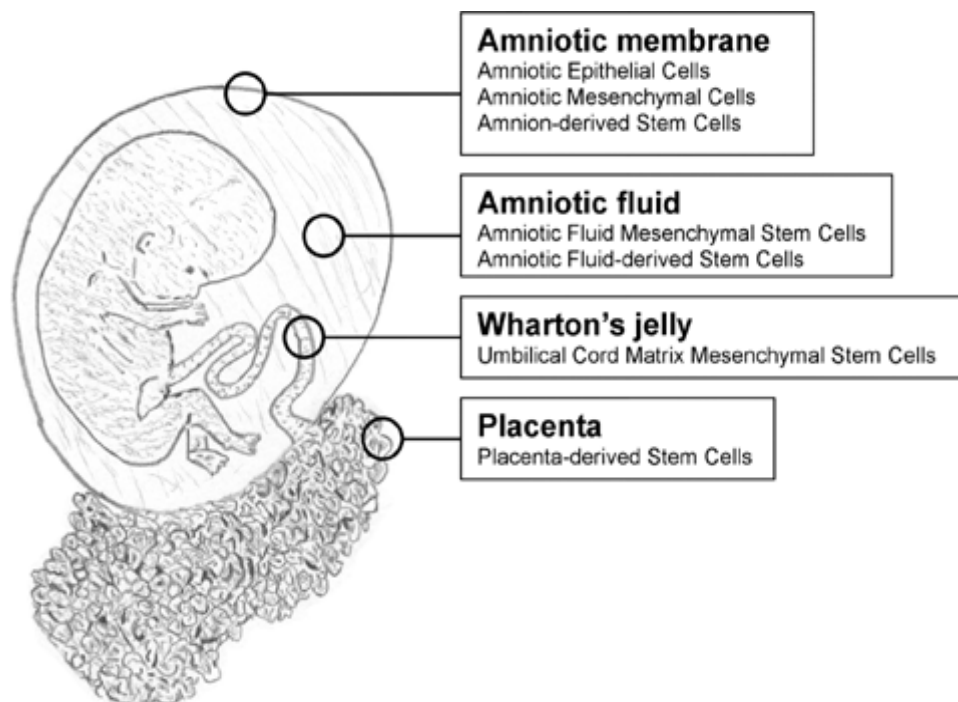
FSC mají potenciál nabídnout ideální rovnováhu mezi kvalitou a etikou [17]. Různé podtypy fetálních kmenových buněk byly popsány na základě tkáně, ze které jsou odvozeny, tj. plodová voda, pupeční šňůra, amniotická membrána a placenta (obr. 2). Fetální kmenové buňky netvoří teratomy. Jsou relativně snadně dostupné a mají vysokou míru proliferace, a to dělá FSC ideální zdroje buněk pro regenerativní medicínu [18]. FSC mají vlastnosti, které jsou mezi ESC a dospělými KB a mohou být derivována z různých tkání v těhotenství v prvním trimestru fetální krve, jater a kostní dřeně, ve druhém trimestru jater, plic, slinivky břišní, kostní dřeně, plodové vody, pupečníku a membrán. FSC ukazují přednostně diferenciaci kostí *in vitro a in vivo*, což by mohl být prostředek pro léčbu jak vrozených, tak získaných nemocí. [19]. Počet KB získaných z plodu je menší než z embryonálních tkání, ale získání FSC je mnohem snazší, jednodušší, častější a nejsou problémy s etikou jako u ESC.

FSC jsou atraktivnější než ESC, protože jejich odebrání nevyžaduje zničení embrya, neboť zdroj FSC je považován za odpad [20].

1.1.2.1 Z plodové vody (AFS= amniotic fluid-derived stem cells)

Buňky plodové vody (AFS), mají pluripotentní vlastnosti. Lidská plodová voda se získává aminocentézou. Při odběru a zpracování buněk nejsou kladeny žádné etické otázky. Plodová voda obsahuje řadu kmenových buněk pocházejících z embryonálních a extra-embryonálních tkání. Také tam lze nalézt buňky plodu pocházející z kůže, dýchacích cest, urogenitálního a zažívacího traktu. V případě anomálií plodu mohou být v plodové vodě někdy přítomny nevhodné typy buněk, jako jsou nervové buňky. Buňky plodové vody se běžně používají pro prenatální diagnostiku široké škály fetálních abnormalit v důsledku genetických vad. Druhy a vlastnosti buněk amniotické tekutiny se mění s délkou těhotenství a také v případě, že je u dítěte nalezena fetální patologie. Na základě morfologické a růstové charakteristiky mohou být buňky rozděleny do tří typů: specifické fibroblastoidní, epiteloidní a buňky plodové vody. AFS netvoří teratokarcinomy. Buňky mají široké spektrum schopnosti

diferenciace, která byla prokázána u všech tří zárodečných vrstev. AFS je vhodným zdrojem kmenových buněk pro klinické účely [16, 21, 22].



Obrázek 2 - Zdroj extra-embryonálních kmenových buněk [3]

1.1.3 Mezenchymové kmenové buňky (MSCs = mesenchymal stem cell)

Je prokázáno, že MSCs existují nejen v kostní dřeni, ale prakticky ve všech orgánech, např. tukové tkáni, pupečnickové krvi, plodové vodě, periferní krvi, zubní tkáni, kůži ... [23]. Získáváme je nejčastěji punkcí kostní dřene (z lopaty kosti kyčelní), odběrem tukové tkáně (liposukcí) nebo z pupečnickové krve a jejich následnou kultivací v podmínkách in-vitro. Takto získané multipotentní kmenové buňky jsou nediferencované, nekrvotvorné a mohou se změnit v řadu jiných buněčných typů, hlavně v osteoblasty (buňky kostní tkáně), chondrocyty (buňky tvořící chrupavky), tenocyty (šlachy), myocyty (buňky kosterní), kardiomyocyty (buňky srdeční svaloviny) či adipocyty (buňky tukové tkáně) [15].

1.1.3.1 Kmenové buňky z tukové tkáně (ASCs, adipose stem cells)

ASCs mají terapeutickou použitelnost v různých oblastech pro reparaci a regeneraci akutních a chronicky poškozených tkání [24]. Bylo prokázáno v preklinických a klinických studiích, že aplikace ASCs je bezpečná a účinná jak při zranění, tak při nemoci. Tento typ buněk je jedním z nejslibnějších SCs identifikovaných tak dobře, protože lidská tuková tkáň

je všudypřítomná a lze snadno získat ve velkém množství. Z tohoto důvodu je použití autologních ASCs v současné době velmi dobrým výzkumným nástrojem [25]. Tyto buňky také mají chondrogenní, neurogenní a osteogenní schopnosti. Věk dárce může být faktorem, protože některé studie ukazují, že diferenciační kapacita je vyšší v kultuře mladších lidí ve srovnání se staršími lidmi. [26].

1.1.3.2 Kmenové buňky z pupečnickové krve (UCB, umbilical cord blood)

UCB jsou všechny novorozeneckého původu, a proto mají vynikající vlastnosti, zejména vysoký proliferační a diferenciační potenciál. Buňky jsou snadno dostupné ve velkém množství z tkáně, které jsou obvykle odstraněny a mohou být izolovány a rychle a levně kultivovány *in vitro*. Mají nízké riziko vzniku teratomu [5]. Získané buňky mohou být zmrazeny ("kryokonzervovány") v buněčných bankách a jsou v současné době používány k léčbě dětí s rakovinou, krevními chorobami, jako je leukémie, stejně jako genetické onemocnění krve, jako je Fanconiho anémie. Léčba dospělých je náročnější, vzhledem k malému počtu buněk získaných z jedné pupeční šňůry. Taková léčba pro dospělé vyžaduje transplantaci krve ze dvou až čtyř pupečních šňůr. Nicméně jedna z výhod transplantace UCB je, že je méně pravděpodobné, že bude transplantace imunitním systémem odmítnuta, než tomu bývá obvykle u transplantace kostní dřeně. Pupečnicková krev musí být ještě přizpůsobena pacientovi, tak aby byla transplantace úspěšná [27]. Pupečnicková krev se musí zpracovat nejpozději do 48 hodin po odběru. Vzorek se smíchá v přesném poměru se speciální látkou (kryoprotektivním roztokem) a to zabrání poškození buněk v průběhu zamrazení. Také se může upravit objem pupečnickové krve odstraněním části plazmy. Nejmodernější přístroje sami automaticky upravují a regulují objem a míchání s kryoprotektivním roztokem. Pomocí par tekutého dusíku probíhá ve speciálním přístroji zamrazení buněk. Tento proces je řízen počítačem a vzorek je tak postupně ochlazen na teplotu -180 °C [28]. Dále se odebírají vzorky na zjištění HLA typizaci buněk v krvi. Zjištění HLA znaků na povrchu buněk je zásadní pro použití buněk k transplantaci. Sleduje se zpravidla 6 znaků a je potřeba, aby mezi dárce a příjemcem byla co největší shoda. Ideálně by to měla být shoda úplná, tedy 6 z 6. Pupečnickovou krev lze transplantovat až do neshody 4 z 6 znaků u nepříbuzného dárce. Po transplantaci, ale stoupá riziko potíží a nežádoucích účinků [29]. Zvýšená imunitní odpověď u dospělých pacientů může způsobit problémy jako je například reakce štěpu proti hostiteli [28].

1.1.3.3 KB z kostní dřene

Kostní dřeň je měkká houbovitá tkáň, která je tekutá a vypadá jako krev. Nachází se v dutinách dlouhých kostí, jako jsou kyčle a stehenní kosti. Kmenové buňky z kostní dřene jsou zodpovědné za produkci nových krvinek. Existují dvě hlavní větve SCs v kostní dřeni, krvetvorná SCs a mezenchymální SCs. Kostní dřeň obsahuje buňky nezralé a kmenové, které se mohou vyvinout do červených krvinek, bílých krvinek a krevních destiček. Kostní dřeň je běžným zdrojem pro odběr lidských SC [30, 31].

1.1.4 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

iPSC (Induced Pluripotent Stem Cells) se podobají na molekulární a funkční úrovni lidským ESC. Pro modelování chorob, testování léků a také v regenerativní medicíně mohou být iPSC považovány za lepší než lidské ESC. Nejedná se o buněčný typ, který by bylo možné najít ve vyvíjejícím se či dospělém člověku, ale jsou připravovány uměle cílenou modifikací již diferenciovaných buněk těla, nejčastěji fibroblastů [32].

iPSC buňky přitahovaly velkou pozornost, protože mohou být generovány z dospělých somatických buněk, aby se zabránilo etické otázce související s výzkumem použití lidských embryí. Tyto reprodukční buňky byly použity k vytvoření myších embryí, která vyrostla do živě narozených myší, když hostitelem je náhradní matka. Mohla by být použita tato technologie k výrobě lidských embryí z kožních buněk podobným způsobem? Tuto technologii ještě není možné provádět u lidí, přesto existují obavy nad tím, jak by měly být tyto postupy regulovány [4].

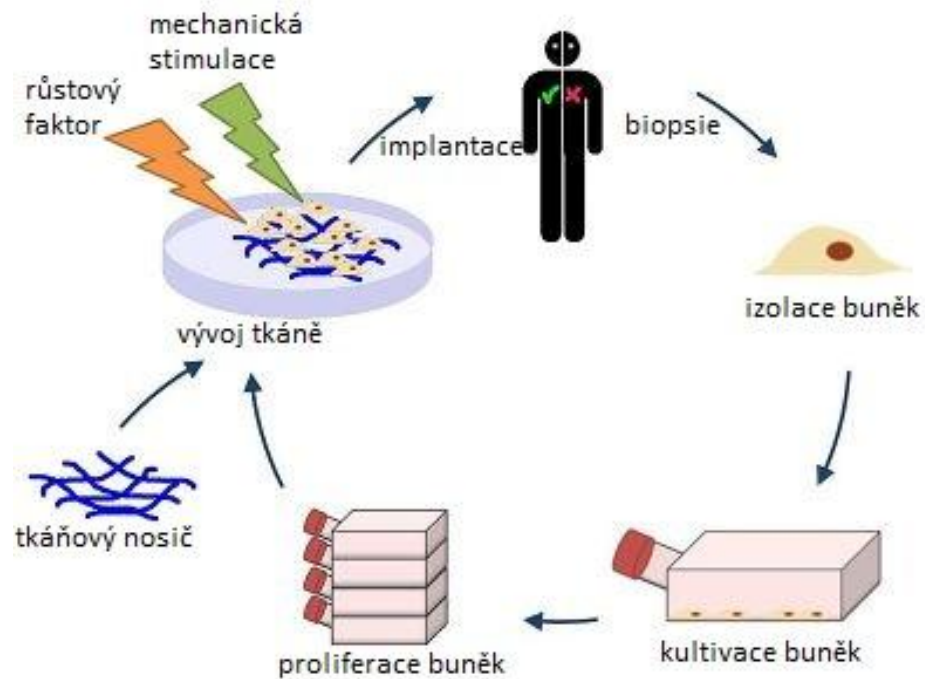
1.2 Historie

V 19. století bylo Virchovem a Schwannem formulováno tvrzení „*omnis cellula a cellula*“. To popisuje, že tkáň savců obsahuje hlavní buňky, ze kterých vznikají další jiné buňky [10]. Na začátku 20. století hrály důležitou úlohu při výzkumu buněk schopných sebeobnovy, pokusy o transplantaci kostní dřene [33]. V roce 1909 Maximov pronesl teorii, že lymfocyty působí jako obecné kmenové buňky, které cestují tkáněmi, aby se usadily ve vhodném mikroprostředí. O pár let později v roce 1917 Pappenheim zveřejnil svůj předpoklad o existenci nediferencovaných kmenových buněk, které pojmenovával „*gemeinsame Stammzelle*“ [10]. Poté až v roce 1950, vědci zjistili, že kostní dřeň obsahuje

alespoň dva druhy kmenových buněk, a to krvetvorné kmenové buňky, které tvoří všechny typy krevních buněk v těle [34]. Roku 1957 Thomas a kolektiv poprvé podali zprávu o úspěšné nitrožilní infuzi kostní dřeně u pacientů, kteří podstoupili ozařování nebo chemoterapie. V roce 1990 za to dostaly Nobelovu cenu. Thomas a kolektiv také stanovily základní pravidla pro úspěšnou transplantaci kostní dřeně. Transplantace kostní dřeně byla první terapie za pomoci kmenových buněk [33]. V roce 1961 James Till a Ernest McCulloch prokázaly existenci buňky CFU-S (colony forming unit-spleen) metodou slezinných kolonií. O rok později tedy 1962 byl Goodmanem a Hodgsonem poprvé použit termín kmenová buňka. Také definovali vztah těchto buněk k obnově krvetvorby u myši po celotělním ozáření [10]. Kanadští vědci Ernest McCulloch a James Till v roce 1963 kvantitativně popsali sebeobnovení kostní dřeně u myši, které byla transplantována kostní dřeň od jiného jedince. Také dělali experimenty na myši kostní dřeně a pozorovali, zdali různé krevní buňky pocházejí ze speciálních tříd buněk. To je jeden z prvních důkazů krevních kmenových buněk. V roce 1968 byla provedena doktorem Thomasem první úspěšná transplantace kostní dřeně u dvojčat, z nichž jeden trpěl několika kombinacemi získané imunitní nedostatečnosti. Mezi dárcem a příjemcem u této transplantace byla naprostá HLA kompatibilita. Mezi nepříbuzenskými jedinci byla provedena úspěšná transplantace v roce 1973 [33]. Objevení kmenových buněk v lidské pupečnickové krvi bylo až v roce 1978. Roku 1981 bylo první odvození linií embryonálních kmenových buněk vyvinutých z embryoblastu myších blastocyst [29]. V roce 1997 úspěšné první naklonování savce ze somatické buňky dospělého jedince (ovce Dolly) [33]. V roce 1998 vědec James Thomson izoloval lidské embryonální kmenové buňky, které jsou odvozeny od časných embryí. Tyto buňky mají potenciál k omlazení a specializovat se do tkání. Tento objev také iniciuje etické otázky o výzkumu lidských embryonálních kmenových buněk. V roce 2001 se Americké společnosti podařilo k lékařským účelům naklonovat lidské embryo. Poměrně velký pokrok ve výzkumu indukovaných pluripotentních kmenových buněk byl v roce 2006 [29]. V průběhu posledních deseti let byly nalezeny somatické kmenové buňky v mnoha orgánech a tkáních, včetně centrálního nervového systému, kostní dřeně, periferní krve, krevních cév, pupečnickové krve, kosterního svalu, epidermis kůže, zubní dřeně, srdce, střev, jater, slinivky břišní, plic, tukové tkáně, ovariální epitel, sítnice, rohovky a varlat [13].

1.3 Využití

Embryonální kmenové buňky, dospělé kmenové buňky a indukované pluripotentní kmenové buňky mohou být použity pro účel transplantace. Potřebují pouze správné médium obsahující faktory, které budou poskytovat požadovanou stimulaci pro řízené diferenciaci a makroprostředí s odpovídající teplotou, pH, rychlost plynů (jako je bioreaktor), trojrozměrné struktury pro zajištění správného mikroprostředí pro buněčnou proliferaci, růst a diferenciaci (obr. 3) [35].



Obrázek 3 - Princip využití kmenových buněk [1]

1.4 Získání kmenových buněk pro buněčnou terapii

Ačkoliv embryonální SCs mají sice nejvyšší stupeň diferenciacního potenciálu, nejsou však snadno dostupné a zprostředkování těchto buněk z embryí či tkání plodu, včetně abortů, vyvolává náboženské a etické otázky [13]. Naopak, několik typů dospělých SCs, jako jsou SCs mezenchymální, hematopoetické, kožní, stromální kmenové buňky derivované z tukové tkáně, jsou dostupnější a tolik nevyvolávají etické diskuse oproti embryonálním SCs. Existují určitá omezení praktického využití embryonálních SCs a indukovaných pluripotentních SCs (iPSC): například buněčné regulace tvorby teratomu, etická úvaha, imunitní problémy týkající se SC a potíže s genetickou manipulací s ohledem na iPSCs [27].

1.4.1 Embryonální kmenové buňky (ESCs)

Tyto buňky lze získat z embryí ve stádiu blastocysty nebo moruly (4-5 dní staré) [36]. Blastocysta je shluk buněk v množství asi 150 buněk o průměru ~ 0,2 mm. Buňky v blastocystě také obsahují SCs, které pak výzkumníci izolují a pěstují v laboratoři jako buňky ESC [4]. Blastocysty jsou vyrobeny z nepoužitých embryí vytvořených pomocí *in vitro* fertilizace při problémech s neplodností. Mohou být také použity buňky odvozené z dřívějších vývojových stádií. Nepoužitá embrya mohou být použita pouze pro výzkumné účely s písemným souhlasem rodičů [17].

1.4.2 Fetální kmenové buňky (FSC)

FSC mohou být odvozeny buď z tkání plodu (z potratu) nebo pupečnickové krve, plodové vody, Whartonův rosol a plodový vak [18].

1.4.2.1 Z pupečnickové krve

SCs z pupečnickové krve mohou být získány z pupeční šňůry po narození dítěte. Odběr se může provést až po podvázání a přestřížení pupečnicku. Není to bolestivé ani pro matku, ani pro dítě a nepředstavuje to pro ně žádné riziko. Pouze v případě komplikací u porodu, kdyby odběr pupečnickové krve mohl zkomplikovat nebo zdržet neodkladnou péči o rodičku nebo o novorozence, může lékař rozhodnout odběr ze závažných důvodů neprovést, život matky a dítěte má vždy přednost. Buňky z pupečnickové krve jsou shromažďovány do vaku. Jednotka pak podstoupí další zpracování (přednostně dochází k odstranění červených krvinek) a konzervaci (zmražení) a jsou uloženy v kapalném dusíku v mrazáku pro případné použití v pozdější době. Buňky v pupečnickové krvi mohou být méně zralé, to může někdy znamenat větší odlišnosti v tkáních tzn. jsou rozdílné HLA systémy, které potom soupeří mezi buňkami dárce a příjemce. K dispozici může být také menší výskyt potransplantačních odpovědí jako je například reakce štěpu proti hostiteli (komplikace transplantace, která může být život ohrožující). Pacienti se vzácnými typy HLA, jsou často úspěšní v nalezení vhodného kabelu štěpu, když jiné zdroje nejsou k dispozici. [27, 28, 31].

1.4.2.2 Z plodové vody (AFS= amniotic fluid-derived stem cells)

Tento zdroj KB je jediný z AFS, kde dochází k odebrání buněk před porodem. Plodová voda byla získána amniocentézou. Amniocentéza je rutinní klinický zákrok prováděný mezi 15-20. týdnem těhotenství pro prenatální diagnostiku. Vpich se provádí přes stěnu břišní v oblasti dělohy velmi tenkou jednorázovou jehlou, bez umrtvení, protože je téměř nebolestivý. Při jednom odběru se vezme 20-30 ml plodové vody. Celý odběr je pod kontrolou ultrazvuku. Jedná se o eticky schválený a potvrzený postup. Plodová voda byla také použita z odvodnění u těhotných pacientek s nadbytkem plodové vody. Vzorky buněk byly použity pouze tehdy, když nebyly zjištěny žádné významné abnormality v cytogenetické analýze. Všichni pacienti museli vždy dát písemný souhlas, aby mohly být vzorky dále použity pro výzkumné účely [16, 37, 38].

1.4.3 Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

Tento typ kmenových buněk se nachází někde mezi dospělými a embryonálními kmenovými buňkami. iPSC jsou odvozeny z diferencovaných buněk, jako jsou kožní fibroblasty, ale byly také odvozeny z jater, beta buněk slinivky břišní a zralých B buněk. Zdá se, že přes rozdíly v jejich původu, mají stejný potenciál a vlastnosti jako embryonální KB. Jedná se o vysoce univerzální buňky podobně jako ESCs, ale jsou vyrobeny ze specializovaných buněk dospělých pomocí laboratorních technik (genetické přeprogramování) [29]. Buňky lze přeprogramovat několika způsoby, např. přenos jader somatických buněk (SCNT), změna přenosu jádra (ANT) a metody fúze somatických buněk z ESCs [4, 25, 18, 39].

Přenos jader somatických buněk (SCNT)

Lidské oocyty (vajíčka) se získají z dobrovolného dárce (ženy), jenž přijal léky, které stimulují produkci více než jednoho vajíčka v průběhu menstruačního cyklu. Lékaři pak odstraňují jádro z darovaného vajíčka a nahrazují ho jádrem ze somatické buňky, tedy dospělými buňkami z jiné části těla. Oocyt s nově přeneseným jádrem je pak stimulován se vyvíjet. Oocyt se může vyvinout pouze v případě, že transplantované jádro se vrátí do pluripotentního stavu pomocí faktorů přítomných v cytoplasmě oocytů. Proces přenosu jiného jádra do vajíčka „přeprogramování“ ji dostane do pluripotentního stádia, to je reaktivace úplné sady genů pro výrobu všech tkání v těle. Tato změna ve stavu zralého

jádra se nazývá jaderné přeprogramování. Vajíčko se poté nechá vyvíjet v laboratoři po dobu několika dní, a pluripotentní kmenové buňky jsou odvozeny od něj [39, 40].

1.4.4 Mezenchymální kmenové buňky

Mohou se získávat například z kostní dřeně, tukové tkáně, pupečnickové krve, ale i dalších tkání [15].

1.4.4.1 Z kostní dřeně

Odběr kostní dřeně je bezpečný. Trvá přibližně hodinu a provádí se v celkové narkóze. Z vnitřku kostí můžeme kmenové buňky získat jednoduchým odsátím dutou jehlou z dutiny kostí v plné narkóze. Celkově se odebírá i více než 1 litr krve z kostní dřeně kostí kyčelní [30, 31, 41]. Po asi 2–3 hodinách po skončení odběru může být dárce bezpečně propuštěn domů. Po odebrání jsou kultivovány v médiu s 10% fetálním telecím sérem [42]. Pokud je velký časový rozestup (až několik dní) mezi odběrem a infuzí, může být kostní dřeň skladována buď při pokojové teplotě, nebo v chladničce po dobu 24 až 48 hodin. Kostní dřeň může být také konzervována chlazením nebo zmrazením, pokud je to nutné. Tento postup se běžně používá, pokud jsou vzorky shromažďovány pro použití v autologní transplantaci. Zmrazené buňky jsou obvykle uloženy v kapalném dusíku v mrazáku [31]. Odběr kostní dřeně může mít mírné vedlejší účinky. Velká většina dárců pocítila bolest v oblasti vpichu nebo pouze v zádech. Mírné negativní dopady mohou zahrnovat zvýšenou teplotu, nevolnost, zvracení nebo mírnou bolest hlavy [43].

1.4.4.2 Z periferní krve

Odběr HSCs z periferní krve se provádí ambulantně pomocí přístroje neboli separátoru. Toto zařízení funguje jako odstředivka, která odděluje složky plné krve od dárce. Dárce je napojen na separátor loketními žilami, pouze ve vzácných případech, kdy dárce má špatné žíly, jde použít centrální žilní katétr. Krev vstupuje do zařízení a je zpracována tak, že krvetvorné progenitorové buňky a další bílé krvinky se odstraní, zbytek krve se vrací do dárce přes druhou jehlu umístěnou v druhé loketní jamce. Celý odběr trvá cca 4 hodiny. Po asi 2–3 hodinách po skončení odběru může být dárce bezpečně propuštěn domů. Jelikož je SCs v krvi velmi málo je zapotřebí je před samotným odběrem

vyplavit z kostní dřeně do krve pomocí tzv. růstového faktoru (G-CSF, =Granulocyte Colony Stimulating Factor). Růstovými faktory si každý organismus reguluje normální tvorbu všech krvinek. Pacienti darující autologní progenitorové buňky periferní krve také obdrží chemoterapii jako součást mobilizace. Pokud je delší doba (až několik dní mezi odběrem a infuzí), mohou být progenitorové buňky periferní krve skladovány při pokojové teplotě, nebo v chladničce jako KB získané z kostní dřeně. Podobně jako dárce kostní dřeně, i dárce PBSC mohou trpět mírnými nepříznivými účinky. Závažné, životu nebezpečné vedlejší účinky nejsou časté [30, 31, 41, 43].

1.4.4.3 Z tukové tkáně

ASCs lze získat ve vysokém počtu buď z aspirátu z liposukce, nebo z fragmentů podkožní tukové tkáně a mohou být snadno pomnoženy in vitro. Izolované ASC jsou obvykle pěstovány v jednovrstevné kultuře v základním médiu obsahujícím 10 % fetálního bovinního séra [25].

1.5 Aplikace kmenových buněk do organismu

Kmenové buňky se dají implantovat několika způsoby a to systémově, lokálně nebo kombinovaně. Při lokálním podání se používají cesty intracerebrální, intraventrikulární, intraspinální, intramuskulární a intrathekální. Při podání systémovém jde o intraarteriální, intravenózní a intraperitoneální cesty. Tyto aplikace jsou vhodné díky relativnímu neinvazivnímu podání, které jsou spojené s nízkým rizikem dodatečného poškození tkáně příjemce [44].

Způsob aplikace kmenových buněk může významně ovlivnit počet buněk na cílovou oblast, stejně jako výskyt nežádoucích účinků. Velkým problémem při systémovém zavádění kmenových buněk je, že buňky mohou být zachyceny uvnitř orgánů, které filtrují krev (efekt prvního průchodu). Aby se tomuto zabránilo, byla vymyšlena strategie, která minimalizuje adhezi plic a zlepšení vestavění systémově zavedených kmenových buněk, a proto jsou používány různé cesty aplikace buněk do těla pacienta. Například na rozdíl od intra-venózních infuzí a intra-arteriálních přístupů lze plicní oběh obejít, což má za následek vynikající dodání

a trvalou přítomnost kmenových buněk v ischemickém mozku. Avšak arteriální přístup může způsobit arteriální okluze, což má za následek mrtvice [44, 45].

Velmi záleží na typu a ložiscích poškození, protože podle toho se rozhodne, kam a jak se mohou transplantovat kmenové buňky, aby jejich působení v organismu bylo co nejúčinnější. Blízké okolí v místě poranění hraje významnou roli v migraci buněk, protože čím jsou implantované buňky vzdálenější od ložiska poškození, tím slábne jejich působení [45].

Před samotnou transplantací je nutné pacienta na tento zákrok připravit např. chemoterapií nebo celotělovým ozářením. Toto opatření je nutné, aby se zničila nemocná kostní dřeň, nebo se v kostní dřeni udělalo místo pro zachycení nové krvetvorby [41, 46]. Počet buněk a rychlost implantace jsou rozhodujícími faktory pro dosažení vysoké účinnosti buněk v buněčné terapii [47].

1.5.1 Vybrané aplikace kmenových buněk

1.5.1.1 Systémové podání kmenových buněk

Intra-venózní aplikace (do žíly)

Kmenové buňky se podají pacientovi do žíly jako běžná transfúze, nejde tedy o žádnou operaci. Nejbezpečnější, nejjednodušší a nejpoužívanější způsob podávání kmenových buněk do celého těla. Anestezie není nutná, pouze v některých případech může být podána lehká anestézie. Buňky se pak krevní cestou dostanou do kostní dřene, kde se uchytí, začnou se množit a po určité době obnoví krvetvorbu. Celý proces podání obvykle trvá asi 20 až 30 minut. Aplikace se používá na spoustu nemocí, ale i na léčbu poruch zraku, dětské mozkové obrny i roztroušenou sklerózu. [41, 46, 48].

Intra-arteriální aplikace (do tepny)

Intra-arteriální injekce významně snižuje zachycení buněk v plicích a zvyšuje se pravděpodobnost, že injikované buňky najdou lépe cílové poškozené orgány ve velkém organismu. Tato aplikace může zabránit implantovaným buňkám se široce distribuovat

do jiných orgánů. Pro regeneraci tkání a orgánů mají lepší účinky kmenové buňky aplikované intraarteriálně než intravenózně.

Například kmenové buňky podané přes renální arterie se homogenně distribuovaly v rámci ledvinné tkáně, což výrazně zlepšilo funkce ledvin a histologickou strukturu, ve srovnání s intravenózní infuzí kmenových buněk na akutní poškození ledvin krysy [47].

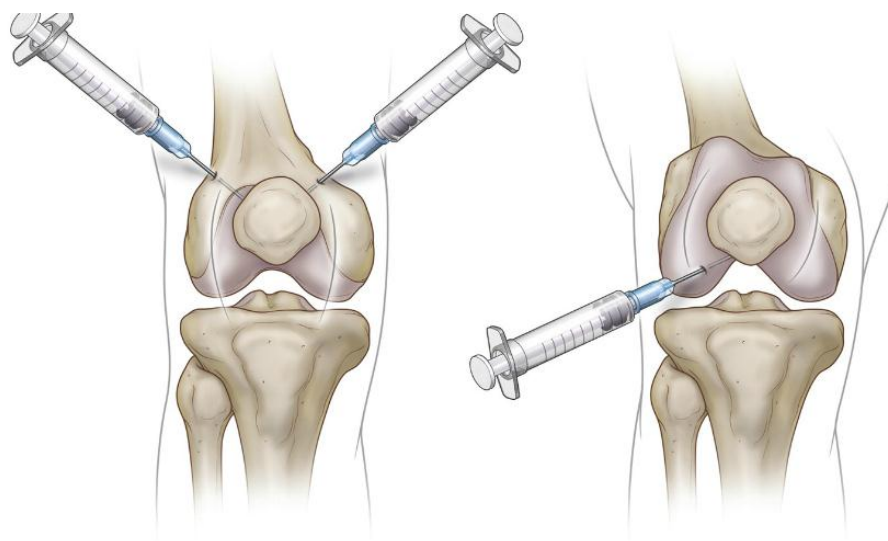
Intra-koronární aplikace (do koronárních tepen)

Kmenové buňky se podají do organismu katetrizační metodou s využitím balónkového katetru typu „over the wire“, který je zaveden do koronární tepny. Poté katetr na přechodnou dobu tepnu uzavírá. Kmenové buňky jsou poté aplikovány lumenem balónku na místo uzávěru tepny. Tato metoda byla používána pro svoji poměrnou jednoduchost a minimální invazivitu, ve velkém množství experimentálních a klinických studií [49, 50].

1.5.1.2 Lokální aplikace kmenových buněk

Intra-artikulární aplikace (do kloubu)

Kmenové buňky se injekčně vpravují přímo do postiženého kloubu licencovaným lékařem. Tento způsob se běžně používá pro artritidu. Intraartikulární implantace (obr. 4) je zcela bezpečná a nevyžaduje anestezii. Tato aplikace se používá u pacientů s fokálními vadami, osteoartritidou a dalšími nemocemi [48, 51, 52].



Obrázek 4 - Intra-artikulární aplikace

Intra-muskulární aplikace (do svalu)

Kmenové buňky se injekčně vpravují přímo do svalu. Intramuskulární implantace je velmi bezpečná a nevyžaduje anestezii [48]. Ideálním místem pro podání injekce jsou stehna, horní část paže, koleno, boky. Tato aplikace se používá například u svalové dystrofie [52].

Intra-tekální (lumbální punkce, do míchy)

Intratekální podání je ideální pro neurologická onemocnění, protože se kmenové buňky injekčně vpraví přímo do míšního moku a ty se dostanou dále přes hematoencefalickou bariéru. To jim umožňuje dosáhnout opravy porušených buněk míchy a mozku.

Lumbální punkce se provádí v lokální anestezii. V průběhu procesu zkušený anesteziolog vstříkne kmenové buňky do míšního kanálu mezi spodními obratli. Všechny postupy lumbální punkce se provádí za sterilních podmínek. Lumbální punkce obvykle trvá asi 30 minut. Tato aplikace se používá například pro léčbu roztroušené sklerózy, poruch zraku, dětské mozkové obrny, ale i dalších nemocí [48, 52].

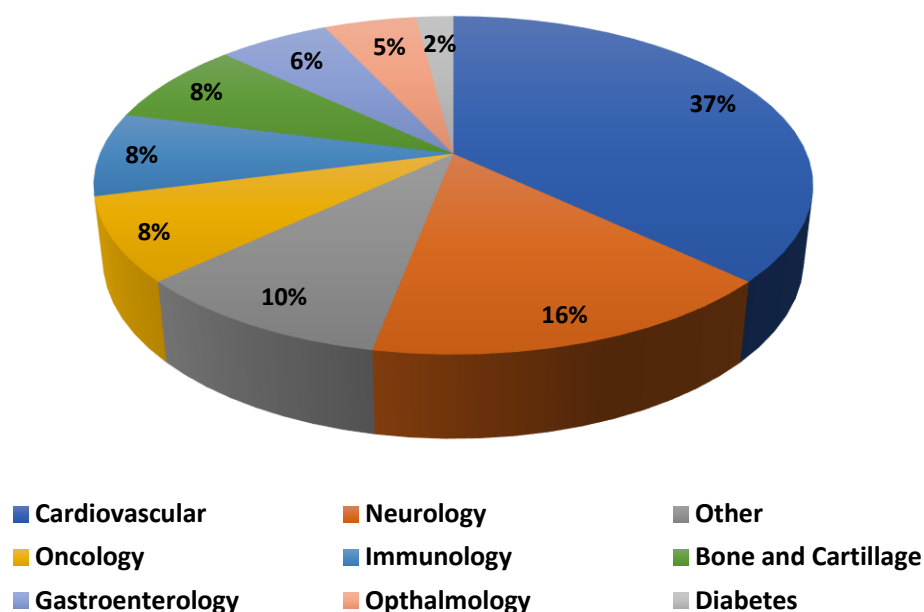
Retro-bulbární aplikace (do oka)

Retrobulbární aplikace je určena pro pacienty s postižením zraku a zrakového nervu. Tato aplikace umožňuje podání kmenových buněk co možná nejbližší ke zrakovému nervu, sítnici a dalším důležitým tkáním oka. Injekce trvá pouze několik sekund a je naprosto bezbolestná. [53].

Intra-dermální aplikace (kolem rány)

Tato specifická metoda se používá u otevřených ran, jako jsou například diabetické nohy nebo dekubity. Jedná se o aplikaci kmenových buněk přímo do rány nebo do jejího okolí, tj. vstříkávání buněk do dermální vrstvy kůže. Tato vrstva je nejvýhodnější vrstva pod epidermální vrstvou kůže, protože je vrstva vysoce vaskulární, obsahuje velké množství cév, imunitní buňky a kožní dendritické buňky. Tímto způsobem infuze kmenových buněk okamžitě vyvolá posílení těla a přirozené hojení pro rychlejší zotavení [54].

1.6 Použití kmenových buněk u vybraných onemocnění

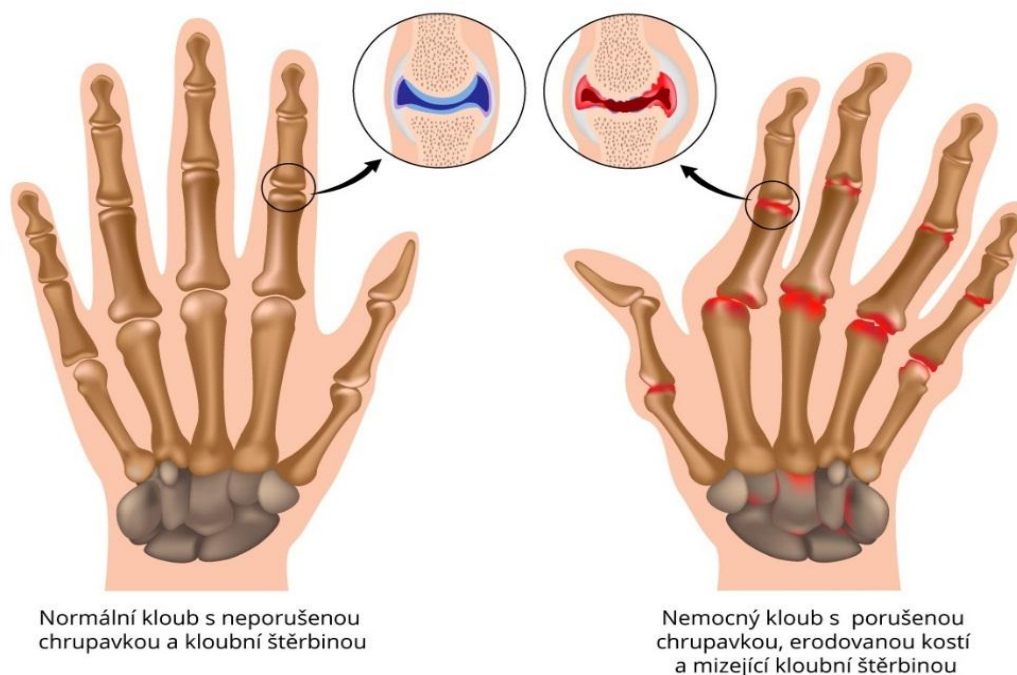


Graf 1: Procentuální použití kmenových buněk u vybraných onemocnění

1.6.1 Autoimunitní onemocnění

1.6.1.1 Revmatoidní artritida

Revmatoidní artritida (RA) je T lymfocyty zprostředkované autoimunitní onemocnění způsobené ztrátou vlastní imunologické tolerance a je charakterizováno chronickým zánětem. Toto onemocnění postihuje periferní klouby, včetně zápěstí, nohou, kotníků a kolen. Nakonec se poškozené části těla zanítí a způsobí bolestivý otok, který může vést k erozi kosti a kloubním deformitám (obr. 5). Nejčasnější příznaky RA se objeví v těch nejmenších spárách nejprve na prstech rukou a nohou. Mezi příznaky patří citlivost kloubů, ranní ztuhlost, únava, horečka a hubnutí. Není znám žádný lék k úplnému vyléčení RA. Příčina tohoto onemocnění je neznámá, a kromě kloubů může také poškodit plíce, kůži, oči, a dokonce i cévy. Onemocnění je častější ve středním věku (okolo 40 let), a to zejména u žen. Na RA neexistuje žádný lék, a proto cílem současných terapií je dosáhnout co nejnižší možnou míru aktivity artritidy [53, 54].



Obrázek 5 - Projevy RA na prstech ruky

Léčba kmenovými buňkami

Vzhledem k tomu že SCs zvyšují obranyschopnost organismu a mají protizánětlivé vlastnosti, byly mesenchymální kmenové buňky příslibem v léčbě RA. Protože mesenchymální kmenové buňky mají vynikající flexibilitu, mohou se přeměnit na celou řadu různých typů buněk, včetně kostí, tuku, svalů, chrupavek, kostní dřeně a šlachy. Zatím co RA buněčnou terapií nelze „vyléčit“, je tato terapie účinná alespoň při regeneraci chrupavky nebo kosti, která byla poškozená během období zánětu. Ostatní léky RA stabilizují stav, avšak neumí obnovit poškozenou chrupavku. To je místo, kde kmenové buňky mohou hrát významnou roli a obnovit pohodlí a mobilitu pro osoby s RA, kteří mají kloubní problémy [53, 54, 55].

V preklinických studiích bylo prokázáno, že MSC potlačují imunitní reakci a regulují zánět. Některé kmenové buňky, ale mohou také snižovat agresivní odezvu imunitního systému, inhibovat zánět, stimulovat tvorbu krevních cév, reparovat tkáně a s pomocí transplantovaných kmenových buněk se lépe uchytit a zlepšit poškozenou část těla, jako je například poškozená chrupavka. U MSC bylo také prokázáno, že snižují přítomnost patogenních T-buněk a indukují tvorbu nebo aktivaci regulačních T-buněk. Další klinické studie u pacientů s refrakterním RA prokázaly, že standardní farmakologická léčba v kombinaci s MSC byla bezpečná, snížila aktivitu onemocnění po dobu několika měsíců

a také, že opakující se léčba u některých pacientů by mohla stabilizovat výsledky léčby [53, 54].

Kmenové buňky pro léčbu RA jsou odebírány z kostní dřeně, tuku a pupečníku, proto nejsou na tento způsob odběru tkání a na samotnou transplantaci kmenových buněk kladeny žádné etické otázky. Obvykle se kmenové buňky podávají intravenózně (IV) v průběhu několika dní. Transplantace MSC u lidí za různých podmínek je obecně dobře tolerována, ale výsledky jsou proměnné v závislosti na způsobu podání a na variabilitě účinnosti buněk mezi dárci nebo tkáňovými zdroji a na kultivačními podmínkami. Velkou výhodou u transplantace MSC je, že snižují bolest a nemají u pacientů žádné nežádoucí účinky [48, 53, 54, 55].

1.6.1.2 Diabetes Mellitus (DM)

Diabetes je skupina metabolických onemocnění. Ta je diagnostikována u pacientů, u kterých je po dlouhou dobu pozorována vysoká hladina krevní glukózy. Hladina glukózy je vysoká v krvi, z důvodu nedostatečného vylučování inzulínu ze slinivky břišní v těle. Inzulín reguluje glukózu, homeostázu a zejména snižuje glykémii, když je její hladina v krvi vyšší. DM je onemocnění, které postihuje miliony lidí na celém světě. Diabetes lze rozdělit do dvou typů diabetu 1. typu a 2. typu [54, 56, 57].

DM 1. typu se vyvíjí, když imunitní systém vidí své vlastní buňky jako cizí a začne buňky ničit (= autoimunitní onemocnění). Výsledkem je, že buňky Langerhansových ostrůvků ve slinivce břišní, které produkují inzulín, jsou poškozeny natolik, že produkce inzulínu je velmi malá nebo je úplně zastavena. Buňky v organismu vydají signál k vyšší produkci inzulínu, aby se glukóza dostala do buněk, protože nemají energii, kterou potřebují pro správné fungování. V nepřítomnosti inzulínu se glukóza nemůže dostat do buňky a kumuluje v krevním řečišti [54, 56].

DM 2. typu je častější forma nemoci a vyznačuje se hlavně rezistencí na inzulín. Ta je vyvinuta v důsledku toho, že β -buňky produkují více inzulínu pro signalizaci jiných buněk, ale nakonec nejsou schopny hladinu kompenzovat a poté postupně klesá funkce β -buněk až do té míry, že buňky už nemohou dostatečně produkovat inzulín k překonání rezistence na inzulín. [54, 56, 58].

Pokud DM u pacientů není pod kontrolou, může to vést až k oslepnutí, selhání ledvin, srdečnímu onemocnění a k mnoho dalším chorobám. Proto je velmi nutné, aby nadměrně

vysoká hladina glukózy v krvi byla regulována. Komplikace DM jsou například bolest hlavy, poškození cév, rozmazané vidění, koncentrovaná moč, ztráta vědomí, závratě, infekce močového traktu s bohatým množstvím glukózy v moči, což podporuje množení bakterií, slabost v rukou a nohou, deprese, časté močení, náhlý úbytek nebo zisk hmotnosti, pomalé hojení ran a vždy pacienti cítili únavu, hlad a žízeň [54, 56, 57].

Léčba kmenovými buňkami

Zkoumání nejnovějších metod léčby diabetu pomocí kmenových buněk byl zahájen v několika klinických studiích s použitím malé autologní transplantace hematopoetických kmenových buněk, které využívají imunomodulační vlastnosti kmenových buněk. Jejich hlavní strategií zpracování buněk bylo inhibovat autoimunitní destrukci β -buněk imunosupresivy a doplnit zničené imunitní buňky pomocí autologních hematopoetických kmenových buněk, které budou zase tvořit normální imunitní systém [61].

Vědci v Kanadě, ale i ve Spojených státech zjistili, že když se diabetickým myším injekčně vstříknou kmenové buňky do krevního řečiště, tak si samy najdou cestu k poškozené slinivce břišní, kde se jim podařilo podnítit růst nových buněk. Mysleli si, že je něco v kostní dřeni nějak aktivuje, a tím podpoří regeneraci buněk. Vysoké hladiny glukózy v krvi byly sníženy na téměř normální hodnoty a hladiny inzulínu byly zvýšeny. Vědcům přišlo ještě zajímavější, že buněčný růst nebyl z injikovaných buněk samotných. Spíše injikované kmenové buňky vyvolaly tvorbu buněk ve vlastním pankreatu příjemce. Výsledky byly zvláště fascinující i v tom, že když se kmenové buňky injekčně vpraví do zdravých myší, tj. ne-diabetických myší, tak u nich nedochází k žádné změně [29].

Řada studií potvrdilo existenci kmenových buněk ve slinivce břišní, které mohou vést k produkci inzulínu. Existují i další důkazy, jež naznačují, že trans-diferenciace jaterních buněk může generovat β -buňky. Několik dalších studií uvádí, že kmenové buňky z kostní dřeni mohou být diferencovány na inzulín exprimující buňky. Nervové progenitorové buňky z mozku mají také schopnost diferencovat se na inzulín exprimující buňky. Kromě těchto buněk jsou i jiné vysoce proliferativní a pluripotentní buňky, ty jsou odvozené z vnitřní buněčné masy blastocyst (buňky ESCs). Mají schopnost diferencovat se do všech tří zárodečných listů [61].

Výzkumní pracovníci aktivně zkoumají substituční buněčnou terapii jako potenciální strategii pro léčbu diabetu 1. typu, neboť pacienti s tímto onemocněním ztratily všechny nebo

téměř všechny funkce β -buněk. Jednou z hlavních výzev substituční buněčné terapie je aktuální nedostatečný přívod β -buněk z lidských orgánů dárců [56]. Klinické studie prokázaly, že u diabetu 1. typu při transplantaci mezenchymálních kmenových buněk lze využít jejich dvou vlastností. Za prvé mají regenerační potenciál opravit β -buňky a za druhé mohou modulovat imunitní systém tím, že inhibují odpovědi, které vedou k autoimunitnímu útoku na pankreatické β -buňky [59].

U diabetu 2. typu se dají k léčbě použít vlastní kmenové buňky, které mohou pomoci slinivce regenerovat se a zvýšit tak svoji schopnost produkovat inzulin. Mesenchymální kmenové buňky u pacientů s diabetem 2. typu vedou ke zvýšenému vývoji nových krevních cév, sekreci různých výrobků imunitního systému a ke zlepšení regulace pankreatických transkripčních faktorů a vaskulárních růstových faktorů. To vše vytváří mikroprostředí, které podporuje β -buňky k aktivaci a přežití [60].

Kmenové buňky se chovají „inteligentně“ v tom, že si sami vyhledají poškozenou tkáň a spustí nový růst buněk, čímž dojde k regeneraci tkáně. Další výhodou použití kmenových buněk kostní dřeně je, že mohou být získány z pacientovy vlastní kostní dřeně, poté pěstovány a pomnoženy v laboratorním prostředí a poté vstříknou štěp zpět do pacienta, kde mohou buňky cestovat do poškozené slinivky a stimulovat zdravý růst buněk [29].

Vzhledem k tomu, že mezenchymové kmenové buňky mají imunomodulační fenotyp (zvláště u pacientů, kteří byli včasně diagnostikováni) mohly by MSC přispět ke snížení množství poškozených β -buněk a tím zachovat zdravé β -buňky ve slinivce břišní. Současné podání MSC a β -buněk by mohlo také pomoci snížit odmítnutí štěpu hostitelem. Zatímco někteří z vědců věří, že MSC se můžou stát buňkami, které vylučují inzulin a takto by MSC mohly přispět ke snížení hladiny glukózy pomocí faktorů parakrinně vyloučených z MSC. Optimální výsledky dosavadně vypadají, že zahrnují transplantaci současně β -buněk a MSC. Transplantace MSC u lidí za různých podmínek byla obecně dobře tolerována [60].

Švýcarská Medica Clinic zjistila, že kmenové buňky derivované z tukové tkáně u pacientů s DM 2. typu by mohly vést k odstranění nebo alespoň ke snížení požadavku na inzulin o 80 % (nebo i více) během 6 měsíců [60]. Pacientovy vlastní kmenové buňky odebrané z tukové tkáně nebo kostní dřeně, mohou „převychovat“ imunitní systém tak, aby nenapadal β -buňky. Nové β -buňky jsou schopné snímat hladinu glukózy v krvi a podle toho glykémii regulovat [59]. V průběhu léčby za pomoci buněčné terapie pacient obdrží 200 až 300 milionů kmenových buněk. Množství obnovených buněk zahrnuje nejen denní

ztráty, ale je tisíckrát větší než normálně. To znamená, že zásoba kmenových buněk, která byla prakticky ztracena za posledních 15-20 let je obnovena. Po takovém aktivním doplňování buněk, nově vzniklé zdravé a aktivní buňky vytlačí staré a poškozené a dojde k omlazení a obnově orgánu [60].

1.6.1.3 Crohnova choroba

Crohnova choroba je druh zánětlivého autoimunitního onemocnění střev. Lidé mají chronický zánět trávicího traktu, který postihuje oblast střevní stěny, kde dochází k zahuštění střevního obsahu. Tato nemoc má genetické predispozice, nicméně je to onemocnění, při kterém vlastní imunitní systém napadá vlastní trávicí trakt. Nejčastěji je postižena část tenkého střeva, které se nazývá ileum. Crohnova choroba může ovlivnit některou z částí trávicího traktu od úst až ke konečníku. Symptomy jsou závislé na tom, jaká část gastrointestinálního traktu je právě postižena a také na tom jaký rozsah onemocnění má. Rozsah symptomů může být od mírných příznaků až po těžké. U každého pacienta jsou symptomy variabilní, avšak nejčastěji zahrnují bolesti břicha, nadýmání, průjem (který může být krvavý, pokud je zánět), zvracení (může být kontinuální), horečka, únava, snížená chuť k jídlu, úbytek hmotnosti, ale může také nastat kožní vyrážka a artritida. Nekontrolovaný chronický zánět může vést k řadě různých komplikací, jako jsou střevní obstrukce, píštěle, abscesy a anální praskliny. Lidé, kteří trpí Crohnovou chorobou, mají vyšší riziko rakoviny tlustého střeva. Přesná příčina vzniku onemocnění není známa, ale zdá se, že zde můžou hrát roli přehnané reakce těla na normální střevní bakterie. Nemoc se může objevit v každém věku, nicméně je obvykle diagnostikováno mezi 15 a 35 rokem života. Rizikové faktory zahrnují rodinnou anamnézu Crohnovy choroby, špatné stravovací návyky a kouření [59, 66, 67].

Léčba kmenovými buňkami

Pro léčbu Crohnovy choroby se často používají steroidy, které potlačí imunitní systém. Hodně se také používají antibiotika proti zánětům. V Evropě jsou k léčbě Crohnovy choroby běžně používány kmenové buňky. Stále se ale zkoumají účinky kmenových buněk za autoimunitních podmínek. MSCs z kostní dřeně nebo z tukové tkáně se alternativně používají pro lokální léčbu onemocnění střev, aby bylo hojení ran účinnější. Většina současných experimentů však používá kmenové buňky z tukové tkáně kvůli jejich vyššímu

množství v lidské tukové tkáni. Pro léčbu lze ale použít i buňky embryonální. ESCs jsou známy svými schopnostmi zastavit zánět a regenerovat poškozené tkáně, a to je důvod proč jsou důležitým nástrojem v boji proti chronickému onemocnění střev. Buněčná terapie je zaměřená na opravy poškozené tkáně, které byly způsobeny chronickým onemocněním a užíváním léků na bázi steroidů. Úspěšná léčba může poskytnout úlevu od příznaků a remisi pro zlepšení kvality života [66, 67, 68].

Po identifikaci Crohnovy choroby lékařem je nutné všechny pacienty, kteří chtějí být léčeni za pomoci kmenových buněk, musí být zbaveni případné enterické invaze patogenních parazitů a bakterií. Aby mohl být pacient léčen, musí podstoupit jednoduchý zákrok, což je získání kmenových buněk z kostní dřeně nebo tukové tkáně. Tento proces trvá maximálně několik hodin. Je potřeba pouze malé množství buněk, které se později oddělí a aktivuje. Teprve aktivované kmenové buňky mohou být vráceny zpět do těla pacienta. Nejčastěji se aplikují intravenózně, takže se dostanou do všech orgánů, které potřebují opravit a pracovat na imunitním systému. Jedná se o bezpečný, bezbolestný a rychlý proces. Vzhledem k tomu že kmenové buňky pocházejí z vlastního těla pacienta, není žádné riziko vedlejších účinků nebo odmítnutí. Tělo přijme 200-300 milionů kmenových buněk v průběhu léčby, která obnovuje denní ztráty dané osoby a hodnotu buněk přesahuje až tisíckrát. O množství a četnosti kmenových buněk, které se injekčně podají pacientovi, rozhodují lékaři, a to v závislosti na závažnosti zánětu. Pacient pocítí zlepšení nepříjemných příznaků 2-4 měsíce po aplikaci buněk.

V dnešní době už některé kliniky nabízí léčbu kmenovými buňkami lidem s Crohnovou chorobou. Tuto léčbu nabízí např. švýcarská klinika Medica [59, 68].

1.6.2 Kardiovaskulární onemocnění

1.6.2.1 Srdeční selhání

Srdeční selhání, i v dnešní době, patří stále mezi nejčastější příčiny úmrtí ve vyspělých zemích. Je to stav, kdy srdce není schopné normální funkce, a to pumpovat dostatečné množství krve do celého těla. Krev proudí pomaleji, tlak v srdci se zvyšuje a srdce není schopno dodat dostatek kyslíku a dalších živin do zbytku těla. Pro kompenzaci se mohou komory srdce protáhnout a zadržet více krve nebo stěny komor mohou zahustit krev a ochabnout. Nakonec, ledviny reagují na slabší krevní čerpací působení tím, že udrží více vody a soli a vznikají otoky v rukou, nohou, kotnících, chodidlech, ale i na plicích.

Hlavní rizikové faktory pro srdeční selhání jsou ischemická choroba srdeční, vysoký krevní tlak, diabetes mellitus, abnormality srdečních chlopní, zánět srdce a infekce srdečních chlopní nebo svalů. Jedinou možnou prevencí je včasný zásah, který obnoví průchodnost tepny po jejím předchozím uzávěru (např. trombem) a zabrání nekróze buněk nebo alespoň omezí její rozsah. Časový faktor zde samozřejmě hraje klíčovou roli. U srdečního selhání mohou být příznaky jako je zvýšená dušnost, rychlý nárůst hmotnosti (více než 1,5 kg za 1 až 2 dny, nebo 2,5 kg v jednom týdnu), kašel, nebo nachlazení, které trvají déle než týden, únava, ztráta energie nebo extrémní únava, ztráta nebo změna chuti k jídlu, zvýšený otok kotníků, nohou, ramen, křížové kosti nebo břicha, a také časté močení v noci. Základní léčba může přispět ke zlepšení příznaků, zastavení srdečního selhání a zhoršování nemoci, ale hlavně prodloužit pacientovi dobu života. Standardní léčba lidí s pokročilými příznaky srdečního selhání zahrnuje léky, které snižují zadržování tekutin, zpomalují rozšíření srdce nebo zablokování tepny. Pacientům se změní životní styl, což znamená snížený příjem soli v potravě, úpravu denních aktivit a doporučí se odpočívat. Srdeční selhání ale nelze vyléčit [48, 58, 62].

Léčba kmenovými buňkami

Nové léčby, které nám mohou nabídnout naději trvalého vyléčení, jsou založeny na buněčné terapii, která má jedinečnou regenerační kapacitu a flexibilitu pro růst do stovky různých typů buněk. Kmenové buňky by mohly být také použity pro léčbu tohoto onemocnění, mohou totiž tvořit buňky srdeční, podpůrné, buňky krevních cév a regulační signály. Primárním mechanismem účinku v buněčné terapii se nyní předpokládá, že prostřednictvím parakrinních účinků, které zahrnují uvolňování cytokinů, chemokinů a růstových faktorů, které inhibují apoptózu a fibrózu, zlepšují kontraktilitu a aktivaci endogenních regeneračních mechanismů pomocí endogenních cirkulujících nebo místně specifických kmenových buněk [62].

Aktivní oblastí výzkumu dnes je, zda lze použít pro srdeční opravy embryonální a dospělé kmenové buňky. Řada typů kmenových buněk, včetně embryonálních kmenových buněk, srdečních kmenových buněk, které přirozeně pobývají v srdci, myoblastů (=svalové kmenové buňky), dospělých kmenových buněk odvozených z kostní dřeně včetně mesenchymálních buněk (z nich vzniknou tkáně, jako jsou svaly, kosti, šlachy, vazy a tukové tkáně), endotelové progenitorové buňky (buňky, které vedou k endotelu, obal krevních cév)

a pupečnickové krevní buňky byly zkoumány jako možné zdroje pro regeneraci poškozené srdeční tkáně. Všechny výše uvedené příklady byly zkoumány na myších nebo krysích modelech a některé z nich byly testovány i na větších zvířecích modelech, jako jsou například prasata [63].

Optimální typ kmenových buněk pro regeneraci srdeční svaloviny je stále diskutován stejně jako nejistota v načasování terapie. Mezi další otázky patří, jestli se buňky „usadí“ na správné místo, ale také jejich další osud, o kterém je zatím jen velmi málo informací. Také některé studie zaměřené na buněčnou terapii se vyznačují komplexními a někdy i spornými výsledky. Jedny z nejslibnějších výsledků nám zatím přinesla studie z roku 2009, kdy byly pacientům po infarktu vpraveny progenitorové buňky z kostní dřeně. Tato terapie znatelně zlepšila srdeční funkce pacientů a také prodloužila dobu přežití [64].

U několika studií bylo prokázáno, že kmenové buňky, které jsou vstříkovány do oběhu nebo přímo do poškozené srdeční tkáně, zlepšují srdeční funkce nebo alespoň byla vyvolávají tvorbu nových kapilár. Mechanismus této opravy zůstává sporný a kmenové buňky mohou obnovit srdeční tkáň přes několik cest. Nicméně, populace kmenových buněk, které byly testovány v těchto experimentech, se velmi liší, stejně jako podmínky pro jejich separaci a aplikaci. I když je zapotřebí mnohem více výzkumu k posouzení bezpečnosti a zlepšení účinnosti tohoto přístupu, tyto předběžné klinické experimenty ukazují, jak kmenové buňky mohou být jednoho dne použity k reparaci poškozené srdeční tkáně, čímž se v populaci snižuje zatížení kardiovaskulárními chorobami [63].

1.6.3 Nádorové onemocnění

1.6.3.1 Leukemie

Leukemie je slovo, které lze do češtiny přeložit jako "bílá krev" nebo "bělokrevnost". Vymyslel ho významný německý patolog Rudolf Virchow už v polovině 19. století. Byl to jeden z prvních lékařů, který toto onemocnění rozpoznal.

Leukemie není pouze jedno onemocnění, ale jde o skupinu nemocí s různou prognózou. Projevuje se nádorovým zmnožením určitých skupin bílých krvinek v kostní dřeni a většinou i v krvi. Bílé krvinky se vymykají kontrole organismu, nekontrolovatelně se množí a poškozují organismus, neplní svoje funkce, ke kterým byly původně určeny. Jedná se o zmnožení jedné ze složek imunitního systému člověka. Jsou to nemoci zhoubné povahy, i když jejich zhoubnost je u různých druhů leukemií různá (od lehkých zhoubných variant

leukemie po vysoce agresivní nemoci). Zhoubnost leukemie spočívá v tom, že zmnožené "nekvalitní" bílé krvinky nevykonávají svou obrannou funkci, a naopak utlačují zdravé krvetvorné buňky, ale i jiné buňky v lidském těle.

Leukémie lze rozdělit do několika typů podle průběhu této nemoci. Dělí se na akutní myeloidní leukémii (AML), akutní lymfoblastickou leukémii (ALL) tyto dvě mají rychlý průběh a na chronickou myeloidní leukémii (CML) a chronickou lymfocytární leukémii (CLL), které mají naopak pozvolný průběh. Dále se leukémie rozlišují podle krvetvorných buněk, a to na lymfoidní (ALL, CLL) z lymfocytů a myeloidní (CML, AML) z myocytů [27, 46].

Leukemie je způsobena mutací v genu a podílí se na buněčném bujení. První známky a příznaky leukémie jsou nespecifické a zahrnují únavu, nevolnost a abnormální krvácení, nadměrné modřiny, slabost, sníženou toleranci zátěže, úbytek tělesné hmotnosti, infekce a horečku, bolesti břicha nebo „plnost“, zvětšenou slezinou, lymfatickými uzlinami a játry. Zmnožené zhoubné bílé krvinky mohou způsobit, že se tyto krvinky hromadí v různých orgánech, které se poté z tohoto důvodu zvětšují. Kromě toho vysoký počet bílých krvinek je detekovatelný z krevního obrazu a z mikroskopie krve. Chemoterapie je počáteční volba léčby. Zatímco chemoterapie používá neuvěřitelně silné léky zaměřené na zničení abnormálních krevních buněk, existují vážné vedlejší účinky, jako je např. poškození zdravých buněk a sliznic, poškození krvetvorby, infekční komplikace ale i další. Transplantace kostní dřeně může pomoci zvýšit účinky chemoterapie a obnovit imunitní systém pacienta [1, 29, 57].

Léčba kmenovými buňkami

Před transplantací kmenových buněk u pacienta s leukémií, musí nemocný nejdříve podstoupit udržovací léčbu, která zahrnuje intenzivní ošetření s cílem zničit tolik leukemických buněk, jak je to jen možné. Pacienti obdrží vysoké dávky chemoterapie, nicméně v některých případech musí podstoupit i radiační terapii. Před transplantací můžou nemocní také podstoupit malou alogenní transplantaci, která používá nižší dávky chemoterapie s méně toxickými účinky nebo celkové tělesné ozáření. Jakmile je takto pacient připraven, tak teprve může nemocný podstoupit transplantaci kmenových buněk.

Transplantace je velmi účinná metoda pro léčení mnoha typů akutních leukémií, protože obsahuje důležité složky imunitního systému, které pomáhají zabít leukemické buňky. Podání kmenových buněk se podobá krevní transfuzi, kde se štěp intravenózně podává

do těla s leukemií. Celý cyklus trvá asi hodinu. Lidem s leukemií se podávají krvetvorné kmenové buňky, aby došlo k obnově jejich kostní dřeně. Kmenové krvetvorné buňky použité pro transplantaci mohou pocházet buď z krve, nebo z kostní dřeně dárce, někdy ale mohou být použity i kmenové buňky z pupečnickové krve dítěte. Podmínkou je, že musí být odebrány vždy od zdravého dárce. U některých pacientů mohou být odebrány jejich vlastní kmenové buňky, které mohou být někdy použity pro autologní transplantaci, ale jen pokud je možné shromáždit dostatek zdravých buněk před provedením chemoterapie. Buňky z pacienta odebrány před autologní transplantací jsou v laboratoři proplachovány, aby se pokusilo odstranit co nejvíce leukemických buněk ve vzorcích, a tak snížit riziko návratu onemocnění. Dále jsou zmrazeny a uloženy až do samotné transplantace. V den transplantace jsou přípravky rozmrazeny a temperovány na danou teplotu a vráceny zpátky do těla pacienta. V některých případech to nelze a je zapotřebí zvolit jiného dárce, alogenní transplantace, který musí odpovídat HLA typu pacienta, jinak transplantované dárcovské buňky mohou být napadeny zbytkovým imunitním systémem pacienta a odmítnuty.

Velkou výhodou alogenní transplantace je, že štěpy pocházejí od zdravého jedince a přípravek je bez maligních buněk. Nicméně to může být obtížné najít odpovídajícího dárce, autologní transplantace je obvyklejší. Po transplantaci se v průběhu několika pár dnů kmenové buňky usadí do kostní dřeně pacienta, kde začnou růst a vytvářet nové krvinky [1, 27, 29, 46, 65].

Téma buněčná terapie je v dnešní medicíně rychle se rozvíjející obor. Nové technologie, jako jsou indukované pluripotentní kmenové buňky, jsou již používány ke studiu leukémie v laboratoři. Poskytují nástroj pro výrobu velkého počtu leukemických buněk v misce. Výzkumní pracovníci pak na buňkách mohou studovat, jak nemoc vzniká, jak probíhá ale také další informace o nich. Z poznatků potom mohou navrhnout a otestovat novou terapii, která bude potenciálně účinnější a méně toxická. V budoucnu mohou být rovněž vyvinuty nové metody pro výrobu laboratorního základu z HSC, který může být použit u pacientů po transplantaci. To by mohlo znamenat revoluci v nedokonalých transplantátech a v nedostatku dárců [27].

1.6.4 Svalová dystrofie

Svalová dystrofie neboli přesně řečeno Duchennova svalová dystrofie (DMD-Duchenne muscular dystrophy) je těžké svalové degenerativní onemocnění, které je dědičné

přes abnormální gen, který neprodukuje dostatečně „špatný“ dystrofin. Tento gen je umístěn na chromozomu X (ženy jsou méně pravděpodobné, protože mají dva X chromozómy, na rozdíl od mužů, kteří mají pouze jeden). Žena, která má abnormální gen, může být také nosička onemocnění, aniž by sama trpěla tímto onemocněním.

Je to nemoc, která postihuje kosterní svaly a často i sval srdeční. Svalová dystrofie je onemocnění charakterizované progresivní slabostí kosterního svalstva, poruchami svalových proteinů a smrtí svalových buněk a tkání. Existuje devět hlavních typů svalové dystrofie. Mnoho typů tohoto onemocnění jsou multisystémové poruchy s projevy v tělových systémech včetně srdce, gastrointestinálního systému, nervového systému, endokrinních žláz, očí a mozku. Všechny formy této nemoci se dědí. Příznaky svalové dystrofie jsou např. ztráta svalové hmoty (viz obr. 6), ztrátou pevnosti, ztuhlost kloubů, obtížnost udržet se na nohou nebo chodit, zvětšená lýtka, problémy s motorikou, únava. Nemoc se může projevit již v dětství, nebo až do středního věku, někdy se projeví i později [27, 66, 69].



Obrázek 6: Porovnání svalové hmoty u zdravého těla a těla se svalovou dystrofií

Léčba:

Dnešní možnosti v léčbě jsou omezené. Existuje velký zájem o použití kmenových buněk k regeneraci svalové tkáně a úspěšnost při použití lidských kmenových buněk pro svalovou dystrofii. Existuje naděje, že kmenové buňky odvozené z tukové tkáně mohou být také účinné při regeneraci poškození svalů při tomto onemocnění [66].

Cílem buněčné terapie je přímo regenerovat dospělá svalová vlákna přes systémové nebo cílené injekce kmenových buněk, které slouží k blokování svalové ztráty a k obnově buněk, alespoň částečně, na normální běžnou svalovou aktivitu.

Nedávný výzkum léčby DMD demonstruje potenciál pro léčbu lidských embryonálních kmenových buněk, aby se stala úspěšnější než stávající způsoby léčby s použitím genové terapie. Dalším způsobem, jak potenciálně léčit DMD je vstříkáváním mezenchymálních kmenových buněk do poškozené svalové tkáně. Buňky by mohly být schopny najít tuto poškozenou tkáň a začít stimulovat endogenní proliferaci svalových buněk, což by snížilo zánět. Buňky se podávají buď intravenózně nebo intramuskulárně nebo obojími způsoby. Cílem zde je nahradit poškozený sval nově regenerovanými svalovými buňkami [69, 70].

Existuje řada různých typů kmenových buněk, o kterých se vědci domnívají, že mohou být použity různými způsoby k vývoji léčby svalové dystrofie. Hlavní postupy založené na kmenových buňkách, které jsou v současné době zkoumány, jsou: za prvé produkce zdravých svalových vláken: vědci doufají, že pokud budou kmenové buňky bez genetické vady, která způsobuje DMD, mohou být dodány do svalů pacientů, mohou vytvářet pracovní svalová vlákna, která nahradí poškozená. Za druhé snížení zánětu: při svalové dystrofii dochází ke zhoršení funkce svalů. Tento zánět zrychluje svalovou degeneraci. Vědci se domnívají, že některé typy kmenových buněk mohou uvolňovat chemikálie, které snižují zánět, což zpomaluje průběh onemocnění. Za třetí regenerativní buněčná medicína vyvinula specifický protokol tzv. SVF (stromální vaskulární frakce buněk), který se pokouší využít potenciálních regeneračních vlastností SVF (bohatých na mezenchymální kmenové buňky a růstové faktory). SVF je systémově rozmístěno a očekává se, že bude přednostně opravovat poškozené oblasti. To vše provádí jako ambulantní pracovník v době sklizně a odběru SVF. Celá celulární chirurgická procedura trvá přibližně tři hodiny [66].

Klinika na Ukrajině Cell Therapy Center EmCell nabízí buněčnou terapii pro různé typy svalové dystrofie. Klinika používá fetální kmenové buňky, protože se ukázaly být jednou

z možností vedoucích nejen ke snížení ochabování svalů, ale i hlavních příznaků tohoto onemocnění [71].

1.7 Nebezpečí a rizika v buněčné terapii

Nové odvětví v medicíně je terapie kmenovými buňkami, které se rychle rozvíjí a jde prudce kupředu. I přes to, že jsou používány k mnoha léčbám a výzkumům, má tato terapie stále i mnoho rizik.

Mnoho klinických studií bylo zahájeno zkoumáním kmenových / progenitorových buněk k použití léčby degenerativních onemocnění, rakoviny a také pro opravy poškozených nebo chybějících tkání. I přes velké úsilí lékařů a vědců stále existuje mnoho otázek týkajících se bezpečného používání léčby kmenovými buňkami.

Vždy po objevení určitých vlastností kmenových buněk k léčbě různých onemocnění musí být provedeno dostatečné posouzení rizik/přínosu kmenových buněk na bázi buněčného přípravku. Všechna důležitá identifikovaná rizika (tj. rizika nebo nežádoucí účinky zjištěné klinickými zkušenostmi), stejně jako potenciální / teoretická rizika (např. z neklinických bezpečnostních důvodů, které nebyly pozorovány v klinické praxi) by měla být pečlivě vyhodnocena.

Rizika spojená s touto léčbou závisí na mnoha rizikových faktorech. Jsou to např. použití jednotlivých druhů kmenových buněk, jejich získávání a kultivace, historie buněk, míra manipulace a způsob aplikace [74, 73, 72].

Štěp kmenových buněk vyvolává terapeutické a nežádoucí účinky. Je třeba zvážit možné vedlejší účinky a rozhodnout se, zda lék může být přijat v lékařské praxi. Ve skutečnosti, vědecký výzkum musí nastínit závažnost nežádoucích účinků, jejich frekvenci v klinické praxi a dokázat zabránit, snížit nebo vyloučit tato rizika [57].

Různé kategorie rizikových faktorů mohou být rozlišeny. Za prvé rizikové faktory mohou být spojené s vnitřními buněčnými vlastnostmi konkrétního buněčného typu nebo třídy kmenových buněk. Za druhé příměšové rizikové faktory vnesené do odebraného vzorku, manipulace, kultivace nebo skladování buněk. Vyskytují se i rizikové faktory spojené s klinickými parametry (například chirurgických zákroků, imunosuprese, místa a způsobu podání nebo současného výskytu i jiných nemocí). Je důležité si uvědomit, že více rizikových faktorů z těchto různých kategorií může přispět k velkému riziku pro pacienta. V zásadě platí,

že poznatky o potenciálních rizicích a rizikových faktorech získané v praxi, mohou přispět k novým léčebným postupům při léčbě různých nemocí za pomoci kmenových buněk [62, 72, 73, 74].

Rizika při autologní a alogenní transplantaci:

Při autologní transplantaci je mnohem méně rizik než při alogenní transplantaci, i přes to jsou v této terapii rizika. Je jen několik známých rizik u autologní transplantace kmenových buněk: a to je manipulace buněk v klinické laboratoři, která může narušit normální fungování kmenových buněk, včetně té, která řídí buněčný růst. Je-li narušena funkce buněčného růstu, nepříznivě to ovlivní funkce buňky. Jejich porušení se může projevit např. nekontrolovatelným bujením. To by znamenalo následné zhoršení zdravotního stavu pacienta, což je nežádoucí. Hlavní omezení úspěchu při autologní transplantaci kmenových buněk je respirační komplikace. Plicní dysfunkce se vyskytuje až u 50 % pacientů po transplantaci kmenových buněk, a plicní komplikace patří mezi nejčastější příčiny nemocnosti a úmrtnosti po buněčné terapii.

U alogenní transplantace je rizikem kontaminace buněk viry, bakteriemi nebo jinými patogeny, které by mohly způsobit závažné infekce. Jelikož pacienti, kteří jsou léčeni kmenovými buňkami, často berou silná imunosupresiva, která v podstatě zničí jejich imunitní systém. Nicméně je to nutné, protože je tím snížena pravděpodobnost odvrhnutí transplantátu. U tohoto typu transplantace je hlavním rizikem reakce štěpu proti hostiteli. Při této transplantaci také hrozí rizika, jako jsou popsána u autologní transplantace [29, 57, 58, 73].

Rizika z použití různých typů kmenových buněk:

Největší riziko v buněčné terapii je při použití ESC a nově objevených iPSC.

Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní buňky, které mají schopnost diferencovat se do všech tří zárodečných vrstev (endodermu, mezodermu a ektodermu). Nicméně, pluripotentní kmenové buněčné linie musí být schopny plnit několik specifických funkcí. Jednou z funkcí kmenové buněčné linie je schopnost růst do nekonečna. Tím se zvyšuje riziko tvorby teratomů.

Pro iPSC generace se používají převážně fibroblasty, iPSC byly také odvozeny z jater, slinivky beta buněk a zralých B buněk. Přes rozdíly v jejich původu, ESC a iPSC jsou velmi podobné. Mají velmi podobné růstové charakteristiky, profily genové exprese, epigenetické modifikace a diferenciací potenciál. Nicméně, některé rozdíly v genové expresi byly zaznamenány, což naznačuje, že přeprogramování iPSC je neúplné. iPSC jsou spojovány s vyšším rizikem tvorby nádorů [74].

ZÁVĚR

Buněčná terapie je termín, který je dnes nejen v odborné literatuře, ale i ve všech mediích často zmiňován. Do tohoto oboru jsou vkládány velké naděje a také je předmětem mnoha výzkumných projektů v zahraničí i v České republice.

Cílem bakalářské práce bylo přiblížit druhy a vlastnosti jednotlivých kmenových buněk, ale i nejnovější nebo teprve zkoumané metody a způsoby léčby těžce léčitelných nebo neléčitelných chorob, u kterých lze tuto metodu využít. Jelikož je těchto onemocnění velké množství, jsou v bakalářské práci zmíněna pouze vybraná. Důležité je, že jednotlivé typy kmenových buněk lze využít díky jejich vlastnostem na více typů onemocnění. U chorob, při kterých je možné využít buněčnou terapii, záleží mimo jiné na druhu buněk, jejich kultivaci a na typu podání.

Za zmínku stojí popsaná léčba diabetu, kde se dají použít nejen kmenové buňky z kostní dřeně, ale i nervové progenitorové buňky z mozku. Ty mají schopnost se diferenciovat na buňky produkující inzulin, což je u této léčby podstatou. Dalším velmi rozšířeným, špatně léčitelným onemocněním je revmatoidní artritida. Zde se v léčbě uplatňují především kmenové buňky z kostní dřeně, tuku a pupečníku, které napomáhají nemocným snížit bolestivé příznaky choroby a zmírnit průběh onemocnění. Nedávný výzkum u léčby svalové dystrofie demonstruje možnost léčby lidskými embryonálními kmenovými buňkami. Dalším způsobem, jak potenciálně léčit toto onemocnění je využití mezenchymálních kmenových buněk. Regenerativní buněčná medicína nově vyvinula specifický protokol tzv. SVF (stromální vaskulární frakce buněk), který se pokouší využít potenciálních regeneračních vlastností SVF, které jsou bohaté na mezenchymální kmenové buňky a zároveň na růstové faktory. V léčbě leukemie jsou nejvíce využívány buňky z kostní dřeně. Současný výzkum se snaží použít k léčbě této nemoci teprve nedávno objevené indukované pluripotentní kmenové buňky. Ty poskytují nástroj pro výrobu velkého počtu leukemických buněk *in vitro*. Za použití této metody lze v laboratořích na buňkách studovat, jak nemoc vzniká, jak probíhá a zjišťovat další informace. Z poznatků lze navrhnout a otestovat novou terapii, která bude potenciálně účinnější a méně toxická než dosavadní léčba.

Dle mého názoru, je třeba věnovat této oblasti stále více pozornosti, aby se odhalily nejen vynikající léčebné vlastnosti této metody, ale také případná negativa buněčné terapie, která by mohla ohrozit stav pacienta.

Použitá literatura

1. American Cancer Society. [online] [cit. 2017-03-06]. Dostupné z: <http://www.cancer.org>
2. RATCLIFFE E, GLEN KE, NAING MW, WILIAMS DJ. Current status and perspectives on stem cell-based therapies undergoing clinical trials for regenerative medicine: case studies. *Br Med Bull*, 2013, 108 (1), 73-94.
3. LE BLANC K, GÖTHERSTRÖM C, RINGDÉN O, HASSAN M, MCMAHON R, HORWITZ E, ANNEREN G, AXELSSON O, NUNN J, EWALD U, NORDÉN-LINDEBERG S, JANSSON M, DALTON A, ASTRÖM E, WESTGREN M. Fetal mesenchymal stem-cell engraftment in bone after *in utero* transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta. *Transplantation*. 2005, 79 (11), 1607-1614.
4. Centre for Regenerative Medicine [online] [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://www.crm.ed.ac.uk/>
5. ZIAEI M, JIE Z, DIPIKA P, Umbilical Cord Stem Cells in the Treatment of Corneal Disease. Charles NJ. McGheeSurvey of Ophthalmology. 2017 [online] [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: [http://www.surveyophthalmol.com/article/S0039-6257\(16\)30207-7/fulltext](http://www.surveyophthalmol.com/article/S0039-6257(16)30207-7/fulltext)
6. XIN W, XUE Y, ZHI-PENG H, FANG-FANG Q, LI S. and YU-FANG S. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2013, 34, 747-754.
7. BONGSO A, FONG CY, GAUTHAMAN K. Taking stem cells to the clinic: Major challenges. *Journal of Cellular Biochemistry*. 105 (6), 1352–1360.
8. WONG VW, SORKIN M, GURTNER GC. Enabling stem cell therapies for tissue repair: Current and future challenges. *Biotechnology Advances*. 2013, 31 (5), 744-751.
9. GEFFNER LF, SANTACRUZ P, IZURIETA M, FLOR L, MALDONADO B, AUAD AH, MONTENEGRO X, GONZALEZ R, SILVA F. Administration of autologous bone marrow stem cells into spinal cord injury patients via multiple routes is safe and improves their quality of life, comprehensive case studies. *Cell Transplant*. 2008, 17 (12), 1277-1293.
10. FILIP S, MOKRÝ J. a HRUŠKA I. *Kmenové buňky: biologie, medicína, filozofie*. Praha: Galén, ©2006. Makropulos. ISBN 80-7262-401-6.

11. MUMMERY C. L. *Stem cells: scientific facts and fiction*. Burlington, MA: Academic Press, 2011. ISBN 978-0-12-381535-4.
12. MASON C, DUNNILL P. A brief definition of regenerative medicine. *Regenerative Medicine*. 2008, 3, 1-5.
13. CHRETIEN F, LATIL M, TÁDŽBACHŠ S. Institut Pasteur FRANCE. Methods for obtaining stem cells. PCT / EP2011 / 059214. US9499792 B2. 2016 [online] [cit. 2017-03-08]. Dostupné z: <https://www.google.com/patents/US9499792#legal-events>
14. CHEN Y, SHAO JZ, XIANG LX, XUE-JUN D, GUO-RONG Z. Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2008, 40 (5), 815-820.
15. *CellMaGel*. 2013. [online] [cit. 2017-03-11]. Dostupné z: <http://cellmagel.cz/cs/uvodni-stranka/typy-kmenovych-bunek>
16. WU Y, ZHAO R. CH, EDWARD E. Tredget. Concise Review: Bone Marrow-Derived Stem/Progenitor Cells in Cutaneous Repair and Regeneration. *Stem Cells Journals*. 2010. 28 (5), 905-915.
17. AKTIVA JM, WOODBURY D. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008. 12 (3), 730-742.
18. HERBERTS CA, KWA SGM, HERMSEN PHH. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*. 2011. 9 (29).
19. JO CH, KIM OS, PARK EY, KIM BJ, LEE JH, KANG SB, LEE JH, HAN HS, RHEE SH, YOON KS. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion. *Cell and Tissue Research*. 2008. 334 (3), 423-433.
20. BRIGNIER AC, GEWIRTZ AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2010. 125 (2).
21. ARNHOLD S, GLÜER S, HARTMANN K, RAABR O, ADDICKS K, WENISCH S, HOOPMANN M. Amniotic-Fluid Stem Cells: Growth Dynamics and Differentiation Potential after a CD-117-Based Selection Procedure. *Stem Cells International*. 2011.
22. VELEMÍNSKÝ M. a M. Nová kniha o těhotenství a mateřství. GREGORA, Praha: Grada, ©2011. ISBN 978-80-247-3081-3.
23. L DA SILVA MEIRELLES, ARNOLD I. CAPLAN, NANCE BEYER NARDI. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Journals*. 2008. 26 (9), 2287-2299.

24. LINDROOS B, SUURONEN R. & MIETTINEN. The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2011. 7 (2).
25. MIZUNO H, TOBITA M, UYSAL A C. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. *Stem Cells Journals*. 2012. 30 (5), 804-810.
26. Center for Cellular Therapies. [online] [cit. 2017-03-17]. Dostupné z: <http://www.aabb.org>
27. Euro Stem Cell. [online] [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://www.eurostemcell.org>
28. Národní centrum tkání a buněk. [online] [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.natic.cz>
29. Explore Stem Cells. [online] [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.explorestemcells.co.uk/>
30. Český národní registr dárců dřeně. [online] [cit. 2017-03-13]. Dostupné z: <http://www.kostnidren.cz/registr2014/index.html>
31. KEHOE S, CHITTY L. a HOMFRAY T. Reproductive genetics. London [England]: RCOG Press, 2009. ISBN 978-1-906985-16-5.
32. BHARATHAN SP, MANIAN KV, AALAM SM, PALANI D, DESHPANDE PA, PRATHEESH MD, SRIVASTAVA A, VELAYUDHAN SR. Systematic evaluation of markers used for the identification of human induced pluripotent stem cells. *Biology Open*. 2016. 100-108.
33. Buněčná terapie. [online] [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.bunecnaterapie.cz/>
34. Global Stem Cells Group. [online] [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://www.stemcellsgroup.com/>
35. SOCCOL V, PANDEY A, RESENDE R. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. 2016. ISBN: 9780444636607
36. KLABUSAY M. Kmenové buňky v kardiologii: minulost, současnost a budoucnost celulární terapie poškozeného myokardu. *Interní medicína pro praxi*. 2009, ISSN 1803-5256. 10, 452-457.
37. PHERMTHAI T, ODGLUN Y, JULAVIJITPHONG S, TITAPANT V, CHUENWATTANA P, VANTANASIRI C. and PATTANAPANYASAT K. A novel method to derive amniotic fluid stem cells for therapeutic purposes. *BioMed Central*. 2010. 11 (79).

38. ABDALLAH BM. and KASSEM M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene therapy*. 2007. 109-116.
39. BATTEY J. F, COLE L. K. and GOLDTHWAITE C. A. The Clinical Application of Pluripotent Cells: The Promise and the Challenges. National Institutes of Health. chapter 8. [online] [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <https://www.nih.gov/>
40. Boston Children's Hospital. [online] [cit. 2017-03-28]. Dostupné z: <http://stemcell.childrenshospital.org/about-stem-cells/pluripotent-stem-cells-101/>
41. Český Registr Dárců Krvetvorných buněk-Praha. [online] [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.darujzivot.cz>
42. CHAMBERLAIN G, FOX J, ASHTON B, MIDDLETON J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells Journals*. 2007. 25 (11), 2739-2749
43. Interactive Educational Materiál For Pediatric Bone Marrow Transplantation Nurses [online] [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.bmtcare.com/>
44. BANG OY, KIM EH, CHA JM, MOON GJ. Adult Stem Cell Therapy for Stroke: Challenges and Progress. *Journal of Stroke*. 2016. 18 (3), 256-266.
45. FOROSTVAK S, HOMOLA A, TURNOVCOVA K, SVITIL P, JENDELOVA P, SYKOVA E. Intrathecal delivery of mesenchymal stromal cells protects the structure of altered perineuronal nets in SOD1 rats and amends the course of ALS. *Stem Cells Journals*. 2014. 32 (12), 3163-3172.
46. Linkos. Česká onkologická společnost České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně. [online] [cit. 2017-03-14]. Dostupné z: <http://www.linkos.cz/transplantace-krvetvornych-bunek/priprava-a-postup-pri-transplantaci/>
47. LIU S, ZHOU J, ZHANG X, LIU Y, CHEN J, HU B, SONG J. and ZHANG Y. Strategies to Optimize Adult Stem Cell Therapy for Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. 17 (6).
48. Stem Cell Institut. [online] [cit. 2017-04-03]. Dostupné z: <https://www.cellmedicine.com/stem-cell-implantation/>
49. ASSMUS B, WALTER DH, LEHMANN R, HONOLD J, MARTIN H, DIMMELER S, ZEIHNER AM, SCHÄCHINGER V. Intracoronary infusion of progenitor cells is not associated with aggravated restenosis development or atherosclerotic disease progression in patients with acute myocardial infarction. *European Heart Journal*. 2006. 27 (24), 2989-2995.

50. ABDEL-LATIF A, BOLLI R, TLEYJEH IM, MONTORI VM, PERIN EC, HORNUNG CA, ZUBA-SURMA EK, AL-MALLAH M, DAWN B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med.* 2007. 167 (10), 989-997.
51. Advancells. [online] [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.advancells.com>
52. Léčba Kmenovými Buňkami. [online] [cit. 2017-04-03]. Dostupné z: <http://lecbakmenovymibunkami.com/poruchy-zraku/>
53. Advancells. [online] [cit. 2017-04-04]. Dostupné z: <http://www.advancells.com>
54. Stem Cells 21. [online] [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <https://stemcells21.com/>
55. Bennett Orthopdics And Sportsmedicine. [online] [cit. 2017-04-09]. Dostupné z: <http://www.bennettorthosportsmed.com>
56. GOLDTHWAITE CA. National Are Stem Cells the Next Frontier for diabetes treatment? *Institutes of Health Turning Discovery Into Health.* 2006. Chapter 7.
57. LODI D, IANNITTI T. and PALMIERI B. Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2011. 30 (9).
58. A Closer Look At Stem Cells. [online] [cit. 2017-04-11]. Dostupné z: <http://www.closerlookatstemcells.org>
59. Swiss Medica Clinic [online] [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://www.startstemcells.com>
60. Celltex. [online] [cit. 2017-04-12]. Dostupné z: <http://celltexbank.com/therapies/type-1-diabetes/>
61. MISHRA PK, SINGH SR, JOSHUA IG, TYAGI SC. Stem cells as a therapeutic target for diabetes. *Frontiers in Bioscience.* 2010. 15, 461-477.
62. Canadian Stem Cell Foundation. [online] [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <http://stemcellfoundation.ca/en/diseases/heart-failure/>
63. National Institutes of Health Turning Discovery Into Health [online] [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <https://stemcells.nih.gov/info/basics/7.htm>
64. JACKO M. Gate2biotech. [online] [cit. 2017-04-18]. Dostupné z: <http://www.gate2biotech.cz/kmenove-bunky-a-genova-terapie-pro-lecbu-srdcnich-selhani-nejsme-prilis-optimisticti/>
65. Cancer Treatment Centers of America. [online] [cit. 2017-04-19]. Dostupné z: <http://www.cancercenter.com/leukemia/stem-cell-transplantation/>
66. Center For Regenerative Cell Medicine. [online] [cit. 2017-04-20]. Dostupné z: <http://www.mystemcelltherapy.com/>

67. AL-MAAWALI AKS, NGUYEN P. and PHANG PT. Modern Treatments and Stem Cell Therapies for Perianal Crohn's Fistulas. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2016. 2016, 7.
68. A1 Stem Cells. [online] [cit. 2017-04-28]. Dostupné z: <http://a1stemcells.com>
69. Stem Cell Centers. [online] [cit. 2017-05-04]. Dostupné z: <http://www.stemcellcenters.com/conditions/muscular-dystrophy/>
70. ICHIM TE, ALEXANDRESCU DT, SOLANO F, LARA F, CAMPION R. DEN, PARIS E, WOODS EJ, MURPHY MP, DASANU CA, PATEL AN. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: Implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cellular Immunology*. 2010. 260 (2), 75-82.
71. Em Cell [online] [cit. 2017-05-24]. Dostupné z: https://www.emcell.com/en/list_of_diseases/duchenne-muscular-dystrophy.htm
72. Healthline. [online] [cit. 2017-05-24]. Dostupné z: <http://www.healthline.com/health-news/stem-cell-treatments-offer-hope-also-severe-risks#3>
73. Stem Cultures. [online] [cit. 2017-05-25]. Dostupné z: <https://stemcultures.com/risks-of-stem-cell-treatments/>
74. HERBERTS CA, KWA MSG, HERMSEN HPH. Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*. 2011. 9 (29).

Obrázky zdroje:

1. Princip využití KB. převzato a upraveno podle Wikimedia Commons. [online] [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Tissue_engineering_english.jpg#filelinks
2. Struktura KB. převzato a upraveno podle Department of Health and Human Services [online] [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.stemcells.nih.gov>
3. Zdroj extra embryonálních KB. převzato z Journal of Cellular and Molecular Medicine. Fetal stem cells from extra-embryonic tissues: do not discard. Akiva J. Marcus, Dale Woodbury. June 2008. 12 (3), 730–742. [online] [cit. 2017-03-20]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2008.00221.x/full?wvURL=/doi/10.1111/j.1582-4934.2008.00221.x/full®ionCode=CZ&identityKey=fe155a18-37b5-409d-9fae-3d4f4d37a7bd>

4. Intra-artikulární aplikace. [online] [cit. 2017-04-04]. Dostupné z:
<https://stemcells21.com/stem-cell-injections/>
5. Porovnání svalové hmoty u zdravého těla a těla se svalovou dystrofií. [online] [cit. 2017-05-24]. Dostupné z <http://www.mystemcelltherapy.com/neurological-conditions/muscular-dystrophy-2/>