

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko – technologická

Využití kmenových buněk pro léčbu Beckerovy svalové dystrofie a její
diagnostika

Bakalářská práce

2022

Kateřina Rubínová

The University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Use of Stem Cells for the Treatment of Becker Muscular Dystrophy and the
Diagnostic

Bachelor thesis

2022

Kateřina Rubínová

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Kateřina Rubínová**
Osobní číslo: **C18273**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Využití kmenových buněk pro léčbu Beckerovy svalové dystrofie a její diagnostika**
Téma práce anglicky: **Use of Stem Cells for the Treatment of Becker Muscular Dystrophy and the Diagnostic**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Rešerše na téma využití kmenových buněk pro léčbu Beckerovy svalové dystrofie
 - a) Beckerova muskulární dystrofie
 - b) Diagnostické metody
 - Molekulárně biologické metody
 - Další metody
 - c) Kmenové buňky
 - Současný stav
 - Využití pro léčbu

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

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Vojtěch Vejvoda, Ph.D.**
Herbacos Recordati s.r.o.

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

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

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

LS.

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2022

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu práce Mgr. Vojtěchu Vejvodovi Ph.D. za ochotnu, pomoc, trpělivost a čas, který věnoval čtení a opravě bakalářské práce.

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., 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

Kateřina Rubínová

ANOTACE

Beckerova muskulární dystrofie je genetická porucha, která je charakteristická progresivní slabostí a degenerací primárně kosterních svalů, které řídí pohyb a dále sval srdce. Je způsobená alelickou poruchou na chromozomu X a dědí ji chlapci. Tato práce popisuje příčinu, průběh a diagnostiku. Dále popisuje uchovávání pupečnickové krve a využití kmenových buněk v oblasti léčby.

KLÍČOVÁ SLOVA

Beckerova muskulární dystrofie, genetika, diagnostika, léčba, kmenové buňky, pupečnicková krev

TITLE

Use of stem cells for the treatment of Becker muscular dystrophy and diagnosis

ANNOTATION

Becker muscular dystrophy is a genetic disorder characterized by progressive weakness and degeneration of the primarily skeletal muscles that control movement and heart muscle. It is caused by an allelic disorder on the X chromosome and is inherited by boys. This work describes the cause, course and diagnosis. It also describes the preservation of umbilical cord blood and the use of stem cells in treatment.

KEYWORDS

Becker muscular dystrophy, genetics, diagnostic, treatment, stem cells, umbilical cord blood

SEZNAM ILUSTRACÍ

| | |
|--|----|
| Obrázek č. 1 - Progrese svalového postižení u různých typů svalové dystrofie [4]..... | 16 |
| Obrázek č. 2 - Biceps zdravého člověka a pacienta postiženého svalovou dystrofií. [5]..... | 17 |
| Obrázek č. 3 - Komplex dystrofin asociovaných proteinů (DAPC) [10] | 18 |
| Obrázek č. 4 - Gowerův manévr neboli myopatický šplh, příznak svalové dystrofie [14] | 20 |
| Obrázek č. 5 – Rodokmen gonozomálně recesivních chorob s vyznačením rodinné anamnézy BMD [15]..... | 21 |
| Obrázek č. 6 – Ukázka histologického preparátu, zobrazující buňky s normální hodnotou dystrofinu [17] | 23 |
| Obrázek č. 7 – Ukázka histologického preparátu zobrazující buňky se sníženou hodnotou dystrofinu[17] | 23 |
| Obrázek č. 8 - Příčný řez svalem, náhrada svalových vláken za tukové buňky [18] | 23 |
| Obrázek č. 9 - Imunobarvení dystrofinu a asociovaných proteinů, v řezech svalu [19] | 24 |
| Obrázek č. 10 - Přeměna kreatinu na kreatininfosfát [22]..... | 25 |
| Obrázek č. 11 - Fyziologický nález EMG [26] | 27 |
| Obrázek č. 12 – Příklad výsledku Sangerova sekvenování [27] | 28 |
| Obrázek č. 13 - Příklad výsledku metody NGS [28]..... | 29 |
| Obrázek č. 14 - Výsledky metody MLPA [28] | 30 |
| Obrázek č. 15 - Schéma rozdělení kmenových buněk [31]..... | 31 |
| Obrázek č. 16 - Kolonie indukovaných pluripotentních kmenových buněk [44] | 35 |
| Obrázek č. 17 - Kolonie lidských embryonálních kmenových buněk [46] | 36 |
| Obrázek č. 18 - Rozdělení transplantací dle dárce a příjemce | 38 |
| Obrázek č. 19 - Popis, kde mohou být kmenové buňky využity [35] | 39 |
| Obrázek č. 20 - Přehled typů buněk pro buněčnou terapii svalových dystrofií [58]..... | 47 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 - Hodnoty CK u jednotlivých svalových dystrofiích a chorob [20] | 26 |
|--|----|

SEZNAM ZKRATEK

BMD – Beckerova svalová dystrofie

DMD – Duchennova svalová dystrofie

DAPC – Komplex dystrofin asociovaných proteinů

IMD – Střední svalová dystrofie

IHC – Imunohistochemická metoda

IB – Imunoblot

CK – Kreatininkináza

NGS – Sekvenování nové generace

MLPA - Multiplex ligation – dependent probe amplification

MM – Svalový izoenzym

BB – Mozkový izoenzym

MB – Myokardinální izoenzym

EMG – Elektromyografie

ESC – Embryonální kmenové buňky

hESC – Lidské embryonální kmenové buňky

ASC – Dospělé kmenové buňky

ISC – Indukované kmenové buňky

MSC – Mezenchymální kmenové buňky

HLA – Hlavní histokompatibilní komplex

rAAV – Rekombinantní adeno – asociovaný vir

SMN2 – Survival motor neuron

AON – Antisense oligonukleotid

MuSC – Muscle Stem cells, satelitní buňky

BMMNC – Mononukleární buňky z kostní dřeně

mMRC – Medical Research Council, Modifikovaná škála dušnosti

OBSAH

| | |
|--|----|
| ÚVOD | 15 |
| 1. BECKEROVA MUSKULÁRNÍ DYSTROFIE..... | 16 |
| 1.1. DĚDIČNOST..... | 17 |
| 1.2. MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERISTIKA DYSTROFINU..... | 18 |
| 1.3. ROLE DYSTROFINU V CHOROBÁCH BMD A DMD | 19 |
| 1.4. PROJEVY, DŮSLEDKY A KAZUISTIKA BMD..... | 19 |
| 2. DIAGNOSTICKÉ METODY BECKEROVY MUSKULÁRNÍ DYSTROFIE | 22 |
| 2.1. SVALOVÁ BIOPSIE | 22 |
| 2.2. HISTOPATOLOGIE..... | 22 |
| 2.4. CHEMIE SÉRA..... | 25 |
| 2.5. EMG..... | 26 |
| 2.6. MUTAČNÍ ANALÝZA..... | 27 |
| 2.7. SEKVENOVÁNÍ NOVÉ GENERACE..... | 28 |
| 2.8. MULTIPLEX LIGATION – DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION | 29 |
| 2.9. WESTERN BLOT (IMUNOBLOTING) | 30 |
| 3. ROZDĚLENÍ A VLASTNOSTI KMENOVÝCH BUNĚK | 31 |
| 3.1. ROZDĚLENÍ DLE VÝSKYTU | 32 |
| 3.2. ROZDĚLENÍ DLE DIFERENCIAČNÍHO POTENCIÁLU | 35 |
| 4. TRANSPLANTACE KMENOVÝCH BUNĚK Z PUPEČNÍKOVÉ KRVE | 38 |
| 4.1. HISTORIE TRANSPLANTACE PUPEČNÍKOVÉ KRVE..... | 39 |
| 4.2. OBECNÉ VYUŽITÍ KMENOVÝCH BUNĚK Z PUPEČNÍKOVÉ KRVE..... | 39 |
| 4.3. ODBĚR PUPEČNÍKOVÉ KRVE..... | 40 |
| 4.4. UCHOVÁVÁNÍ PUPEČNÍKOVÉ KRVE..... | 40 |
| 5. SOUČASNÁ LÉČBA BECKEROVY SVALOVÉ DYSTROFIE..... | 42 |
| 5.1. KORTIKOSTEROIDY..... | 42 |

| | | |
|------|---|----|
| 5.2. | SPINRAZA..... | 42 |
| 5.3. | BUNĚČNÁ TERAPIE..... | 43 |
| 5.4. | GENOVÁ TERAPIE..... | 43 |
| 5.5. | UTROFINOVÁ MODULACE | 44 |
| 5.6. | ANTISENSE OLIGONUKLEOTIDY A PŘESKOČENÍ EXONU | 44 |
| 6. | VYUŽITÍ BUNĚK PŘI LÉČBĚ BECKEROVY SVALOVÉ DYSTROFIE | 45 |
| 6.1. | VYUŽITÍ SATELITNÍCH BUNĚK..... | 45 |
| 6.2. | VYUŽITÍ MYOBLASTŮ | 45 |
| 6.3. | VYUŽITÍ MEZOANGIOBLASTŮ | 45 |
| 6.4. | ÚČINKY INTRAVENÓZNÍHO PODÁNÍ LIDSKÉHO PUPEČNÍKU..... | 46 |
| 6.5. | KAZUISTIKA..... | 47 |
| 7. | ZÁVĚR..... | 49 |
| | SEZNAM LITERATURY | 51 |

Úvod

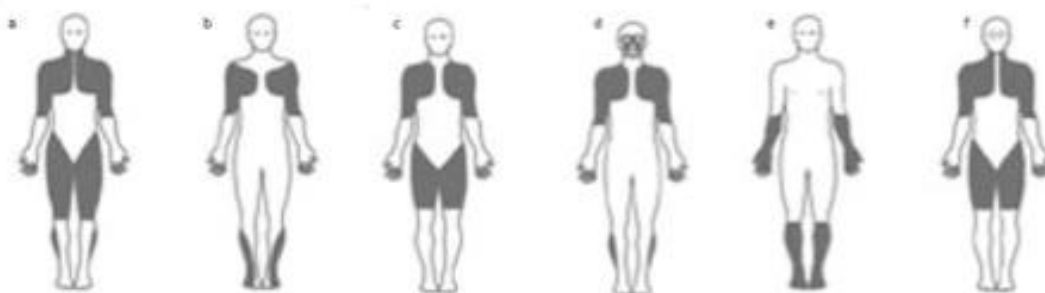
Kmenové buňky mají do budoucna velké využití. Jsou obsaženy nejen v kostní dřeni, tukové tkáni, embryu nebo periferní krvi, ale také v krvi pupečnickové. Právě využitím kmenových buněk z pupečnickové krve se tato práce zabývá. Odběr je bezpečný a z etického hlediska se jedná o zcela bezproblémovou metodu.

Na tomto tématu mám velký osobní zájem, hlavně z hlediska Beckerovy muskulární dystrofie. V naší rodině se jako jedna z mnoha dalších vážných chorob dědí, a ráda bych, aby jednou další generace měly možnost s touto nemocí nějakým způsobem bojovat nebo alespoň zlepšit její průběh. Myslím, že se o možnosti odběru pupečnickové krve a uchování kmenových buněk v běžném životě velmi málo mluví. Spousta budoucích rodičů o možnosti odběru pupečnickové krve neví. Cílem této práce je získat nejnovější informace, přehled o možnostech, využít je ve vlastním životě a poskytnout tyto informace dál svým nejbližším.

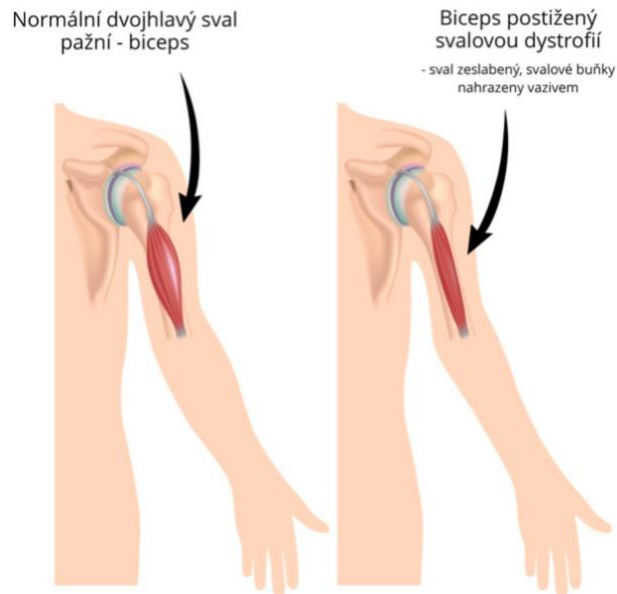
1. Beckerova muskulární dystrofie

Beckerova muskulární dystrofie (BMD) je genetická porucha, která je charakteristická progresivní slabostí (atrofií) a degenerací primárně kosterních svalů, které řídí pohyb a dále sval srdce. Je označována jako benignější forma Duchennovy muskulární dystrofie (DMD). DMD se projevuje ve výrazně mladším věku, má rychlejší průběh a klinické příznaky jsou znatelnější. Obě tyto vrozené vady jsou způsobené alelickou poruchou na chromozomu X, přesněji řečeno v oblasti Xp21.2, kde se nachází gen, který má za úkol syntézu dystrofinu. Jsou klasifikovány jako dystrofinopatie. Na vyšetřeních můžeme vidět buď abnormální molekulovou hmotnost dystrofinu nebo snížené množství. [1], [2], [3]

Na obrázku č. 1 lze vidět progresi svalového postižení u jednotlivých forem dystrofií. Postava „a“ se týká Beckerovy a Duchennovy svalové dystrofie. Na obrázku č. 2 je vidět rozdíl mezi bicipsem zdravého člověka a pacienta postiženého svalovou dystrofií.



Obrázek č. 1 - Progrese svalového postižení u různých typů svalové dystrofie: A – Duchennova a Beckerova; B – Emeryho-Dreifussova; C – pletencová; D – fasciokapulohumerální; E – okulofaryngeální [4]



Obrázek č. 2 - Biceps zdravého člověka a pacienta postiženého svalovou dystrofií. [5]

1.1. Dědičnost

Tato choroba se dědí gonozomálně recesivně. Charakteristickým znakem X – vázané dědičnosti je, že otec nemůže jakékoliv rysy, které jsou v tomto chromozomu zaznamenány, svému synovi předat. Ve většině případech zdědí muž mutaci od své matky. V mužském karyotypu XY, stačí pouze jedna změněná kopie genu v každé buňce, zatímco u žen by musela nastat mutace v obou kopiích, aby došlo k poruše. Mutace v obou kopiích je ale velmi nepravděpodobná. Proto jsou ženy převážně přenašečky, BMD se neprojeví a může dojít k tzv. lyonizaci neboli inaktivaci chromozomu X. V případě, že má jedinec více než jeden chromozom X (karyotyp 46, XX nebo 46, XXY), lze ve stádiu embrya jeden chromozom X „inaktivovat“. Inaktivace je náhodná, ale trvá po zbytek života, protože každá další vzniklá buňka má již tento chromozom X inaktivován. [6], [7], [8]

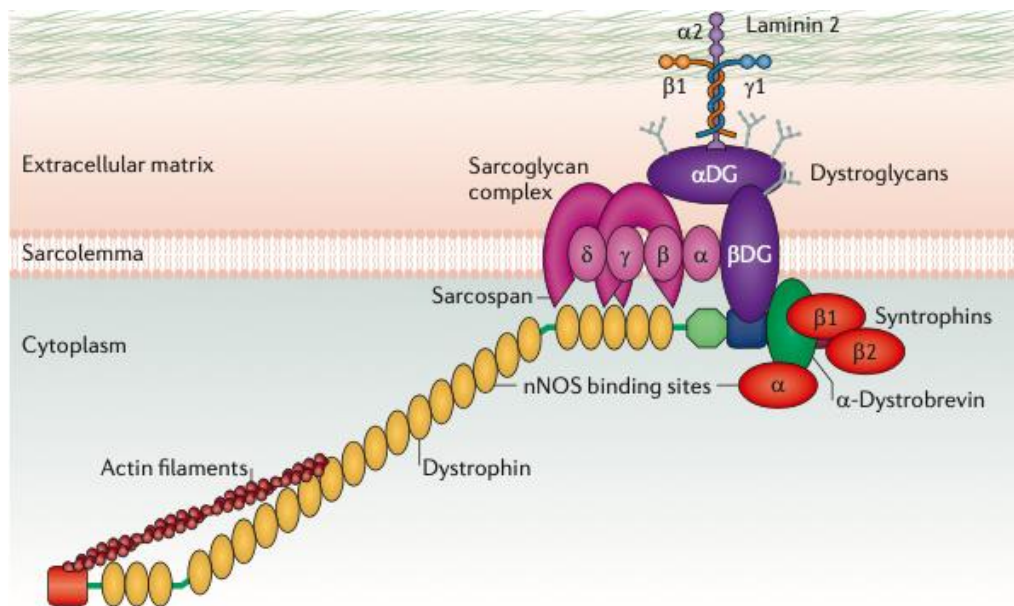
Ženy přenašečky tedy typické příznaky nepocítují. U přenašeček DMD může genová mutace způsobit mírnou atrofii nebo křeče, ale v daleko mírnějším měřítku než u postižených mužů. Dále mohou mít vyšší riziko kardiomyopatie nebo jiných srdečních abnormalit. [8]

V některých případech se vyskytuje i spontánně u jedinců, kteří tuto nemoc v rodinné anamnéze nemají. Frekvence BMD je 1:25000 mužů výrazně nižší než frekvence DMD (1:3500).

1.2. Molekulární charakteristika dystrofinu

Protein dystrofin patří do rodiny β -spektrin/ α -aktinin. Tato rodina je charakterizována aminoterminální doménou. Celkem se dystrofin skládá ze 4 domén. Aminoterminální doména obsahuje vazebné místo pro aktin a dále na ni navazují spectrin – like repeticce. Centrální tyčinková doména obsahuje druhé vazebné místo pro aktin a vazebné místo pro dystrobrevin a syntrofin. Dále doménu bohatou na cystein a karboxyterminální doménu.

Dystrofin se váže k aktinu přes aminoterminální doménu a tyčinkovou doménou, zatímco karboxyterminální a na cystein bohatá doména interaguje s membránovými proteiny jako jsou sarkoglykany, syntrofin, dystrobrevin a dystroglykan. Dohromady tvoří komplex dystrofin asociovaných proteinů neboli DAPC. Tento komplex zajišťuje signální a strukturální propojení extracelulární matrix s cytoskeletem, dále DAPC umožňuje zachovat strukturální integritu sarkolemy. Sarkolema je během svalové kontrakce pod mechanickým stresem a DAPC funguje jako „pohlcovač“ těchto otřesů. [9]



Obrázek č. 3 - Komplex dystrofin asociovaných proteinů (DAPC) α DG: α -dystro-glykan; β DG: β -dystroglykan; nNOS: n-nitrous oxide syntáza [10]

1.3. Role dystrofinu v chorobách BMD a DMD

Molekulární rozdíl mezi BMD a DMD je způsoben rozdíly v expresi dystrofinu. V případě DMD dochází k úplné absenci dystrofinu, protože dojde k deleci exonů, které spolu s introny tento gen kódují. U BMD jsou dvě varianty: buď je dystrofin přítomný a funkční, ale jeho množství je snižené nebo je dystrofin funkční pouze z části. Z tohoto důvodu je BMD výrazně mírnější forma svalové dystrofie. [6]

Primární role dystrofinu je spojit cytoskelet s extracelulární matrix skrz glykovaný protein a jeho komplex, např. sarkoglykan (exprimován v srdečním a kosterním svalstvu, jeho mutace se vyskytují při onemocnění pletencové svalové dystrofie). V nepřítomnosti dystrofinu je svalová membrána náchylná a dochází k poškození svalových vláken. Zvýší se tak počet cyklů regenerace a degenerace, dochází k fibróze a náhradě svalu za tuk. Zjednodušeně stabilizuje, chrání svalová vlákna a může hrát roli v signalizaci v buňkách z chemického hlediska. Dystrofin se nachází v příčně pruhované kosterní svalovině a v myokardu. [6], [8], [11].

1.4. Projevy, důsledky a kazuistika BMD

Forma BMD se projevuje na rozdíl od DMD jako velmi mírná. Průměrný věk, kdy se stanoví tato diagnóza je 11 let, nicméně věkové rozpětí je v této formě široké. Záleží také na konkrétním pacientovi, jak se choroba projeví. V počátku se od DMD příliš neliší a často se překrývá. Proto lékaři pro chlapce, kteří ve dvanácti letech chodí, ale po patnáctém roku svého života nechodí, používají termín „Střední svalová dystrofie“ (IMD). Klasifikace BMD se používá tehdy, když začnou ztrácet „schopnost chodit“ po 15 letech. Skupina IMD tedy zahrnuje chlapce s DMD i s vážným průběhem BMD. [1], [12]

1.1.1. Klinické projevy

Zpočátku se BMD projevuje ponámahovými bolestmi svalstva neboli myalgiemi, dále častějšími křečemi nebo kardiomyopatií. Později dochází k oslabení pánevního pletence, svalů stehna, trupového svalstva a ramenního pletence. Velmi často se vyskytují kontraktury Achillových šlach a v oblasti loketního kloubu. Vše je však velmi pozvolnější než u DMD a ke zhoršení dochází v řádu několika let.

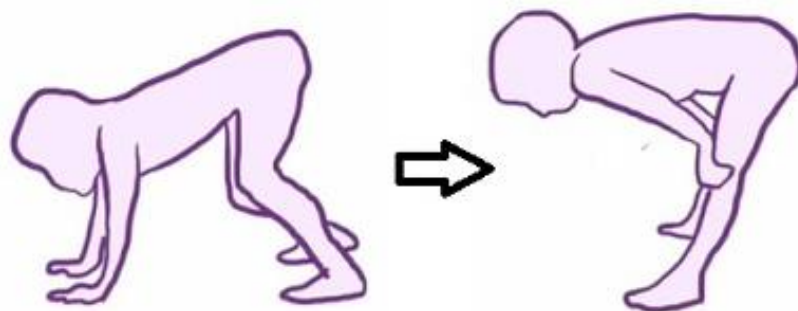
Mezi respirační problematiku patří především snižování kapacity plic, a to v důsledku primárního postižení dýchacího svalstva, břišních svalů a pomocných dýchacích svalů.

V pozdější fázi tento proces může vést k respirační insuficienci. Průběh je velmi pozvolný a k progresi dochází zejména ve spánku, kdy přirozená dechová aktivita klesá. Ráno mohou pacienti trpět bolestmi hlavy, nevolností nebo zvýšenou únavou.

Jak jsem zmínila výše, dystrofin je i součástí myokardu. Při jeho nedostatku tedy dochází ke kardiomyopatii, která je hlavním rizikovým faktorem.

Typickým příznakem je také myopatický šplh neboli Gowerův manévr, jímž si pomáhají při vstávání. Dochází ke „šplhání“ a opírání se rukama na stehnech a postupnému vzpřimování.

[13]



Obrázek č. 4 - Gowerův manévr neboli myopatický šplh, příznak svalové dystrofie [14]

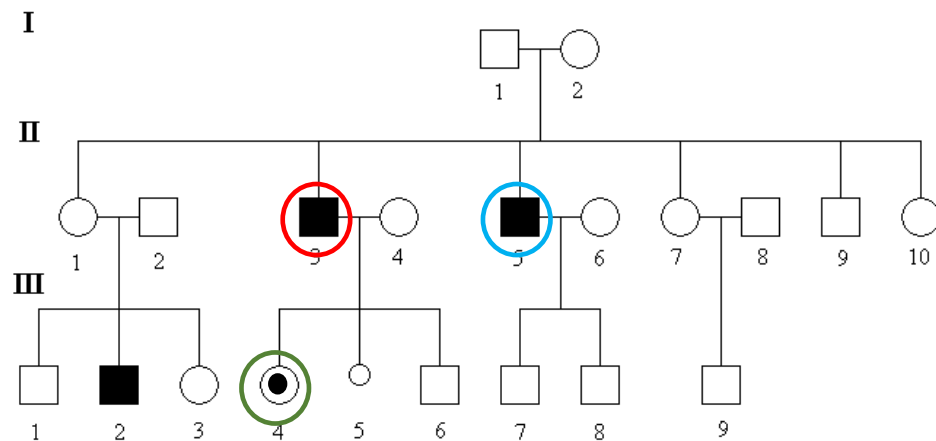
1.1.2. Kazuistika

BMD nicméně představuje velmi variabilní fenotyp a jsou i případy, kdy se na chorobu přijde třeba až v 50 letech nebo i později. Jak jsem zmínila již v úvodu, v naší rodině se dědí po generace. Pamatuji si, jak mi děda říkal, že tělocvik byl pro něj vždy „utrpení“. Přespolní běhy a sprinty byly nejtěžší disciplíny. Později se dostavily křeče při cvičení a celkově ubývalo fyzické zdatnosti i přesto, že se snažil cvičit a nějakým způsobem se udržovat fit. Nicméně v té době se to příliš neřešilo a odpovědnost se přisuzovala cigaretám.

Cca v 50 letech mu byla diagnostikována BMD a 20 let se poté potýkal s čím dál větší svalovou slabostí. Přicházely pády a zranění, u kterých byla rekonvalescence při této nemoci ještě delší. V rodině máme zatím případy dva, o kterých víme, a to můj děda (matky otec) a jeho bratr. Vážnější komplikace se však v obou případech dostavily až po padesáti letech života, a to v návaznosti na jiné zdravotní potíže.

Vzhledem k průběhu onemocnění a ustupující činnosti svalů jak už kosterních svalů či svalu myokardu, pacienti obou těchto forem často zemřou na zástavu srdce nebo udušení, kdy už sval není schopen fungovat. Zdali v tomto případě byla důvodem smrti není známo.

V rodokmenu je dle znázornění vidět, kdo z mé rodiny chorobou trpěl. Červenou barvou je znázorněný můj děda, v modrém jeho bratr, který chorobou také trpěl a v zeleném moje matka, přenašečka.



Obrázek č. 5 – Rodokmen gonozomálně recesivních chorob s vyznačením rodinné anamnézy BMD [15]

2. Diagnostické metody Beckerovy muskulární dystrofie

2.1. Svalová biopsie

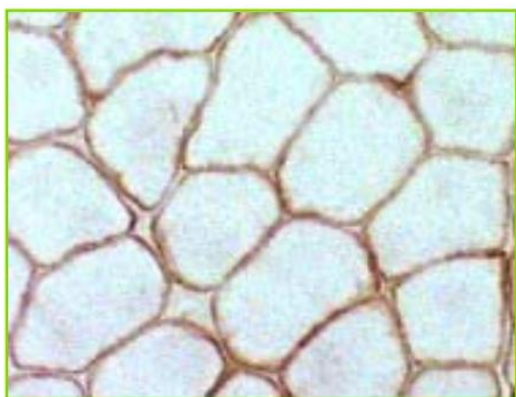
I když v diagnostice molekulárními metodami dochází v poslední době k velkým pokrokům ohledně BMD a DMD, svalová biopsie se relativně často stále používá. Vzorek svalu se odebírá například pomocí bioptické jehly a místo odběru je pod lokální anestézií. Získává se většinou z deltového svalu, bicepsu nebo kvadricepsu. Kromě využití v diagnostice dystrofie odhalí i svalovou infekci nebo chybu v metabolismu a využití energie. Změněná nebo nepřítomná exprese genu ve vzorku pro svalovou biopsii je standardem diagnózy. Současné metody genomické analýzy detekují přibližně 93 % až 96 % mutací. Zbytek tvoří přeuspořádání mRNA. [6], [16]

2.2. Histopatologie

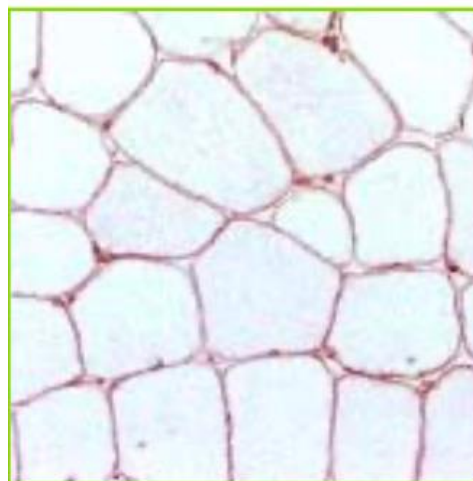
Výsledkem nedostatku dystrofinu jsou histopatologické změny, které lze ve svalech poměrně dobře pozorovat. Ztráta integrity vláken ve svalu vede k nekróze, svalové fibróze a selhání regenerační kapacity. Mezi nejlépe viditelné myopatické změny, díky kterým lze dystrofický nález popsat, patří fibróza a náhrada tuku. Časem se tyto změny zvyšují, což vede až k myopatické změně v konečném stádiu tkáně.

Histopatologická změna se u BMD a DMD liší. Zatímco u vážnější formy dystrofie DMD popřípadě u vážného průběhu BMD lze pozorovat radikální změny poškození, u lehké formy BMD můžeme vidět patologii ve velikosti svalových vláken a fibrózu v různém stupni degradace nebo nekrózy. [6]

Na obrázku č. 6 můžete vidět vzorek tkáně při normální koncentraci dystrofinu u zdravého člověka, zatímco na obrázku č. 7 je hodnota snížena. Tento vzorek odpovídá pacientovi trpící BMD. [17]

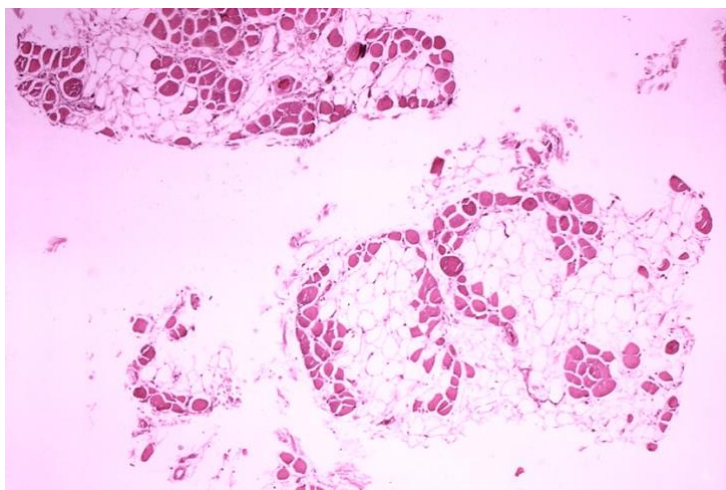


Obrázek č. 6 – Ukázka histologického preparátu, zobrazující buňky s normální hodnotou dystrofinu [17]



Obrázek č. 7 – Ukázka histologického preparátu zobrazující buňky se sníženou hodnotou dystrofinu [17]

Obrázek č. 8 ukazuje příčný řez svalem a náhradu svalových vláken za tukové buňky, což odpovídá typickému nálezu DMD. [18]



Obrázek č. 8 - Příčný řez svalem, náhrada svalových vláken za tukové buňky [18]

Histopatologické změny nejsou specifické, protože podobné změny lze pozorovat u mnoha forem dystrofií. Diagnostika ze svalové biopsie proto závisí na analýze exprese dystrofinu.

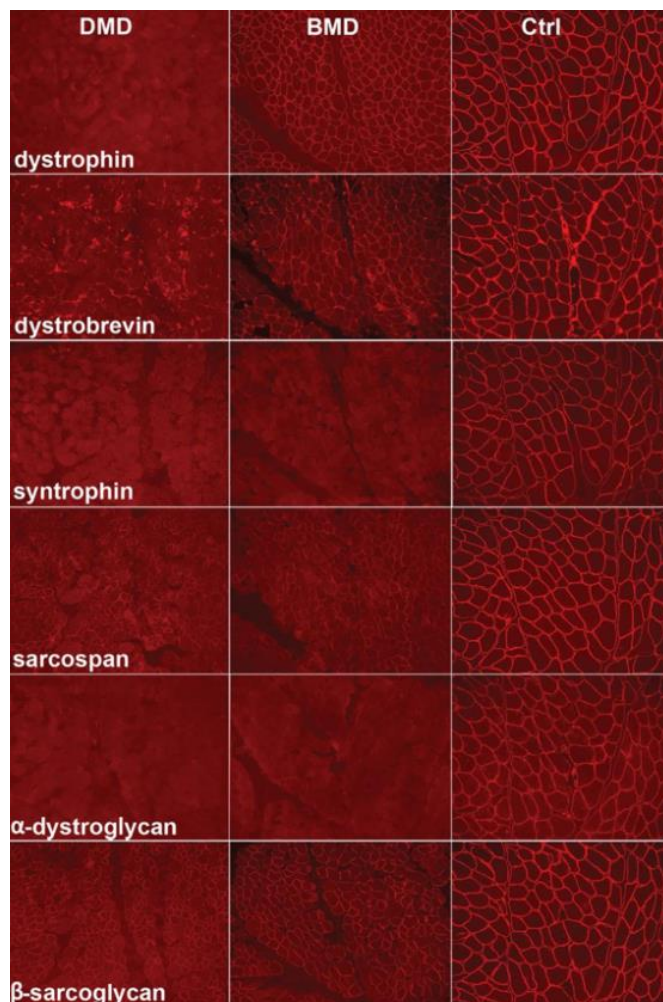
2.3. Hodnocení exprese dystrofinu

Analýzy exprese dystrofinu lze dosáhnout imunohistochemickou (IHC) a imunofluorescenční (IF) metodou analýzou svalových řezů nebo imunoblotem (IB) svalových homogenátů. Metody IHC a IF se provádí pomocí protilátek, které jsou namířeny proti N-konci, centrální tyči a C-koncové doméně. U BMD je barvení dystrofinu nerovnoměrné. Neúplně obklopuje svalová vlákna, zatímco u DMD nějaké „barevné“ známky přítomnosti dystrofinu vidíme pouze

za zvýšené citlivosti IF. Při standardním barvení vzorku z biopsie svalu se u DMD ukazují shluky vláken nebo malá ložiska, které vykazují významnou expresi dystrofinu. Jedná se o tzv. revertantní vlákna (svalová vlákna pozitivní na dystrofin v jinak na dystrofin negativním prostředí) v důsledku sekundárních změn v genu jako například změněný sestřih mRNA, který expresi určitého dystrofinu umožní. [6]

Metoda imunoblot je z těchto tří variant nejvhodnější. Na rozdíl od barvení IF nebo IHC poskytuje informace o velikosti i množství dystrofinu. U změněné velikosti dystrofinu většinou prokazují BMD. [6]

Na obrázku lze vidět porovnání imunobarvení dystrofinu a asociovaných proteinů v řezech svalu. V levém sloupci u pacienta s DMD, uprostřed s BMD a vpravo kontrola (ovládací prvek). [19]

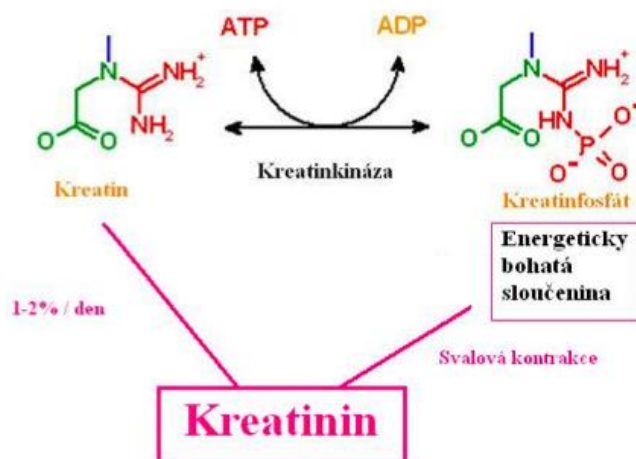


Obrázek č. 9 - Imunobarvení dystrofinu a asociovaných proteinů, v po sobě jdoucích řezech svalu od pacienta s DMD v levém sloupci, pacienta s BMD uprostřed a od zdravého člověka v pravém sloupci [19]

2.4. Chemie séra

Ohledně chemie séra diskutujeme zejména o kreatininkináze (CK). Jako první hladinu tohoto enzymu použil k diagnostice svalového postižení Okinaka v roce 1959. Hladina CK je nyní považována za jednu z nejcitlivějších a nejspolehlivějších laboratorních indikátorů svalového poškození. [20], [21]

CK je jeden z klíčových enzymů energetického metabolismu buněk. Katalyzuje reakci, kdy dochází k přeměně kreatinu na kreatinfosfát pomocí ATP (adenozin trifosfát), který se tím mění na ADP (adenozin difosfát) a obráceně. Kreatinfosfát využívá lidské tělo jako energetický zásobník, a to obzvlášť ve tkáních, které jsou energeticky nejnáročnější. Mezi takové tkáně patří myokard, nervová tkáň, Cortiho orgán, spermie, retina anebo právě kosterní svaly. [21]



Obrázek č. 10 - Přeměna kreatinu na kreatinfosfát [22]

Cytoplazmatická kreatininkináza se díky kombinaci dvou podjednotek, svalové (M = muscle) a mozkové (B = brain), vyskytuje ve 3 izoformách a to: MM (svalový izoenzym), BB (mozkový izoenzym) nebo MB (myokardiální izoenzym). Bílkovina v každé z podjednotek je zakódovaná jiným kódem. Bílkovina pro svalovou podjednotku je na dlouhém raménku devatenáctého chromozomu (19q13) a pro mozkovou podjednotku na čtrnáctém chromozomu (14q32). V kosterních svalech je z 98 % izoenzym CK-MM. [21]

Existuje CK i mitochondriální, jež má dva izoenzymy. Ubikvótní forma se vyskytuje ve všech tkáních kromě příčně pruhované svaloviny. Naopak sarkomerická forma se vyskytuje právě v příčně pruhované svalovině (kosterní svaly a myokard). [23]

Zvýšená hodnota CK je běžná i po fyzické zátěži, v těhotenství, malignity, onemocnění štítné žlázy atd. Jak ale rozlišujeme, zda není CK zvýšená „přirozeně“? Testy na CK se stanovují minimálně 72 hodin po fyzické námaze. Také závisí na hodnotě kolikrát se hodnota zvýšila. Z výzkumu a testů ve výcvikovém středisku Fort Bennig ani v jednom případě nepřesáhla hodnota po fyzické aktivitě padesátinásobek fyziologické hodnoty (bereme – li v potaz venkovní teplotu, pohlaví, etnický původ). [24]

V tabulce lze vidět vzrůst hodnot CK u jednotlivých autosomálně dominantních a recesivních dystrofinopatií. [20]

| Choroba | Frekvence | Hladina CK |
|--|------------------|---------------|
| Dystrofinopatie Duchenneova (DMD) | 100 % | 40–60x (100x) |
| Beckerova forma (BMD) | 100 % | 5–20x |
| Přenašečky DMD | 50 % | 2–20x |
| BMD | 30 % | 2–20x |
| Facioskapulární svalová dystrofie (FSHD) | 75 % | <5x |
| Myotonická dystrofie I. a II. typu | 80 % | <10x |
| Pletencové svalové dystrofie* | Různá podle typu | <100x |
| Pompeho nemoc (GSD II) | 95 % | <10x |
| Rabdomyolýza | 100 % | 5–100x |
| Zánětlivé myopatie (polymyozitida, dermatomyozitida, autoimunitní nekrotizující myopatie) ** | 90–95 % | <100x |

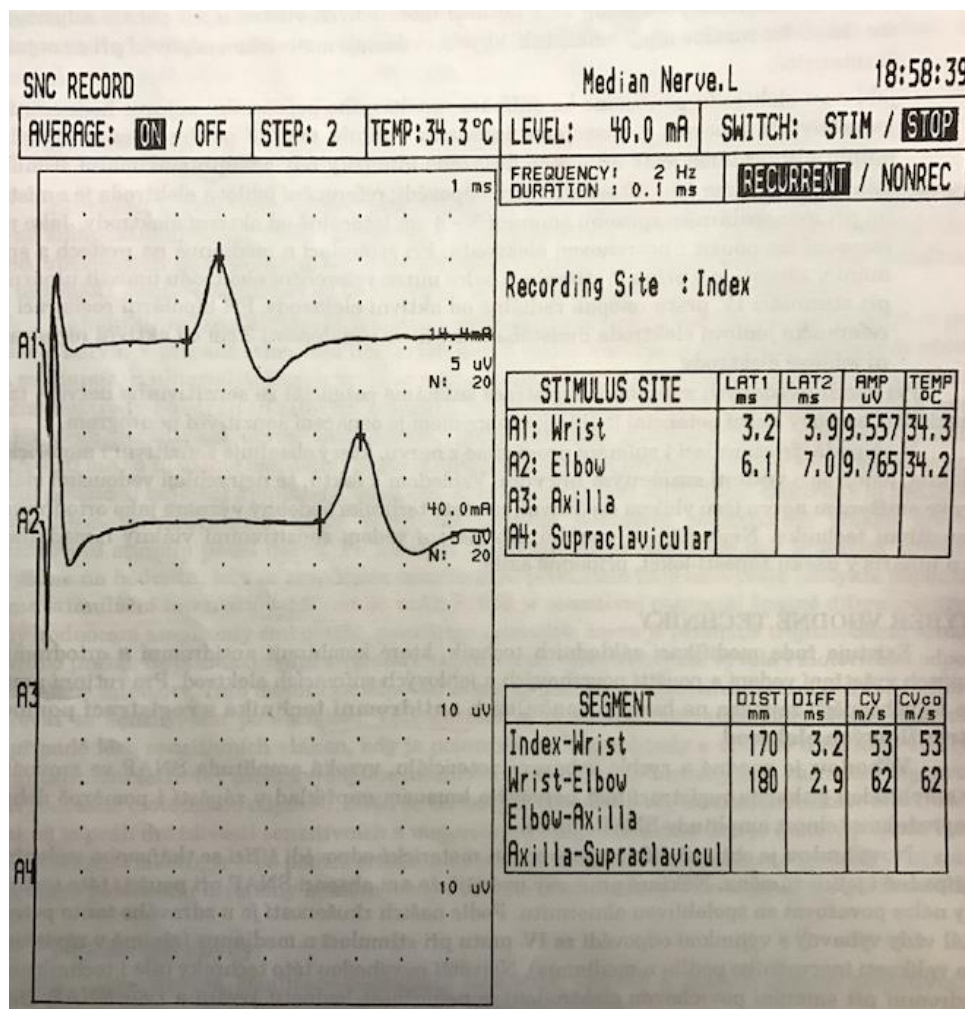
Tabulka 1 - Hodnoty CK u jednotlivých svalových dystrofiích a chorob [20]

2.5. EMG

EMG neboli elektromyografie je vyšetřovací metoda pro měření elektrické aktivity svalů a nervů, který daný sval řídí. Při poranění nervu lze určit nejen lokalizaci, ale i rozsah poškození. Elektrickou aktivitu lze zaznamenávat jehlovými elektrodami, které jsou zavedené do svalu skrz kůži, popřípadě povrchovými elektrodami nad bříškem svalu na kůži. Výsledkem je elektromyogram neboli EMG křivka.

Principem je záměrná aktivace svalu, popřípadě periferního nervu, a přístroj elektromyograf registruje vzruch (akční potenciál). Vzniklý vzruch se šíří nervovým vláknem, aktivuje vlákno svalové a tím vzniká svalový záškub, který je snímán elektrodami, přenášen do procesoru, zpracován a zapsán.

Svalová odpověď se mění v závislosti na poškození. Měření elektrické aktivity svalu a nervu určuje, zdali je například svalová tkáň (svalová dystrofie) nebo nervová tkáň (laterální skleróza) poškozená. [25]



Obrázek č. 11 - Fyziologický nález EMG [26]

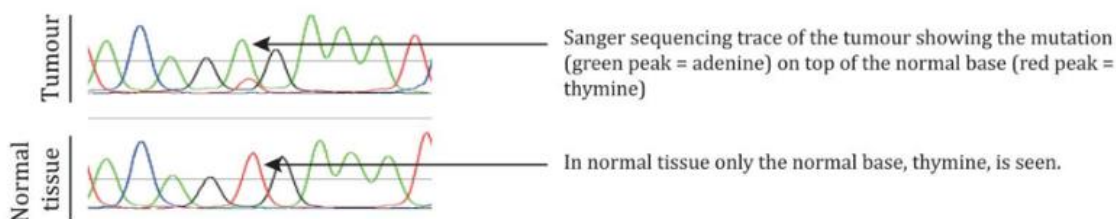
2.6. Mutační analýza

Analýza mutace z DNA z derivovaných lymfocytů je v nynější době dostupný klinický test a provádí se pro potvrzení diagnózy dystrofinopatie po výsledcích z chemie séra (CK). Pro kompletní molekulární diagnostiku byla složitá velikost tohoto genu, protože je jeden z největších. Skládá se ze 79 exonů, které jsou rozloženy přes 2,4 milionu nukleotidů na jednom chromozomu X. Z 65 % je mutací způsobující DMD nebo BMD delece jednoho nebo více exonů. Metody testují počet kopií každého exonu. Snadno detekují mutace duplikace exonu a rozsah souvislých exonových delecí. [6]

Zbytek mutací vyžadují pro detekci sekvenační analýzu. Tradiční metodou je Sangerovo sekvenování exonů. Nutností je, aby bylo sekvenování provedeno přes celou oblast, která nemoc kóduje. Využívá se jako doplněk (číselnými hodnotami cca 30 %) k MLPA (viz níže) pro detekci malých mutací. Nicméně Sangerovo sekvenování je vzhledem k velikosti

poměrně složité, a v současnosti se více používají techniky, které umožňují sekvenování dlouhých úseků DNA jako například metoda NGS.

Pacienti, kteří nemají mutaci detekovatelnou genomickými metodami, ale mají X-vázanou anamnézu v rodině nebo jiný důkaz dystrofinopatie, mají obvykle pseudoexonové mutace. V nich vytváří intronová mutace donorové a akceptorové místo, a to vede k zahrnutí intronického sekvenování do mRNA. [6]



Obrázek č. 12 – Příklad výsledku Sangerova sekvenování [27]

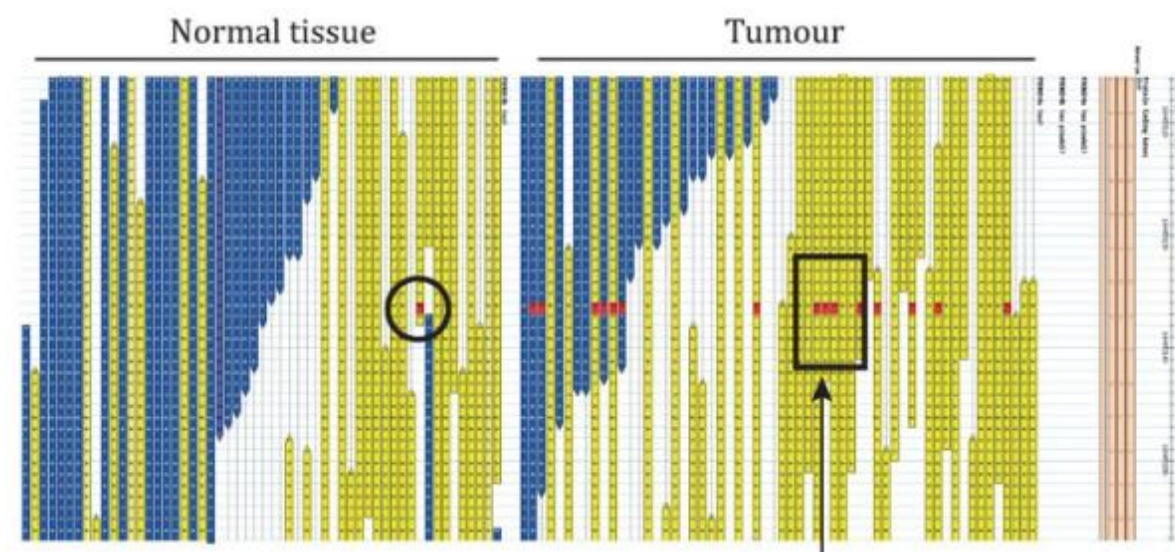
2.7. Sekvenování nové generace

Sekvenování nové generace neboli NGS je technologie sekvenování DNA, jež způsobila ve výzkumu genomu významnou revoluci. Pomocí NGS lze během jediného dne sekvenovat celý lidský genom, zatímco technologií Sangerova sekvenování, bylo sekvenování genomu dokončeno po více než deseti letech. [27], [28] Nicméně vyhodnocení NGS analýzy je značně časově náročné (několik dní až týdnů), přesto je tato velkokapacitní metoda vhodná pro analýzy, kde je nutné sekvenovat velkou část genomu.

Metodami NGS je myšleno několik různých technik sekvenace DNA, které se odlišují po technické stránce (každá platforma využívá technologii, která je využitelná pouze pro ni), ale generují obrovské množství dat (velké pokrytí genomu), případně sekvenování většího množství vzorků, oproti klasickým metodám sekvenace. Všechny platformy ovšem provádí paralelní sekvenování několika milionů malých fragmentů DNA. Při vyhodnocení se ke spojení těchto fragmentů se využívá bioinformatická analýza. Ze tří miliard bází v genomu člověka je každá sekvenována vícekrát, abychom získali co nejpřesnější data a náhled na neočekávané variace DNA. Spektrum variací zahrnuje substituce (malé změny bází), inserce a delece DNA. Dále velké delece exonů nebo celých genů v genomu, inverze a translokace.

Sangerova metoda sekvence se využívá pro substituce, malé inserce a delece. Pro další mutace se provádí specializované testy, jako je například fluorescenční in situ hybridizace (FISH). [27], [28]

Pro analýzu dystrofinu se používá k analýze extrahovaná DNA z krevních lymfocytů pacientů. Pomocí softwaru Ion AmpliSeq Designer byly vytvořeny pooly multiplexních primerů, genový panel, který pokrývá 99,6 % exonové oblasti, včetně oblasti 30 párů bází od hranice exon – intron (lemující oblast) a pokrývá 100 % kódující oblasti. [28]



Obrázek č. 13 - Příklad výsledku metody NGS [28]

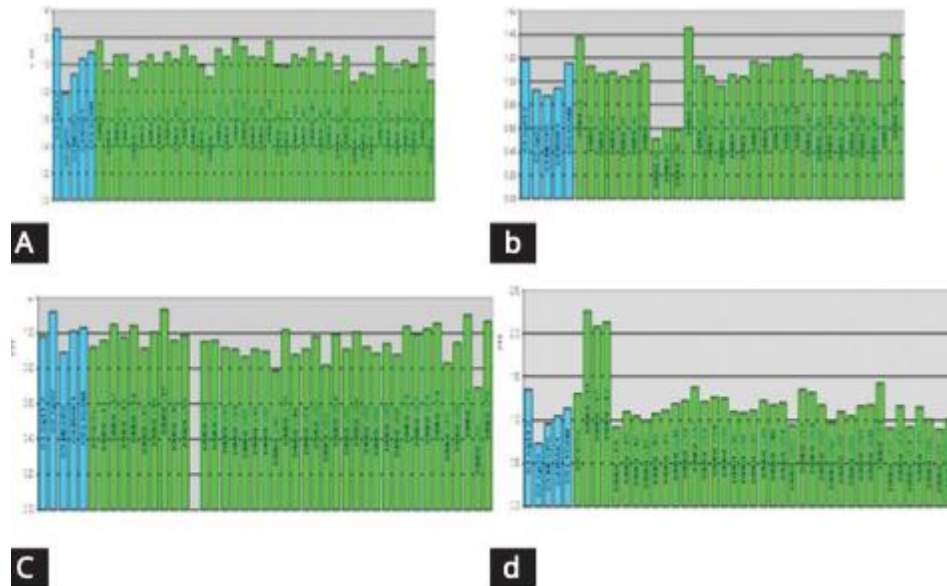
2.8. Multiplex ligation – dependent probe amplification

Metoda Multiplex ligation – dependent probe amplification neboli MLPA je založená na hybridizaci sondy a amplifikaci DNA a používá se pro detekci delecí nebo duplikací v genu. Celosvětově je uvedeno mnoho studií o užitečnosti MLPA metody vzhledem k jiným metodám detekce mutací k chorobě DMD. Výhodou je detekce mutace u přenašeček. Obvykle totiž nestačí použít multiplexní PCR metodu, protože delece dystrofinového genu je maskována druhým, normálním chromozomem X. [29], [30]

V Indii byla provedena studie ohledně detekce mutací u pacientů i nosičů v rodinách s BMD, DMD a zvýšenou hladinou kreatininkinázy. Pomocí standardních vysolovacích protokolů byla izolována DNA z leukocytů a zkontrolována kapkovým spektrofotometrem. Analýza MLPA byla provedená dle výrobce MRC Holland, Nizozemsko (denaturace, hybridizace, ošetření DNA ligázou, ...). Reakce byla zastavena inkubací a poté provedena PCR amplifikace, při které byly použity specifické fluorescenčně značené PCR primery. Produkty amplifikace byly

podrobeny elektroforéze a data analyzována. Celkem bylo analyzováno 217 případů. Deleční mutací bylo postiženo 161 pacientů a z toho 51 případů bylo dovyšetřeno metodou MLPA. [28]

Na obrázku č. 14 lze vidět A – normální píky, B – Heterozygotní delece v exonech, C – Hemizygotní delece v exonu, D – Hemizygotní duplikace [28]



Obrázek č. 14 - Výsledky metody MLPA A – normální píky; B – Heterozygotní delece u přenašečky, C – Hemizygotní delece; D – Hemizygotní duplikace [28]

2.9. Western Blot (Imunobloting)

Metoda Western Blot se využívá pro prognózu, zda je exprese dystrofinu obnovena nebo ne. Prokazuje se změna délky dystrofinu, jeho porušená kvantita, popřípadě úplnou absenci dystrofinu.

Zmražená tkáň svalu se homogenizuje a izolují se proteiny. Elektroforeticky se rozdělí na polyakrylamidovém gelu a na membránu jsou přebíjeny. Membrána se inkubuje s protilátkou a komplex se poté vizualizuje fluorescenčně značeným detekčním systémem. [31]

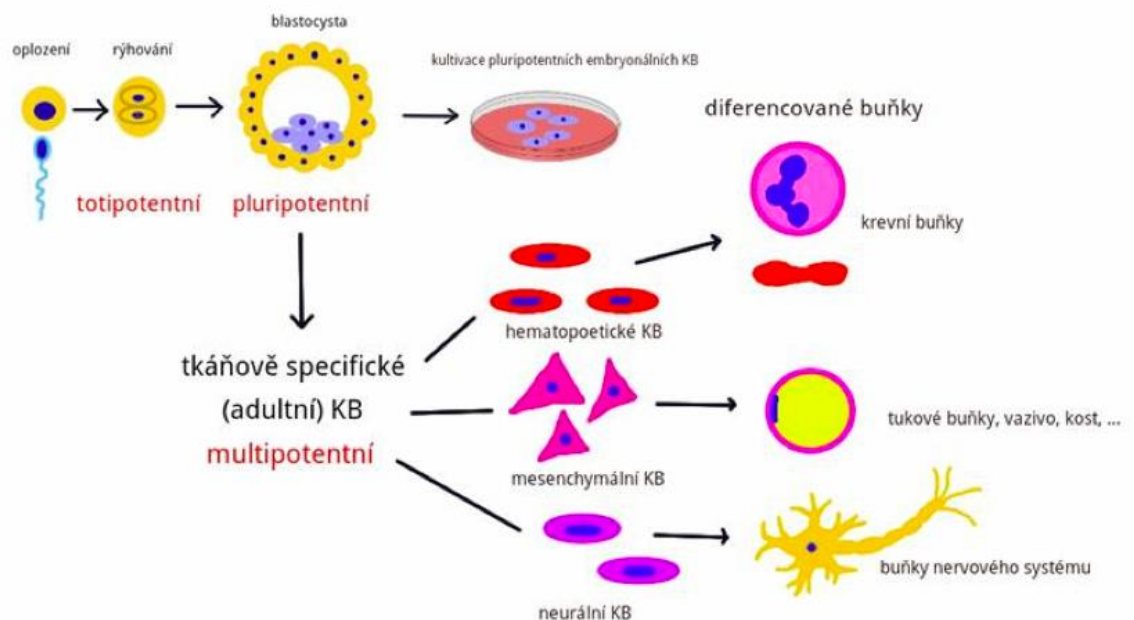
3. Rozdělení a vlastnosti kmenových buněk

Kmenové buňky jsou primární nediferencované buňky, které jsou schopné diferenciaci na jakoukoliv jinou buňku a zároveň se samy neomezeně obnovují. Vytváří tedy úplně nové buňky, které mají schopnost opravovat poškozenou a opotřebovanou tkáň či orgány.

Když jsme nemocní, tělo je zraněné, tak tím nenávratně poškodíme i naše buňky a v tuto chvíli se aktivují právě naše kmenové buňky. Zabraňují i předčasnému stárnutí. Jak bylo řečeno, jsou naše armáda mikroskopických lékařů (citováno – Mgr. Dáša Bohačiová, PhD). Například buňky v kůži mohou vytvářet další buňky kůže nebo se diferenciovat na buňky pokožky. Ty mají už své specifické funkce. [32], [33]

Kmenové buňky proliferují většinou asymetricky (mitózou), kdy z jedné buňky vznikne mateřská se stejnými vlastnostmi a druhá, která je diferenciována. Pokud je ale třeba, proliferují symetricky tzn. buď vzniknou dvě mateřské nebo dvě diferenciované. [34]

Lze je rozdělit podle mnoha kritérií, nejčastěji dle výskytu, podle existence na primární (in vivo) a sekundární (in vitro) nebo podle diferenciačního potenciálu (totipotentní, pluripotentní, multipotentní a unipotentní). [35]



Obrázek č. 15 - Schéma rozdělení kmenových buněk [31]

3.1. Rozdělení dle výskytu

Kmenové buňky lze rozdělit do tří typů podle toho, odkud jsou získávány. A to na:

- Embryonální (ESC),
- Dospělé (ASC),
- A indukované (ISC).

3.1.1. Embryonální kmenové buňky (ESC)

Prvním typem jsou buňky embryonální (ESC). Jsou to pluripotentní buňky, díky kterým vznikají všechny typy somatických buněk v embryu. Jsou získávány z nejprvotnějšího stádia vývinu, tedy 5 dní starého embrya, respektive embrya vytvořeného v laboratoři, kdy partneři využívají umělého oplodnění. Po implantaci do dělohy nevyužitá embrya darují pro vědecké účely. Mají neomezenou schopnost sebeobnovy a plasticity. Tím je možné generovat in vitro neomezený počet různých typů buněk a regenerativní medicíně se tak otevírají dveře. Největší terapeutický příslib lidských ESC (hESC) je v oblasti generování specializovaných buněk, které poté mohou nahradit jakoukoliv poškozenou tkáň u pacientů, kteří trpí nějakou degenerativní chorobou. [32], [33], [36]

Pro progresi ve využití hESC v klinických aplikacích musí být vyvinuty i vhodné kultivační podmínky geneticky stabilní homogenní populace buněk. Zabráni se tak nepříznivým účinkům po transplantaci. Dále je třeba brát v úvahu podmínky související s přežitím buněk a jejich funkční účinnosti po úpravě. [36]

3.1.1.1. Odvození ESC

Poté, co dojde k oplodnění vajíčka a vytvoření diploidní zygoty, se v průběhu brzké embryogeneze vytvoří rozmanitým dělením mitotických buněk nová struktura, blastocysta. Ta se skládá ze dvou vrstev. Vnitřní strana se nazývá embryoblast a vnější vrstva trofoblast. Vnější buněčná hmota, trofektoderm, tvoří embryonální tkáň, ze které později vznikne placenta, chorion a pupeční šňůra. Embryoblast (vnitřní buněčná hmota) se vyvine v embryo. [36], [37]

Dlouhodobá práce s myšími ESC a pokroky v kultivačních technikách vyvinuty pro kultivaci linií ESC primátů, vedly vůbec poprvé k úspěšné generaci linií hESC od Thompsona a spol. (1998) a Reubinoff a spol. (2000). hESC byly odvozeny z lidských embryí produkované in vitro pro klinické účely. Tyto lidské linie si zachovaly pluripotenci a karyotypicky byly normální. Přežívaly na myších embryonálních fibroblastech a kritéria pro ESC včetně

schopnosti tvořit nádory zárodečných buněk, které obsahují různé rozmanité typy tkání, byly splněny.[30]

Izolace z trofektodermu ve stádiu blastocysty bylo dosaženo mechanickou disekcí nebo imunochirurgickými zákroky. Imunochirurgické metody vyžadují použití produktů živočišného původu, a to protilátky proti lidskému séru a morčecího komplementu. Pokud by došlo k expozici produktům živočišného původu, mohlo by dojít k zabránění pozdějšímu použití hESC pro transplantaci kvůli přenosu patogenů. Patogeny by mohly iniciovat vrozené imunitní mechanismy pacienta a transplantovaný štěp by mohl být tělem pacienta odmítnut. Proto by byla výhodná mechanická, popřípadě enzymatická izolace, která by zabránila v kontaktu mezi ICM (embryonální kmenové buňky, které jsou odděleny od vnitřní masy buněk v blastocystě) a živočišnými produkty. [36]

Generování linií hESC z embryoblastu si dosud vždy vyžádalo usmrcení embrya, což je z hlediska etiky a politiky nepřijatelné jako běžná praktika. Z tohoto důvodu byl věnován čas pro izolaci buněk z ranější fáze vývoje embrya bez jeho poničení. Počáteční pokusy ve stádiu 8 buněk nebo moruly vedly z části k úspěšnosti, nicméně diferenciaci blastomer na ICM byla vysoce neefektivní. Tento problém se odstranil použitím kultivačního média s lamininem. Laminin simuluje přirozené niche a umožnil tak úspěšnou generaci hESC. [36]

3.1.2. Dospělé (adultní) kmenové buňky (ASC)

Druhým typem jsou buňky dospělé neboli adultní (Adult stem cells). Jsou to pluripotentní buňky, obsaženy ve tkáních a orgánech a jejich schopností je sebeobnova a diferenciovat se do zralých typů buněk se specializovanou funkcí. Primární funkcí ASC v lidském těle je nahrazování buněk ve tkáni, které odumírají buď v důsledku fyziologického opotřebování nebo poranění a udržení homeostázy. ASC se nachází v periferní dřeni, kostní dřeni, mozku, míše, zubní pulpě, krevních cévách, kosterních svalech, epitelu kůže a trávicího traktu, játrech, rohovce a pankreatu. [38]

Od adultních buněk jsou odvozené buňky somatické. Mezi charakteristické znaky somatických buněk patří schopnost regenerace po celou dobu života a diferenciaci. Za běžných podmínek mají standardní funkci, ale pokud dojde ke zranění nebo jiné „poruše“, plní různé funkce. [39]

3.1.2.1. ASC v kostní dřeni

V kostní dřeni se nachází kmenové buňky hematopoetické a mezenchymové. Diferenciují se do všech typů krevních buněk. Toho se využívá hlavně při dárcovství kostní dřene, kdy se pacientova poškozená krvetvorná tkáň nahradí kostní dření od dárce, která je zdravá. [38]

3.1.2.2. ASC v kosterního svalu

Buňky, které regenerují a obnovují poškozené svaly se nazývají satelitní a nachází se na povrchu zralé svalové buňky, myofibrily. U dospělých savců podněcují růst svalů a proliferaci při poškození, zranění nebo cvičení, které jsou definované expresí markerů. Při zranění dochází ke ztrátě dosavadní uspořádanosti, vznikají mezery, ve kterých je sarkolema poškozená a klidové satelitní buňky. Zranění vede k uvolnění klidových satelitních buněk. Satelitní buňky nazývané „transit amplifying pool“ vstupují do buněčného cyklu, diferenciují se a vznikne tak nové vlákno [38]

Satelitní buňky nalezneme z vnější strany sarkolemy a pod bazální laminou vlákna. Leží ve žlábků buď rovnoběžně nebo příčně k ose svalového vlákna. Klidové buňky mají velký poměr objemu jádra buňky, kde je velké množství nukleárního heterochromatinu k objemu cytoplazmy. Jádro je malé a v cytoplazmě je nižší počet organel (např. malý počet ribozomů). Aktivovaná satelitní buňka má počet organel vyšší a množství heterochromatinu v jádře je nižší. [40]

Reakce každého jedince na cvičení je samozřejmě odlišná ale u většiny lidí dochází ke zvýšení počtu satelitních buněk už po čtyřech dnech cvičení. Při dlouhodobém tréninku hladina roste a udržuje se. V opačném případě začne postupem času klesat. Bylo prokázáno, že pravidelným cvičením dochází ke zvýšené tvorbě IGF – I. Jeho dvě izoformy mají dohromady vliv na regenerační kapacitu stárnoucího svalu a navozuje proliferaci. [40]

3.1.2.3. ASC Centrálního nervového systému

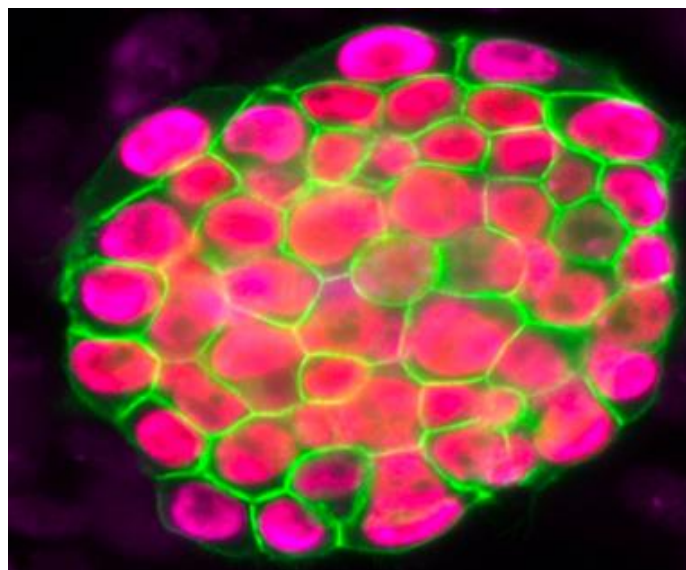
Kmenové buňky jsou v tomto případě ukryty v hipokampu a v zóně gyrus dentatus v blízkosti krevních cév. Dospělé neurony sice nemají schopnost se dělit, nicméně v mozku dospělého člověka byly nalezeny kmenové buňky, které by zdrojem nervových buněk v mozku mohly být. Tato skutečnost je optimistickou vyhlídkou do budoucna při léčbě řady onemocnění mozku,

nicméně je třeba brát v úvahu, že propojení ve vzniklých neuronech nebudou tak dokonalá jako když vzniknou nitroděložně. [41]

3.1.3. Indukované pluripotentní buňky

Třetí typ buněk, indukované pluripotentní kmenové buňky, jsou nejnovějším objevem. Do roku 2006 se předpokládalo, že jediným zdrojem pluripotentních buněk jsou ESC. Dr. Shinya Yamanaka však dokázal, že se mýlíme. Objevil způsob, jak přeprogramovat dospělou specializovanou buňku, a to umělým přidáním 4 genů. Buňky poté byly schopné vytvořit jakoukoliv jinou buňku. Experiment probíhal s použitím myších buněk, nicméně vědci jsou schopni toto provést i s lidskými. Rozdíl je pouze v počtu použitých přidaných genů. Důvod, proč jsou vědci z tohoto objevu tak nadšeni je ten, že odběr ESC je zastíněn etickou problematikou, zatímco toto nikoliv. Tento postup však s sebou nyní nese vážná omezení, protože tato úprava buněk (jejich „přeprogramování“) může vést ke vzniku nádorů. [33], [42]

V budoucnu by ale mohly mít velký význam při autologních transplantacích, kdy je dárce sám pacient. Případnou léčbu by nekomplikovaly nežádoucí reakce imunitního systému (odmítnutí darovaného materiálu). [43]



Obrázek č. 16 - Kolonie indukovaných pluripotentních kmenových buněk [44]

3.2. Rozdělení dle diferenciačního potenciálu

Rozdělení kmenových buněk dle diferenciačního potenciálu se určuje na základě plasticity. Plasticita udává, jak je schopna se přeměnit na buňku specializovanou, dále jak velký rozsah přeměny je tzn. jestli se přemění jen na určitou tkáň anebo na více tkání. [45]

3.2.1. Totipotentní kmenové buňky

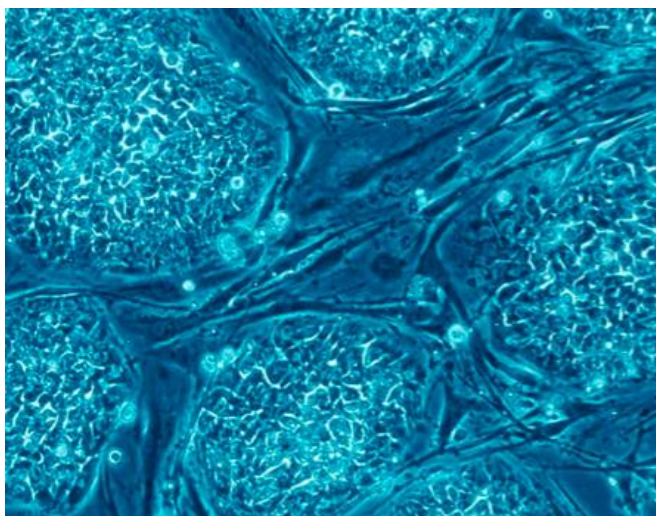
Totipotentní buňky mají schopnost vytvořit jakýkoliv typ buněk, které se v organismu člověka vyskytují. Mají tzv. totální potenciál tzn. že se diferencují do jakékoliv buňky.

Vznikají splynutím vajíčka se spermií a vzniká oplodněné vajíčko. Jsou schopné vytvořit nového jedince, embryoblast i trofoblast, z kterého pak vzniká placenta a plodové obaly. Každá totipotentní buňka má vlastní kompletní genetickou výbavu celého organismu.

Z jedné totipotentní buňky, zygoty, vzniká úplně nový organismus. V embryu jsou přítomny do stádia moruly. [35]

3.2.2. Pluripotentní kmenové buňky

Pluripotentní kmenové buňky jsou rané buňky ve stadiu blastocysty (embryonální kmenové buňky) a schopné široké diferenciaci buněk všech zárodečných listů, ale ne spontánně do všech tkání nebo do totipotentní buňky. Nalezneme je ve tkáních novorozence (placenta, pupečnicková krev) ale hlavně v embryích. V dospělých tkáních je jich velmi málo. [35]



Obrázek č. 17 - Kolonie lidských embryonálních kmenových buněk [46]

3.2.3. Multipotentní kmenové buňky

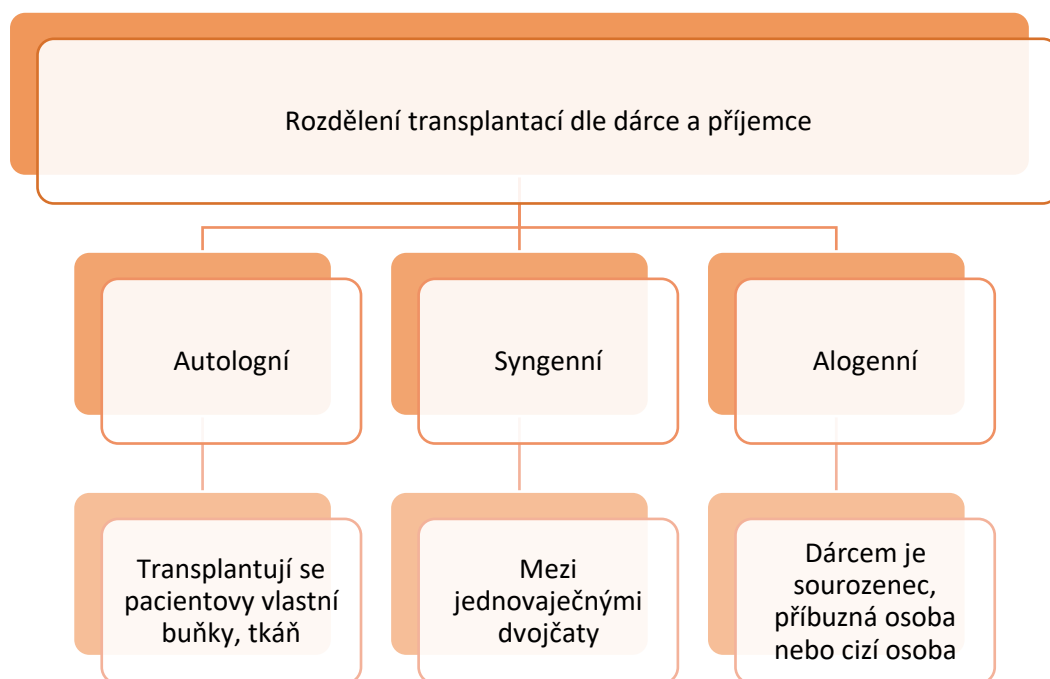
Multipotentní kmenová buňka má na rozdíl od pluripotentní omezenou schopnost přeměny na specializované buňky. Dokáže vytvářet jen některé buňky a tkáně v těle. Může se diferenciovat v rámci jednoho orgánu nebo tkáně, ve kterém je (= tkáňové specifické kmenové buňky).

V roce 2011 vědci objevili jako silný zdroj MSC menstruační krev. Většina MSC z menstruační krve má schopnost se diferenciovat na svalové buňky. Nedávno se dokonce zjistilo, že je lze použít i k „opravě“ mozku. In vitro se totiž mohou diferenciovat na neurony. Tato informace vzbuzuje naději terapie mozkové mrtvice. [47]

4. Transplantace kmenových buněk z pupečnickové krve

Transplantace je obecně přenos orgánu, tkáně nebo buněk z jednoho těla do druhého, popřípadě z určitého místa těla na jiné. Cílem transplantace je obnovení nebo nahrazení nefunkčního orgánu nebo tkáně.

Transplantace můžeme rozdělit na autologní, syngenní nebo alogenní. Při autologní transplantaci se odebraný biologický materiál vpravuje do těla samotného dárce. Při syngenní transplantaci je příjemcem jednovaječné dvojče a u alogenní transplantace může být příjemcem kdokoliv, kdo se shoduje s HLA systémem a dalšími faktory.



Obrázek č. 18 - Rozdělení transplantací dle dárce a příjemce

Při alogenních transplantacích se nejprve hledá dárce mezi sourozenci, u kterých je 25% šance, že dárce a příjemce budou kompatibilní a mají i lepší prognózu.

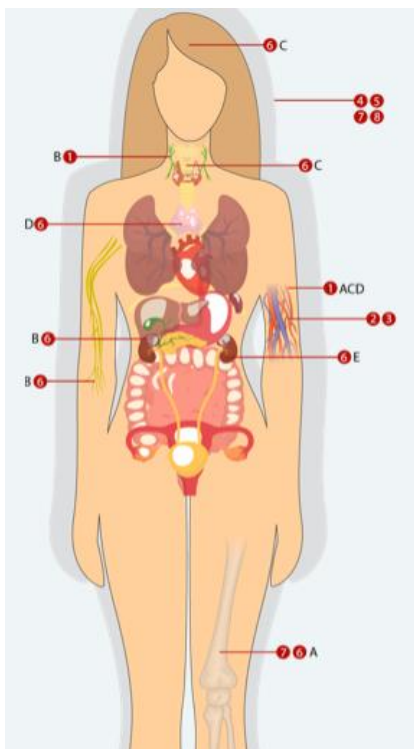
Autologní transplantace nelze využít u chorob, které má pacient dědičné, respektive již zakódované ve svých buňkách. Jimi lze léčit pouze tehdy, když pacient onemocnění získá až po narození a není tudíž nemoc v kmenových buňkách. Alogenní transplantace má v některých případech větší potenciál.

4.1. Historie transplantace pupečníkové krve

První krevní banka, ve které se uchovávala pupečníková krev, byla vybudována na univerzitě v Indianě. V roce 2013 uběhlo 25 let od první transplantace pupečníkové krve. Tehdy doktorka Gluckman transplantovala kmenové buňky chlapčovi, který trpěl Fanconihou anémií. Dárcem byla tehdy jeho mladší sestřička. V roce 2005 bylo po celém světě provedeno více jak 6000 transplantací buněk z pupečníkové krve. [48]

4.2. Obecné využití kmenových buněk z pupečníkové krve

Kmenové buňky z pupečníkové krve nejsou v současnosti vázány pouze v oblasti léčby onemocnění krve. Po celém světě probíhá přes 750 klinických studií, jejichž cílem je zjistit jejich léčebné a regenerační schopnosti v rámci různých onemocněních. Pravděpodobnost použití vlastních kmenových buněk je nyní 1:400 a po dvacáté roku života 1:5000. Kromě využití samotné pupečníkové krve se také diskutuje o využití tkáně pupečníku. [35] Mezi onemocnění, při jejichž léčbě lze nějakým způsobem využít kmenové buňky, zařazujeme téměř 100 chorob, například Alzheimerova choroba, autismus, Crohnova choroba, diabetes I. typu, infarkt myokardu, opravy míchy, mozková obrna, HIV atd. [49]



Obrázek č. 19 - Popis, kde mohu být kmenové buňky využity: 1) Maligní onemocnění krve (A – Leukémie, B – Lymfomy, C – Myelomy); 2) Nemaligní získané poruchy krve; 3) Nemaligní poruchy krve vrozené; 4) Poruchy imunity získané; 5) Poruchy imunity vrozené; 6) Onkologická onemocnění, zhoubné solidní nádory (A – Ewingův sarkom, B – Neuroblastom, C – Rabdomyosarkom, D – Thymom, E – Wilmsův tumor); 7) Metabolické poruchy; 8) Nemoc z ozáření [35]

4.2.1. Léčba HIV

Vyléčit pacienta nakaženého HIV virem bylo letos poprvé úspěšné u ženy (předchozí dva byli muži). Ženě byla v roce 2013 diagnostikována akutní virus HIV a v roce 2017 vysoce riziková akutní myeloidní leukémie (AML). Byly ji transplantovány buňky z pupečnickové krve od blízkého dárce s HIV protektivní mutací CCR5 – delta 32/32. Tato mutace blokuje průnik viru HIV.

Do 100. dne po úspěšné transplantaci se zdravotní stav výrazně zlepšil. Nyní je pacientka bez detekovatelných důkazů infekce HIV a klinicky je v pořádku. Žena v roce 2020 ukončila antiretrovirovou léčbu a od té doby žádnou známku návratu smrtícího viru nenese. Pokud se nemoc nevrátí a tento způsob léčby se ukáže být účinný, jednalo by se o zásadní průlom v medicíně. [50]

4.2.2. Mrtvice

V České republice je současně každý šestý člověk postihnut mrtvicí. Vědci v Duke University v Severní Karolíně testují účinky pupečnickové krve na 1000 osobách, které utrpěly ischemickou mrtvicí mezi 18 a 90 lety. Pacienti se zlepšili v motorických funkcích i schopnosti mluvit. [51]

4.3. Odběr pupečnickové krve

Odběr pupečnickové krve lze provést u všech typů porodů a odebírá se z přestřižené pupeční šňůry. Pokud je odběr proveden do jedné minuty po porodu, není vzorek nijak poškozen. Pokud je odběr po delší době, získáme nižší objem a nižší buňkovitost pupečnickové krve. Odběr je bezpečný a bezbolestný a provádí se ve chvíli, kdy je dítě již u matky. [35]

Odběr pupečnickové krve je možný v cca 55 nemocnicích, nicméně na stránkách nemocnic o možnosti odběru není ani zmínka. [35]

4.4. Uchovávání pupečnickové krve

Vzorek se uchovává výhradně pro dítě samotné, popřípadě pro sourozence. Lze jej ale i darovat. Uchovává se v kapalném dusíku při teplotě cca -196°C. [49]

Cena odběru se pohybuje cca 11 900 Kč (odběr tkáně pupečnicku), 20 900 Kč (pupečnicková krev) a 31 900 Kč (tkáň pupečnicku + pupečnicková krev). V tomto však není započítané uchovávání, které se na 30 let úschovy vyšplhá od 51 000 Kč do 105 000 Kč. Tyto konkrétní

ceny se týkají Národního centra pupečnickové krve. Liší se však od jiných firem, které se odběrem zabývají. [49]

5. Současná léčba Beckerovy svalové dystrofie

Beckerova i Duchennova svalová dystrofie je nevléčitelná. Lze však různými léky a zdravotními potřebami vývoj stabilizovat, popřípadě zpomalit.

5.1. Kortikosteroidy

Kortikosteroidy se považují za zlatý standard, který dokáže zpomalit progresi DMD i BMD. Mechanismus účinku není zcela jasný. Například Prednison a Prednisolon mají protizánětlivé účinky, a i když nemají vliv na regeneraci vláken, zvyšují sílu kosterního svalstva. Po době delší než dva roky, byly pozorovány významné příznivé účinky na srdeční funkci a chůzi. Skolióza a respirační dysfunkce měla opožděný nástup. Vykazují nežádoucí účinky, které ovšem nejsou považovány lékaři za klinicky vážné. Patří mezi ně přírůstek hmotnosti, gastrointestinální symptomy, metabolické poruchy nebo osteoporóza. [52]

5.2. Spinraza

V květnu roku 2017 byla v Evropě registrována první specifická léčba pro pacienty trpící spinální svalovou atrofií, Spinraza. (nusinersenum natrium což je antisense oligonukleotid, který zvyšuje podíl zařazení exonu 7 v transkriptech mRNA pro SMN2 (survival motor neuron 2) vazbou na intronic splice silencing site (ISS-N1) nacházející se v intronu 7 pre-mRNA pro SMN2. Vazbou AON (antisense oligonukleotid) vytěsňují sestrňivé faktory, jejichž normální vlastností je sestřih potlačit. Vytěsněním faktorů dojde k retenci exonu 7 v SMN2 mRNA. Proto když je SMN2 mRNA produkována, je translatována do funkčního proteinu SMN celkové (plné) délky. [53] Jinak řečeno pacienti trpící dystrofií postrádají protein „přežití motorických neuronů“ neboli SMN, jenž je nezbytný pro přežití a normální fungování motorických neuronů (nervové buňky z míchy řídící pohyby svalů). SMN protein je tvořen SMN1 a SMN2. Pacienti trpící spinální svalovou atrofií gen SMN1 postrádají. Gen SMN2 mají, ale tento gen většinou produkuje protein SMN krátký a nefunguje tak dobře, jako protein plné délky. Spinraza umožňuje genu SMN2 produkovat protein plné délky a zajistit normální fungování. Tím se nahradí chybějící bílkovina a zmírní se tak příznaky onemocnění. [54], [55]

Spinraza se aplikuje jako injekční roztok, skladuje se v injekčních lahvičkách o objemu 5 ml, který obsahuje nusinersen sodný. Mezi nejčastější nežádoucí účinky patří bolest hlavy, zvracení a bolest zad. [55]

Tuto léčbu poskytuje i Fakultní nemocnice Brno. Cena této léčby je ale vysoce nákladná, jedna dávka se pohybuje okolo dvou milionů korun. Tento lék proplácí pojišťovna za velmi přísných podmínek, které musí pacient splňovat. Nevýhodou tohoto léku je, že se musí aplikovat intrahekálně, tzn. do mozkomíšního moku. V pozdější fázi nemoci dochází ke skoliotickému poškození páteře a aplikace je velmi náročná. Je poté potřeba ji provádět pod CT navigací. Rozhodnutí, zda pacient léčbu podstoupí nebo nikoliv závisí na odborném zhodnocení očekávaných přínosů léčby pro jednotlivého pacienta. U pacientů, kteří trpí hlubokou hypotonií a respiračním selháním při narození nemusí dojít k významnému přínosu z důvodu těžkému deficitu proteinu motorických neuronů pro přežití SMN. [54], [53]

U dětí se během prvního roku podává šestkrát, poté se dávkovací schéma upravuje a lék se podává jednou za čtyři měsíce. [54]

Kromě léčby Spinrazou je v procesu dalších 6 výzkumných programů, které se zabývají vývojem léků, které by mohly být dávkovány perorálně. [54]

5.3. Buněčná terapie

Terapie buňkami byla u pacienta s DMD provedena pomocí lokální intramuskulární injekcí myoblastů, které pocházely od zdravých dárců, nebyly úspěšné. Hlavním důvodem neúspěchu byla nízká schopnost přežití, migrace a odmítnutí transplantovaných buněk imunitním systémem.

Byly však testovány jako alternativní metoda pro kmenové buňky (popsáno detailněji v kapitole 6). [52]

5.4. Genová terapie

Potencionální léčbou pro pacienty s DMD je dodání terapeutického genu do kosterních svalů a myokardu s cílem obnovit dystrofinový protein. Dystrofin je však zakódován příliš velkým genem a „nevešel“ se do rekombinantního adeno-asociovaného viru (rAAV, vektor, který byl vybrán pro dodání genu). Byla ovšem vyvinuta jiná verze zmenšeného dystrofinu, který u pacientů s BMD zlepšuje stav pacienta k mírnějším projevům. Sérotypy rAAV byly různě testovány, aby se zlepšila jejich nosná kapacita a snížily se imunitní reakce. Jako slibné se ukázaly sérotypy rAAV2/AAV8, rAAV6, rAAV9 pro podání mini a mikro dystrofinů nicméně vůči těmto vektorům byly stále velmi časté imunitní reakce. Tuto problematiku vyřešil vektor rAAV2/8, jenž byl testován na myších. [52]

5.5. Utrofinová modulace

Náhrada dystrofinu za utrofin byl jeden z prvních přístupů léčby. [52] Utrofin je strukturními a funkčními vlastnostmi paralog dystrofinu. Je lokalizován v sarkolemě in utero (v děloze) a dystrofin ho postupně nahrazuje. V dospělém věku je lokalizován v myotendinózním a neuromuskulárním spojení. U pacientů s DMD a BMD je přirozeně hladina utrofinu zvýšená v oblastech vláken procházejících opravou v důsledku nepřítomnosti nebo nízké hladiny dystrofinu. Hladina utrofinu se dle studií na myších může zvýšit trojnásobně až čtyřnásobně. I když je utrofin velmi podobný dystrofinu, utrofin vykazuje různé způsoby interakce s aktinem a mikrotubuly. Nemusí však zabránit narušení mřížky mikrotubulů. I přesto zvýšená hladina utrofinu oddaluje nutnost používání invalidního vozíku.

Významná výhoda modulace a exprese utrofinu ve svalech a srdci je, že lze použít pro všechny pacienty s DMD a nezávisí na typu dystrofinové mutace. [56]

5.6. Antisense oligonukleotidy a přeskočení exonu

Antisense oligonukleotidy (AON) délku cca 30 nukleotidů. Cílí na specifické pre – mRNA sekvence, přeskakují specifický exon, který lemují oblast mutace. Vytvoří se tak zkrácený transkript, který překládá funkční dystrofinový protein.

I když byly studie velmi slibné, dosud nebylo dosaženo dostatečného klinického přínosu. Důsledky nejsou přesně známy, ale jsou odhadnuty z důvodu špatného vychytávání tkání a nízké záchrany exprese dystrofinu. Postup terapie je tak závislý na modifikacích v chemii, aby bylo dodání do cílových tkání účinnější a nebyl vylučován ledvinami nebo játry. Nahé AONy nemají schopnost proniknout do srdce nebo přes hematoencefalickou bariéru. Klíčovou výzvou je do budoucna objev nových molekul, které by byly účinné i na srdeční sval a centrální nervový systém. [52]

Nicméně v současné době je využíván AON Spinraza (viz kapitola 5.2.)

6. Využití buněk při léčbě Beckerovy svalové dystrofie

Transplantace kmenových buněk může dle studií zvýšit regenerační schopnost degenerujících svalových buněk jak u Beckerovy tak i Ducheny svalové dystrofie. Jejich účinnost byla zkoumána na několika zvířatech v mnoha studiích. Kmenové buňky lze získat z mnoha zdrojů (například právě pupečnicková krev) a mají i myogenní potenciál. [57]

Zatímco buněčná terapie je dodání buněk nových nebo opravených, genová terapie je obvykle dodání genu (většinou se dodává jako plazmidová DNA), kterým zavádíme normální kopii genu do svalových vláken. Vzhledem k častému odmítnutí buněk od cizích dárců jsou nejvhodnější autologní buňky. [58]

6.1. Využití satelitních buněk

Tkáň svalstva má vysokou kapacitu pro samoopravu akutního poškození za což jsou zodpovědné satelitní buňky (MuSC). Exprimují transkripční faktor PAX7 a pro opravu svalů jsou nezbytné. Transplantované MuSC si také kromě regenerace udržují schopnost osídlit kmenové buňky. Nicméně v současné době je zde několik překážek ve využití MuSC a to například omezená in vivo migrace po uskutečněné transplantaci. [58]

6.2. Využití myoblastů

Studie a pokusy na myších prokázaly, že využití myoblastů získaných in vitro expanzí MuSC mohou lokálně napravit genetický defekt po intramuskulární injekci. Po tomto objevu vědci vynaložili úsilí, aby účinnost transplantace zvýšili. Přežití prekurzorových buněk, rozsah distribuce proteinů, které produkují transplantované myoblasty a vliv prostředí hostitele a jeho imunitní odpověď byly zkoumány na různých zvířatech, a to včetně těch, které velikostí a fyziologií odpovídají co nejvíce fyziologii lidské. Myoblasty jako prekurzorové svalové buňky přežili. Údaje od jednoho takto léčeného pacienta ukázaly, že dystrofín byl indukován ve více než 30 % svalových vlákních. [58]

6.3. Využití mezoangioblastů

Mezoangioblasty, které byly původně izolované z embryonální aorty myšího embrya přispívají k vývoji svalů a považují se za vývojové prekurzory pericytů. Pericyt neboli Routegova buňka, se nachází v centrálním nervovém systému a jsou součástí neurovaskulárního svazku. Mohou

se diferenciovat na svaly, pokud jsou vystaveny podmínkám nízkého séra nebo pokud jsou kultivovány společně s myoblasty.

Plasticita pericytů byla také potvrzena schopností opustit perivaskulární niku a přijmout osud tkáně příjemce. Tyto důkazy jsou tedy považovány za možnost terapeutického použití pro pacienty s DMD. Intravaskulární injekce prokázaly schopnost kolonizovat sval. [59]

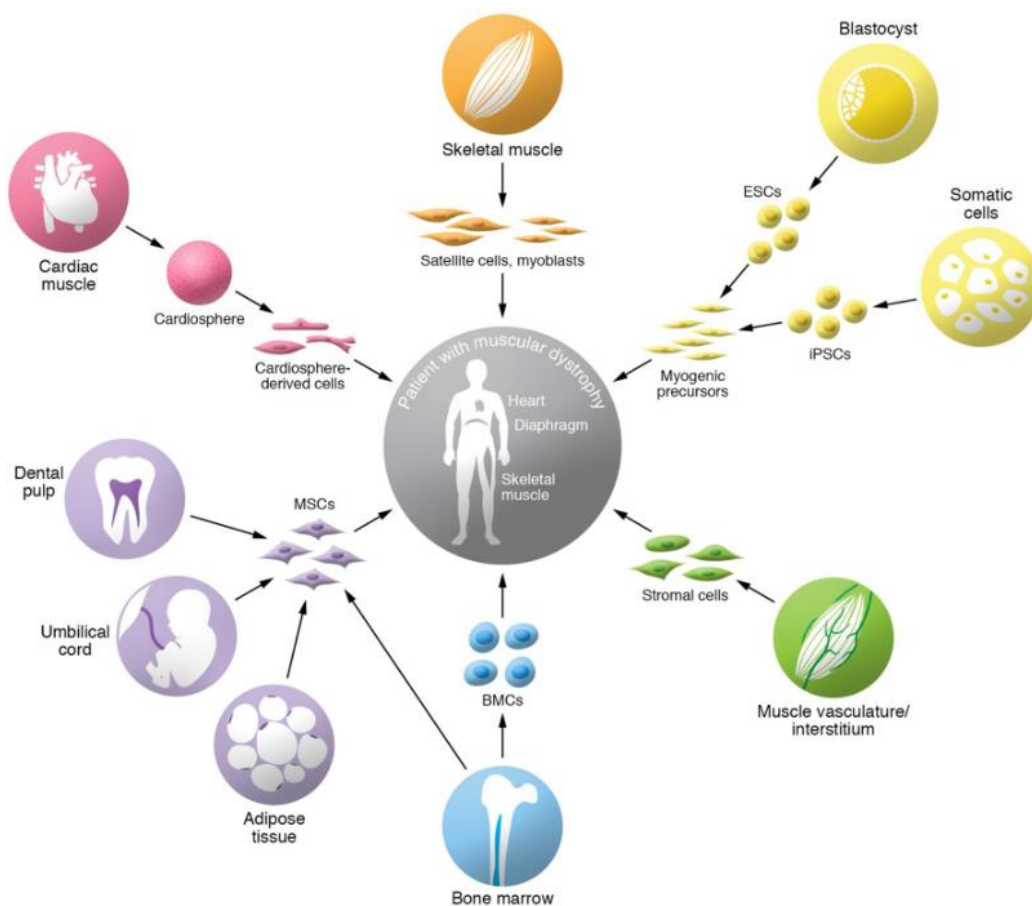
Mezoangioblasty (MAB) jsou významné z hlediska jejich schopnosti diferenciovat se do mezodermálních linií, a to včetně kosterního svalstva, se stal velmi atraktivním pro buněčnou terapii, kterou by bylo možné v této oblasti využít díky propojení linií s krevními cévami a své schopnosti krev odvádět. Stěny cév z oběhu do intersticiální svalové tkáně se nabízí na systémové podání. MAB mají parakrinní účinky a modulují funkci imunitních buněk. U pěti pacientů s DMD byla transplantace MAB provedena. Progrese onemocnění byla u jednoho z pacientů stabilizována více než na dva roky. U druhého pacienta se rozvinula fibrilace síní, což zdůrazňuje nutnost přísné kontroly kardiovaskulárního systému. [58]

Oproti myoblastům vykazují meziangioblasty neočekávanou účinnost, pokud jde o množství produkovaného dystrofinu (40 % u MAB vs. 15 % u myoblastu) a délku membránového proteinu (210 – 240 milimetrů u MAB vs. 40 – 70 milimetrů u myoblastu). [60]

6.4. Účinky intravenózního podání lidského pupečníku

MSC z ikální šňůry (UC – MSC) byly předmětem studií u jednoho dítěte a dvou dospělých mužů s BMD. I když biopsie neprokazovala žádné zlepšení na buněčné úrovni, chůze se u dítěte zlepšila. Dospělí pacienti vykazovaly snížení hodnot kreatininkinázy a zlepšila se plicní ventilace, ovšem svalová síla končetin se po léčbě významně nelišila.

Na obrázku lze vidět přehled typů buněk, které lze využít pro buněčnou terapii svalové dystrofie. [58]



Obrázek č. 20 - Přehled typů buněk pro buněčnou terapii svalových dystrofií – typy progenitorových buněk z kosterního svalstva nebo nesvalových tkání (MSC, iPSC, ESC, BMC – buňky derivované z kostní dřevě) [58]

6.5. Kazuistika

Pro příklad je uveden případ dvacetiletého muže, který trpěl Beckerovou formou svalové dystrofie. Muž podstoupil autologní transplantaci mononukleárních buněk, které byly odebrané z kostní dřevě (BMMNC). Ve věku devíti let byly zpozorovány první klinické obtíže, a to slabost dolních končetin a pády při chůzi. Ve čtrnácti letech se připojily obtíže při chůzi do schodů a další příznaky progresovaly poměrně rychle. Diagnóza se potvrdila na základě vysoké hladiny kreatinfosfokinázy (CPK) v séru. Stěžoval si na velké potíže při vstávání ze židle nebo z podlahy a na nerovnováhu při chůzi. Pacient docházel na fyzioterapie, užíval různé doplňky stravy, ale nebyla zaznamenána žádná pozitivní odpověď na zahájenou terapii.

Na magnetické rezonanci byla prokázána difuzní svalová atrofie a náhrada svalové tkáně za tukovou tkáň. Elektromyografie prokázala krátké trvání akčního potenciálu s nízkou amplitudou. [57]

Pro intramuskulární transplantaci BMMNC byly vybrány svaly dle mMRC (Modifikovaná škála dušnosti Medical Research Council) s nižší hodnotou než 3 (škála od 0 do 4, kdy 4 znamená dušnost i při oblékání) a to například biceps, kvadriceps, břišní svaly atd. [61] Následně byla provedena autologní transplantace BMMNCs. Kostní dřev byla aspirována z pravé kyčle. Buňky byly separovány metodou hustotního gradientu, odebrané životaschopné buňky byly zkontrolovány na CD34+ markery metodou fluorescenčně aktivovaného třídění buněk byly MNC naředěny a injikovány intramuskulárně do motorických bodů. Aby se předešlo zánětlivé reakci, byl ihned podán methylprednisolon v laktátovém roztoku. Po buněčné terapii následovala neurorehabilitace, fyzioterapie (na udržení síly ochablých svalů), ergoterapie (rehabilitace rukou), psychologické poradenství a dietní poradenství. Dieta byla nutná z hlediska vysokého obsahu bílkovin a vlákniny.

Pacient byl následně sledován po následujících devět měsíců. Po třech měsících došlo ke zlepšení hrubé motoriky, snížení tuhosti lýtkových svalů, bylo pozorováno razantní zlepšení držení těla ve stoje i v sedu. Cvičení bylo možné provádět s lehkostí a dle hodnot měřené škálou mMRC – MMT byla progresse onemocnění pozastavena. [57]

7. Závěr

Cílem této práce bylo popsat Beckerovu muskulární dystrofii, diagnostiku a léčbu s důrazem na využití kmenových buněk. Beckerova muskulární dystrofie je choroba s X vázanou dědičností, trpí ji hlavně chlapci a je to benignější forma Duchennovy muskulární dystrofie. Rozdíl mezi těmito chorobami je v množství a funkčnosti dystrofinu. Projevuje se slábnutím kosterních svalů a myokardu.

Díky neustálému rozvoji diagnostických metod se za poslední roky výrazně zvyšuje dostupnost a přesnost diagnostiky, která je nezbytnou podmínkou pro určení přesné formy muskulární dystrofie. I když analýzy proteinů mají stále svůj význam, analytické metody založené na analýze DNA, mohou poskytnout komplexnější pohled na původ nemoci (odhalit, kde je chyba v DNA). Což by hlavně do budoucna, při využití genové terapie bylo jistě výhodné. V současné době je asi nejpoužívanější metodou NGS, díky které lze sekvenovat celý lidský genom velmi rychle a dále metoda MLPA, která je účinná i při detekci mutací u přenašeček. Také se stále využívá svalová biopsie, která slouží jako první průkaz toho, že by se mohlo o dystrofii jednat. Biopsie může odhalit i svalové infekce.

Terapeutické možnosti jsou v současné době soustředěné na metody tzv. advanced therapy, povětšinou genovou nebo buněčnou terapii. I když tyto metody přitahují hodně pozornosti, v současné době nejsou příliš dostupné. Jednou z nejdostupnějších metod je autologní transplantace pupečnickové krve.

Pokud bych uvažovala nad uchováváním pupečnickové krve pouze z důvodu léčby svalové dystrofie, největším faktorem při rozhodování by bylo pohlaví dítěte. V současné době podání pupečnickové krve nemá tak dobré výsledky, i když je pupečnicková krev na MSC bohatá. Dle výsledků (viz kapitola 6.4.) došlo ke zlepšení plicní ventilace a u dítěte se zlepšila chůze. Větší posun v léčebných metodách sice je při použití utrofinové modulace nebo léku Spinraza ale je třeba uvažovat, že cena například tohoto léku je velmi vysoká a na hrazení pojišťovnou bych nespolehala. Vzhledem k tomu, že uchovávání pupečnickové krve lze využít i u jiných chorob, „vyplatí“ se dle mého názoru spíše počítat s touto variantou a v případě, že by buňky z pupečnickové krve neměly využití ani do budoucna pro BMD nebo DMD, lze ji stále použít u sourozence nebo ji darovat a pomoci někomu jinému v případě jiné choroby.

Odběr pupečnickové krve byl poprvé proveden v roce 1988, kdy byly transplantovány kmenové buňky chlapci, který trpěl Fanconiho anémií. Dnes je odběr možný cca v 55 nemocnicích. Zdá

se mi ale alarmující, že rodiče dítěte nejsou běžně od lékařů informováni o této možnosti a na stránkách nemocnic není o odběru ani zmínka. Ceny se pohybují od 11 900 Kč do 31 900 Kč a uchování na 30 let dopředu 105 000 Kč. Skladuje se v kapalném dusíku při teplotě -196°C.

I když efektivita buněčné terapie není v současné době stoprocentní vzhledem k tomu, že získané vzorky pacientů nejsou vždy adekvátní, z přečtených kazuistik bych viděla v tomto ohledu do budoucna velký potenciál. I přesto, že současně není možné svalovou dystrofii jak už Beckerovu formu, tak už Duchennovu formu zcela vyléčit, lze pacientům zmírnit progresi onemocnění a jeho příznaky i o několik let. Obzvlášť u Duchennovy formy získat pár let života navíc a celkem i v kvalitní formě stojí za to, obzvlášť u dítěte.

Závěrem lze říci, že ač BMD i DMD jsou obě nevléčitelné nemoci, v současné době diagnostika (především NGS) velmi pokročila a objevilo se několik slibných metod léčby (Spinraza), které prodlužují plnohodnotný život pacienta. Nicméně jedná se o léčbu finančně velmi náročnou, ale slibující do budoucna další možný rozvoj a s nástupem konkurence zlevnění a zpřístupnění léčby.

SEZNAM LITERATURY

- [1] KLIMEŠ, L., 2005. Slovník cizích slov: nové, rozšířené a upravené vydání. 3. přepracované a rozšířené a doplněné vydání, Praha, Státní pedagogické nakladatelství, s. 864, ISBN: 978-80-7235-446-7.
- [2] HAVLOVÁ, M., KRAUS, J., Progresivní svalová onemocnění [online] [cit. 13.12.2021]. Dostupné z: <https://www.czech-neuro.cz/content/uploads/2018/07/t165.pdf>.
- [3] MAŘÍKOVÁ, T., a kol., 2004. Neurogenetika svalových dystrofií a kongenitálních myopatií. Praha, MAXDORF, s. 323, ISBN 80-7345-015-1.
- [4] BEDNAŘÍK, Josef, prof. MUDr. Svalové dystrofie. Neurologie pro praxi [online]. Brno, Neurologická klinika LF MU a FN v Brně: SOLEN Medical education, 2004, (III.),137-141 [cit. 2022-05-19]. Dostupné z: <https://www.neurologiepropraxi.cz/pdfs/neu/2004/03/03.pdf?fbclid=IwAR3gFyDJ4ISgZPB5ZfGATQBE1DwoqGxcJtUMwlUKvwnhAP6ENbaC6zyzw6w>
- [5] Svalová dystrofie. Symptomy [online]. Brno Syntex: ISSN: 2336-6540, 2009 [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://www.symptomy.cz/nemoc/svalova-dystrofie>
- [6] FLANIGAN KM. Duchenne and Becker muscular dystrophies. Neurol Clin. 2014 Aug;32(3):671-88, viii. Doi: 10.1016/j.ncl.2014.05.002. PMID: 25037084.
- [7] Karyotyp člověka. Genetika - Biologie [online]. 2010 [cit. 2022-02-25]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/karyotyp-cloveka>
- [8] Duchenne and Becker muscular dystrophy. MedlinePlus [online]. 2016 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/condition/duchenne-and-becker-muscular-dystrophy/>
- [9] RANDO, T. A. (2001). The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. Muscle & Nerve, 24(12), 1575–1594.doi:10.1002/mus.1192
- [10] FAIRCLOUGH RJ, WOOD MJ, DAVIES KE. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. Nat Rev Genet. 2013 Jun;14(6):373-8. doi: 10.1038/nrg3460. Epub 2013 Apr 23. PMID: 23609411.

- [11] ŠPINAROVÁ, prof. MUDr. Lenka a MUDr. Hana POLOCZKOVÁ. Je dilatační kardiomyopatie geneticky podmíněné onemocnění?. Kardiologická revue [online]. Brno, I. interní kardiologická klinika LF MU a FN u sv. Anny, 2007, (IV.), 220-221 [cit. 2022-06-19]. ISSN 218–221. Dostupné z: <https://www.kardiologickarevue.cz/casopisy/kardiologicka-revue/2007-4/nobelova-cena-za-fyziologii-a-medicinu-2007-31811/download?hl=cs>
- [12] Beckerova svalová dystrofie (BMD). Asociace muskulárních dystrofií v ČR [online]. Praha: Neurologická klinika 1. LF UK a VFN, 2016 [cit. 2022-05-24]. Dostupné z: <http://www.amd-mdc.cz/nervosvalova-onemocneni/diagnozy-typy-nervosvalovych-onemocneni/56-beckerova-svalova-dystrofie-bmd>
- [13] LAXOVÁ, Dana. Léčebná rehabilitace u Duchenneovy a Beckerovy formy svalové dystrofie. Praha, 2007. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Mgr. Markéta Gerlichová.
- [14] Duchenneova muskulární (svalová) dystrofie – příznaky, příčiny a léčba. Zdravotní magazín a katalog rehabilitací [online]. 2020 [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://www.rehabilitace.info/nemoci/duchenneova-muskularni-svalova-dystrofie-priznaky-priciny-a-lecba/>
- [15] ŠÍPEK, MUDr. Antonín. Genetika – Biologie: Váš zdroj informací o genetice a biologii. In: Genetika – Biologie: Váš zdroj informací o genetice a biologii. [online]. Ústav biologie a lékařské genetiky 1. LF UK a VFN [cit. 2022-06-08]. Dostupné z: <http://www.genetika-biologie.cz/typy-dedicnosti-v-rodokmenu>
- [16] Svalová biopsie – proč a jak se dělá. Rehabilitace.info [online]. 2020, 13.3. [cit. 2022-06-05]. Dostupné z: <https://www.rehabilitace.info/zdravotni/svalova-biopsie-proc-a-jak-se-dela/>
- [17] NEUROGENETICKÁ DIAGNOSTIKA NERVOSVALOVÝCH ONEMOCNĚNÍ. ANZDOC [online]. [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://adoc.pub/neurogeneticka-diagnostika-nervosvalovych-onemocneni.html>

[18] Duchennova muskulární dystrofie. WikiSkripta: projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy, příspěvek UK k výukovým zdrojům sítě lékařských fakult MEFANET [online]. ISSN 1804-6517. Praha, 2020, 6.1. [cit. 2022-05-26]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Duchennova_muskul%C3%A1rn%C3%AD_dystrofie&oldid=434139

[19] CAPITANIO D, MORIGGI M, TORETTA E, BARBACINI P, DE PALMA S, VIGANO A, LOCHMÜLLER H, MUNTONI F, FERLINI A, MORA M, GELFI C. Comparative proteomic analyses of Duchenne muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy muscles: changes contributing to preserve muscle function in Becker muscular dystrophy patients. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020 Apr;11(2):547-563. doi: 10.1002/jcsm.12527. Epub 2020 Jan 28. PMID: 31991054; PMCID: PMC7113522.

[20] OKINAKA S, SUGITA H, MOMOI H, TOYOKURA Y, KUMAGAI H, EBASHI S, et al. Serum creatine phosphokinase and aldolase 53ktivity in neuromuscular disorders. *Trans Am Neurol Assoc*. 1959; 84: 62–64.

[21] VOHÁŇKA, MUDr. Stanislav, CSc., MBA. Zvýšená hladina kreatinkinázy. *Interní medicína pro praxi: Mezioborové přehledy* [online]. Brno, Neurologická klinika LF MU a FN Brno, 2012, (14), 322-326 [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://www.internimedica.cz/pdfs/int/2012/09/07.pdf>

[22] BÖHM, Jitka. Vliv hladin sérového kreatininu stanoveného metodou jaffé a enzymatickou metodou na výpočet GF pomocí korigované kreatininové clearance a rovnice MDRD u neurologických pacientů dospělého věku [online]. Brno, 2010 [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/gcgfx/BOHM_Bakalarska_prace.pdf. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce RNDr. Mária Kubíčková. Dostupné z: https://is.muni.cz/th/gcgfx/BOHM_Bakalarska_prace.pdf. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně. Vedoucí práce RNDr. Mária Kubíčková.

[23] ANFLOUS K, VEKSLER V, MATEO P, SAMSON F, Saks V, VENTURA - CLAPIER R. Mitochondrial creatine kinase isoform expression does not correlate with its mode of action. *Biochem J*. 1997 Feb 15; 322(Pt 1): 73–78.

[24] KHAN FY. Rhabdomyolysis: a review of the literature. *Neth. J. Med*. 2009 Oct; 67(9): 272–283.

- [25] Elektromyografie: Zkušenosti s vyšetřením. Vitalion [online]. Praha: MAFRA. [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://vysetreni.vitalion.cz/elektromyografie/>
- [26] Elektromyografie WikiSkripta: projekt 1. lékařské fakulty a Univerzity Karlovy, příspěvek UK k výukovým zdrojům sítě lékařských fakult MEFANET [online]. 2018 [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://www.wikiskripta.eu/index.php?title=Elektromyografie&oldid=410741>
- [27] BEHJATI S, TARPEY PS. What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed. 2013 Dec;98(6):236-8. doi: 10.1136/archdischild-2013-304340. Epub 2013 Aug 28. PMID: 23986538; PMCID: PMC3841808.
- [28] OKUBO M, MINAMI N, GOTO K, GOTO Y, NOGUCHI S, MITSUHASHI S, NISHINO I. Genetic diagnosis of Duchenne/Becker muscular dystrophy using next-generation sequencing: validation analysis of DMD mutations. J Hum Genet. 2016 Jun;61(6):483-9. doi: 10.1038/jhg.2016.7. Epub 2016 Feb 25. Erratum in: J Hum Genet. 2017 Oct;62(10):931-933. PMID: 26911353; PMCID: PMC4931045.
- [29] VERMA PK, DALAL A, MITTAL B, PHADKE AJ. Utility of MLPA in mutation analysis and carrier detection for Duchenne muscular dystrophy. Indian J Hum Genet. 2012 Jan;18(1):91-4. doi: 10.4103/0971-6866.96667. PMID: 22754229; PMCID: PMC3385188.
- [30] ANNETTE Uwineza, JANVIER Hitayezu, SERAPHINE Murorunkwere, JANVIER Ndinkabandi, CELESTIN Kaputu Kalala Malu, JEAN Hubert Caberg, VINCIANE Dideberg, Vincent Bours, LEON Mutesa, Genetic Diagnosis of Duchenne and Becker Muscular Dystrophy using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification in Rwandan Patients, Journal of Tropical Pediatrics, Volume 60, Issue 2, April 2014, Pages 112–117, <https://doi.org/10.1093/tropej/fmt090>
- [31] ZÁMEČNÍK, Josef. Svalová biopsie [online]. Praha, 2007 [cit. 2022-06-13]. Dostupné z: https://www.lf2.cuni.cz/files/page/files/2016/sval_biopsie_0.pdf. Ústav patologie a molekulární medicíny UK 2. LF a FN v Motole.
- [32] ČEDÍKOVÁ, Miroslava, KRAKOROVÁ, Kristýna, Michaela MIKLÍKOVÁ, Markéta HRONOVÁ, Alžběta BALANDOVÁ, Pavel PITULE a Milena KRÁLÍČKOVÁ, ed. On-line atlas různých typů kmenových buněk a vybraných diferenciačních postupů [online]. Lékařská fakulta v Plzni a Univerzita Karlova v Praze, 2012 [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/On-line_atlas_kmenovych_bunek.pdf

- [33] BOHAČIAKOVÁ, Mgr. Dáša. Co jsou kmenové buňky?. The Niche: Trusted stem cell blog & resources Main Menu [online]. Knoepfler Lab at UC Davis School of Medicine in Sacramento, 2022 [cit. 2022-06-04]. Dostupné z: <https://ipscell.com/co-jsou-kmenove-bunky/>
- [34] SMETANA, Karel, et al. Kmenové buňky. Kontakt, 2010, 12.3: 251-254. [cit. 2022-06-26]. Dostupné z: <https://kont.zsf.jcu.cz/pdfs/knt/2010/03/02.pdf>
- [35] Cord Blood Center Group – Interní materiály [online]. Praha, 2021 [cit. 2022-06-26]. Dostupné z: <https://cordbloodcenter.cz>
- [36] VAZIN T, FREED WJ. Human embryonic stem cells: derivation, culture, and differentiation: a review. Restor Neurol Neurosci. 2010;28(4):589-603. doi: 10.3233/RNN-2010-0543. PMID: 20714081; PMCID: PMC2973558.
- [37] GILBERT, SF. Vývojová biologie. 8. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc. Publisher; 2006
- [38] KLABUSAY M., DVOŘÁK P., MAYER J.: Kmenové buňky: nový příslib v medicíně. Dostupné z: http://www.prolekare.cz/pdf?ida=v1_05_02_13.pdf 3.6.2022
- [39] GOODELL M. A., NGUYEN H., SHROYER N.: Somatic stem cell heterogeneity: diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments, Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015, 16(5): 299–309.
- [40] Myosatelitní buňka. Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2021, 5.10. [cit. 2022-05-15]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Myosatelitn%C3%AD_bu%C5%88ka&oldid=20525678
- [41] Miroslav O.: Nervové buňky a jejich svět, Grada Publishing a.s., 2015, ISBN 978- 80-247-5070-5
- [42] IPS buňky a reprogramace: přeměna jakékoli tělní buňky v buňku kmenovou. EuroStemCell [online]. University of Edinburgh [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://www.eurostemcell.org/ips-bunky-reprogramace>
- [43] MITALIPOV S, WOLF D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming, Advances in biochemical engineering biotechnology, 2009, 114:185-199.

- [44] UCLA Broad Stem Cell Research Center/Plath Lab [online]. In: . 2015 [cit. 2022-06-06]. Dostupné z: <https://www.uclahealth.org/news/scientists-at-ucla-develop-method-to-define-stages-of-stem-cell-reprogramming>
- [45] FILIP S., HRUŠKA I. aj. MOKRÝ Kmenové buňky: biologie, medicína, filozofie. Galén, Praha, 2006, 223s.
- [46] RUSSO E (2005) Follow the Money—The Politics of Embryonic Stem Cell Research. PLOS Biology 3(7): e234. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030234>
- [47] DING DC, shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. Cell Transplant. 2011;20(1):5-14. doi: 10.3727/096368910X. PMID: 21396235.
- [48] KENNETH J. MOISE aj. Umbilical cord stem cells, Obstetrics & Gynecology, 6, 1393-1407, 2005.
- [49] Národní centrum pupečnickové krve. Národní centrum pupečnickové krve [online]. Ostrava: Biotechnologické centrum 4MEDi Areál Fakultní nemocnice Ostrava [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://pupecnikovakrev.cz>
- [50] Národní centrum pupečnickové krve: HIV. Národní centrum pupečnickové krve: HIV [online]. Ostrava: Biotechnologické centrum 4MEDi Areál Fakultní nemocnice Ostrava [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://pupecnikovakrev.cz>
- [51] Národní centrum pupečnickové krve: Mrtvice. Národní centrum pupečnickové krve: Mrtvice [online]. Ostrava: Biotechnologické centrum 4MEDi Areál Fakultní nemocnice Ostrava [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://pupecnikovakrev.cz>
- [52] FALZARANO MS, SCOTTON C, PASSARELLI C, FERLINI A. Duchenne Muscular Dystrophy: From Diagnosis to Therapy. Molecules. 2015 Oct 7;20(10):18168-84. doi: 10.3390/molecules201018168. PMID: 26457695; PMCID: PMC6332113.
- [53] European Medicines Agency: Spinraza. 13. Netherlands: Biogen Netherlands B.V., 2017.

[54] HAVLÍN, MUDr. Ondřej, MUDr. Zdenka BÁLINTOVÁ, MUDr. Lenka MRÁZOVÁ a doc. MUDr. Hana OŠLEJŠKOVÁ. Spinraza – první specifická terapie pro pacienty se spinální svalovou atrofií [online]. Fakultní nemocnice Brno, 2017 [cit. 2022-06-19]. Dostupné z: <https://www.fnbrno.cz/spinraza-prvni-specificka-terapie-pro-pacienty-se-spinalni-svalovou-atrofii/t6311>

[55] Summary of Product Characteristics - Spinraza: Státní ústav pro kontrolu léčiv. In: .Praha: Biogen, 2017, ročník 2017, číslo 1.

[56] GUIRAUD S, SQUIRE SE, EDWARDS B, CHEN H, BURNS DT, SHAH N, BABBS A, DAVIES SG, WYNNE GM, RUSSELL AJ, ELSEY D, WILSON FX, TINSLEY JM, DAVIES KE. Second-generation compound for the modulation of utrophin in the therapy of DMD. *Hum Mol Genet.* 2015 Aug 1;24(15):4212-24. doi: 10.1093/hmg/ddv154. Epub 2015 May 1. PMID: 25935002; PMCID: PMC4492389.

[57] SHARMA A, SANE H, GOKULCHANDRA N, SHARAN R, PARANJAPE A, KULKAMI P, YADAY J, BADHE P. Effect of Cellular Therapy in Progression of Becker's Muscular Dystrophy: A Case Study. *Eur J Transl Myol.* 2016 Mar 31;26(1):5522. doi: 10.4081/ejtm.2016.5522. PMID: 27054018; PMCID: PMC4821220.

[58] BIRESSI S, FILARETO A, RANDO TA. Stem cell therapy for muscular dystrophies. *J Clin Invest.* 2020 Nov 2;130(11):5652-5664. doi: 10.1172/JCI142031. PMID: 32946430; PMCID: PMC7598050.

[59] SUN C, SERRA C, LEE G, WAGNER KR. Stem cell-based therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Exp Neurol.* 2020 Jan; 323: 113086. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.113086. Epub 2019 Oct 19. PMID: 31639376; PMCID: PMC6899334.

[60] SERENA E, ZATTI S, ZOSO A, LO Verso F, TEDESCO FS, COSSU G, ELVASSORE N. Skeletal Muscle Differentiation on a Chip Shows Human Donor Mesoangioblasts' Efficiency in Restoring Dystrophin in a Duchenne Muscular Dystrophy Model. *Stem Cells Transl Med.* 2016 Dec;5(12):1676-1683. doi: 10.5966/sctm.2015-0053. Epub 2016 Aug 8. PMID: 27502519; PMCID: PMC5189642.

[61] Pocket guide to COPD, Diagnosis, management, and prevention. A guide for health care professionals. Global initiative for chronic obstructive lung disease, 2020. Dostupné na: <https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2019/11/GOLD-Pocket-Guide-2020-final-wms.pdf>