

Doložení souladu žádosti se zákonem č. 227/2006 sb., o výzkumu na lidských embryonálních kmenových buňkách a souvisejících činnostech, ve znění pozdějších předpisů

Žadatel: Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně

1. Zaměření žadatele

Mezinárodní centrum klinického výzkumu Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně (FNUSA-ICRC), fungující od roku 2012, je vědecko-výzkumné centrum nové generace a zároveň veřejné centrum špičkové lékařské péče zaměřující se na hledání nových metod, technologií a léčiv pro efektivní prevenci, včasnou diagnostiku a individualizovanou léčbu kardiovaskulárních a neurologických onemocnění. Ty se řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí v moderní společnosti. Těsné propojení lékařského výzkumu s klinickou péčí umožňuje přenášet výsledky nejnovějších výzkumů velmi rychle do klinické praxe, a trvale tak poskytovat pacientům přístup k nejmodernějším léčebným metodám a postupům. V současné době pracuje v tomto centru cca 300 zaměstnanců, převážně vědců, kteří působí ve 26 mezinárodních vědeckých týmech.

2. Plánovaný výzkum

Výzkumné cíle a experimentální přístupy a metody jsou podrobně popsány v přílohách č. 1 – „Žádost o povolení k výzkumu“ a č. 2 – „Komentář k experimentálním přístupům, které budou použity k dosažení vědeckovýzkumných cílů“. Plánovaný výzkum umožní žadateli získat zásadní vědecké poznatky, kterých nelze dosáhnout na *in vitro* modelech, pokusech na zvířatech či jinými obvyklými způsoby. Nabyté poznatky budou využity při vývoji diagnostických, preventivních či terapeutických postupů, které bude možno aplikovat na člověka. Odborná úroveň výzkumu je zajištěna kvalitním materiálně technickým vybavením, vysoce erudovanými odborníky a dlouhodobě rozvíjenými strategickými partnerstvími s českými a světovými vědeckými centry. Klíčová je spolupráce s Lékařskou fakultou Masarykovy univerzity, kde již řadu let probíhá výzkum na lidských embryonálních kmenových buňkách.

3. Předchozí výzkumná práce žadatele v oblasti využitelné ve výzkumu lidských embryonálních kmenových buněk

Vědecké publikace:

The Role of RNA Polymerase II Contiguity and Long-Range Interactions in the Regulation of Gene Expression in Human Pluripotent Stem Cells. Eiselleova L, Lukjanov V, Farkas S, Svoboda D, Stepka K, Koutna I. Stem Cells Int. 2019 Feb 3;2019:1375807. doi: 10.1155/2019/1375807. eCollection 2019.

Reprogramming of Adult Peripheral Blood Cells into Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Safe and Accessible Source of Endothelial Cells.

Simara P, Tesarova L, Rehakova D, Farkas S, Salingova B, Kutalkova K, Vavreckova E, Matula P, Matula P, Veverkova L, Koutna I. *Stem Cells Dev.* 2018 Jan 1;27(1):10-22. doi: 10.1089/scd.2017.0132. Epub 2017 Dec 11.

Hematopoietic Developmental Potential of Human Pluripotent Stem Cell Lines Is Accompanied by the Morphology of Embryoid Bodies and the Expression of Endodermal and Hematopoietic Markers. Tesarova L, Simara P, Stejskal S, Koutna I. *Cell Reprogram.* 2017 Aug;19(4):270-284. doi: 10.1089/cell.2016.0042. Epub 2017 Jun 20.

DNA double-strand breaks in human induced pluripotent stem cell reprogramming and long-term in vitro culturing. Simara P, Tesarova L, Rehakova D, Matula P, Stejskal S, Hampl A, Koutna I. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Mar 21;8(1):73. doi: 10.1186/s13287-017-0522-5.

The Aberrant DNA Methylation Profile of Human Induced Pluripotent Stem Cells Is Connected to the Reprogramming Process and Is Normalized During In Vitro Culture. Tesarova L, Simara P, Stejskal S, Koutna I. *PLoS One.* 2016 Jun 23;11(6):e0157974. doi: 10.1371/journal.pone.0157974. eCollection 2016.

The role of the endoplasmic reticulum stress in stemness, pluripotency and development. Kratochvilová K, Morán L, Paďourová S, Stejskal S, Tesařová L, Šimara P, Hampl A, Koutná I, Vaňhara P. *Eur J Cell Biol.* 2016 Mar-May;95(3-5):115-23. doi: 10.1016/j.ejcb.2016.02.002. Epub 2016 Feb 6. Review.

Cell cycle-dependent changes in H3K56ac in human cells. Stejskal S, Stepka K, Tesarova L, Stejskal K, Matejkova M, Simara P, Zdrahal Z, Koutna I. *Cell Cycle.* 2015;14(24):3851-63. doi: 10.1080/15384101.2015.1106760.

.Haematopoietic Developmental Potential Of Human Pluripotent Stem Cell Lines. Tesařová, L., Šimara, P., Stejskal, S., Koutná, I *Folia Biologica (Praha).* 2014, 60(S1), 90 - 94. Issn 0015-5500.

Generation Of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Genome Integrating Or Non-Integrating Methods Šimara, P., Tesařová, L., Paďourová, S., Koutná, I. *Folia Biologica (Praha).* 2014, 60(S1), 85-9. Issn 0015-5500.

Mutation Frequency Dynamics In Hprt Locus In Culture Adapted Human Embryonic Stem Cells And Induced Pluripotent Stem Cells Correspond To Their Differentiated Counterparts. Krutá, M., Seneklová, M., Raška, J., Salykin, A., Zerzánková, L., Pešl, M., Bartova, E., Franek, M., Baumeisterová, A., Košková, S., Hampl, A., Neelsen, K., Dvořák, P., Rotrekl, V. *Stem Cells And Development.* 2014, 23(20), 2443-2454. Issn 1547-3287.

Non-Coding Rnas In Pluripotency And Neural Differentiation Of Human Pluripotent Stem Cells. Lukovic, D., Moreno-Manzano, V., Klabusay, M., Stojkovic, M., Bhattacharya, S., Erceg, S. *Frontiers In Genetics.* 2014, 14(5), 132. Issn 1664-8021.

Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes As Research And Therapeutic Tools. Acimovic, I., Vilotic, A., Pešl, M., Lacampagne, A., Dvořák, P., Rotrekl, V., Meli, A. *Biomed Research International.* 2014, 2014(512831). Issn 2314-6133.

Chondrogenic Differentiation Of Mesenchymal Stem Cells In A Hydrogel System Based On An Enzymatically Crosslinked Tyramine Derivative Of Hyaluronan. Dvořáková, J., Kučera, L., Kučera, J., Švík, K., Foglarová, M., Muthný, T., Pravda, M., Němcová, M., Velebný, V., Kubala, L. *Journal Of Biomedical Materials Research : Part A*. 2014, 102(10), 3523-3530. Issn 1549-3296.

Aggregation And Defined Factors Allow Highly Uniform-Sized Embryoid Bodies And Functional Cardiomyocytes From Human Embryonic And Induced Pluripotent Stem Cells. Pešl, M., Acimovic, I., Příbyl, J., Hezová, R., Vilotic, A., Fauconnier, J., Vrbský, J., Kružliak, P., Skládal, P., Kára, T., Rotrekl, V., Lacampagne, A., Dvořák, P., Meli, A. *Forced Heart And Vessels*. 2014, 29(6), 834-846. Issn 0910-8327.

Adaptation To Robust Monolayer Expansion Produces Human Pluripotent Stem Cells With Improved Viability. Kunova, M., Matulka, K., Eiselleova, L., Salykin, A., Kubikova, I., Kyrylenko, S., Hampl, A., Dvořák, P. *Stem Cells Translational Medicine*. 2013, 2(4), 246-254. Issn 2157-6564.

Cell Cycle Regulation In Human Embryonic Stem Cells: Barta, T., Dolezalova, D., Holubcova, Z., Hampl, A. *Links To Adaptation To Cell Culture. Experimental Biology And Medicine (Maywood)*. 2013, 238(3), 271-275. Issn 1535-3702.

Decrease In Abundance Of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Causes Failure Of Base Excision Repair In Culture-Adapted Human Embryonic Krutá, M., Balek, L., Hejnova, R., Dobsakova, Z., Eiselleova, L., Matulka, K., Barta, T., Fojtik, P., Fajkus, J., Hampl, A., Dvořák, P., Rotrekl, V. *Stem Cells*. 2013, 31(4), 693-702. Issn 1066-5099.

Human Embryonic And Induced Pluripotent Stem Cells Express Trail Receptors And Can Be Sensitized To Trail-Induced Apoptosis. Vinarsky, V., Krivanek, J., Rankel, L., Nahacka, Z., Barta, T., Jaros, J., Andera, L., Hampl, A. *Stem Cells And Development*. 2013, 22(22), 2964-2974. Issn 1547-3287. If 4.202.

. Pluripotent Stem Cells And Gene Therapy. Šimara, P., Motl, J., Kaufman, D. *Translational Research*. 2013, 161(4), 284-292. Issn 1931-5244.

Nonlinear Regression Models For Determination Of Nicotinamide Adenine Dinucleotide Content In Human Embryonic Stem Cells. Salykin, A., Kuzmic, P., Kyrylenko, O., Musilova, J., Glatz, Z., Dvořák, P., Kyrylenko, S. *Stem Cell Reviews And Reports*. 2013, 9(6), 786-793. Issn 1550-8943.

Xenogeneic-Free Protocol For Isolation And Expansion Of Human Adipose Stem Cells For Clinical Uses. Escobedo-Lucea, C., Bellver, C., Gandia, C., Sanz-Garcia, A., Esteban, F., Mirabet, V., Forte, G., Moreno, I., Lezameta, M., Ayuso-Sacido, A., Garcia-Verdugo, J. *A Plos One*. 2013, 8(7). Issn 1932-6203

Micrnas Regulate P21 Protein Expression And The Dna Damage Response In Human Embryonic Stem Cells. Doležalová, D., Mráz, M., Bárta, T., Plevová, K., Vinařský, V., Holubcová, Z., Jaroš, J., Dvořák, P., Pospíšilová, Š., Hampl, A. *Stem Cells*. 2012, 30(7), 1362-1372. Issn 1066-5099.

Aktuálně řešené projekty:

další aktuálně řešené projekty

| | |
|--------------------|--|
| Název: | Translation Medicine |
| Reg. Číslo: | LQ1605 |
| Období řešení: | 2016 - 2020 |
| Zdroj financování: | MŠMT - Národní program udržitelnosti II |
| Název: | Podpora ověřování a komercializace výsledků výzkumu a vývoje ve Fakultní nemocnici u sv. Anny v Brně |
| Reg. Číslo: | TG02010048 |
| Období řešení: | 2016 - 2019 |
| Zdroj financování: | TACR |
| Název: | Lidské embryonální kmenové buňky pro klinické aplikace: derivace a charakterizace |
| Reg. Číslo: | NV18-08-00412 |
| Období řešení: | 2018 - 2021 |
| Zdroj financování: | AZV ČR |
| Název: | Mapování molekulární podstaty procesů stárnutí pro vývoj nových léčebných metod |
| Reg. Číslo: | CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000492 |
| Období řešení: | 2017 - 2022 |
| Zdroj financování: | OP VVV (Operační program Výzkum, vývoj vzdělávání) |
| Název: | Molekulární, buněčný a klinický přístup ke zdravému stárnutí |
| Reg. Číslo: | CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868 |
| Období řešení: | 2018 - 2023 |
| Zdroj financování: | OP VVV (Operační program Výzkum, vývoj vzdělávání) |

Dříve řešené projekty:

| | |
|--------------------|---|
| Název: | Fakultní nemocnice u sv. Anny v Brně - Mezinárodní centrum klinického výzkumu (FNUSA-ICRC) |
| Reg. Číslo: | CZ.1.05/1.1.00/02.0123 |
| Období řešení: | 2010 - 2015 |
| Zdroj financování: | OP VaVpI |
| Název: | FNUSA-ICRC - podpora rozvoje kvalitních týmů neurologického výzkumu a vývoje inicializací postdoktorských pozic |
| Reg. Číslo: | CZ.1.07/2.3.00/30.0043 |
| Období řešení: | 2013 - 2015 |
| Zdroj financování: | OP VK |
| Název: | FNUSA-ICRC Management: Zajištění špičkových lidských zdrojů do vedení Mezinárodního centra klinického výzkumu (ICRC Management) |

Reg. Číslo: CZ.1.07/2.3.00/42.0001
Období řešení: 2012 - 2015
Zdroj financování: OP VK

Název: HistoPARK – Centrum analýz a modelování tkání a orgánů
Reg. Číslo: CZ.1.07/2.3.00/20.0185
Období řešení: 2012 - 2015
Zdroj financování: OP VK

Název: ICRC Human Bridge - podpora kvalitních týmů výzkumu a vývoje pomocí vzniku postdoktorských pozic
Reg. Číslo: CZ.1.07/2.3.00/30.0023
Období řešení: 2012 - 2015
Zdroj financování: OP VK

Název: PRECEDENCE
Reg. Číslo: CZ.1.05/3.1.00/13.0292
Období řešení: 2012 - 2015
Zdroj financování: OP VaVpI

Název: ICRC PartnerNet- Partnerská síť výzkumné spolupráce
Reg. Číslo: CZ.1.07/2.4.00/31.0057
Období řešení: 2012 - 2014
Zdroj financování: OP VK

Další výzkumné projekty jsou uvedeny na <http://www.fnusa-icrc.org>.

4. Výklad souladu s podmínkami uvedenými v § 4 odstavce 2 zákona 227/2006

- *Výzkum slouží k získávání zásadních vědeckých poznatků nebo k rozšíření lékařských poznatků při vývoji diagnostických, preventivních nebo terapeutických postupů, které lze aplikovat na člověka*

Cílem výzkumu je zejména získání poznatků o:

- a) genetické stability lidských embryonálních kmenových buněk,
- b) molekulárních mechanismech řídících proliferaci a diferenciaci těchto buněk,
- c) možných způsobech indukce diferenciaci těchto buněk do specifických buněčných typů,
- d) osudu těchto buněk po jejich implantaci do živého organismu,
- e) možnostech monitorovat osud těchto buněk během života jedince.

Všechny výše uvedené cíle jsou stanoveny tak, aby vedly k získání experimentálních dat, která jsou zcela klíčová pro bezpečné a efektivní klinické použití lidských embryonálních kmenových buněk.

- *Podle současných poznatků vědy a techniky řeší výzkum otázky, které nelze řešit pouze na in vitro modelech se zvířecími buňkami nebo při pokusech na zvířatech*

Plánovaný výzkum si klade za obecný cíl poznat základní biologické vlastnosti lidských embryonálních kmenových buněk, a to jak v podmínkách *in vitro* tak *in vivo* po jejich implantaci experimentálním zvířatům, které jsou významné z hlediska jejich potenciálního biomedicínského využití. Ačkoli mnoho experimentálních dat již bylo v minulosti získáno s myšími embryonálními kmenovými buňkami, vzhledem k mnoha více či méně definovaným biologickým odlišnostem mezi myšími a lidskými embryonálními kmenovými buňkami, nemohou být tyto výsledky použity jako spolehlivý podklad pro medicínské použití tohoto unikátního buněčného typu. Díky značné genetické variabilitě v lidské populaci a nestabilitě linií při dlouhodobé kultivaci pak tyto experimenty nemohou být učiněny na pouze jedné vybrané linii lidských embryonálních kmenových buněk, ale musí být validovány na větším počtu takových buněčných linií.

- *Předpokládaného vědeckého přínosu nelze dosáhnout jiným způsobem*

Vědecký přínos plánovaného výzkumu je zcela závislý na experimentech na lidských embryonálních kmenových buňkách (viz předchozí odstavec).

- *Je zaručena odborná úroveň výzkumu, zejména odbornou publikační činností, patenty nebo přihláškami patentů a výročními zprávami*

Odborná úroveň výzkumu je zaručena expertízou klíčových vědeckých pracovníků, kteří budou výzkum řídit či se na něm jinak aktivně podílet. Tato expertiza je dokumentována v části 3. této přílohy formou výsledků předchozí a současné vědeckovýzkumné činnosti pracovišť, na nichž bude výzkum prováděn.

- *Výzkumný projekt je eticky přijatelný*

Výzkum bude prováděn na liniích lidských embryonálních kmenových buněk, které byly ustaveny z embryí (blastocyst) darovaných pro vědecké účely, na základě informovaného souhlasu podepsaného oběma partnery a bez finanční kompenzace. Výzkum nebude zahrnovat experimenty, které by měly za cíl tvorbu nového živého jedince. Výzkum bude schválen etickou komisí žadatele.

- *Jsou splněny ostatní podmínky uvedené v § 3 a 5*

Výzkum bude prováděn na liniích lidských embryonálních kmenových buněk, které byly získány z nadbytečných lidských embryí ve zdravotnickém zařízení v České republice, ve kterém se provádí asistovaná reprodukce podle zvláštního právního předpisu (viz. předchozí odstavec), případně na liniích lidských embryonálních kmenových buněk, které budou v souladu se zákonem 277/2006 Sb. a na základě povolení Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy importovány do České republiky.

Během výzkumu nebudou prováděny manipulace s buňkami, které by vedly k vytvoření nového jedince.

Linie a lidská embrya budou chráněna před jakoukoli neoprávněnou manipulací, která je v rozporu s právními předpisy. K tomuto účelu je každé pracoviště, na kterém bude výzkum prováděn, vybaveno závazným provozním řádem. Návrh provozního řádu je přílohou č. 4 této žádosti.

Práce na lidských embryonálních kmenových buňkách bude probíhat v rámci výzkumného projektu Translation Medicine (2016 – 2020) a také dalších výzkumných projektů, které jsou aktuálně ve fázi přípravy a jsou v souladu s výzkumnými cíli uvedenými v žádosti.

Lidské embryonální kmenové buňky budou kultivovány a expandovány v nediferencovaném stavu (Oh, et al, 2005), nebo budou pomocí diferenciačních protokolů (Reubinoff et al., 2000, Cheng L., et al. 2003, Itsykson et al. 2005) diferencovány v neurální prekursor (Matulka a kol., 2013), kardiomyocyty (Pesl a kol., 2014). Připravené buňky budeme používat ke studiu genomové stability, aktivity a kooperace opravných mechanismů DNA, ke studiu jejich metabolismu a ke studiu buněčného signálování. Připravené buňky budou transplantovány do imunodeficientních myší za účelem studia diferenciace a stability těchto buněk v hostitelském organismu. Dále budou kardiomyocyty diferencované z lidských embryonálních kmenových buněk transplantovány do prasečích srdcí (spolupráce s MU a VFU Brno) a s pomocí elektromapování a následné histologické analýzy bude analyzována jejich schopnost začlenit se a případně vytvořit pacemakerový uzel. Připravené buňky budeme značit superparamagnetickými nanočásticemi (Jendelová et al, 2004), aby bylo možné buňky sledovat po transplantaci do hostitele neinvazivními technikami magnetické rezonance. Po skončení pokusu (1, 2, 3 a 6 měsíců) budou tkáně zfixovány a pomocí druhově specifických a diferenciačních markerů (pomocí imunohistochemie, Western blotu a stereomorfologie) bude vyhodnocena integrace implantátu do tkáně příjemce, diferenciace implantovaných buněk a vliv implantátu na velikost léze. Dále budeme připravené buňky používat k modelování chorob tak, že do těchto buněčných linií budeme technologií CRISPS/CAS zavádět mutace, způsobující lidské choroby srdce a mozku.

Veškerá výzkumná činnost povede ke studiím využívajícím diferenciační potenciál embryonálních buněk k regeneraci a reparaci poškozeného myokardu. V žádném případě nebudou lidské embryonální buňky použity ke vzniku chimérních zárodečných buněk, k rozmnožování chimérních jedinců nebo k přenosu jader. Xenotransplantace lidských embryonálních buněk experimentálním zvířatům jsou legitimním způsobem, ve světě stále častěji využívaným (Ben-Hur, et al., 2004, Nistor, et al., 2005, Lerou and Daley 2005), jak rozšířit naše vědomosti o využití embryonálních kmenových buněk v regenerativní medicíně a jsou nedílnou součástí preklinických studií.

Reference uvedené v textu:

Oh S.K., Kim H.S., Park Y.B., Seol H.W., Kim Y.Y., Cho M.S., Ku S.Y., Choi Y.M., Kim D-W, Moon S.Y., 2005, Methods for expansion of human embryonic stem cells., Stem Cells. May;23(5):605-9

Reubinoff B. E., 2005, Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. Mol Cell Neurosci. 30 24-36.

Cheng L., Hammond Y., Ye Z., Zhan X., Dravid G., 2003, Human adult marrow stem cells support prolonged expansion of hESCs in culture. Stem Cells 21:131-142.

Itsykson P., Ilouz N., Turetsky T., Goldstein R. S., Pera M. F., Fishbein I., Segal M., Reubinoff B. E., 2005, Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. Mol Cell Neurosci. 30:24-36.

Matulka K., Lin HH, Hříbková H., Uwanogho D., Dvořák P., Sun YM., 2013, PTP1B is an effector of activin signaling and regulates neural specification of embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 5;13(6):706-19

Pesl M., Acimovic I., Pribyl J., Hezova R., Vilotic A., Fauconnier J., Vrbsky J., Kruzliak P., Skladal P., Kara T., Rotrekl V., Lacampagne A., Dvorak P., Meli AC. 2014, Forced aggregation and defined factors allow highly uniform-sized embryoid bodies and functional cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Heart Vessels*. Nov;29(6):834-46.

Jendelová P., Herynek V., Urdzíkova L., Glogarová K., Kroupová J., Bryja V., Andersson B., Burian M., Hájek M., Syková E., 2004, Magnetic resonance tracking of transplanted bone marrow and embryonic stem cells labeled by iron oxide nanoparticles in rat brain and spinal cord. *J. Neurosci. Res*, 76:232-243

Ben-Hur T., Idelson M., Khaner H., Pera M., Reinhartz E., Itzik A., Reubinoff B. E., 2004, Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats. *Stem Cells*. 22(7):1246-55.

Nistor G. I., Totoiu M. O., Haque N., Carpenter M. K., Keirstead H. S., 2005, Human Embryonic Stem Cells Differentiate into Oligodendrocytes in High Purity and Myelinate After Spinal Cord Transplantation. *Glia* 49:385–396

Lerou P. H., Daley G. O., 2005, Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Reviews* 19, 321–331.