Centrum buněčné terapie a tkáňových

Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad

Centrum buněčné terapie a tkáňových náhrad (www.medicon.cz/cbt/) vzniklo v roce 2000 na základě hodnocení soutěže vypsané Ministerstvem školství a Rady vlády pro výzkum a vývoj jako centrum číslo LN00A065. V České republice existuje dobře rozvinutá platforma výzkumu v oblasti vývojové biologie, v oblasti syntézy biokompatibilních polymerů, v oblasti neurověd a transplantační chirurgie. Snaha o vytvoření Centra pro buněčnou terapii a tkáňové náhrady byla tedy logickým vyústěním předchozích vědeckých kontaktů mezi těmito obory. Hlavním cílem Centra je soustředit vybrané směry základního výzkumu v těchto disciplinách do vzájemně provázaného celku, poskytujícího experimentální základnu pro výzkum v oblasti buněčné terapie a tkáňových náhrad na kvalitativně nové úrovni, srovnatelné s úrovní dosahovanou ve vyspělých zemích EU a USA. Vedle výzkumu nových léčebných preparátů a postupů a jejich kvalifikovaného a včasného preklinického testování, si Centrum klade nejen vědecké cíle, ale současně je i koordinačním střediskem výzkumu a vývoje nových terapeutických přístupů, základnou pro systematickou postgraduální výchovu a místem intenzivní mezinárodní spolupráce.
Základní organizační jádro Centra, konzultační středisko a místo setkávání všech řešitelů, studentů a klinických pracovníků tvoří Ústav neurověd Univerzity Karlovy, 2. lékařské fakulty (klíčoví pracovníci centra) . Lokalizace Centra v prostorách Fakultní nemocnice v Motele (FNM) umožňuje operativní kooperaci s klinickými jednotkami. Dalšími institucemi, které se mimo pracovišť FNM, 1. a 2. lékařské fakulty UK účastní na plnění projektů centra, jsou některá oddělení Ústavu experimentální medicíny AV ČR, Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Institutu klinické a experimentální medicíny (IKEM), Laboratoř molekulární embryologie MZLU v Brně a Výzkumný ústav živočišné výroby v Uhříněvsi.
Základní strategie buněčné terapie a tkáňových náhrad je založena na využití kmenových buněk a zvládnutí procesů jejich cílené diferenciace. Vedle zdrojů samotných buněk, je k realizaci této myšlenky nutné vyvinout unikátní polymerní média, umožňující jak kultivaci a studium diferenciace buněk, tak i jejich pozdější implantaci. Dále je nutné vypracovat buněčné a zvířecí modely, na kterých bude možné ověřovat funkčnost a bezpečnost studovaných systémů. Souběžně je třeba rozvíjet nejvhodnější systémy z hlediska konkrétních klinických aplikací. V souladu s takto interdisciplinárním charakterem problému je projekt strukturován do čtyř vzájemně provázaných pracovních celků (workpackage). Tyto pracovní celky současně odpovídají převažující odbornosti a dosavadní zkušenosti týmů, které se k řešení projektu spojily, a charakterizují i obor činností, za které jsou jednotliví klíčoví pracovníci v programu Centra zodpovědní.

WP1: Buněčné zdroje

- Klíčovým slovem v experimentálním programu WP1 je kmenová buňka. Jako nezastupitelný model pro in vitro diferenciaci budou používány totipotentní embryonální kmenové buňky (ES, Embryonic Stem) myší. Výsledky získané s liniově specifickou diferenciací ES myší poskytnou teoretický základ pro následné experimenty na modelu miniaturního prasete. Jedinečný biomedicínský model miniaturního prasete také umožní izolaci orgánově specifických kmenových buněk (OS, Organ-specific Stem). Hlavní důraz bude kladen na vypracování kultivačních podmínek, které umožní efektivní propagaci nervových OS buněk a jejich následnou diferenciaci do všech buněčných typů nervové tkáně. Tento program bude realizován po etapách, ve vazbě na postup prací v ostatních tématických celcích WP2 a WP3, s využitím biospecifických polymerních nosičů. V delším výhledu se předpokládá, pokud to legislativní prostředí umožní, že experimentální výsledky a jedinečné zkušenosti získané s ES buňkami budou uplatněny i v práci s lidskými ES buňkami, určenými pro humánní medicínu.

WP 2: Biomateriály

- Pro studium proliferace a diferenciace buněk i pro praktickou realizaci myšlenky buněčné terapie je nutné připravit polymerní média, poskytující potřebný biokompatibilní substrát ve formě pevné záchytné struktury, která může být osídlena buňkami. Polymerní matrix v systému nahrazuje roli mezibuněčné hmoty (ECM) nebo bazální membrány (BM). Její interakce s buňkami může být do různého stupně specifická a komplexní, v závislosti na charakteru polymeru. Z hlediska chemických struktur budou proto připravovány polymery tří typů, podle komplexnosti a specifity možných interakcí s buňkami a organismem, a to (a) - materiály inertní; (b) - funkcionalizované a (c) - biodegradovatelné a se specifickou architekturou. Polymerní biomateriály budou připravovány v laboratořích Centra v ÚMCH AVČR. V různých fázích projektu budou biomateriály sloužit

jednak jako nástroj (WP1 - při přípravě buněčných zdrojů), jako vlastní předmět výzkumu (WP1 a WP3 - při studiu role specifických struktur a interakcí na funkční uplatnění biomateriálu v jednotlivých experimentálních modelech) i jako součást konečného preparátu určeného ke klinické aplikaci (WP4). V delším výhledu je cílem navrhnout takové systémy, v kterých biodegradovatelné polymery umožní, aby s postupem vývoje diferencované tkáně byla polymerní matrix resorbována a po splnění původní opěrné a stimulační funkce nahrazena vlastní, strukturalizovanou mezibuněčnou hmotou, produkovanou regenerovanou tkání.

WP 3: Experimentální modely

Postupně budou zaváděny zvířecí modely vybraných degenerativních a civilizačních chorob, na kterých bude možné testovat transplantované buňky a jejich účinnost při obnově funkce. Budou testovány faktory, na př. neurotrofiny (NF), které ovlivňují diferenciaci, přežívání a obnovu nervových buněk. Pouze pracoviště ÚN 2. LFUK a ÚEM AVČR jsou přístrojově vybavena a mají potřebné zkušenosti pro testování membránových vlastností transplantovaných buněk, difúzních a mofologických vlastností tkáně a vytváření funkčních celků:

WP3a:

Model buněčné terapie a tkáňových náhrad v CNS transplantací nervových buněk. Na zvířecích modelech stárnutí, neurodegenerativních onemocnění, zejména Parkinsonovy a Alzheimerovy choroby, hydrocephalu a poranění mozku a míchy budou vypracovány techniky implantace vhodných buněk a biokompatibilních hydrogelů do mozku a míchy myši a potkana a studována úloha růstových faktorů. Bude provedena transplantace kmenových buněk do zdravé nervové tkáně pokusných zvířat a po navození neurodegenerativních onemocní. Stupeň přihojení bude určen imunohistochemickými, morfologickými a NMR technikami. Elektrofyziologické vlastnosti transplanovaných buněk budou studovány také pomocí optických metod a dalších funkčních testů jako jsou behaviorální testy, studium dlouhodobé potenciace a vytváření paměťových stop .

WP3b:

Inkorporace proliferujících kmenových buněk do hydrogelů implantovaných do CNS pokusných zvířat bude studována morfologickými, imunologickými a molekulárně-biologickými metodami, elektrofyziologické vlastnosti kmenových buněk v hydrogelech a jejich změny metodou terčíkového zámku (patch-clamp) a difúzní vlastnosti hydrogelů s vpravenými kmenovými buňkami iontoforetickou metodou v reálném čase.

WP3c:

MR-spektroskopie (MRS) a MR-zobrazování (MRI) bude užito pro sledování biochemických funkcí orgánů určených pro transplantaci, potransplantačního stavu buněk a transplantovaných orgánů, sledovaných subjektů a pro studium biochemického a biofyzikálního chování buněčných a tkáňových kultur. Budou zkonstruovány speciální cívky pro MR spektrometr které umožní využívat MRS a MRI technologie u studovaných zvířecích modelů.

WP3d:

Model re-epithelizace kožních defektů u prasete. Studie bude zahrnovat vyvolání kožního defektu u miniaturního prasete, transplantaci imobilizovaných kultivovaných epidermálních kmenových buněk, hodnocení úspěšnosti dle klinických (rychlost re-epithelizace) a histologických kriterií.

WP3e:

Model migrace a diferenciace buněk neurální lišty u potkana. Bude studován význam neurotrofních růstových faktorů a jejich receptorů pro diferenciaci, přežívání a obnovu nervových buněk, exprese genů, které kódují růstové faktory, receptory růstových faktorů, které se uplatňují v řízení vývojových procesů a změny průběhu vývoje s cílem získávat nové poznatky o řízení diferenciace a morfogenese.

WP3f:

Vypracování technik použití kmenových buněk v biokompatibilních hydrogelech pro léčení transverzálních míšních lézí a mozkových lézí. Vyhodnocení poznatků a vypracování teoretických základů pro aplikaci buněčné terapie u vybraných onemocní a poškození nervového systému (Alzheimerova ch., Parkinsonova ch., poruch paměti a chování). Vyhodnocení možností MRS a MRI pro diagnostické, prognostické a funkční testy. Delší výhled. Pro pětileté období, které pokrývá předkládaný projekt Centra, je zapotřebí soustředit se především na vypracování spolehlivých zvířecích modelů, na kterých bude možné ověřit teoretické předpoklady buněčné terapie a tkáňových náhrad. Implementace získaných poznatků do klinické praxe v humánní medicíně bude vyžadovat delší časový horizont, zejména v tak náročné oblasti jakou je léčba neurodegenerativních onemocnění. Možnosti rozšíření vyvinutých postupů na lidské kmenové buňky a z nich diferencované tkáně, ať již z komerčně dostupných zdrojů (např. lidské ES od WiCell Res. Inst., Madison, WI, USA), nebo z domácích laboratoří (již ustavené vlastní linie lidských ES v ÚEM AVČR), budou sledovány v kontextu s vývojem legislativních a bio-etických norem ČR v této oblasti.

WP 4: Klinicky orientované modely a klinické testy

WP4a:

Příprava metody pro izolaci epidermálních kmenových buněk ze suspenze keratinocytů získaných po rozvolnění buněk epidermis. Klinické testování již dříve vyvinuté technologie transplantace epidermálních buněk kultivovaných na polymerních nosičích na kožní defekty (popáleninové trauma, diabetická noha)

WP4b:

Transplantace hepatocytů jako experimentální vyjádření snahy řešit nepoměr mezi počtem dárců a zvyšujícím se počtem kandidátů transplantace jater a problém urgentní transplantace u nemocných s fulminantním jaterním selháním. V rámci Centra vybudujeme pracoviště pro experimentální přenos hepatocytů na zvířecím modelu a vývoj bioreaktoru. Získání těchto zkušeností je nezbytné pro aplikaci metody v klinické praxi.

WP4c:

Transplantace inzulín produkující tkáně pro léčbu diabetu mellitu 1. typu. Jedním z nových a málo invazivních postupů je transplantace izolovaných Langerhansových ostrůvků, která by navíc mohla dovolit předchozí modifikaci transplantované tkáně tak, aby intenzivní trvalá imunosuprese nebyla nutná. Hlavní činnosti v této oblasti se soustředí na získání dostatečného množství vhodné tkáně a ochranu buněk před nespecifickým poškozením bezprostředně po implantaci. Zajištění propagace progenitorů beta-buněk pankreatu in vitro tak, aby zůstala uchována jejich schopnost produkovat inzulín v závislosti na koncentraci glukózy.
Prof. MUDr. Eva Syková, DrSc.