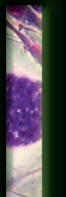
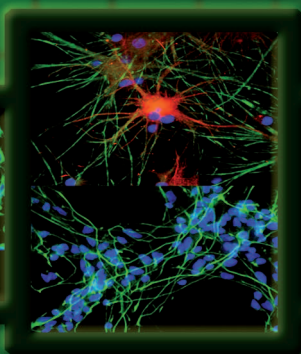
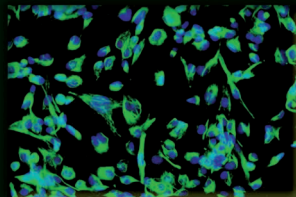
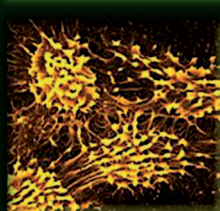
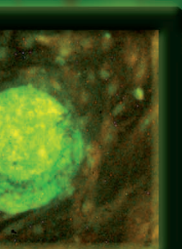




INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

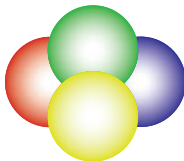
# Kmenové buňky

## využití ve výzkumu a klinické praxi



**Zuzana Koledová**  
**Vladimír Divoký**  
**Monika Horváthová**  
**Ivana Fellnerová**

Milý čtenáři,  
publikace, kterou držíte v ruce je součástí olomouckého cyklu vzdělávacích materiálů vydávaných k projektu *Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe*. Projekt je spolufinancován Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky.



## Od fyziologie k medicíně

– integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe

CZ.1.07/2.3.00/09.0219  
<http://cit.vfu.cz/fyziolmed>



**Trvání projektu:**

červen 2009 – květen 2012

**Řešitelská pracoviště:**

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno  
Univerzita Palackého v Olomouci

**Cíl projektu:**

Umožnit nadstandardní vzdělávání v oblasti fyziologie a biomedicínských aplikací.



# Projektová etapa 2011 region OLOMOUC



## 1. Téma

### Kmenové buňky: využití ve výzkumu a klinické praxi

Mgr. Zuzana Koledová, Ph.D. • [zkoledova@picr.man.ac.uk](mailto:zkoledova@picr.man.ac.uk)

Doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D. • [divoky@lf.upol.cz](mailto:divoky@lf.upol.cz)

Mgr. Monika Horváthová, Ph.D. • [priwitzer@seznam.cz](mailto:priwitzer@seznam.cz)

RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D. • [fellneri@hotmail.com](mailto:fellneri@hotmail.com)

#### **Na přípravě materiálů a realizaci semináře dále spolupracovali:**

MVDr. Dalibor Doležal • [dalibor.dolezal@upol.cz](mailto:dalibor.dolezal@upol.cz)

Ing. Lucie Piterková, Ph.D. • [lucie.piterkova@upol.cz](mailto:lucie.piterkova@upol.cz)

#### **Místo konání semináře:**

Ústav biologie LF UPOL

Centrum pro práci s laboratorními zvířaty LF UPOL

Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Hněvotínská 3

775 15 Olomouc

<http://biologie.upol.cz/>

#### **Termíny konání semináře:**

18. února 2011

25. února 2011

26. února 2011

27. února 2011

Autor designu obálky a grafických úprav:

Vlastislav BIČ, Katedra zoologie, PřF UP Olomouc

Na obálce byly použity ilustrační obrázky z webové galerie

[http://www.stemcellresources.org/library\\_images.html](http://www.stemcellresources.org/library_images.html)

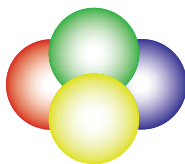
## OBSAH:

1. ÚVOD .....	5
1.1. Projekt od fyziologie k medicíně – obecné informace .....	6
1.2. Projektové diskusní semináře .....	7
1.3. Ohlédnutí za semináři v regionu Brno: jaro 2010 .....	8
1.4. Diskusní semináře v regionu Olomouc 2011 .....	11
2. TEORETICKÁ ČÁST .....	13
2.1. Kmenové buňky - úvod .....	14
2.2. Vlastnosti kmenových buněk.....	15
2.2.1. Regulace pluri(multi)potence .....	16
2.2.2. Regulace buněčného cyklu .....	17
2.2.3. Odpověď na poškození DNA - G1 kontrolní bod .....	20
2.3. Kultivace kmenových buněk.....	22
2.4. Typy kmenových buněk .....	22
2.4.1. Kmenové buňky pocházející z embrya .....	23
2.4.2. Tkáňové kmenové buňky .....	23
2.4.3. Nádorové kmenové buňky .....	25
2.5. Uměle vytvořené kmenové buňky .....	26
2.6. Využití kmenových buněk v medicíně .....	26
2.7. Genové modifikace myších embryonálních kmenových buněk – tvorba modelů lidských chorob .....	27
2.7.1. Cílená mutagenese homologní rekombinací v embryonálních kmenových buňkách .....	28
2.7.2. Tvorba myších modelů z geneticky modifikovaných embryonálních kmenových buněk .....	29
2.7.3. In vitro diferenciacie embryonálních kmenových buněk.....	33
3. PRAKTICKÁ ČÁST .....	35
3.1. Kmenové buňky krvetvorby: kultivace a pozorování.....	36
3.1.1. Úvod do kultivace buněk in vitro: buněčné kultury .....	36
3.1.2. Co obsahují kultivační média? .....	36
3.1.3. Jak vypadá laboratoř buněčných kultur? .....	36
3.1.4. Hodnocení kvality štěpu pro transplantaci .....	38
3.2. Práce s laboratorními zvířaty: myší modely.....	40
3.2.1. Oprávnění k práci s geneticky modifikovanými laboratorními zvířaty....	40
3.2.2. Zásady práce v Centru pro práci s laboratorními zvířaty .....	41
3.2.3. Praktická ukázka práce v Centru pro práci s laboratorními zvířaty .....	42
4. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA.....	47

# 1. téma

## KMENOVÉ BUŇKY

### Využití ve výzkumu a klinické praxi



# 1. ÚVOD

Projekt od fyziologie k medicíně – obecné informace  
Projektové diskusní semináře  
Ohlédnutí za semináři v regionu Brno: jaro 2010  
Diskusní semináře v regionu Olomouc 2011

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ  
Integrace vědy výzkumu odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## 1.1. Projekt Od fyziologie k medicíně

Projekt Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu, vzdělání a praxe je vzdělávací projekt, jehož cílem je nadstandardní vzdělávání v oblasti fyziologie a biomedicínských aplikací (<http://cit.vfu.cz/fyziolmed/>). Vzdělávání je vedeno jak v rovině teoretické (prezentace aktuálních poznatků v kontextu vzájemných souvislostí), tak v rovině praktické (experimentální praxe, metody efektivního zpracování dat, aplikace výsledků výzkumu, exkurze).

### PRO KOHO je projekt určen?

- 1) **Akademické pracovníky VŠ** (školitele VŠ studentů na úrovni Bc., Mgr. a Ph.D.)
  - 2) **Studenty VŠ** (Bc., Mgr. a Ph.D.)
  - 3) **Studenty a pedagogy SŠ** (s hlubším zájmem o fyziologii a medicínu)
- Podmínkou účasti v projektu byla registrace prostřednictvím projektových webových stránek. (registrace byla uzavřena 31.12.2010)

### CO projekt nabízí?

- 1) Odborné vzdělávání formou **diskusních seminářů (viz dále)** se zaměřením na aktuální fyziologicko-lékařskou problematiku a témata oceněná Nobelovými cenami za Fyziologii a medicínu
- 2) **Exkurze** na pracoviště vědy a výzkumu, **aktivní zapojení do experimentů**
- 3) Získání zkušeností s **atraktivní prezentací vlastních výsledků na odborných akcích** (konferencích)
- 4) Seznámení s možnostmi **mezinárodních kontaktů a uplatnění na světovém vědecko-výzkumném fóru**
- 5) Tištěné a interaktivní **publikace** k jednotlivým seminářům



### OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ Časový harmonogram projektu

**2009**

Organizační start projektu, příprava seminářů  
nábor účastníků do brněnského cyklu seminářů

**2010**

**Brno**

**1 2 3 4 5 6 7**

Cyklus seminářů v regionu Brno  
nábor účastníků pro olomoucký cyklus seminářů

**2011**

**Olomouc**

**1 2 3 4 5 6 7**

Cyklus seminářů v regionu Olomouc

**2012**

Závěrečná konference brněnské i olomoucké skupiny registrovaných; závěr a obhajoba projektu

## 1.2. Projektové diskusní semináře

Jednotlivé semináře probíhají v neformální přátelské atmosféře. Skládají se z **části teoretické** a navazující **části praktické**, kdy mají účastníci možnost uplatnit získané teoretické poznatky přímo v praxi.

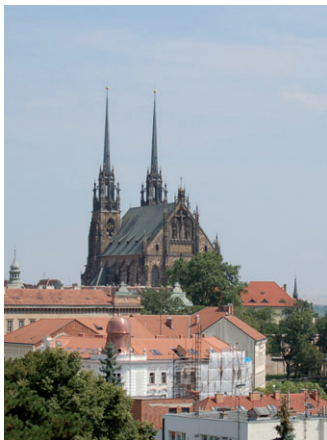
Během seminářů jsou uplatňovány následující principy:

- **Atraktivní přístup:** Pro zvýšení motivace a posílení zájmu cílové skupiny je důležité prezentovat poznatky přehlednou, jednoduchou a atraktivní formou. Pokud je první kontakt s odbornými informacemi realizován stroze a nepřiměřeně odbornou úrovní a zkušenostem studentů, může snadno odradit.
- **Komplexní přístup:** Důraz je kladen na propojení znalostí a dynamickou orientaci ve velkém množství informací v jednotlivých biologických oborech.
- **Aktivní přístup:** Účastníci mají možnost se v rámci seminářů aktivně zapojit do průběhu experimentů, zpracování dat a jejich vyhodnocování. Zároveň se dostanou na atraktivní pracoviště biomedicínského zaměření.
- **Individuální přístup:** Jednotlivé semináře jsou realizovány pro malé skupiny účastníků. To umožňuje zohlednit úroveň vědomostí, individuálních schopností popř. specifického zájmu jednotlivých účastníků semináře.
- **Mezinárodní přístup:** Úspěchy ve výzkumu, vzdělávání i lékařské praxi jsou podmíněny zkušenostmi a spoluprací na mezinárodní úrovni. Proto jsou během seminářů využívány aktuální poznatky a odborné materiály ze zahraničních zdrojů. Jeden ze seminářů proběhne přímo na zahraničním vědecko-výzkumném pracovišti.

*První etapa seminářů již úspěšně proběhla v regionu Brno v průběhu roku 2010.*



### Brněnský cyklus seminářů



## Brno

**únor - prosinec 2010**

#### **ŘEŠITELSKÝ TÝM:**

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno  
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR  
Externí odborníci

#### **Semináře (realizovány):**

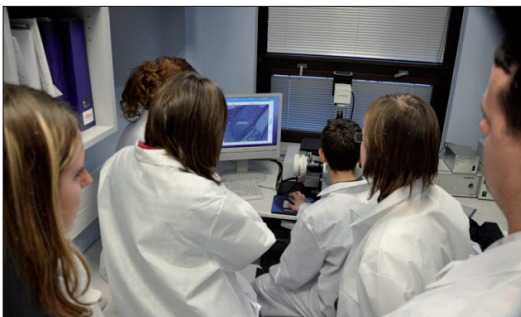
1. Věda na úrovni Nobelových cen
2. Aktuální výzkum kmenových buněk
3. Prezentace vlastního výzkumu
4. Možnosti mezinárodního uplatnění
5. Laboratorní diagnostika
6. Moderní medicína na začátku 21. století
7. Klinická fyziologie koní



## 1.3. Ohlédnutí za semináři v regionu Brno: jaro 2010

### 1. seminář (únor 2010) Věda na úrovni Nobelových cen:

Titul doprovodné publikace (1a); Práce s laserovou mikrodisekcí (1b); Manipulace s kuřečcími embryi (1c)

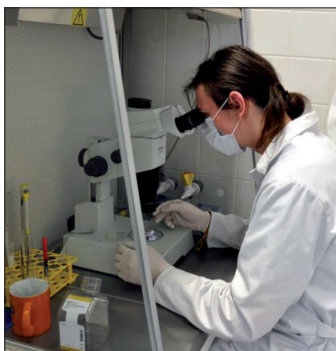
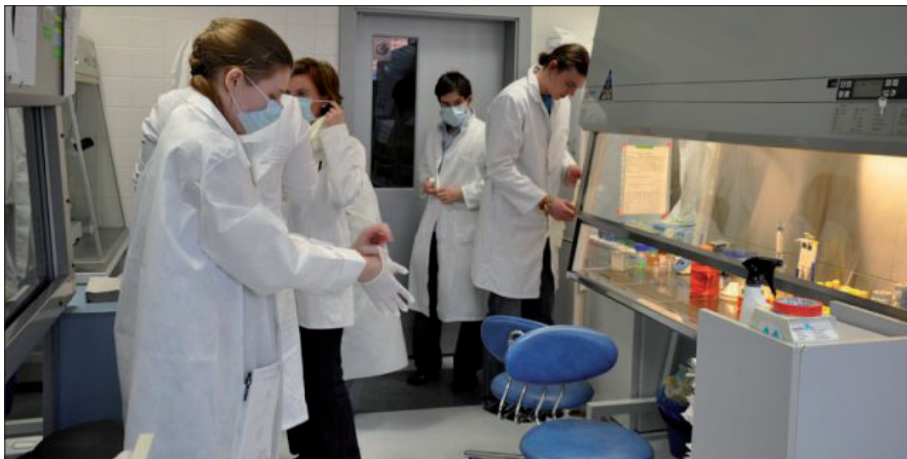


### 2. seminář (březen 2010) Aktuální výzkum kmenových buněk: ze zkumavky k terapeutickému využití.

Titul doprovodné publikace (2a); Seminář na téma úspěchy regenerativní medicíny (2b)



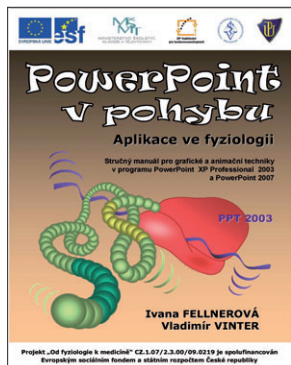
**2. seminář (březen 2010) Aktuální výzkum kmenových buněk: ze zkumavky k terapeutickému využití.** Příprava na práci ve sterilních podmínkách laminárního boxu (2c); Odebírání vzorků během kultivace kmenových buněk (2d); Práce ve sterilním laminárním boxu (2e)



**3. seminář (duben 2010) Prezentace vlastního výzkumu a výzkum funkčních plánů organismu:** Titul doprovodné publikace (3a); Izolace DNA ze vzorku krve (3b)



**3. seminář (duben 2010) Prezentace vlastního výzkumu a výzkum funkčních plánů organismu:**  
Titul doprovodné publikace (3c); Seminář o zásadách manipulace s laboratorními zvířaty (3d)



**4. seminář (květen 2010) Mezinárodní možnosti:**  
Titul doprovodné publikace (4a); Odběr ejakulátu na Univerzitě veterinární medicíny ve Vídni (4b)



**Reprodukce koní na Univerzitě veterinární medicíny ve Vídni (4c)**



## 1.4. Diskusní semináře v regionu Olomouc 2011

V návaznosti na první cyklus projektových seminářů realizovaných v roce 2010 v regionu Brno, probíhá **druhý cyklus seminářů v regionu Olomouc** (únor-prosinec 2011). Podobně jako v brněnské etapě, proběhnou olomoucké semináře ve dvou cyklech: **jarním** (4 semináře) a **podzimním** (3 semináře).

Olomoucké semináře jsou zaštiťovány odborníky z Přírodovědecké a Lékařské fakulty Univerzity Palackého, ve spolupráci s řadou externích spolupracovníků (vědci, lékaři, pedagogové i pracovníci biomedicínských institucí a provozů).

Trendy pro výběr témat projektových seminářů pro rok 2011 v regionu Olomouc:

- Fyziologicko-medicínská problematika, bezprostředně se dotýkající každého z nás (fyziologie a patofyziologie v návaznosti na civilizačních onemocnění)
- Celosvětově významná témata oceňovaná Nobelovými cenami
- Oblasti aktuálního výzkumu a aplikací poznatků do praxe
- Možnosti exkurzí na atraktivní výzkumná pracoviště; aktivní individuální zapojení se do experimentů a diagnostických metod

Pro olomoucký region jsou kromě zahraniční exkurze připravovány semináře zaměřené např. na následující témata: Kmenové buňky-využití ve výzkumu a klinické praxi, Urgentní medicína a laická resuscitace, Imunologie a imunomodulační léčba, Reprodukční medicína, Hematoonkologie, Metabolický syndrom, Kardiofyziologie a patologie oběhového systému, popř. další.

Registrovaní účastníci projektu si mohou vybrat vždy jeden ze 2-4 termínů konkrétního semináře v daném měsíci. Zápis na vybraný seminární termín účastníci potvrzují prostřednictvím projektových webových stránek vždy v předstihu 3-4 týdnů (<http://cit.vfu.cz/fyziolmed/>)



### Olomoucký cyklus seminářů



## Olomouc

### únor - prosinec 2011

#### ŘEŠITELSKÝ TÝM:

Univerzita Palackého v Olomouci  
Externí odborníci

#### Semináře (realizovány):

1. Kmenové buňky (výzkum a klinická praxe)
2. Urgentní medicína a laická resuscitace
3. Imunologie a imunomodulační léčba
4. v přípravě
5. v přípravě
6. v přípravě
7. v přípravě

Časový harmonogram jarního a podzimního cyklu seminářů v regionu Olomouc v roce 2011.

## OLOMOUC

# JARNÍ CYKLUS 2011



**2011**

<b>Leden</b>	Registrace do <b>ÚNOROVÉHO</b> semináře (výběr ze 3-4 termínů)	
<b>Únor</b>	Registrace do <b>BŘEZNOVÉHO</b> semináře (výběr ze 3-4 termínů)	Absolvování <b>ÚNOROVÉHO</b> semináře
<b>Březen</b>	Registrace do <b>DUBNOVÉHO</b> semináře (výběr ze 2-4 termínů)	Absolvování <b>BŘEZNOVÉHO</b> semináře
<b>Duben</b>	Registrace na zahraniční exkurzi (jen jeden termín)	Absolvování <b>DUBNOVÉHO</b> semináře
<b>Květen</b>		Společná zahraniční exkurze

**Červen – září:** Projektové prázdniny

## OLOMOUC

# PODZIMNÍ CYKLUS 2011



**2011**

<b>Září</b>	Registrace do <b>ŘÍJNOVÉHO</b> semináře (výběr ze 3-4 termínů)	
<b>Říjen</b>	Reg. do <b>LISTOPADOVÉHO</b> semináře (výběr ze 3-4 termínů)	Absolvování <b>ŘÍJNOVÉHO</b> semináře
<b>Listopad</b>	Reg. do <b>PROSINCOVÉHO</b> semináře (výběr ze 3-4 termínů)	Absolvování <b>LISTOPADOVÉHO</b> semináře
<b>Prosinec</b>		Absolvování <b>PROSINCOVÉHO</b> semináře

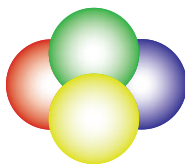
## Jaro 2012

Společná závěrečná konference všech účastníků projektu (brněnské i olomoucké skupiny registrovaných)

# 1. téma

## KMENOVÉ BUŇKY

### Využití ve výzkumu a klinické praxi



## 2. TEORETICKÁ ČÁST

Kmenové buňky - úvod  
Vlastnosti kmenových buněk  
Kultivace kmenových buněk  
Typy kmenových buněk  
Uměle vytvořené kmenové buňky  
Využití kmenových buněk v medicíně  
Genové modifikace myších embryonálních kmenových buněk  
– tvorba myších modelů lidských chorob

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ  
Integrace vědy výzkumu odborného vzdělávání a praxe

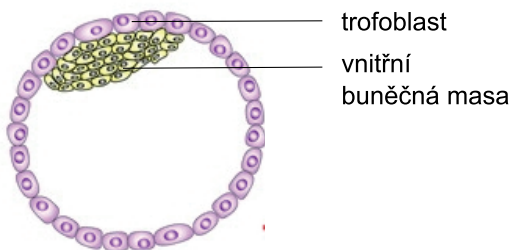


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## 2.1. Kmenové buňky - úvod

Organismus se skládá z velkého množství různých typů buněk, z nichž každá má svou speciální funkci a je na ni optimálně přizpůsobena. Funkce a přibližná lokalizace mnoha typů buněk je více-méně všeobecně známá. Nervové buňky (neurony) se nacházejí v mozku a díky nim myslíme a vnímáme, červené krvinky kolují v našich cévách a přenášejí kyslík... V posledních letech se v médiích objevuje stále více zpráv o kmenových buňkách – ať už jejich využití při léčbě různých onemocnění nebo o etických problémech spojených především s použitím lidských embryonálních kmenových buněk. Ale víte opravdu, co je *kmenová buňka*, kde se vyskytuje, jaké má vlastnosti, jaká je její funkce?

*Kmenové buňky* mají velmi specifickou a zásadní funkci v organismu – produkovat nové buňky. Jsou studnicí, z níž pocházejí všechny buňky. V dospělosti máme vícero typů kmenových buněk, tzv. tkáňových kmenových buněk, které jsou schopny tvořit různé typy buněk určité tkáně. Např. nervové kmenové buňky produkují neurony, ale i další typy nervových buněk, jako jsou oligodendrocyty a astrocyty a kmenové buňky kostní dřevě tvoří červené krvinky jako i všechny typy bílých krvinek a pocházejí z nich i krevní destičky. Další typ kmenových buněk, mezenchymové<sup>1</sup> kmenové buňky, tvoří buňky kostí a chrupavek a svalové kmenové buňky vytvářejí, jak jinak, buňky svalů. Tak má každý typ tkáně své vlastní kmenové buňky (tkáňové kmenové buňky), které jsou zásobárnou všech typů buněk na jeho růst a obnovu (regeneraci), ale nejsou schopny tvořit buňky jiného typu tkáně, a proto se označují jako *multipotentní* (multi = více).



Obr. 1 - Blastocysta

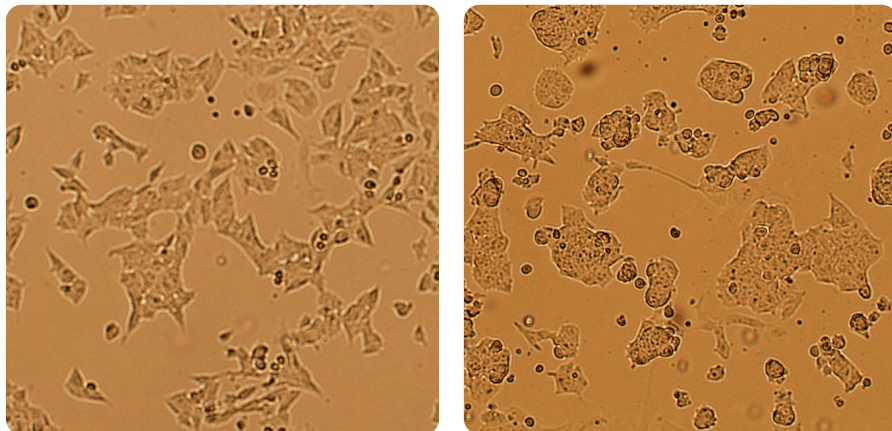
Všechny tkáňové kmenové buňky (i ostatní, somatické buňky) mají společný původ v kmenových buňkách embrya a z něj odvozených embryonálních kmenových buňkách<sup>2</sup>. Embryonální kmenové buňky vznikají z oplodněného vajíčka (zygoty) po rozlišení obalových buněk (trofoblastu) od buněk, z nichž vznikne embryo (vnitřní buněčná masa) ve stádiu blastocysty (*obr. 1*). Embryonální kmenové buňky vytvoří úplně všechny typy buněk dospělého organismu a tato jejich schopnost se nazývá pluripotence (pluri = hodně,

<sup>1</sup> Mezenchym = pojivová tkáň řídkého, houbovitého složení

<sup>2</sup> Název *embryonální kmenové buňky* se, v užším významu slova a ve vědeckých kruzích, používá pro buňky odvozené z embryí, tedy buňky, které pěstujeme v kultuře v laboratoři. Předpokládá se, že v důsledku této kultivace v umělých podmínkách se embryonální kmenové buňky v kultuře do jisté (malé) míry liší od skutečných buněk embrya. Avšak pro naše účely tyto malé rozdíly nebudou podstatné a budeme výraz „embryonální kmenové buňky“ volně používat jak pro buňky v kultuře, tak pro buňky v embryu.

více). Avšak chybí jim schopnost vytvářet buňky trofoblastu, od kterého se v blastocystě odlišily. A protože trofoblast je základem pro placentu, nezbytnou pro vývoj plodu savců, embryonální kmenové buňky samy o sobě nového jedince vytvořit nedokáží. Tuto schopnost má jediné zygota, která je *totipotentní* (toti = všechno).

Embryonální kmenové buňky byly poprvé odvozeny z myši v roce 1981, a to nezávisle na sobě dvěma skupinami (Evansem<sup>3</sup> s Kaufmannem<sup>4</sup> a Martinovou<sup>5</sup>). Lidské embryonální kmenové buňky byly poprvé derivovány o 17 let později, v roce 1998, skupinou Jamese Thomsona.<sup>6</sup> Do dnešní doby bylo odvozeno mnoho linií myších (*obr. 2*) i lidských embryonálních kmenových buněk a podařilo se izolovat embryonální kmenové buňky i z jiných savců, např. potkana a makaka.



*Obr. 2 - Kolonie dvou různých linií myších embryonálních kmenových buněk*

## 2.2. Vlastnosti kmenových buněk

S jednou ze základních vlastností kmenových buněk jsme se již seznámili - je to schopnost tvořit vícero různých typů buněk (multipotence a pluripotence). Tento proces, kterým vzniká z buňky (méně specializované) buňka jiného typu (více specializovaná na určitou funkci), se nazývá diferenciací a je obvykle nevratný. Naopak proces, který zajišťuje zachování původních vlastností kmenové buňky i v dceřiných buňkách, které z ní vzniknou, se nazývá sebeobnova. Dělení, při kterém z kmenové buňky vznikají dvě nové kmenové buňky stejných vlastností jako mateřská buňka, nazýváme symetrickým.

<sup>3</sup> Sir Martin John Evans (\*1941), University of Cambridge, Velká Británie

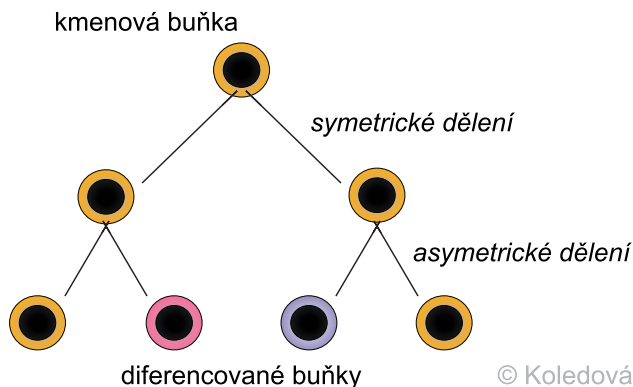
<sup>4</sup> Matthew H. Kaufman (\*1942), University of Cambridge, Velká Británie

<sup>5</sup> Gail R. Martin, University of California, San Francisco, USA

<sup>6</sup> James Alexander Thomson (\*1958), University of Wisconsin–Madison, USA



Dělení, při kterém z kmenové buňky vzniká jedna (více) diferencovaná buňka a jedna nová kmenová buňka, je označováno jako asymetrické (*obr. 3*).



© Koledová

Obr. 3 - Symetrické a asymetrické dělení kmenových buněk

Další důležitou vlastností kmenových buněk je *schopnost velkého počtu dělení* (teoreticky až nekonečného). Ostatní buňky organismu, somatické, mají schopnost dělení výrazně omezenou (cca 50 dělení) a jejich reprodukční čas odměřují buněčné molekulové hodiny v podobě telomer<sup>7</sup>, specializovaných částí DNA. Po dosažení povoleného počtu dělení somatická buňka ztratí schopnost dělení. Avšak v kmenových buňkách působí specializované mechanismy (enzym telomeráza), které zabraňují takovému měření reprodukčního času buňky, a tak se kmenové buňky mohou dělit zdánlivě donekonečna a jsou „nesmrtelné“.

Ve schopnosti diferencovat do vícero typů buněk a ve zvýšeném povoleném limitu počtu dělení se kmenovým buňkám podobají **progenitorové** buňky, avšak ty mají oproti kmenovým buňkám obě tyto vlastnosti o něco omezené.

### 2.2.1. Regulace pluri(multi)potence

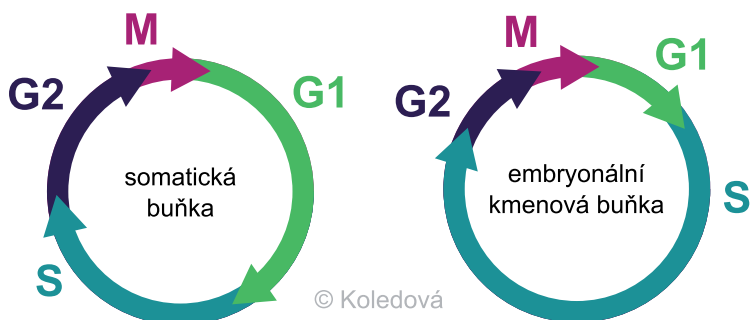
Za specifickými vlastnostmi kmenových buněk stojí specifická regulace buněčných procesů jak na úrovni exprese genetické informace, tak na úrovni regulace buněčného cyklu, dělení, odpovědi na poškození DNA atd.

Embryonální kmenové buňky se vyznačují aktivitou proteinů Oct4, Nanog, Sox2 a Klf4, které se vážou na DNA a specifickou regulací exprese genetické informace nastolují pluripotenci. Dokonce dovedou reprogramovat somatické, diferencované buňky na buň-

<sup>7</sup> Teloméry = koncové úseky chromozomů, které obsahují opakující se sekvence DNA, důležité pro zabránění zkracování chromozomů počas replikace DNA

ky pluripotentní (viz dále). Další charakteristickou vlastností embryonálních kmenových buněk je specifický stav chromatinu<sup>8</sup>. Geny jsou pomocí regulačních mechanismů buňky (chromatin-modifikujícími komplexy) značeny speciálními značkami (např. metylací histonů), které značí, zda se určitý gen má či nemá přepisovat (dostanou pozitivní nebo negativní značku). V embryonálních kmenových buňkách jsou geny důležité pro vývin a diferenciaci označené zároveň jak pozitivními, tak i negativními značkami. A to proto, aby byly připraveny okamžitě reagovat na diferenciální signály.

Embryonální kmenové buňky se vyznačují i specifickou strukturou a regulací buněčného cyklu. Buněčným cyklem nazýváme období od jednoho dělení buňky po další dělení. Skládá se ze čtyř etap, fází buněčného cyklu: G1 (přípravná fáze - v ní se rovněž rozhoduje o tom, zda se vůbec buňka bude dělit), S (syntetická nebo replikační - dochází v ní k replikaci genetické informace), G2 (druhá přípravná fáze) a M (mitotická - dochází k dělení buňky) (*obr. 4*). Embryonální kmenové buňky mají na rozdíl od somatických buněk velmi krátký buněčný cyklus, tj. dělí se velmi rychle, a to zejména díky tomu, že mají velmi krátkou fázi G1. Přitom G1 fáze bývá často ta nejdelší fáze buněčného cyklu somatických buněk.



*Obr. 4 - Schéma buněčného cyklu u somatických a embryonálních kmenových buněk*

Nejnovější studie ukázaly, že velmi krátká G1 fáze je nezbytná pro zachování pluripotence embryonálních kmenových buněk - prodloužení G1 fáze vedlo k diferenciaci embryonálních kmenových buněk (myších i lidských) do různých buněčných linií.

Další výjimečnou vlastností embryonálních kmenových buněk je, že na rozdíl od somatických buněk nezastavují svůj buněčný cyklus, pokud dojde k poškození DNA na začátku buněčného cyklu - v G1 fázi. Přitom zastavení v G1 fázi po poškození DNA je důležité na to, aby se stihla opravit DNA ještě před její replikací v S fázi, a tím se zabránilo vzniku a přenosu mutací do dceřiných buněk. Vzhledem k tomu, že oprava DNA není vždy dokonalá a mohou při ní vzniknout mutace a mutace embryonálních kmenových buněk mohou ohrozit správnou funkci buněk a životaschopnost celého vyvíjejícího se organismu, embryonální kmenové buňky raději spáchají sebevraždu (apoptózu)<sup>9</sup> nebo diferencují na buňky, které ztratí schopnost se dělit, než by měly riskovat, že oprava DNA

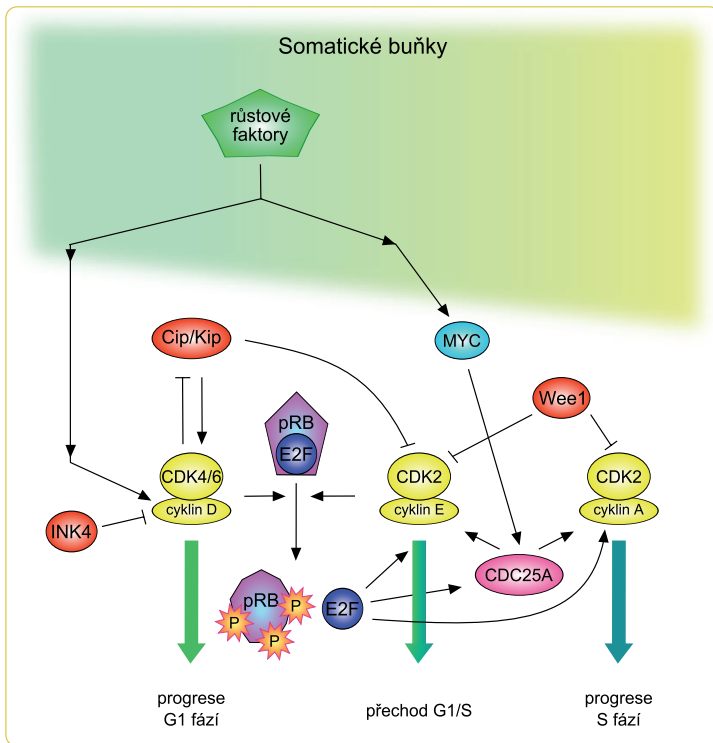
<sup>8</sup> Chromatin = hmota chromozomů; obsahuje DNA a proteiny a má specifickou prostorovou strukturu

<sup>9</sup>Apoptóza = programovaná smrt buňky

po poškození v G1 fázi vnesou do jejich genetického materiálu mutace, které by mohly mít fatální následky pro celý organismus.

## 2.2.2. Regulace buněčného cyklu

Přechod buňky buněčným cyklem je řízen komplexy cyklinů<sup>10</sup> s cyklin-dependentními kinázami<sup>11</sup> (Cdk) a jimi zprostředkovanou fosforylací mnoha proteinů (*obr. 5a, 5b*).



Obr. 5a - Schéma regulace buněčného cyklu u somatických buněk

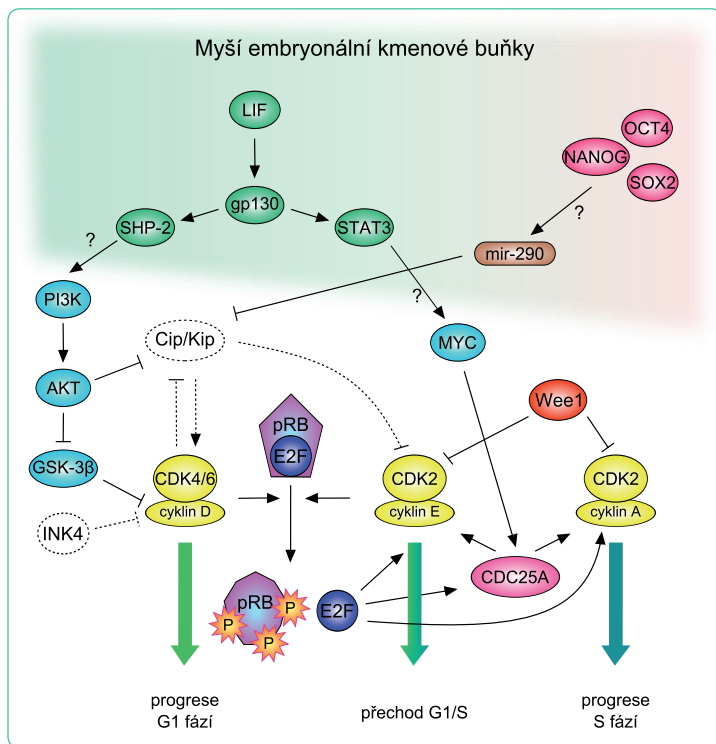
Tyto komplexy se formují a aktivují postupně během přechodu buňky buněčným cyklem. Pro vstup somatické buňky do buněčného cyklu je zapotřebí stimulace růstovými faktory (mitogen). V jejím důsledku dochází k expresi cyklinů D, které tvoří v rané G1 fázi komplexy s CDK4/6. Cyklin D-CDK4/6 fosforyluje protein retinoblastomu<sup>12</sup> (pRb). Tím jej inaktivují a dochází k uvolnění transkripčních faktorů E2F, které umožní expresi

<sup>10</sup> Cykliny = proteiny, které byly pojmenovány podle jejich cyklické exprese v průběhu buněčného cyklu

<sup>11</sup> Kináza = enzym, který fosforyluje substrát, t.j. vnáší fosfoskupinu ( $PO_4^{3-}$ )

<sup>12</sup> Retinoblastom = nádor sítnice

genů potřebných pro posun buňky G1 fází, mezi nimi i cyklinu E. Cyklin E se asociuje s Cdk2 a tento komplex dále fosforyluje protein pRb, což spouští expresi genů potřebných pro přechod buňky z G1 fáze do S fáze buněčného cyklu, jako např. cyklinu A a DNA polymerázy<sup>13</sup> a zajišťuje přechod buňky restričním bodem. Od tohoto okamžiku již je definitivně rozhodnuto, že se buňka bude dělit a další přechod buňky buněčným cyklem již není závislý na přítomnosti růstových faktorů. Komplexy cyklin A-Cdk2 regulují přechod buňky S fází, především replikaci DNA a aktivaci komplexů cyklinu B s Cdk1, které pak řídí přechod buňky mitózou. Aktivita kináz CDK je regulována kromě asociace s cykliny i dalšími mechanismy, např. fosforylací (Cdk aktivační kináza, fosfatázy Cdc25 a kinázy Wee1/Myt1) či asociací s inhibičními proteiny (Cip /Kip, Ink4).



Obr. 5b - Schéma regulace buněčného cyklu u embryonálních kmenových buněk

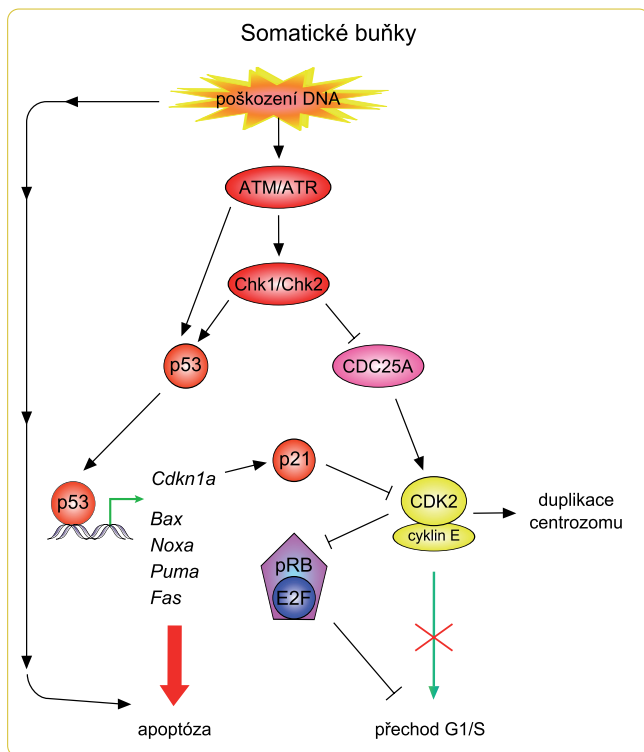
Na rozdíl od somatických buněk, embryonální kmenové buňky nevyžadují pro vstup do buněčného cyklu růstové faktory (somatické buňky nevstupují bez růstových faktorů do buněčného cyklu, ale do fáze G0, tzv. klidové fáze). Dalším významným rozdílem v regulaci buněčného cyklu u embryonálních kmenových buněk je velmi vysoká aktivita Cdk2, která pohání rychlý přechod buňky G1 fází a je esenciální pro zachování sebeob-

<sup>13</sup> DNA polymeráza = enzym, který katalyzuje polymerizaci deoxyribonukleotidů do vlákna DNA

novy embryonálních kmenových buněk. Inhibice nebo snížení aktivity Cdk2 způsobuje prodloužení G1 fáze a diferenciaci embryonálních kmenových buněk do různých buněčných linií.<sup>14</sup> Vysoká aktivita Cdk2 je zajištěna i nepřítomností inhibičních proteinů, jako je např. p21<sup>Cip1</sup>, jejichž exprese je inhibována prostřednictvím specifických microRNA.<sup>15</sup>

### 2.2.3. Odpověď na poškození DNA - G1 kontrolní bod

Vlivem různých environmentálních faktorů, ale také v důsledku normálních buněčných procesů může dojít k poškození DNA, jako např. ztrátě nebo naopak nadměrnému zařazení jednoho či více nukleotidů či jedno-nebo dvouvláknovým zlomům DNA. Poškození DNA je závažný stav, protože může vést ke vzniku mutací s negativním dopadem na životaschopnost buňky a/nebo organismu. Proto musí být detekovány a opraveny ještě



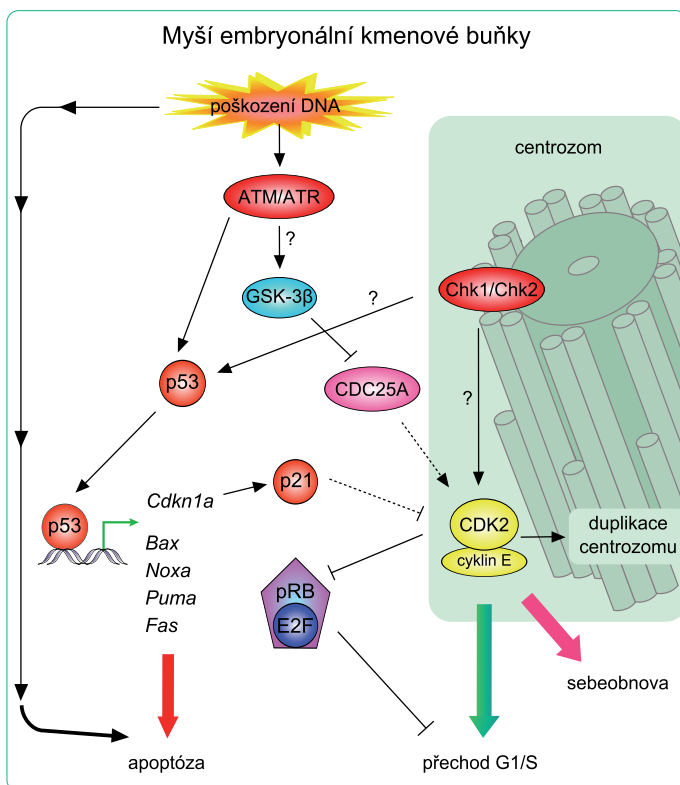
Obr. 6a - Mechanismus G1 kontrolního bodu u somatických buněk

<sup>14</sup> Neganova a kol., 2009 (Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells); Koledová a kol. 2010 (Cdk2 inhibition prolongs G1 phase progression in mouse embryonic stem cells)

<sup>15</sup> microRNA = miRNA = krátké molekuly RNA, které negativně regulují expresi cílových genů navázáním na jejich mRNA produkty, což vede k degradaci vzniklých komplexů a tím ke snížení hladiny mRNA a daného proteinu v buňce

před replikací DNA a musí být zabráněno dělení buněk s poškozenou DNA. Tyto funkce zajišťují mechanismy odpovědi na poškození DNA - proteiny kontrolních bodů a proteiny opravy DNA. Proteiny kontrolních bodů zastavují přechod buňky buněčným cyklem po poškození DNA, čímž zajišťují čas pro opravu DNA před vstupem do další fáze, nebo nařídí buňce smrt, pokud se poškození nelze opravit. Somatické buňky mají více kontrolních bodů - na přelomu G1 a S fáze (G1 kontrolní bod), v S fázi, a před vstupem do mitózy, na přelomu G2 / M. Proteiny kontrolních bodů působí v signálních drahách (kaskádách) (*obr. 6*), počínajících kináza ATM / ATR, které rozpoznávají poškozenou DNA a aktivují další proteiny, např. Chk1/Chk2, které dále fosforyluje další proteiny, čímž je aktivují (např. p53) nebo inaktivují (např. Cdc25). Tyto dráhy směřují ke společnému cíli - inaktivaci komplexů cyklin-CDK (p53-zprostředkovanou expresí p21<sup>Cip1</sup> a degradací fosfatázy Cdc25, která je potřebná pro aktivaci cyklin-CDK), a tím zastavení progresu buněčným cyklem.

Vzhledem k tomu, že inaktivace Cdk2 u embryonálních kmenových buněk, i když jen na pár hodin, může u těchto buněk indukovat diferenciaci, embryonální kmenové buňky nemají funkční G1 kontrolní bod. To znamená, že se v G1 fázi po poškození DNA neza-



Obr. 6b - Mechanismus G1 kontrolního bodu u embryonálních buněk

stavují - nedochází u nich ke snížení aktivity Cdk2. Dráhy G1 kontrolního bodu jsou sice v embryonálních kmenových buňkách aktivovány stejně jako v somatických buňkách, ale (minimálně) u myších embryonálních kmenových buněk je Cdk2 chráněna před jejich zásahem specifickou lokalizací na centrozomy.<sup>16</sup>

## 2.3. Kultivace kmenových buněk

Kultivace kmenových buněk vyžaduje speciální podmínky. V kultuře se snažíme co nejvíce přiblížit přirozenému prostředí buněk, jaké mají v živém organismu. A to teplotně, chemickým složením kultivačního média i atmosféry v inkubátoru a zajištěním vhodného povrchu pro přisednutí (u adherentních buněk). Buňky se kultivují při 37 ° C ve vlhké atmosféře s obsahem 5 - 10% CO<sub>2</sub> v médiu, které poskytuje všechny potřebné živiny i růstové faktory, které zajišťují zachování kmenových buněk v nediferencovaném stavu. Např. myší embryonální kmenové buňky vyžadují v médiu přítomnost proteinu LIF, který zabraňuje jejich diferenciaci. Lidské embryonální kmenové buňky využívají pro zachování sebeobnovy a pluripotence jiné dráhy - FGF2 a Noda1/Activin. Embryonální kmenové buňky potřebují i speciální úpravu povrchu misky nanesením proteinů (želatina nebo matrigel) nebo výsevem jiných buněk, fibroblastů,<sup>17</sup> aby se dokázaly přichytit a růst jako adherentní kultura. Fibroblasty zároveň poskytují i růstové faktory pro zachování pluripotence embryonálních kmenových buněk.

Bez přisednutí na pevný povrch a bez potřebných růstových faktorů embryonální kmenové buňky ztrácejí pluripotentní vlastnosti a diferencují do *embryonálních tělísek*, které částečně rekapituluji časný embryonální vývin (viz dále). Zpočátku jsou to neorganizované shluky buněk kulatého tvaru a postupně získávají komplexnější strukturu. Vzniká v nich dutina a vyvíjí se žlutkový vak, diferencují neurony a kardiomyocyty (buňky srdečního svalu) a dokonce lze pozorovat rytmický pulz těchto buněk připomínající tlukot srdce embrya.

Možnosti kultivace tkáňových (krevních) kmenových buněk budou probrány v Praktické části.

## 2.4. Typy kmenových buněk

Kmenové buňky můžeme podle původu rozdělit do několika skupin (*obr. 7*):

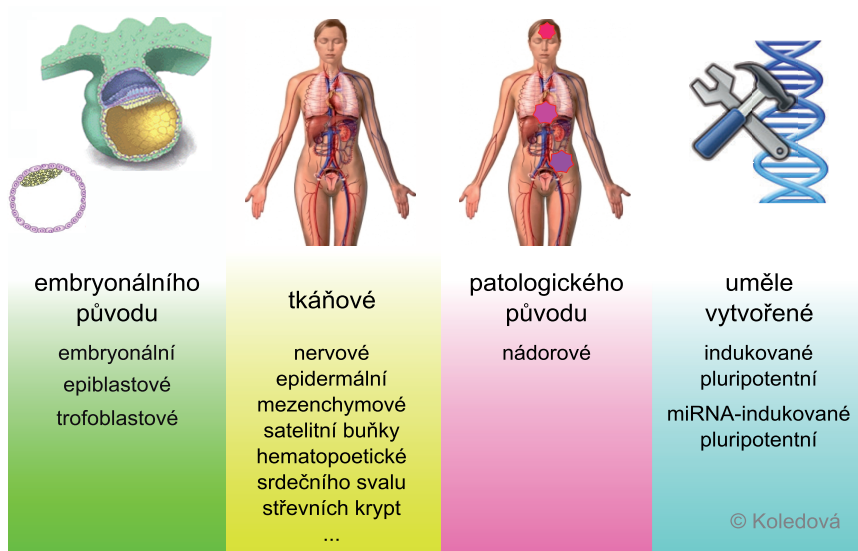
- Kmenové buňky pocházející z embrya
- Tkáňové kmenové buňky (kmenové buňky dospělého organismu)
- Kmenové buňky patologického původu - nádorové kmenové buňky
- Uměle vytvořené kmenové buňky

---

<sup>16</sup> Koledová a kol., 2010 (DNA damage-induced degradation of Cdc25A does not lead to inhibition of Cdk2 activity in mouse embryonic stem cells)

<sup>17</sup> Fibroblast = buňka pojivové tkáně; produkuje materiál mezibuněčné hmoty (např. kolagen)

## Rozdělení kmenových buněk



Obr. 7 - Typy kmenových buněk

### 2.4.1. Kmenové buňky pocházející z embrya

Do skupiny kmenových buněk embryonálního původu patří embryonální kmenové buňky, epiblastové kmenové buňky a trofoblastové kmenové buňky.

*Embryonální kmenové buňky* i *trofoblastové kmenové buňky* jsou odvozeny z blastocysty, přičemž embryonální kmenové buňky pocházejí z vnitřní buněčné masy a trofoblastové kmenové buňky z trofoblastu (obr. 1). Embryonální kmenové buňky jsou pluripotentní a mohou diferencovat na všechny typy buněk dospělého organismu. Trofoblastové kmenové buňky jsou multipotentní a mohou diferencovat jen do buněčných typů placenty.

*Epiblastové kmenové buňky* pocházejí, jak již jejich název říká, z epiblastu, tkáně vzniklé z vnitřní buněčné masy o něco později v embryonálním vývinu, po implantaci.<sup>18</sup> Epiblastové kmenové buňky jsou stejně jako embryonální kmenové buňky pluripotentní, schopné diferencovat na všechny typy buněk dospělého organismu. Derivovány byly v roce 2007 z myši; derivace lidských epiblastových kmenových buněk není z etických důvodů povolena.

### 2.4.2. Tkáňové kmenové buňky

Tkáňové kmenové buňky jsou specializované kmenové buňky, které se vyskytují v tkáních a zajišťují tvorbu buněk pro růst, vývoj a regeneraci těchto tkání. Jsou multipotentní.

<sup>18</sup> Implantace = přilnutí embrya (v stadiu blastocysty) k stěně dělohy



Po transplantaci do jiného organismu jsou schopny opět vytvořit stejný typ tkáně, z jaké pocházejí, a tuto vlastnost si ponechávají během několika následných transplantací (sériová transplantace).

Ve výjimečných situacích jsou některé tkáňové kmenové buňky schopné tvořit i buňky jiné tkáně nebo změnit se na tkáňovou kmenovou buňku jiného typu - tento proces se nazývá transdiferenciace.

Tkáňové kmenové buňky jsou v tkáni lokalizované v nikách. Je to mikroprostředí specializované na podporu udržování a ochranu kmenových buněk. Nika poskytuje optimální podmínky pro kmenovou buňku (povrch na uchycení, růstové faktory...) a účastní se regulace dělení kmenové buňky.

Většina tkáňových kmenových buněk neprodukuje nové buňky neustále ani se tkáňové kmenové buňky běžně nedělí. Většinu času jsou tkáňové kmenové buňky ve stavu klidu, quiescenci.<sup>19</sup> Např. myší hematopoetická<sup>20</sup> kmenová buňka se dělí jednou za 145 dnů. K aktivaci a dělení tkáňové kmenové buňky pro produkci nových buněk dochází dle potřeby organismu.

Dělení tkáňových kmenových buněk je přísně kontrolováno. Nadměrné dělení kmenových buněk může vést ke vzniku hyperplazii<sup>21</sup> a benigních nádorů.<sup>22</sup>

Mezi tkáňové kmenové buňky patří:

- Nervové kmenové buňky - nacházejí se v mozku (pod bočními komorami předního mozku a v hipokampu) a jsou zdrojem neuronů a všech typů pomocných nervových buněk (vlčkové buňky - mikroglie, astrocyty a oligodendrocyty).
- Epidermální kmenové buňky (keratinocytové kmenové buňky, kmenové buňky rohovky ...) - produkují buňky na obnovu pokožky, rohovky oka, růst vlasů, chlupů a nehtů. Nacházejí se v kůži a ve vlasových folikulech.
- Kmenové buňky prsní žlázy - tvoří všechny typy buněk prsní žlázy
- Mezenchymové kmenové buňky - kmenové buňky pojivové tkáně, diferencují do buněk kosti (osteoblasty), chrupavky (chondrocyty) a tukové tkáně (adipocyty). Vyskytují se v kostní dřeni, tukové tkáni, ale např. i v zubní dřeni či svalcích.
- Svalové kmenové buňky - kmenové buňky pro buňky příčně pruhovaného (kosterního svalstva). Nazývají se také satelitní buňky a nacházejí se mezi svalovými vlákny.
- Hematoetická kmenové buňky - kmenové buňky, z nichž vznikají všechny typy krevních buněk, včetně červených krvinek (erytrocytů), megakaryocytů<sup>23</sup> a všech typů bílých krvinek myeloidní i monoklonální lymfoidní řady (*obr. 8*). Nacházejí se v kostní dřeni, slezině, fetální játrech, v pupečnickové krvi i v periferní krvi.
- Srdeční kmenové buňky - diferencují na buňky srdečního svalu a cév.
- Kmenové buňky střeva - kmenové buňky, které jsou zdrojem epitelových i sekrečních buněk střeva. Nacházejí se v kryptách, strukturách mezi klky střeva.

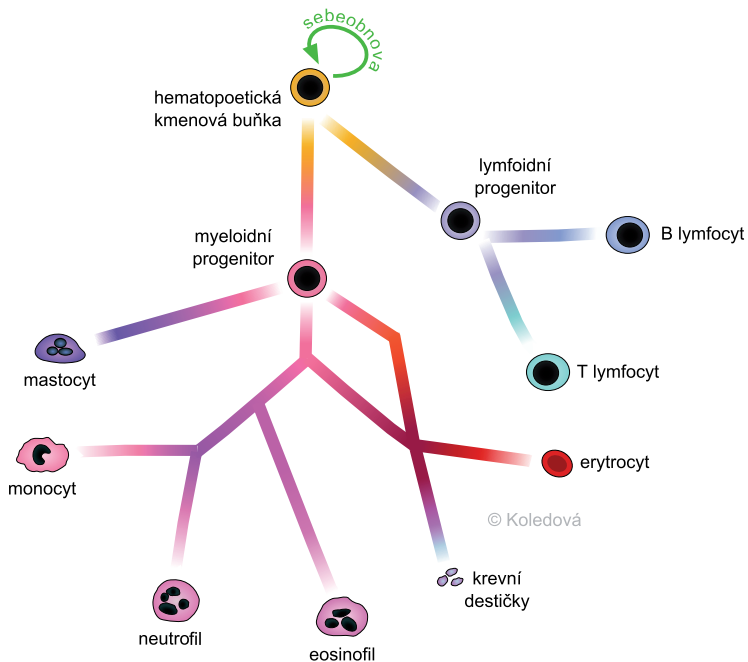
<sup>19</sup> Quiescence = stav klidu buňky z hlediska dělení, G0 fáze; v tomto stavu normálně probíhá buněčný metabolismus a buňka plní svoje funkce v tkáni, ale nedělí se; v případě příjmu signálu k dělení je však schopná se dělit a opětovně vstupuje do buněčného cyklu

<sup>20</sup> Hematoetická = týkající se hematopoézy, tj. krvetvorby

<sup>21</sup> Hyperplázie = nadměrné zvětšení tkáně nebo orgánu v důsledku nadměrného dělení buněk

<sup>22</sup> Benigní nádor = nádor nezhoubný, který netvoří metastázy

<sup>23</sup> Megakaryocyt = velká buňka, ze které odlamováním cytoplazmy vznikají krevní destičky (trombocyty)



Obr. 8 - Hematopoéza – zjednodušené schéma

### 2.4.3. Nádorové kmenové buňky

Nádorové kmenové buňky jsou buňky s vlastnostmi kmenových buněk (tj. se schopností sebeobnovy a diferenciací na různé typy buněk), které jsou zdrojem buněk tvořících nádorovou masu. Ve zdravém organismu se nevyskytují. Nádorové kmenové buňky vznikají buď z nádorových buněk získáním vlastností kmenových buněk nebo z tkáňových kmenových buněk patologickou změnou genetické informace - nádorovou transformací. Nádorové kmenové buňky jsou schopné po transplantaci do imunodeficientního<sup>24</sup> organismu znovu vytvořit stejný typ nádoru, z jakého pocházejí, a tuto vlastnost si ponechávají během několika následných transplantací (sériová transplantace). Nádorové kmenové buňky jsou vysoce odolné vůči chemoterapii a radioterapii a zanechání i jen jedině nádorové kmenové buňky po chirurgickém odstranění nádoru může vést k opětovnému nádorovému bujení (relaps nádoru) i po letech zdánlivého vyléčení. Proto se v současnosti věnuje velká pozornost studiu a popisu nádorových kmenových buněk a vytváření terapií cílených proti nádorovým kmenovým buňkám.

<sup>24</sup> Imunodeficientní = mající oslabený nebo nefunkční imunitní systém

## 2.5. Uměle vytvořené kmenové buňky

Mezi uměle vytvořené kmenové buňky řadíme ty, které se přirozeně nevyskytují a vznikají lidským působením přeměnou diferencovaných buněk na kmenové - reprogramováním. Patří mezi ně indukované pluripotentní kmenové buňky. **Indukované pluripotentní kmenové buňky** vznikají nastolením exprese klíčových genů pluripotentních kmenových buněk v diferencovaných buňkách vnesením těchto genů (Oct4, Sox2, Nanog, Klf4, případně Lin28 či jiných) na vektorech<sup>25</sup> nebo změnou genové exprese prostřednictvím microRNA (*pluripotentní kmenové buňky indukované prostřednictvím microRNA*). Poprvé byly indukované kmenové buňky vytvořeny v roce 2006 skupinou dr. Yamanaky<sup>26</sup> z myších fibroblastů vnesením genů Oct4, Sox2, Klf4 a c-Myc. O rok později se podařilo vytvořit indukované pluripotentní kmenové buňky také z lidských fibroblastů pomocí stejné kombinace genů (Dr. Yamanaka) i variace OCT4, SOX2, nanog, LIN28 (Dr. Thomson).

Technika indukce pluripotentních kmenových buněk představuje slibný, neomezený zdroj kmenových buněk pro terapeutické využití. Indukované pluripotentní kmenové buňky jsou „šité na genetickou míru“ pacienta a navíc jejich produkci nedoprovázejí takové etické problémy a kontroverze jako embryonální kmenové buňky.

## 2.6. Využití kmenových buněk v medicíně

Poznání kmenových buněk jako zdroje nových, zdravých, funkčních buněk přineslo nové možnosti léčby (nebo alespoň jejich příslib) různých poúrazových stavů (např. poškození míchy), degenerativních chorob (Parkinsonova choroba, Huntingtonova chorea), diabetes, imunodeficitních stavů i rakoviny. Momentálně je jedinou dobře zavedenou, spolehlivou metodou využívající kmenové buňky transplantace krvetvorných kmenových buněk (kostní dřeně). Prospívá pacientům s různými typy hematologických malignit, imunodeficiencí nebo např. srpkovitou anémií.<sup>27</sup> Před transplantací jsou nejdříve odstraněny nádorové (např. leukemické) buňky a kostní dřeň příjemce (protože je zdrojem nádorových buněk, případně jiným způsobem nefunguje správně) pomocí chemoterapie a radioterapie. Následně se provede samotná transplantace krvetvorných kmenových buněk ať již ve formě klasické transplantace kostní dřeně do kosti nebo transplantace jen samotných krvetvorných kmenových buněk separovaných z krve dárce nebo i samotného pacienta ještě předtím, než podstoupil chemoterapii a radioterapii. Transplantované hematopoetické kmenové buňky umožňují obnovení normální krve tvorby pacienta (příjemce).

Dále byly navrženy mnohé aplikace kmenových buněk v medicíně pro léčbu různých onemocnění, chorobných/degenerativních stavů a úrazů a momentálně probíhá několik

---

<sup>25</sup> Vektor = molekula (nejčastěji DNA), která slouží k přenosu cizí genetické informace do buňky

<sup>26</sup> Shinya Yamanaka (\*1962), Kyoto University, Japonsko

<sup>27</sup> Srpkovitá anémie = dědičné onemocnění způsobené mutací genu pro hemoglobin (barvivo červených krvinek potřebné pro přenos kyslíku), která vede ke změně bikonkávního tvaru červených krvinek na srpkovité. Srpkovité erythrocyty způsobují uzavření cév (vazookluze) a s tím spojené komplikace zdravotního stavu

(nejen) klinických studií, ve kterých se testuje účinnost, ale i rizikovost použití kmenových buněk v terapii. Např.:

- nervové kmenové buňky nebo embryonální kmenové buňky pro léčbu poškození mozku, míchy, různých neurodegenerativních stavů (Parkinsonova či Alzheimerova choroba)
- kmenové buňky srdečního svalu, embryonální, mezenchymové a hematopoetické kmenové buňky pro opravu poškození srdečního svalu po infarktu
- kmenové buňky rohovky pro obnovu vidění
- embryonální kmenové buňky, diferencované na buňky slinivky, pro obnovu tvorby inzulínu a léčbu diabetu - atd.

Jedním z problémů, se kterým se terapie kmenovými buňkami musí vypořádat, je kromě dostatečné charakterizace jednotlivých typů kmenových buněk a poznání jejich vlastností i samotný nedostatek kmenových buněk. Tkáňové kmenové buňky se v organismu nacházejí většinou pouze v malém počtu a je třeba zdokonalit metody jak pro jejich izolaci, tak i pro jejich expanzi v kultuře.

Jedním z řešení je cílená diferenciací embryonálních kmenových buněk nebo indukovaných pluripotentních buněk do požadovaných tkáňových kmenových (nebo pluripotentních) buněk. Ty je pak možné použít pro transplantační účely. Použití lidských embryonálních kmenových buněk je však spojeno s etickými problémy, zejména odvozování nových linií z lidských embryí. Jako slibná náhrada embryonálních kmenových buněk se nabízejí indukované pluripotentní kmenové buňky, ale také jejich použití má svá úskalí - především bezpečnost. Pluripotentní kmenové buňky (ať už indukované pluripotentní kmenové buňky nebo embryonální kmenové buňky) jsou totiž tumorigenní - po transplantaci tvoří nádory. Embryonální kmenové buňky vytvářejí teratomy; tento typ nádorů se vyskytuje i spontánně a vzniká ze zárodečných buněk. Indukované pluripotentní kmenové buňky, které jsou vytvořeny genetickými modifikacemi, jsou ještě méně bezpečné. Např. jeden z genů, který se používá při jejich derivaci, c-Myc, je silný onkogen.<sup>28</sup>

## 2.7. Genové modifikace myších embryonálních kmenových buněk – tvorba myších modelů lidských chorob

Průlom v poznání podstaty mnoha lidských onemocnění přinesly technologie využívané k tvorbě zvířecích modelů z geneticky modifikovaných embryonálních kmenových buněk. Tyto technologie slouží k vytváření geneticky modifikovaných zvířat, tj. zvířecích modelů s utlumenou nebo jinak modifikovanou expresí genů. Zvířecí modely jsou zatím technologicky všeobecně možné jen u myši (*Mus musculus*). Tyto sofistikované technologie kombinují několik metod – jedná se o kultivaci a pasážování embryonálních kmenových buněk *in vitro* (viz výše), tzv. cílenou mutagenézi v myších embryonálních

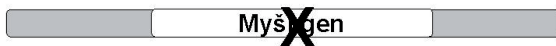
<sup>28</sup> Onkogen = gen, kterého proteinový produkt pozitivně reguluje buněčný cyklus, signalizaci atd. a jeho nadměrná aktivace vede k nadměrnému dělení buňky, které nereaguje na kontrolní podněty z vnějšího prostředí. Tím onkogen přispívá ke vzniku nádorů

kmenových buňkách, a samotnou tvorbu myších modelů z geneticky modifikovaných embryonálních kmenových buněk. Za vývoj těchto technologií byla v roce 2007 udělena Nobelova cena za fyziologii a medicínu.<sup>29</sup>

## 2.7.1. Cílená mutagenese homologní rekombinací v embryonálních kmenových buňkách

Cílená (nebo také řízená) mutagenese v embryonálních kmenových buňkách umožňuje přenos modifikovaných genů do savčí zárodečné linie. Současné technologie umožňují testovat *in vivo* nejen ztrátu genu, resp. jeho produktu („loss-of-function“ mutace, genový „knock-out“, *obr. 9*), ale i abnormální (zvýšenou) aktivaci genů resp. abnormální funkci jimi kódovaných proteinů („gain-of-function“ mutace). Cílená mutagenese v embryonálních kmenových buňkách tak napomáhá poznání úlohy jednotlivých genů, resp. jimi kódovaných proteinů, v normálních i patologických stavech.

### Řízená mutagenese v embryonálních kmenových buňkách



Genová inaktivace - KNOCK-OUT; mutace „loss-of-function“



Genová náhrada - KNOCK-IN - lidského (mutovaného) genu

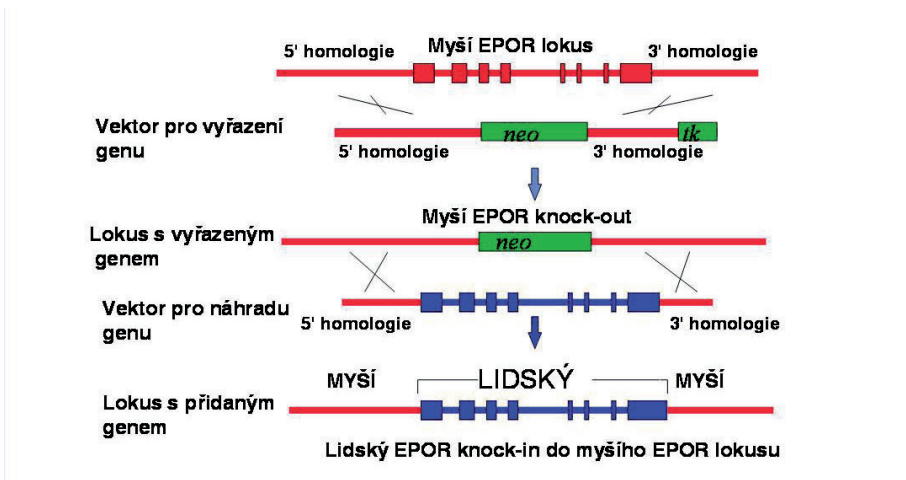
*Obr. 9 - Umlčení genu a vložení náhradního úseku DNA (záměna myšího genu za lidský gen) – zjednodušené schéma*

Jestliže je naklonovaný gen vnášen do savčí buňky, může dojít k jeho náhodné integraci nebo může být cíleně inkorporován do specifického genového lokusu. **Cílená mutagenese** je založena na principu **homologní rekombinace**.<sup>30</sup> Úsek klonované DNA, který vnášíme do savčího genomu, je ve vektoru ohraničen sekvencemi, které normálně vymezují (ohraničují) cílený gen. Podle principu podtypu homologní rekombinace, tzv.

<sup>29</sup> Američan Mario R. Capecchi (University of Utah), Brit sir Martin J. Evans (University of Cardiff) a Američan Oliver Smithies (University of North Carolina)

<sup>30</sup> Homologní rekombinace = překřížení a vzájemná výměna nukleotidových sekvencí mezi homologními molekulami DNA

**místně-specifické homologní rekombinace**<sup>31</sup>, dojde po dopravení vektoru do embryonálních kmenových buněk k náhradě genomové sekvence za sekvenci vektoru, která je ohraničena homologii (obr. 10). Vnášená DNA nese prokaryotický selekční gen pro rezistenci k neomycinu (*neo*), který umožní selekci homologních rekombinantů gentamicinem, resp. jeho modifikací G418<sup>32</sup> (pozitivní selekce). Pravděpodobnost selekce může být zvýšena zařazením herpesvirového genu pro tymidin kinázu (*tk*) do originálního vektorového konstrukt. Jestliže je konstrukt pouze náhodně inkorporován do savčího genomu (což se také může stát), je součástí integrované DNA i *tk* gen. V takovém případě je však buňka senzitivní na gancyklovir<sup>33</sup> (negativní selekce). Jestliže dojde k homologní rekombinaci, je *tk* gen eliminován a buňka - homologní rekombinant - přežije negativní selekci (obr. 10).



Obr. 10 - Knock-out myšního genu pro erythropoetinový receptor (EPOR) a náhrada myšního EPOR genu lidským EPOR řízenou metagezí – zjednodušené schéma

## 2.7.2. Tvorba myších modelů z geneticky modifikovaných embryonálních kmenových buněk

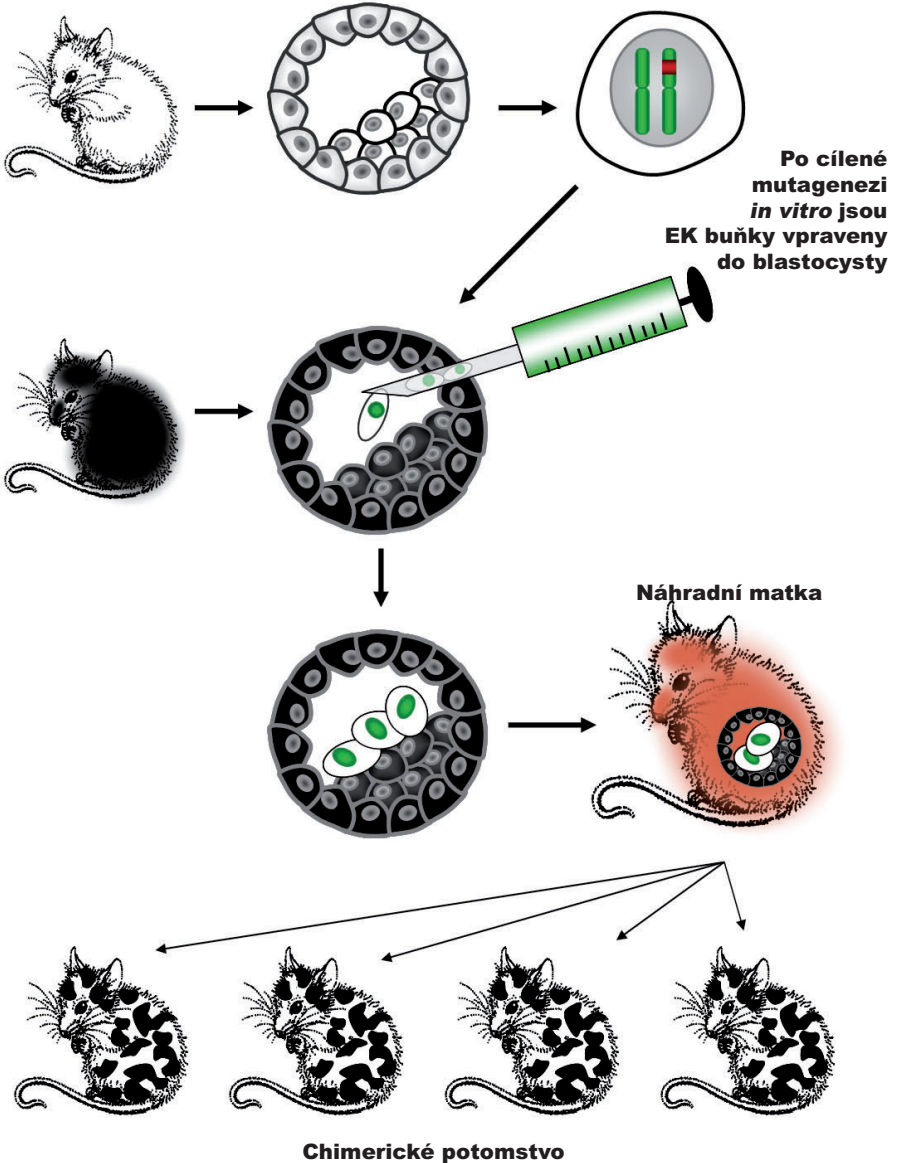
Tvorba myších modelů z embryonálních kmenových buněk je znázorněna na obr. 11a, 11b. V prvním kroku jsou embryonální kmenové buňky geneticky modifikovány řízenou mutagenézí. V dalším kroku jsou tyto pozměněné embryonální kmenové

<sup>31</sup> Místně-specifická homologní rekombinace = homologní rekombinace mezi homologickými sekvencemi jinak dvou nehomologických sekvencí

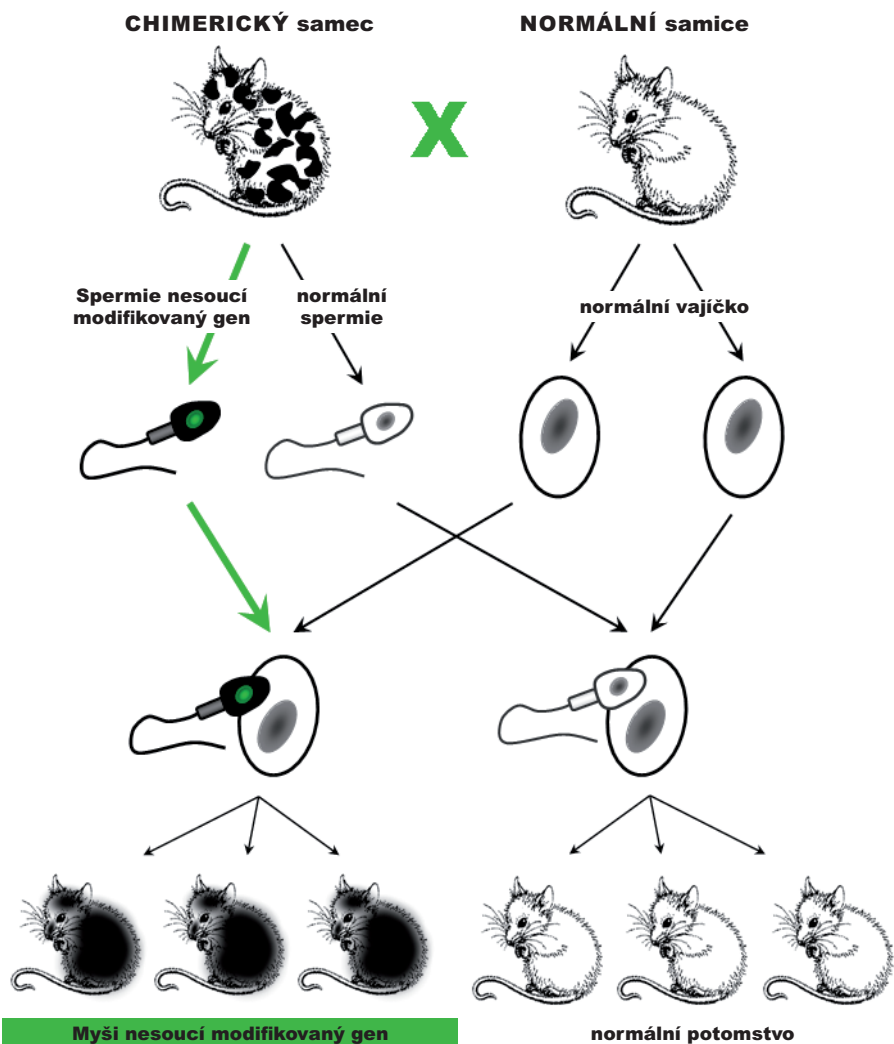
<sup>32</sup> G418 = antibiotikum; rezistenci k tomuto antibiotiku umožňuje exprese prokaryotického *neo* genu; buňky, které nenesou *neo* gen pro rezistenci, jsou G418 antibiotikem eliminovány

<sup>33</sup> Gancyklovir = antivirotikum, které inhibuje replikaci některých herpetických virů, je účinné, je-li fosforylováno virovou tymidin kinázou

**EK buňky (XY) derivované z blastocysty bílé myši jsou geneticky modifikované**



Obr. 11a - Tvorba geneticky modifikovaného myšního modelu



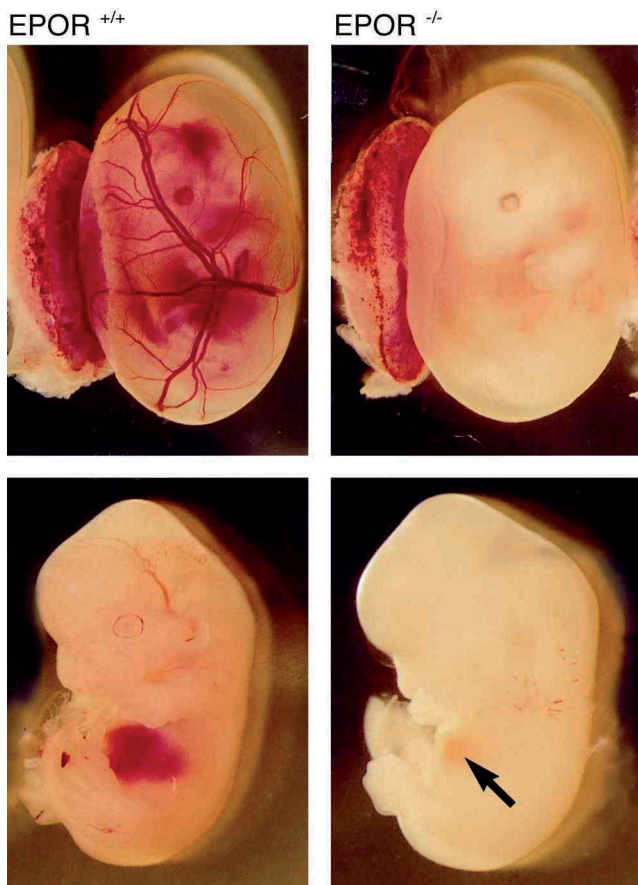
*Obr. 11b - Křížení - selekce geneticky modifikovaného modelu*

buňky injikovány do časného vývojového stadia embrya myši; tyto buňky jsou normálně začleněny do rostoucího embrya a z něho vzniká myš, která má ve svém těle část somatických buněk s pozmeněným genem (chiméra). U některých myší vznikají z pozmeněných buněk buňky zárodečné linie, v tom případě bude část potomstva heterozygotní pro modifikovaný gen.

Řízená mutagenese v savčích embryonálních kmenových buňkách je jednou z nejdůležitějších biotechnologií, které byly vyvinuty v posledních 30 letech. Technologii, která revolučně změnila biologii i medicínu, vypracovali již zmínění laureáti Nobelovy ceny O.



Smithies a M. Capecchi a také další badatelé, jako A. Bradley<sup>34</sup>. Nové a dokonalejší modifikace řízené mutagenese dnes umožňují provádět v podstatě jakékoliv genové náhrady v myších a potenciálně i v lidských embryonálních kmenových buňkách.



*Obr. 12 - Genový knock-out: vlevo normální myší embryo 12. den embryonálního vývoje, vpravo myší embryo s inaktivovaným genem pro erythropoetinový receptor ( $EPOR^{-/-}$  značí, že obě genové kopie  $EPOR$  jsou umlčeny; foto V. Divoký, převzato<sup>35</sup>). Embryo nemá receptor pro erythropoetin (EPO), v důsledku toho mu chybí cirkulující červené krvinky a v jeho játrech (označena šipkou) neprobíhá erythropoéza (tj. tvorba červených krvinek). Jedná se o přímý důkaz funkce EPO a jeho receptoru – jsou nezbytné pro tvorbu červených krvinek. Ztráta  $EPOR$  genu je letální, myší embryo umírá 13. den embryonálního vývoje na anemii.<sup>35</sup>*

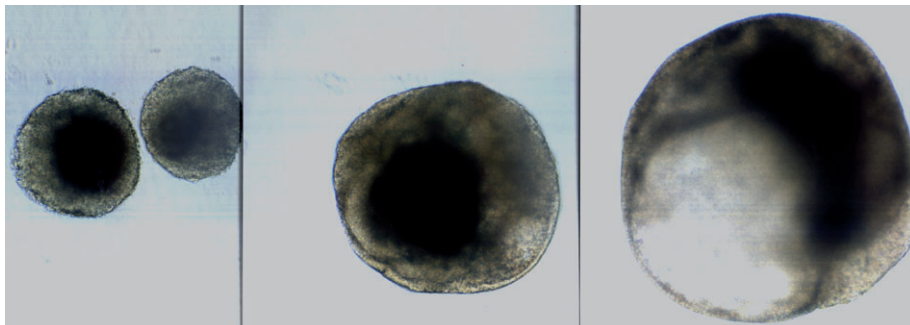
<sup>34</sup> Allan Bradley, Wellcome Trust Sanger Institute, Velká Británie

<sup>35</sup> Prchal, Divoky, 2001 (Lessons to a better understanding of hypoxia sensing. In: Hypoxia: From Genes to the Bedside, Adv Exp Biol Med (502). R. C. Roach, P. D. Wagner, and P. H. Hackett (Eds.) New York: Kluwer/Plenum Academic, str. 189-205.

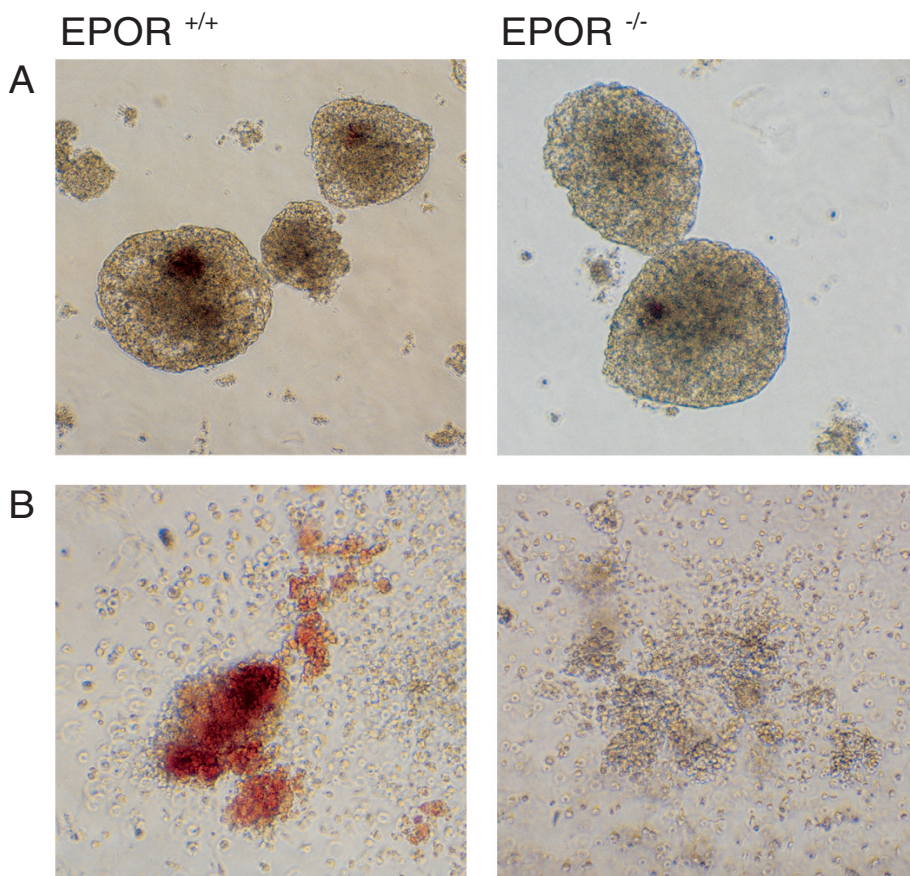
Nejběžnějšími genovými modifikacemi jsou genové vyřazení, genové přidání a genová náhrada. U genového vyřazení (delece) vede změna k úplné ztrátě genové funkce (kompletní inaktivace), myši pak označujeme jako **knock-out**. Pokud je vyřazený gen funkční v embryonálním vývoji, umírají knock-out myši před narozením (**obr. 12**). U genového přidání (inzerce) můžeme inkorporovat do předem určeného místa v genomu libovolný gen. Myši pak označujeme jako **knock-in**. Pokud je vnášený gen mutovaný a mutace je dominantní, má myš patologický fenotyp, i když v genomu zůstaly standardní („wild-type“) alely. U genové náhrady (substituce) provádíme nejčastěji dvoukrokovou homologní rekombinací náhradu myšského genu za jeho lidský homolog (po sobě následující knock-out a knock-in, **obr. 10**). Předpokladem úspěšné genové náhrady je to, že jsou interakce myšských a lidských genových produktů – proteinů – navzájem kompatibilní. Jestliže tímto způsobem nahradíme myšský gen jeho lidským homologem (**obr. 10**), který je navíc mutovaný, můžeme vytvořit myšský model lidského onemocnění.

### 2.7.3. In vitro diferenciacie embryonálních kmenových buněk

Jedinečnou vlastností embryonálních kmenových buněk je jejich schopnost diferencovat *in vitro* do embryonálních struktur („embryoid bodies“, embryonální tělíška), které napodobují *in vivo* časný embryonální vývoj (jak bylo vzpomenuo již v kapitole „Kultivace kmenových buněk“; **obr. 13**). To znamená, že v kultivačním médiu *in vitro* můžeme z embryonálních kmenových buněk vytvářet embryonální struktury, které vykazují vlastnosti živých embryí, včetně rozrůznění do buněčných typů a tkání, rytmických kontrakcí kardiomyocytů atd. Zvláště vhodná je *in vitro* diferenciacie embryonálních kmenových buněk pro studium krvetvorby, včleně analýzy hematopoetických progenitorů (**obr. 14**). Jestliže tedy zjišťujeme roli určitého genu v embryonální hematopoéze, vytvoříme knock-out myšský embryonální kmenové buňky a nemusíme podstoupit časově náročný *in vivo* experiment tvorby myšského modelu, tak jak byl popsán v předchozí kapitole, ale využíváme s výhodou technologií *in vitro* diferenciacie embryonálních kmenových buněk do embryonálních tělísek.



**Obr. 13** Myšský embryonální tělíška ve 3., 9. a 13. dnu diferenciacie (foto V. Divoký)



**Obr. 14** - *In vitro* diferenciace myších embryonálních kmenových buněk s umlčeným genem pro erythropoetinový receptor (foto V. Divoký, převzato<sup>35</sup>). **A.** Embryonální tělíska narostlá z normálních (EPOR<sup>+/+</sup>) a geneticky modifikovaných embryonálních kmenových buněk s inaktivovaným genem pro erythropoetinový receptor (EPOR<sup>-/-</sup>). **B.** Krevní kmenové buňky, které se tvoří v embryonálních tělísčích, mohou být analyzovány v testu krevních progenitorů (viz Praktická část). Krevní kmenové buňky z EPOR<sup>-/-</sup> embryonálních tělísk netvoří v médiu s erythropoetinem žádné červené krvinky.<sup>35</sup>

1. téma  
**KMENOVÉ BUŇKY**  
Využití ve výzkumu a klinické praxi

# 3. PRAKTICKÁ ČÁST

Kmenové buňky krvetvorby: kultivace a pozorování  
Práce s laboratorními zvířaty: myši modely

OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ  
Integrace vědy výzkumu odborného vzdělávání a praxe



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

## 3.1. Kmenové buňky krvetvorby: kultivace a pozorování

### 3.1.1. Úvod do kultivace buněk *in vitro*: buněčné kultury

Metoda kultivace buněk a tkání *in vitro* se stala rutinní a důležitou metodou v medicínském výzkumu i v diagnostické praxi. V klinické praxi se např. kultivací krevních kmenových buněk standardně vyhodnocuje kvalita štěpu pro transplantaci kostní dřeň.

V **buněčných kulturách** kultivujeme buňky mimo organismus v kultivačních médiích. V buněčných kulturách již buňky nejsou dále organizovány do tkáňové architektury a rostou jednotlivě nebo ve shlucích (koloniích). Buňky rostou ve speciálních plastových miskách nebo lahvích buď volně v roztoku (např. různé krevní buňky), nebo jsou adherentní (tj. přichycují se k povrchu plastické misky či lahve, např. fibroblasty).

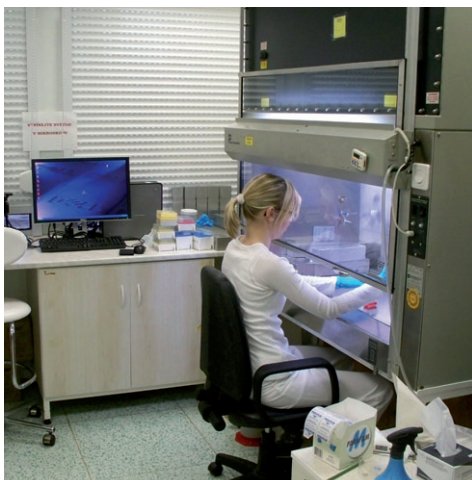
**Primární buněčná kultura** je tvořena buňkami, které byly odebrány z orgánů nebo tkání a byly přímo nasazeny do kultivačního média. Takovéto buňky mohou v kulturách přežít jen krátkou dobu (dny, max. týdny), během které se mohou dělit a diferencovat, poté zaniknou. Jako každá savčí buňka mají totiž limitovaný růstový potenciál, jsou „smrtné“. Naopak „nesmrtelné“ (**imortalizované**) **buněčné linie** se mohou neomezeně dlouho dělit a proto je lze **pasážovat** (přenesením části buněk z jedné kultivační nádoby do druhé), mají neomezený růstový potenciál. Imortalizace se dosáhne chemickými nebo fyzikálními karcinogeny, příp. virovou infekcí, eventuálně proběhne spontánně. **Transformované** buněčné linie navíc vykazují vlastnosti nádorových buněk.

### 3.1.2. Co obsahují kultivační média?

Savčí, tedy i lidské buňky rostou *in vitro* v médiu obsahujícím zdroj energie (glukózu), minerální látky, aminokyseliny, vitamíny a některé doplňkové látky (bílkoviny, lipidy), sérum (nejčastěji hovězí) jako zdroj stimulačních růstových faktorů a hormonů, pufr na bázi uhličitanu a na pH citlivý barevný indikátor. Do kultivačních médií také většinou přidáváme antibiotikum a antimykotikum, abychom buněčnou kulturu ochránili před bakteriální nebo plísňovou infekcí. Kultivační média mohou být tekutá nebo polotekutá (viz dále).

### 3.1.3. Jak vypadá laboratoř buněčných kultur?

**Ke standardnímu vybavení laboratoře tkáňových kultur** patří sterilní boxy s laminárním prouděním vzduchu, které slouží k dodržení aseptických podmínek při manipulaci s buněčnou kulturou (*obr. 1a*), CO<sub>2</sub> inkubátory (*obr. 1b*), ve kterých jsou savčí buňky kultivovány při teplotě 37°C v 5-10% CO<sub>2</sub> atmosféře (pro udržení neutrálního pH) a při vysoké vlhkosti prostředí. Dále pak centrifugy, sady pipet pro zpracování tkáňových kultur a invertovaný mikroskop pro zhodnocení jejich růstu (*obr. 1c*).



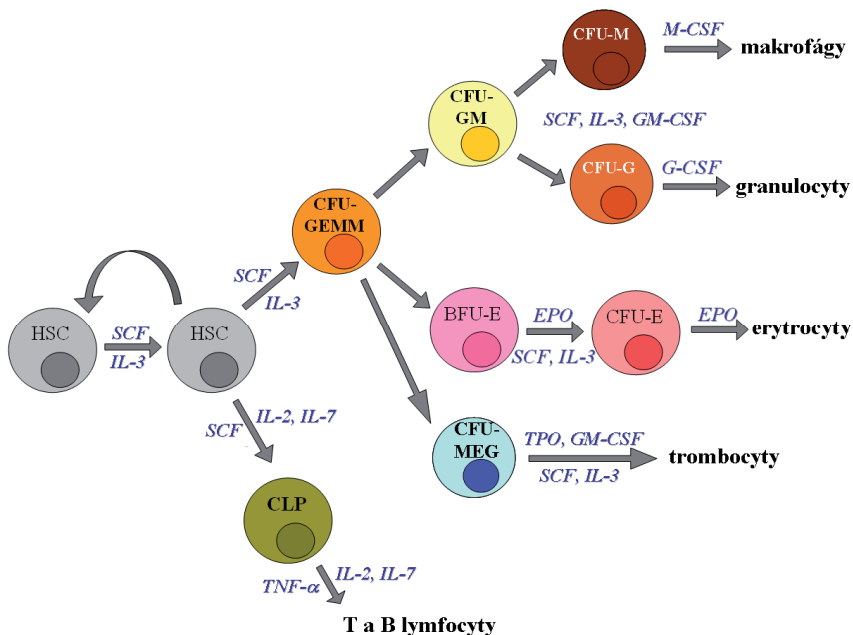
*Obr. 1a - Nasazování buněk do kultury v laminárním boxu. Obr. 1b - Kontrola kultivace buněk v inkubátoru*



*Obr. 1c - Hodnocení buněčné kultury při použití invertovaného mikroskopu.*

### 3.1.4. Hodnocení kvality štěpu pro transplantaci

Krvetvorba (hematopoéza) je proces, během kterého pluripotentní hematopoetická kmenová buňka diferencuje do všech typů krevních elementů (*obr. 2*).



*Obr. 2 - Hematopoetická kmenová buňka je schopná sebeobnovy i diferenciace na multipotentní progenitory. I multipotentní progenitory mají schopnost sebeobnovy a současně diferencují na bipotentní a unipotentní progenitory, které dále diferencují do jednotlivých zralých krevních elementů. Hematopoetické progenitory se dělí a diferencují v definovaném polotuhém médiu obsahujícím metylcelulózu, sérum, růstové faktory a další složky. Viskozita metylcelulózy zabezpečuje, že vyrostlé kolonie krevních buněk představují klon - potomstvo jedné jediné progenitorové buňky a označujeme je proto jako „colony-forming units“ (CFUs). HSC – hematopoetická kmenová buňka (hematopoietic stem cell); CLP – společný lymfoidní progenitor (common lymphoid progenitor); CFU-GEMM – společný myeloidní progenitor (colony-forming unit granulocytic, erythroid, megakaryocyte, macrophage); CFU-GM – progenitor granulocytů a makrofágů (colony forming unit-granulocytic, macrophage); BFU-E – časný erytroidní progenitor (burst-forming unit-erythroid); CFU-E - pozdní erytroidní progenitor (colony forming unit-erythroid).*

Hematopoetická kmenová buňka je tedy příkladem tkáňové kmenové buňky. Transplantace hematopoetických kmenových buněk je nejznámějším použitím kmenových buněk v klinické praxi. Zdrojem štěpu mohou být hematopoetické kmenové buňky separované z periferní krve, kostní dřeň nebo pupečnicková krev. Jednotlivé typy štěpů mají různé zastoupení kmenových buněk a krevních elementů.

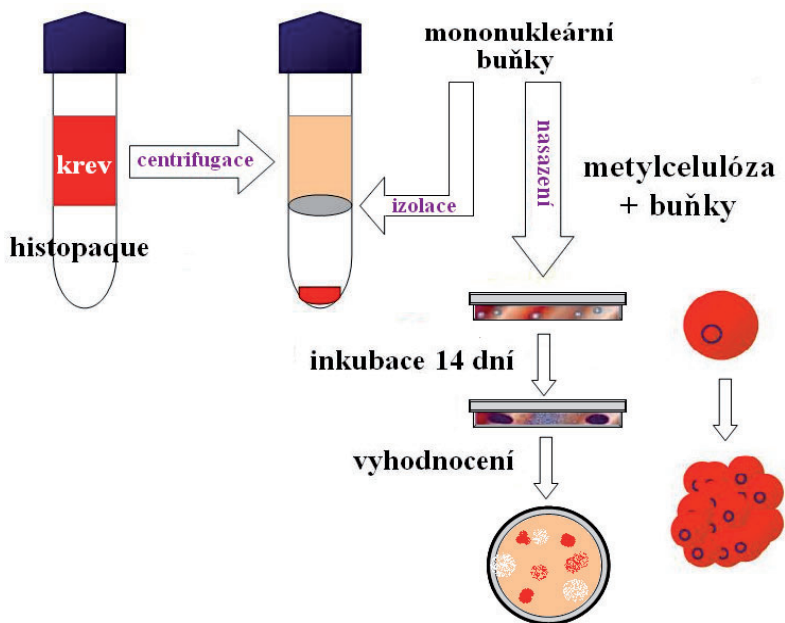
Odběr kmenových buněk z periferní krve probíhá na tzv. separátoru krevních elementů na hemato-onkologické klinice, pod dohledem separačního lékaře. Odběr buněk kostní dřeně provádí lékaři na operačním sále do tzv. odběrového vaku. Odebrané štěpy se poté skladují hluboce zmrazené v tekutém dusíku. V laboratoři tkáňových kultur se provádí stanovení viability (životaschopnosti) buněk ve štěpu a schopnosti kmenových buněk (progenitorů) růst a diferencovat. Jen kvalitní štěp se může použít pro transplantaci.

### **ÚLOHA: Analýza skladovaného štěpu – stanovení viability**

Jako kritérium viability buněk se nejčastěji používá neporušenost cytoplazmatické membrány. Živé buňky mají neporušenou cytoplazmatickou membránu, která volně nepropouští ani malé molekuly nesoucí kladný nebo záporný náboj. Barvivo „obarví“ pouze buňky s porušenou membránou tj., buňky mrtvé.

Provedeme stanovení viability barvením s trypanovou modří.

Hodnocení se provádí na sklíčku pod mikroskopem nebo s použitím automatického analyzátoru. Buňky, které jsou živé mají neporušenou membránu, nepropustí tedy vitální barvivo dovnitř buňky a zůstávají bezbarvé. Usmrcené buňky obsahují barvivo.



*Obr. 3 - Izolace mononukleárních buněk na hustotním gradientu. Krev naředěná tekutým médiem se navrství na roztok histopaque, který při pomalé centrifugaci (1400 rpm) vytvoří hustotní gradient. Na dno zkumavky klesnou erytrocyty, na rozhraní plazmy a histopaque se vytvoří prstenec mononukleárních buněk. Tyto se odeberou umělohmotnou pasterovou pipetou, promyjí médiem a posléze PBS. Buňky jsou spočítány a v příslušném počtu smíchány s polotuhým kultivačním médiem. Po 14 dnech kultivace kultur v inkubátoru se spočítají a hodnotí vyrostlé kolonie. Každá kolonie představuje potomstvo 1 progenitorové buňky.*



## **ÚLOHA: Hodnocení růstu a diferenciacie krevních buněk na polotuhém médiu**

Mononukleární buňky, které se vyzisolují z periferní krve (*obr. 3*) obsahují i krevní progenitory. Buňky jsou posléze nasazeny do metylcelulóзовého kulturačního média (MethoCult™ 4531, StemCell Technologies, [www.stemcell.com](http://www.stemcell.com)) s přísávkem hematopoetických růstových faktorů stimulujících růst a diferenciaci progenitorů. Kolonie krevních buněk rostou na miskách v inkubátoru při teplotě 37°C a v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře po dobu 10 až 14 dnů. Dělicí se a diferencující buňky v polotuhém médiu mají omezený pohyb, vytvářejí proto kolonie (kolonie = potomstvo jedné dělicí se buňky, klon). U krevních buněk můžeme pozorovat hemoglobinizované kolonie vytvořené z erytroidního progenitoru BFU-E a kolonie vytvořené z neerytroidních progenitorů CFU-GM a CFU-M (viz *obr. 2* a barevné přílohy ve Fotogalerii).

Při celkovém zvětšení 100× (10× zvětšujícím objektivem) budeme pozorovat různé typy kolonií krevních buněk (viz barevné přílohy ve Fotogalerii).

Pozn. Pro účely tohoto semináře jsme připravili kultury krevních progenitorů dobrovolných dárců (členů týmu, kteří se podílejí na přípravě a realizaci tohoto semináře). Nejedná se tedy v žádném případě o kultury buněk pacientů ani dárců kmenových buněk pro transplantační účely.

## **3.2. Práce s laboratorními zvířaty: myší modely**

### **3.2.1. Oprávnění k práci s geneticky modifikovanými laboratorními zvířaty**

Každý pracovník, který využívá laboratorní zvířat pro experimentální účely, musí mít příslušné osvědčení, které je vydávané na základě absolvování teoretického resp. praktického vzdělávacího cyklu a zakončeno zkouškou. Požadavky pro získání osvědčení se v jednotlivých zemích liší a jsou upraveny zákonem. V obrazové příloze jsou ukázky osvědčení vydávaného v ČR, evropský certifikát vydávaný asociací FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) a americký certifikát vydávaný ve státě Washington na University of Washington. Další doplňující informace k legislativě a k právním předpisům v souvislosti s ochranou laboratorních zvířat viz publikace z předchozích kurzů (Prezentace vlastního výzkumu a výzkum funkčních plánů organismu, ISBN 978-80-7305-102-0)

Předpisy pro nakládání s geneticky modifikovanými zvířaty (resp. obecně geneticky modifikovanými organizmy<sup>36</sup>) jsou poměrně složité. Existují úmluvy na evropské úrovni, řešící např. problematiku biologické bezpečnosti a otázky uvolňování geneticky modifikovaných organismů do prostředí.<sup>37</sup>

---

<sup>36</sup> geneticky modifikovaný organizmus - organizmus, kromě člověka, jehož dědičný materiál byl změněn *genetickou modifikací*; technická řešení, pomocí kterých může vzniknout geneticky modifikovaný organizmus, a technická řešení, která ke vzniku geneticky modifikovaného organismu nevedou, stanoví prováděcí právní předpis, *genetická modifikace* - cílená změna dědičného materiálu organismu způsobem, kterého se nedosáhne přirozenou rekombinací, a to vnesení cizorodého dědičného materiálu do dědičného materiálu organismu nebo vynětí části dědičného materiálu organismu,

<sup>37</sup> The Aarhus Convention: An Implementation Guide. <http://www.unece.org/env/pp/>

Legislativní opatření v ČR řeší zákon 78/2004 Sb. „O nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty“ a prováděcí vyhláška č. 39/2009 Sb., kterou se mění vyhláška č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat. Některé aspekty práce s geneticky modifikovanými myšmi jsou řešeny i jinými souvisejícími zákony, např. zákonem č. 312/2008 Sb., kterým se mění zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

Povolení nakládání (vč. např. dovozu) geneticky modifikovaných zvířat vydává Ministerstvo životního prostředí (MŽP), odbor environmentálních rizik; stejně tak se na tento odbor MŽP podávají každoroční hlášení o nakládání s geneticky modifikovanými zvířaty.

### 3.2.2. Zásady práce v Centru pro práci s laboratorními zvířaty

Práce s laboratorními zvířaty se řídí „Provozním řádem pracoviště“. Jsou-li mezi laboratorními zvířaty i geneticky modifikované myši, je používán „Provozní řád pracoviště pro uzavřené nakládání s geneticky modifikovanými organismy“. Zde jsou přesně popsány jednak technické prvky vybavení příslušných laboratorních prostor (obr. 4), tak závazné pracovní postupy se zvířaty. Předpisy pro takové pracoviště jsou velmi striktní; se zvířaty je nakládáno podle tzv. „kategorie rizika“. Ta stanovuje bezpečnostní rizika práce s geneticky modifikovanými myšmi jak pro pracovníky, tak pro životní prostředí pro případ havárie s únikem chovaných zvířat do přírodní populace.

Případný neplánovaný únik laboratorních myší (vč. myších modelů) mimo určený laboratorní prostor řeší tzv. „Havarijní řád“ pracoviště. V něm jsou stanoveny jak možné následky havárie s únikem geneticky modifikovaných myší, tak opatření, která by musela následovat, kdyby k tomuto úniku skutečně došlo. Všechna opatření musí směřovat k zamezení úniku zvířat do prostředí, tj. k zamezení možnosti kontaminace populace ve volné přírodě genetickými modifikacemi vytvořenými experimentálně v laboratoři.



*Obr. 4a - Chov geneticky modifikovaných myší (myších modelů) probíhá v místnosti s tzv. systémem individuálně ventilovaných klecí. Všechny pracovní postupy jsou přísně definovány v provozním řádu pracoviště.*



*Obr. 4b - Manipulace se zvířaty, výměna steliva v kleci, dodání krmné směsi a napájecích lahví probíhá v laminárním boxu (v provedení biohazard) za sterilních podmínek. Box chrání před kontaminací jak pracovníka, tak laboratorní zvíře. Pracovník používá při manipulaci ochranný oděv a rukavice.*

### **3.2.3. Praktická ukázka práce v Centru pro práci s laboratorními zvířaty**

Studenti budou seznámeni s vybavením laboratoří, s pracovními zásadami a postupy i se základní laboratorní analýzou (operační výkon, hematologická a biochemická vyšetření) laboratorních myší. Budou demonstrována opatření pro práci s geneticky modifikovanými zvířaty. Veškeré analýzy a postupy práce se zvířaty musí být předem schváleny v tzv. Projektu pokusů (*obr. 5, str. 43-45*)

Tuto tabulku vyplňuje vedoucí pokusu (§ 18a odst. 2 písm. b) zákona č. 246/1992 Sb.):

## PROJEKT POKUSŮ č.

podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat

1.	<b>Identifikace osoby provozující uživatelské zařízení:</b> <b>Žadatel</b> - název právnické osoby nebo jméno a příjmení fyzické osoby, která zařízení provozuje
	IC, bylo-li přiděleno <input type="text"/> RČH, bylo-li přiděleno <input type="text"/> Adresa sídla nebo místa podnikání žadatele (včetně PSČ a okresu) <input type="text"/>
	Statutární orgán žadatele - jméno, příjmení, titul <input type="text"/>
2.	<b>Číslo rozhodnutí o udělení akreditace a doba jeho platnosti</b>
3.	<b>Vedoucí pokusu</b> - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. <b>Zástupce vedoucího pokusu</b> (je-li ustanoven) - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.
4.	<b>Osoba odpovědná za péči o zvířata v uživatelském zařízení</b> - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.
5.	<b>Osoba, která řídí činnost odborné komise uživatelského zařízení</b> - jméno, příjmení, titul a číslo osvědčení o kvalifikaci podle § 17 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.
6.	<b>Název úkolu studie, případně označení grantu</b>
7.	<b>Charakteristika cílů studie s uvedením konkrétního očekávaného přínosu, včetně charakteristiky aplikovaných látek, nebo zařazení látek do indikačních skupin, s výjimkou výstupní kontroly šarží látek</b>
8.	<b>Podle § 15 odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb. bude pokus proveden za účelem (odpovídající zařazení označe křížkem (x) do prázdného políčka):</b> a) odvrácení nebo prevence nemocí, zdravotních poruch a jiných anomálií nebo jejich následků u člověka, zvířat nebo rostlin, včetně výroby a zkoušení jakosti, účinnosti a neškodnosti léčiv, látek nebo výrobků b) provádění diagnostiky nebo léčby onemocnění, zdravotních poruch nebo jiných anomálií a jejich následků u člověka, zvířat nebo rostlin c) zjišťování, vyhodnocování, řízení nebo modifikace fyziologických stavů u člověka, zvířat nebo rostlin d) ochrany životního prostředí v zájmu zdraví nebo dobrých životních podmínek lidí anebo zvířat e) provádění výuky, pokud účelu nelze dosáhnout jinak f) zachování nebo rozmnožování živého materiálu pro vědecké účely g) provádění vědeckého výzkumu h) konání soudního řízení
9.	<b>Metodické postupy práce se zvířaty</b>
10.	<b>Prohlášení navrhovatele o průkazu nezbytnosti pokusu nebo uvedení právního předpisu, který provedení pokusu ukládá, včetně zdůvodnění, proč nelze pokus na zvířeti nahradit alternativními metodami</b>
11.	<b>Zdůvodnění volby druhu, plemene, kmene a kategorie zvířat, jejichž využití je plánováno, s uvedením parametrů jejich kvality</b>
12.	<b>Původ pokusných zvířat, s uvedením evidenčních údajů chovného a dodavatelského zařízení a RČH</b>
13.	<b>Zdůvodnění počtů zvířat, jejichž využití je plánováno, za stanovené časové období</b>
14.	<b>Způsob značení zvířat v pokusu</b>
15.	<b>Způsob znecitlivění, případně podání bolest utišujících prostředků nebo opatření ke snížení bolesti</b>
16.	<b>Umístění zvířat během pokusu nebo u volně žijících zvířat místo pokusu</b>

17.	Časový plán jednotlivých fází pokusu na zvířatech, včetně data jeho ukončení
18.	Úroveň operačního vybavení a způsob pooperační péče
19.	Způsob naložení se zvířaty po ukončení pokusu
20.	Způsob kontroly dodržování předpisů k ochraně zvířat
21.	Uvedení zdravotního rizika pro další zvířata a pro zaměstnance
22.	Veterinární podmínky pokusu stanovené podle zvláštních právních předpisů
23.	Zdůvodnění opakování zákroků na zvířatech (je-li s ním počítáno)
24.	Údaj o úrovni podmínek správné laboratorní praxe (je-li to požadováno zvláštními právními předpisy)
25.	Stanovisko orgánu ochrany přírody v případě pokusu na jedincích druhů volně žijících zvířat (možno uvést a citovat jako přílohu)
26.	Uživatelské zařízení, které předkládá projekt pokusů k jednorázovým odběrům od hospodářských zvířat a zvířat v zájmových chovech pro získání biologického materiálu k výrobě sér, očkovacích látek, diagnostik a léků, jej rozšíří o písemnou smlouvu s vlastníkem zvířete, od kterého se v takovém případě nevyžaduje osvědčení pro chovné zařízení (smlouvu uvést jako přílohu):
	Provádí uživatelské zařízení takové jednorázové odběry? (nehodící se vymažte)   ANO      NE
	Druh a množství materiálu určeného k odběru, doba jeho odběru, jeho metodika a způsob péče o zvíře po provedeném odběru, způsob seznámení majitele zvířete s těmito podmínkami a jejich kontrolou

Projekt pokusů předkládá	
Telefon / Fax	
E-mail	

Razítko uživatelského zařízení

.....  
Datum, podpis vedoucího pokusu

.....  
Datum, podpis zástupce vedoucího pokusu

.....  
Datum, podpis statutárního orgánu žadatele

<b>Tuto tabulku vyplňuje odborná komise uživatelského zařízení (§ 18b odst. 1 zákona č. 246/1992 Sb.):</b>		
<b>STANOVISKO ODBORNÉ KOMISE UŽIVATELSKÉHO ZAŘÍZENÍ K PROJEKTU POKUSŮ č.</b>		
<b>Členové odborné komise</b>		<b>Datum</b>
<b>Jméno</b>	<b>Podpis</b>	

<b>Tuto tabulku vyplňuje příslušný státní orgán (§ 18b odst. 2, § 23 odst. 1 písm. a) zákona č. 246/1992 Sb.):</b>	
<b>Nedílnou součástí tohoto projektu pokusů je povolení použití zvířat č.j.</b>	
<b>Povolení bylo vydáno dne</b>	
<b>Razítko a podpis příslušného státního orgánu</b>	

<b>Tuto tabulku vyplňuje vedoucí pokusu (§ 18a odst. 2 písm. c) zákona č. 246/1992 Sb.):</b>	
<b>Schválení projektu pokusů oznámeno příslušnému orgánu veterinární správy dne</b>	
<b>Datum a podpis vedoucího pokusu</b>	

<b>Tuto tabulku vyplňuje odborná komise uživatelského zařízení (§ 18 odst. 7 zákona č. 246/1992 Sb.):</b>	
<b>Souhlas k zahájení pokusu udělen dne</b>	
<b>Datum a podpis člena odborné komise uživatelského zařízení</b>	

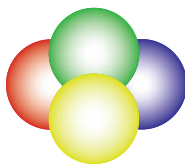
*Obr. 5 - Projekt pokusů, který po vyplnění schvaluje Odborná komise pro práci s laboratorními zvířaty při LF UP a příslušný státní orgán (MŠMT)*



# 1. téma

## KMENOVÉ BUŇKY

### Využití ve výzkumu a klinické praxi



## 4. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA

Fotogalerie kolonií krevních buněk narostlých v polotekutém médiu z kultur hematopoetických progenitorů izolovaných z lidské periferní krve nebo z myších fetálních jater a sleziny.

K focení byl použit invertovaný mikroskop Olympus IX71, s digitální barevnou kamerou DP70.

Autoři fotografií krevních buněk:

M. Horváthová, V. Divoký, S. Takáčová, Ústav Biologie LF UP Olomouc.  
U jednotlivých fotografií je uvedeno původní zvětšení.

Ukázky osvědčení pro práci s laboratorními zvířaty

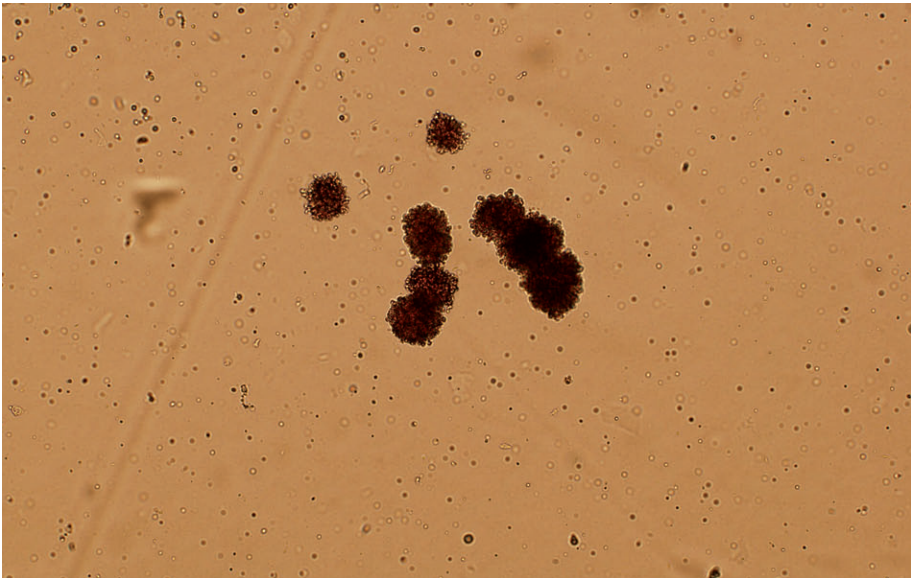
OD FYZIOLOGIE K MEDICÍNĚ

Integrace vědy výzkumu odborného vzdělávání a praxe

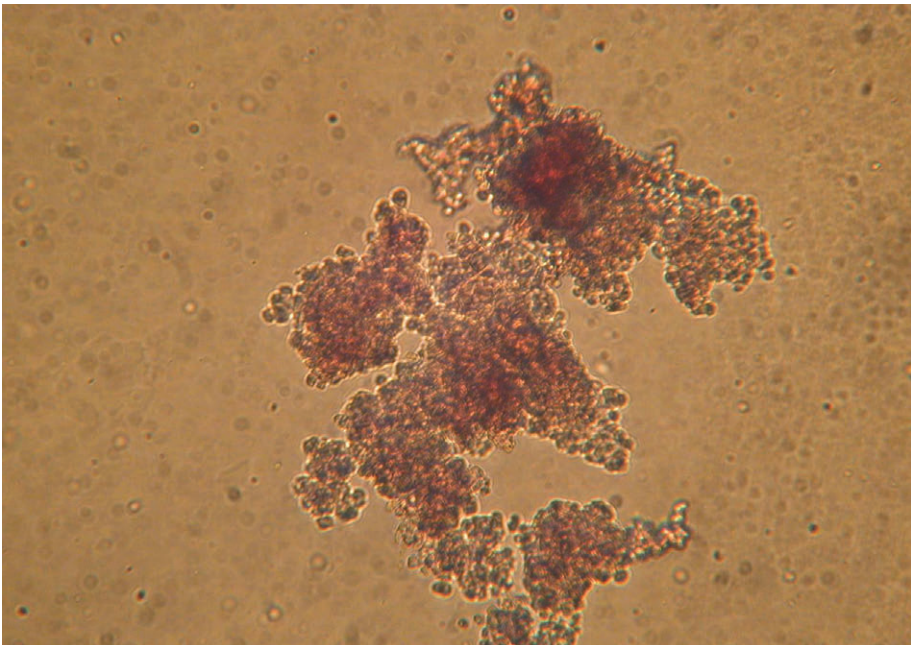


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ



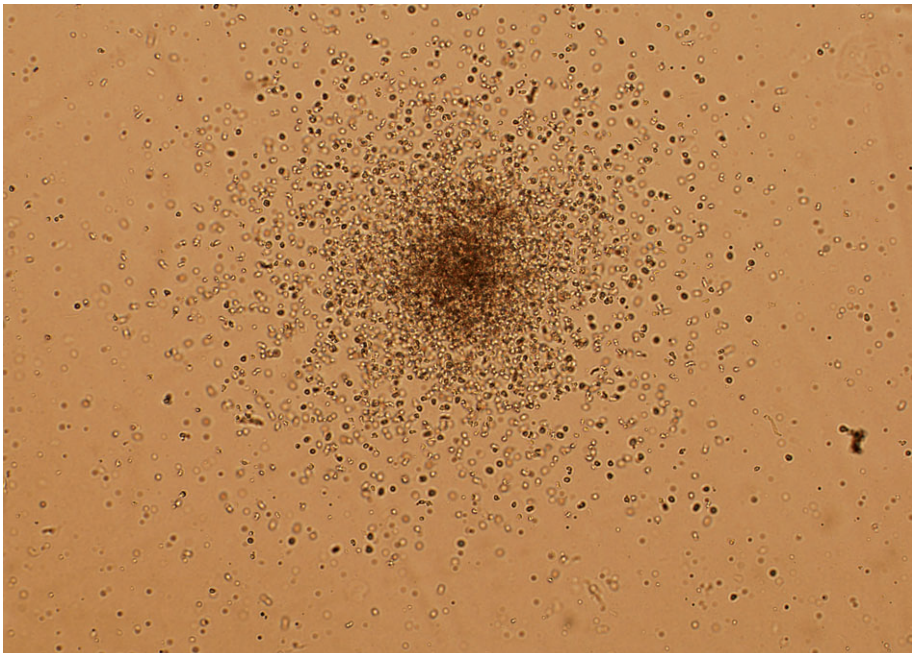


*Zvětšení 40x*

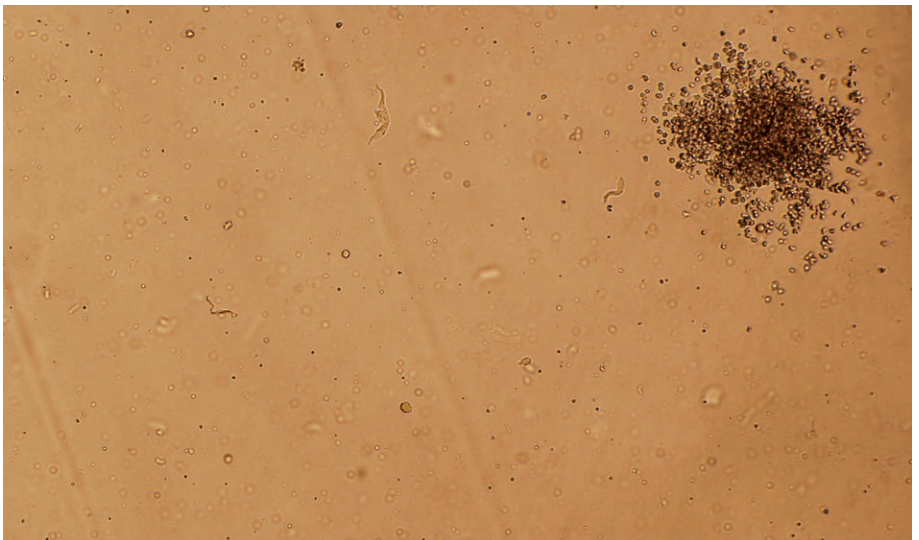


*Zvětšení 100x*

*Kolonie z erytroidních progenitorů (BFU-E) z lidské krve*

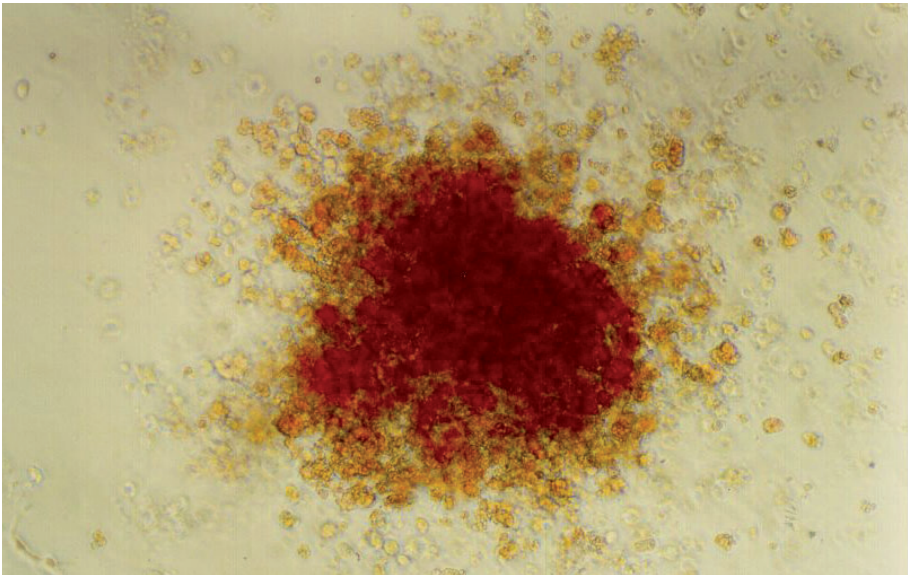


*Zvětšení 40x*

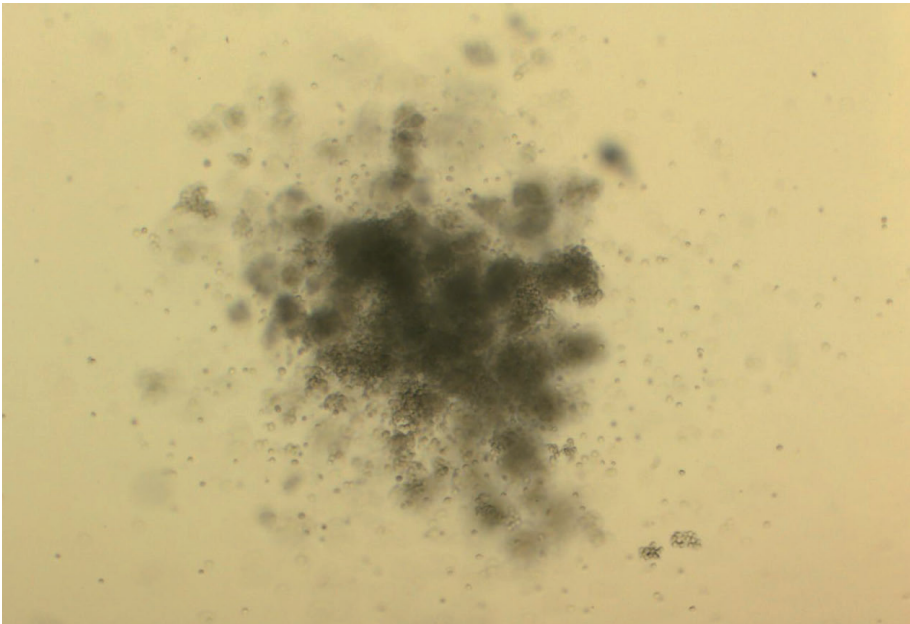


*Zvětšení 40x*

*Kolonie z granulocytárního-makrofágového progenitoru (CFU-GM, nahoře) a z makrofágového progenitoru (CFU-M, dole) z lidské krve*



*Zvětšení 100x*



*Zvětšení 100x*

*Kolonie z myších progenitorů: erytroidního z fetálních jater (nahore) a granulocytárního-makrofágového ze sleziny (dole)*

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

ÚSTŘEDNÍ KOMISE PRO OCHRANU ZVÍŘAT



## OSVĚDČENÍ

o způsobilosti podle § 17 zákona ČNR č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání,  
ve znění zákona č. 162/1993 Sb. (zákona č. 193/1994 Sb., zákona č. 243/1997 Sb.,  
nálezu US č. 30/1998 Sb.).

Jméno: \_\_\_\_\_

Rodné číslo: \_\_\_\_\_


absolvoval(a) kvalifikační přípravu a úspěšně složil(a) zkoušku podle zkušebního řádu  
schváleného dne 12. 5. 2000 ministrem zemědělství ČR  
(Věstník Ministerstva zemědělství České republiky, částka 3, číslo 3 - červen 2000)


Evid. číslo: **103/2004 – V2**

Datum: **9. 4. 2004**

  
děkan



  
předseda ÚKOZ

  
předseda zkušební komise



# CERTIFICATE

\_\_\_\_\_

has participated successfully in the intensive course on  
**RESEARCH, ANIMALS & WELFARE**

held in Jūrmala, Latvia from 9-19 October 1999

This course followed the FELASA curriculum (Category C) for the training of scientific personnel, as acknowledged by the European Union and the Council of Europe, and aims at providing competence as "a person planning or performing animal experiments"

The Course included 80 hours of lectures, demonstrations, hands-on work and group work, on basic and applied laboratory animal science and a written examination.

Jūrmala, 19 October, 1999

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Maisin', is positioned above the name of the chairman.

Professor Jean Maisin  
Universite Catholique de Louvain  
Brussels, Belgium  
Chairman Course Organization Group

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Vija Kluša', is positioned above the name of the local organizer.

Professor Vija Kluša  
University of Latvia  
Rīga, Latvia  
President of Balt-LASA  
Local organizer

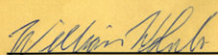


UNIVERSITY OF WASHINGTON  
INSTITUTIONAL ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE  
Animal Use Training

CERTIFICATE OF ACHIEVEMENT

This certifies that [REDACTED]  
successfully completed the following procedures

Biosafety Level 2 Vivarium	September 13, 2002
Cervical Dislocation Unanesthetized Mouse	April 23, 2002
Laws & Regulations Training	May 1, 2001
Modified SPF Orientation to 6th Floor	September 9, 2002
Mouse Animal Use Training Session	May 1, 2001
SPF Procedures Training	September 5, 2002

  
William Wheeler  
Animal Use Training Instructor

1/31/2003  
Date

*Osvědčení pro vybrané činnosti v souvislosti s laboratorními zvířaty vydávané na University of Washington, USA*

Mgr. Zuzana Koledová, Ph.D.  
Doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.  
Mgr. Monika Horváthová, Ph.D.  
RNDr. Ivana Fellnerová, Ph.D.

## **Kmenové buňky: využití ve výzkumu a klinické praxi**

Výkonný redaktor: Prof. RNDr. Tomáš Opatrný, Dr.  
Odborný redaktor: Doc. RNDr. Vladimír Divoký, Ph.D.  
Odpovědná redaktorka: Mgr. Jana Kreiselová  
Technický redaktor: Book's print s.r.o., I.P.Pavlova 69, Olomouc 772 00,  
www.booksprint.cz

Návrh obálky: Vlastislav Bič

Publikace je určena jako vzdělávací materiál pro účastníky projektu  
Od fyziologie k medicíně – integrace vědy, výzkumu odborného vzdělávání a praxe  
(CZ.1.07/2.3.00/09.0219)

Vydala Univerzita Palackého v Olomouci  
Křížkovského 8, 771 47 Olomouc  
www.upol.cz/vup  
e-mail: vup@upol.cz  
Olomouc 2011

Tato publikace neprošla redakční jazykovou úpravou.  
© Zuzana Koledová, Vladimír Divoký, Monika Horváthová, Ivana Fellnerová, 2011

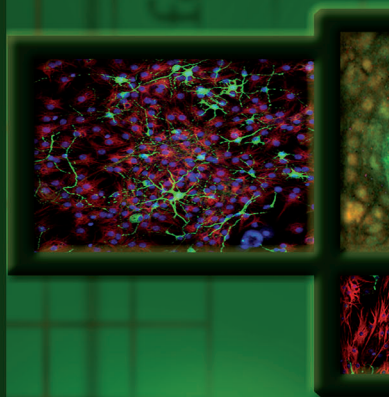
1. vydání

ISBN 978-80-244-2690-7

Neprodejné

Ústav biologie, Lékařská fakulta  
UP Olomouc

Katedra zoologie, Přírodovědecká  
fakulta UP Olomouc



**VYDALA UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI 2011**  
**ISBN 978-80-244-2690-7**