

UPORABA MATIČNIH CELIC V HUMANI MEDICINI

Primož Rožman

Zavod RS za transfuzijsko medicino, Ljubljana

December 2008

REPRODUKTIVNO KLONIRANJE

Stara zaveza 1 Mz 2,22

1. Mojzesova knjiga (Geneza)

Poglavje 2

Psalm 22

“In gospod Bog stvari iz tistega rebra, ki ga je vzel človeku, ženo, in jo privede k človeku.”

REGENERATIVNA MEDICINA V SLOVENIJI 19. STOL.



(A painted bee-hive front)

MATIČNA CELICA - DEFINICIJA

nespecializirana celica zarodka, ploda ali odraslega, ki ima sposobnosti:

- neomejenega samoobnavljanja
- diferenciacije v specializirane celice
- plastičnosti

MATIČNA CELICA - ODKRITJE

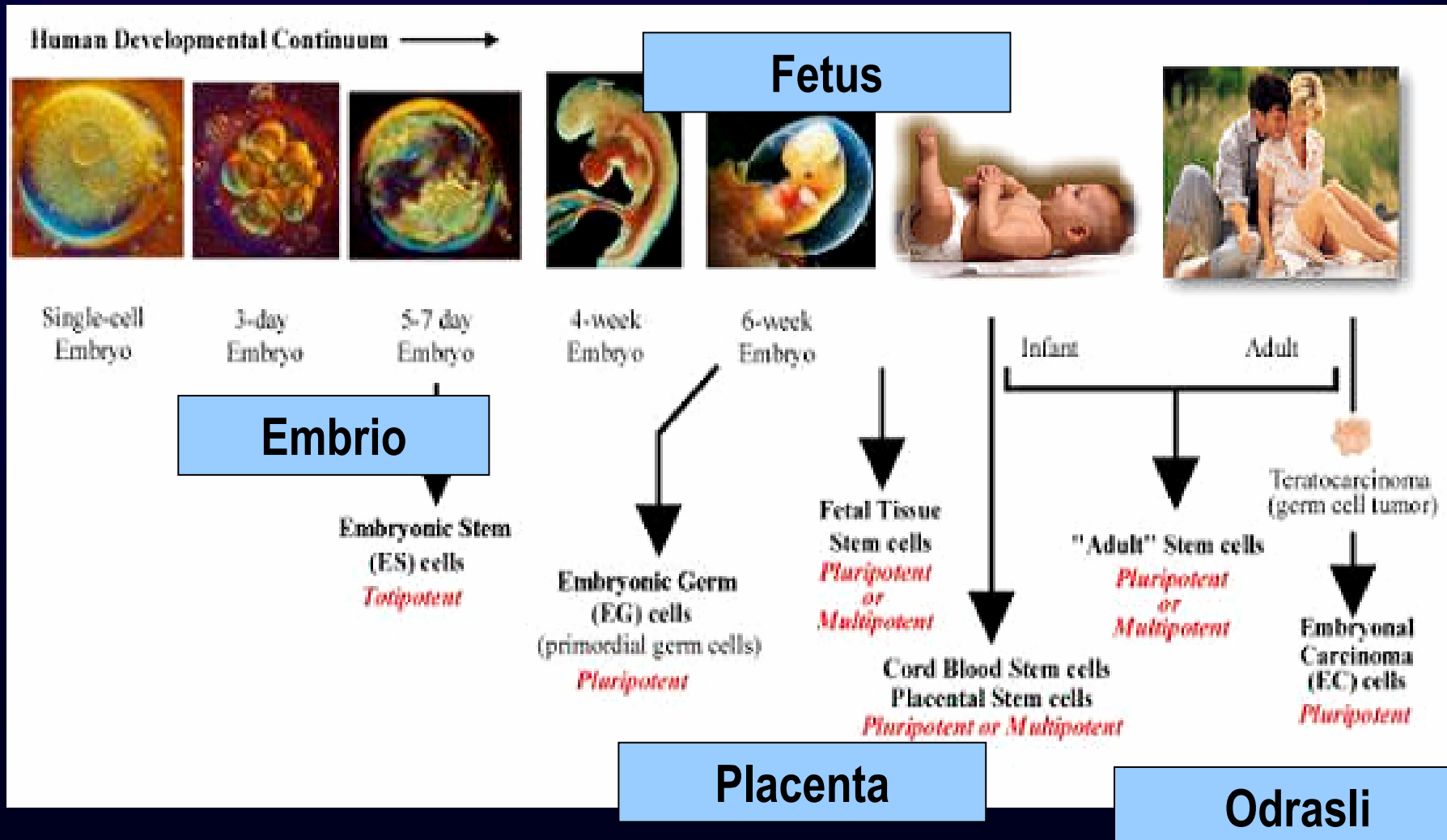
HSC: *Till JE and McCulloch EA. Radiat Res* **1961**;

MSC: *Friedenstein et al. Transplantation* **1974**

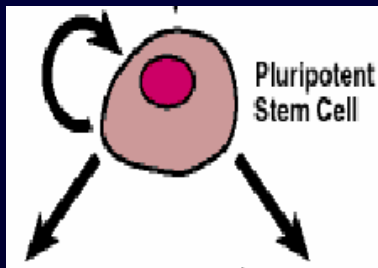
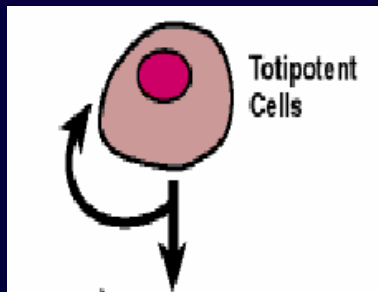
EPC: *(endoth. prog. Cell) Asahara et al.* **1997**

EMC: *Thomson JA et al.* **1998**

IZVOR MATIČNIH CELIC



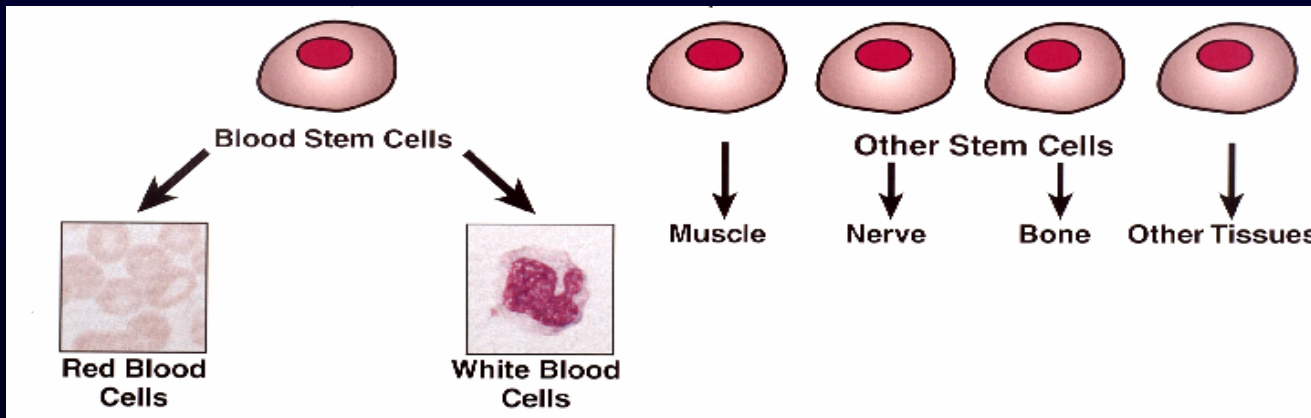
VRSTE MATIČNIH CELIC



• **Totipotentna** – dif. v vse celične vrste (>200), tudi v spermije in oocyte

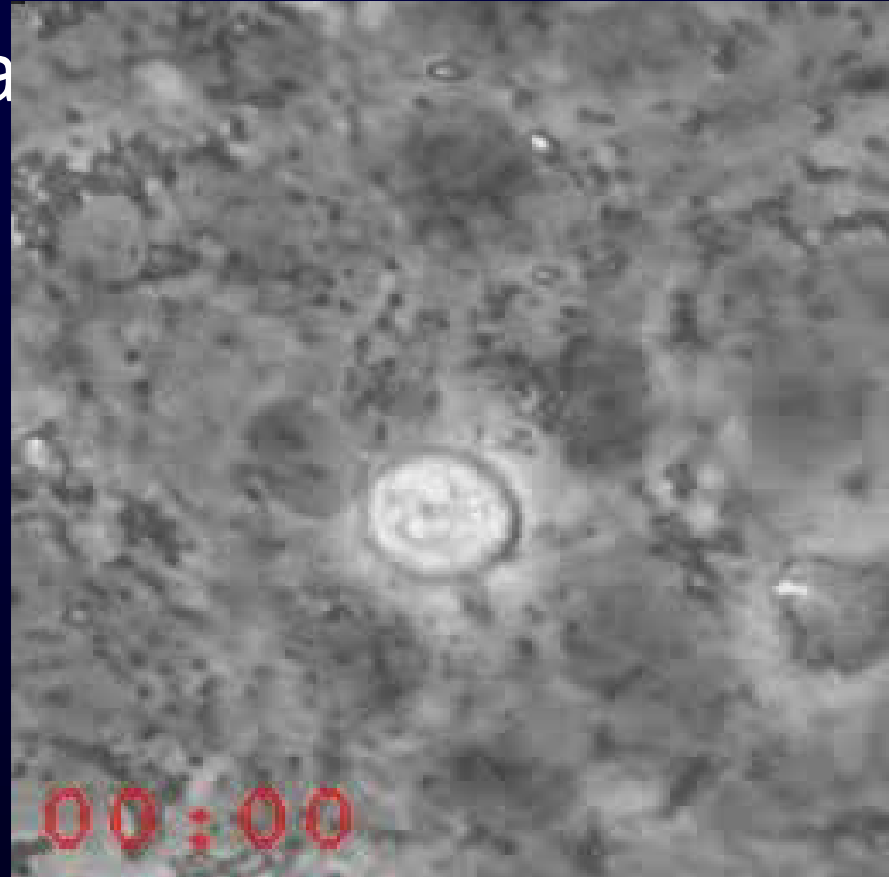
• **Pluripotentna** – dif. v vse klične plasti

• **Multipotentna** – (tudi oligo-) – v več kot eno celično vrsto – npr. mieloična KMC



LASTNOSTI MATIČNIH CELIC - 1

- Asimetrična delitev (identična MC + usmerjena prednica)
- Aktivne telomerase - omogočajo samoobnavljanje (dodajajo nukleotide na telomerne konce chr.)
- Popravljalni mehanizmi DNA
- Značilen set površinskih antigenov CD



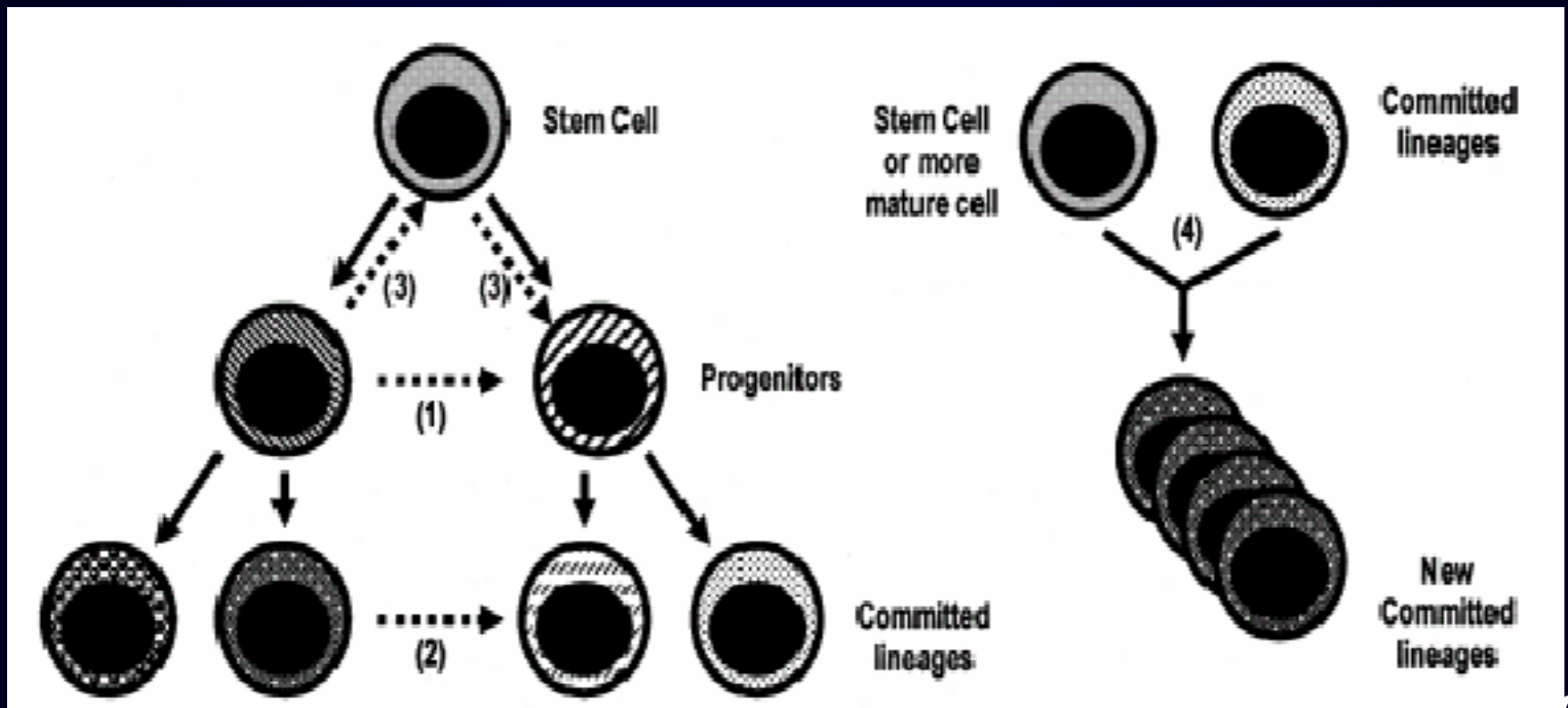
LASTNOSTI MATIČNIH CELIC - 2

- Diferenciacija: zmanjša sposobnost samoobnavljanja
- Plastičnost: sposobnost MC, da
 - se razvijejo v celice drugih nesorodnih tkiv
 - pridobijo fenotip celic drugega tkiva
 - preskočijo iz ene embrionalne zarodne linije v drugo

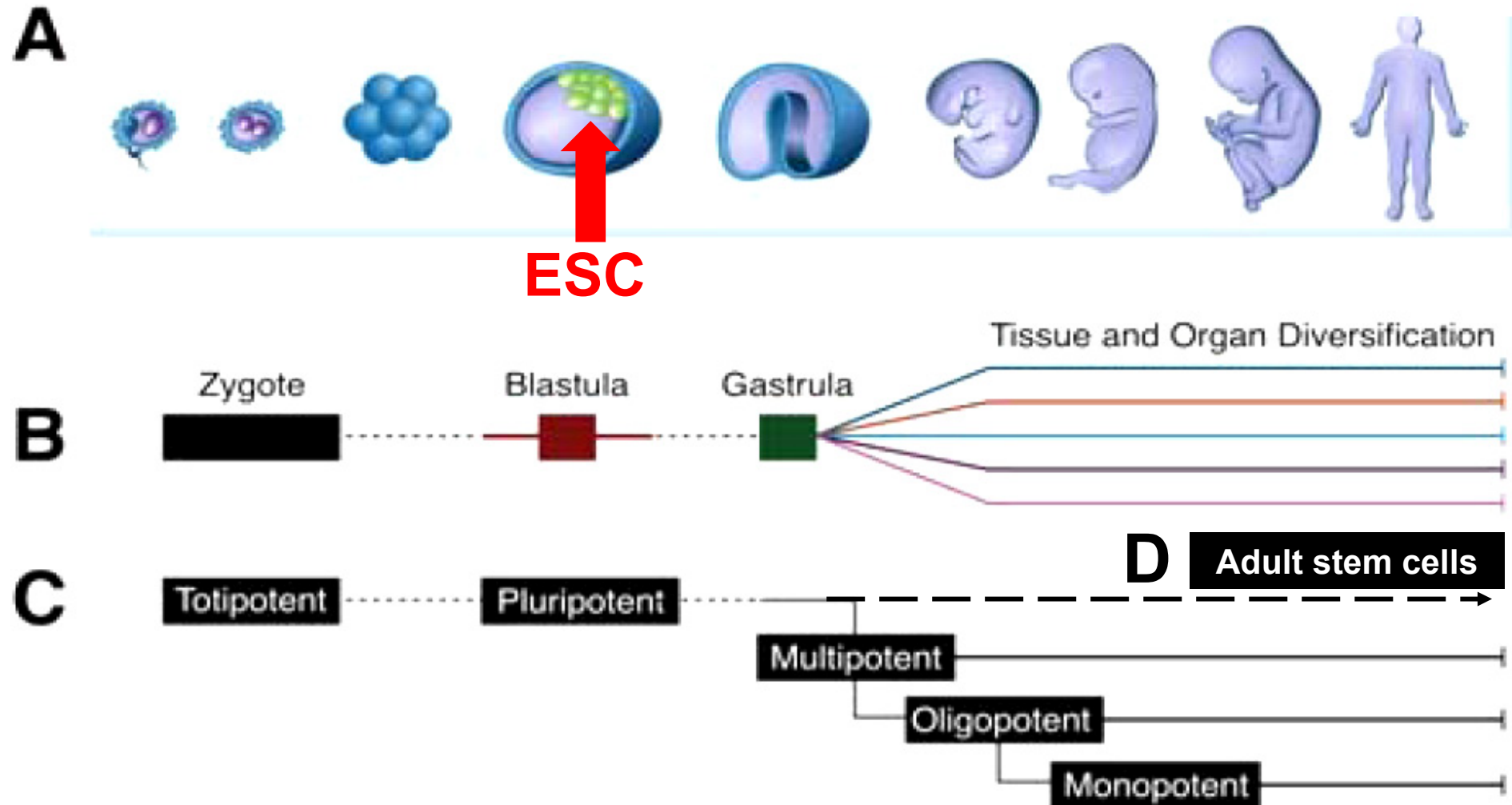
MEHANIZMI PLASTIČNOSTI

1. transdeterminacija
2. transdiferencijacija

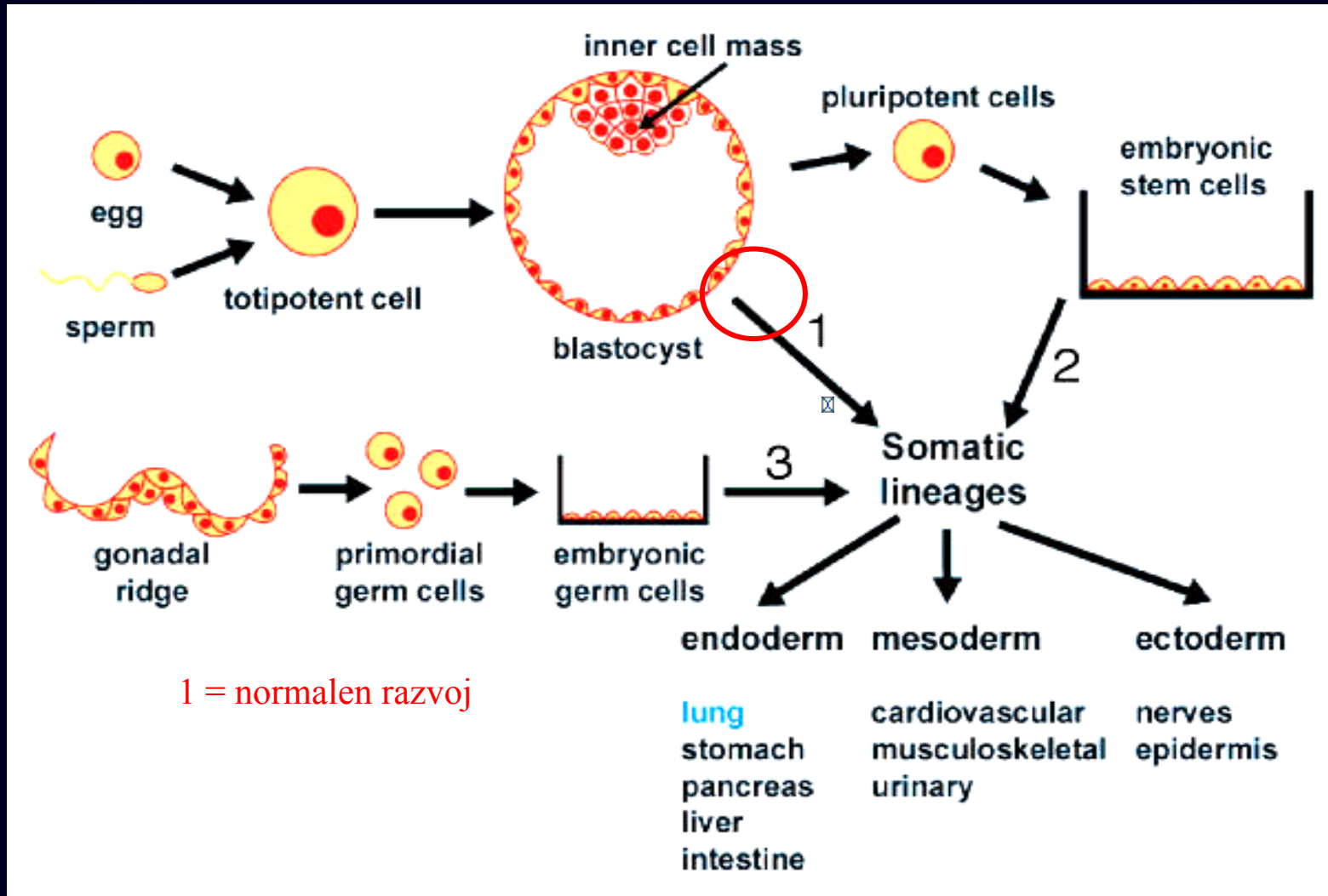
3. dediferencijacija
4. celična fuzija



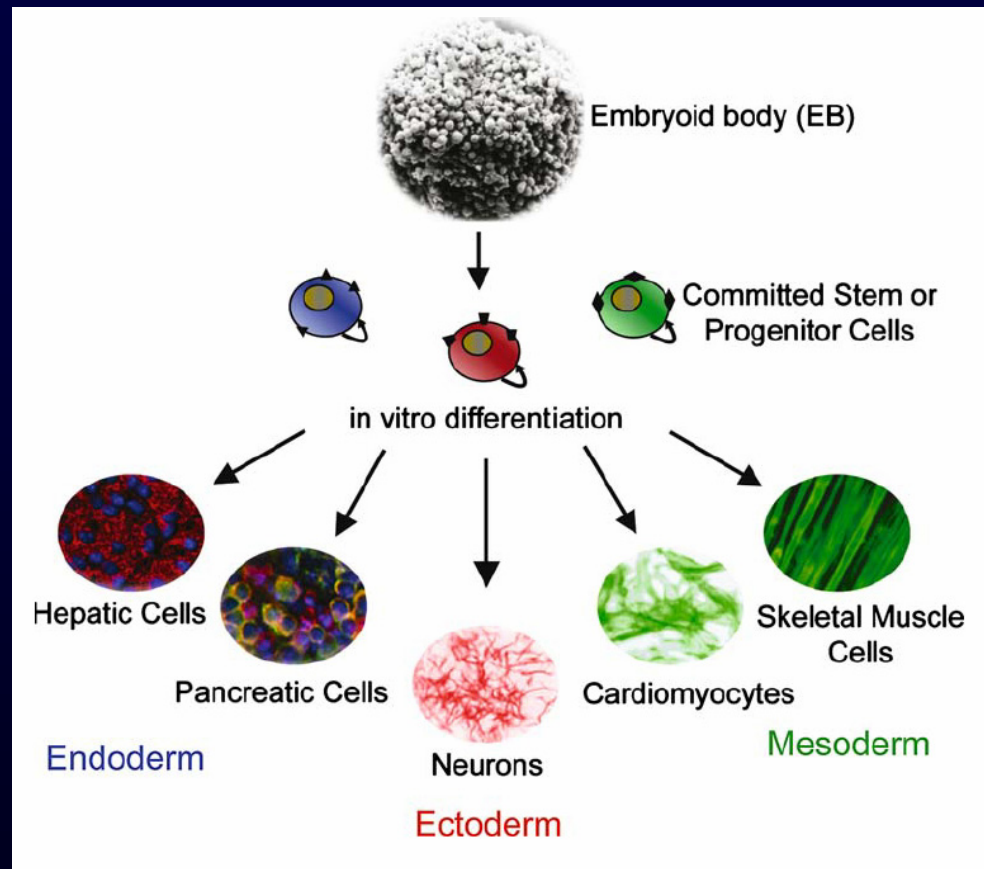
Pluripotenz



EMBRIONALNE MATIČNE CELICE (EMC)



ESM so edine pluripotentne celice



Yamanaka S et al.
Pluripotency of
embryonic stem
cells. Cell Tissue
Res Oct. 2007

MC V POPKOVNIČNI KRVI



MATIČNE CELICE ODRASLEGA

1. KM

1. Hemangioblast

- krvotvorna MC (CD34+) angl. HSC (CD34+)
- angioblastna MC (endotelij, žile)

3. Mezenhimska MC

4. Multipotentne celice odraslega

2. MC tkiv in organov

Diferenciacija MC *in vitro*

citokini in rastni faktorji

KMC	trombociti, eritrociti, levkociti	IL-1, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-11, G-CSF, GM-CSF, Epo, Tpo
MMC	osteoblasti	BMP-2, bFGF, β -glicerol-P, dexamethasone, askorbat
	hondrociti	TGF- β 3, dexamethasone
	živčne celice	EGF, BDNF, RA
	maščobne celice	dexamethasone, inzulin, indometacin
MAPC	nediferencirane	fibronektin, EGF, PDGF-BB, 2% FBS
	osteoblasti	fibronektin, dexamethasone
	hondrociti	TGF- β 1
	endotelijske celice	fibronektin, VEGF
	hepatocitom podobne celice	FGF-4, HGF

EMC odraslega (ESC-A)

- (i) Endothelial Progenitor Cells (EPCs) (Asahara et al. 1997; Shi et al. 1998),
- (ii) Mesenchymal Stem Cells (MSCs) (Peister et al. 2004; Prockop et al. 1997),
- (iii) Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPCs) (Jiang et al. 2002)
- (iv) Marrow-isolated Adult Multilineage Inducible (MIAMI) cells (D'Ippolito et al. 2004).
- (v) McGuckin et al. 2005 - Cell Prolif. cord blood-derived embryonic-like stem cells (CBE)
- (vi) Precursors of germ cells (oocytes and spermatogonial cells) in BM (Johnson et al. 2005; Nayernia et al. 2006).
- (vii) Very Small Embryonic-like Stem Cells (VSELs) (Kucia et al. 2006)
- (viii) Embryonic Stem Cells of an Adult (ESC-A) Virant Klun et al. 2008

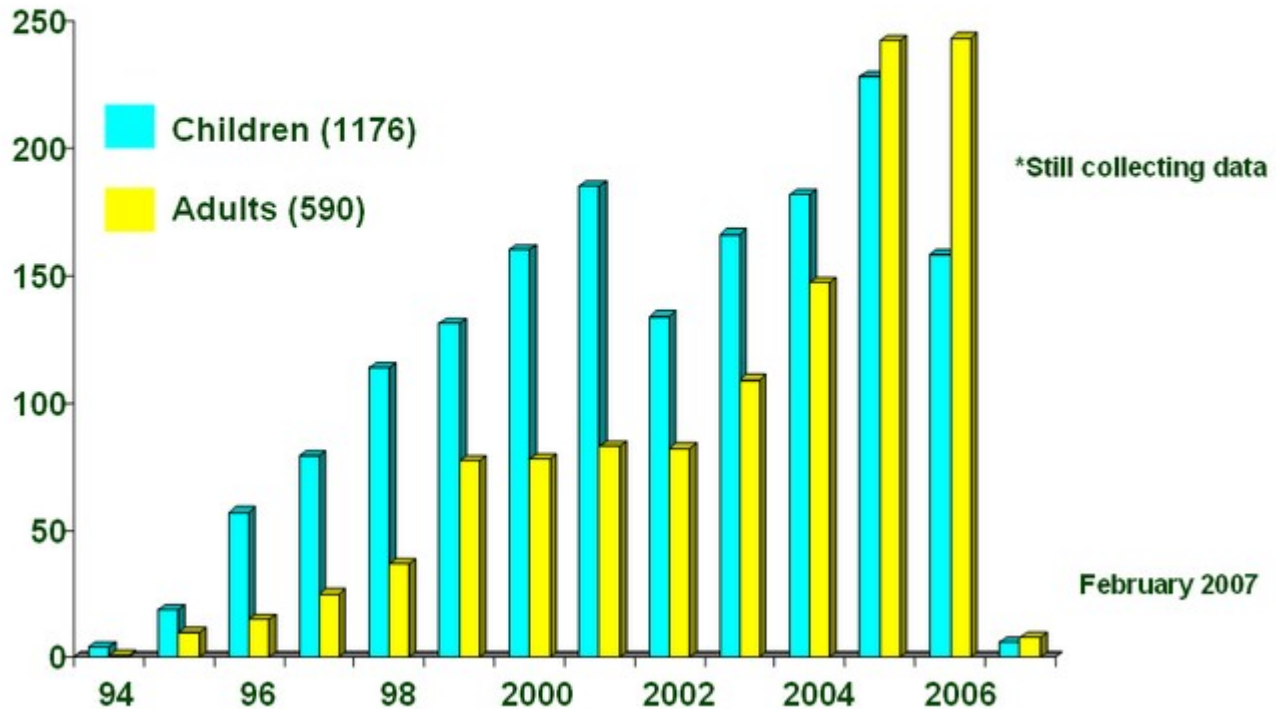
ZDRAVLJENJE S KRVOTVORNIMI MATIČNIMI CELICAMI

- Hematološke bolezni
- 1959 presaditev alogenskega KM bolniku z AML, †
- 1965 prva uspešna presaditev alogenskega KM, † GVHD
- **1988: prva presaditev popkovničnih KMC (dg. Fanconijeva anemija)**

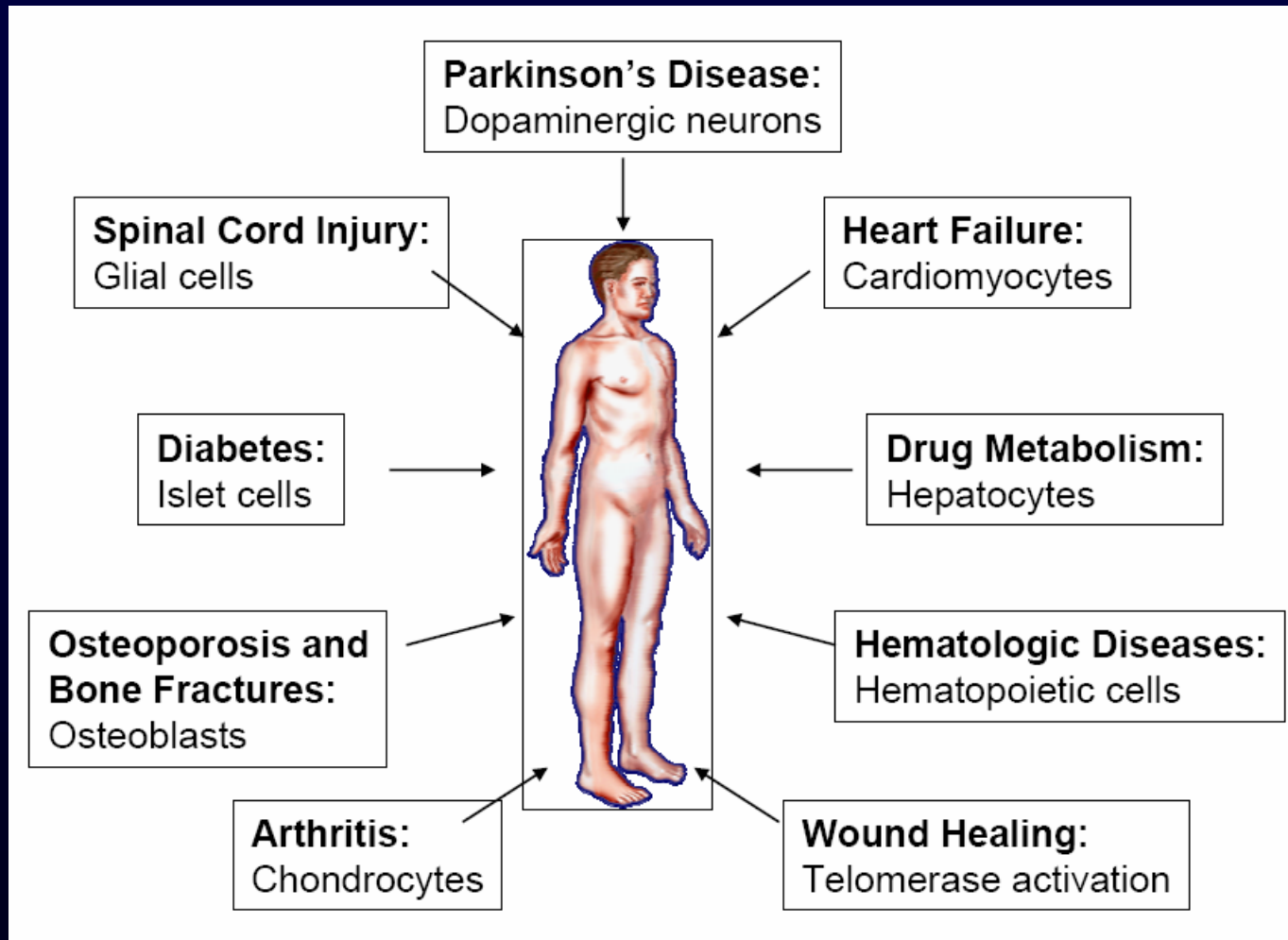
ZDRAVLJENJE S KMC IZ POPKOVNICE

- Akutne levkemije
- Aplastična anemija
- Limfomi
- Avtoimunske bolezni
- Kronične levkemije
- Dedne bolezni
- Tumorji

Single Unrelated CBT according to the recipient age/year reported to Eurocord



ZDRAVLJENJE Z DRUGIMI MC – REGENERATIVNA MEDICINA



KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC V HUMANI MEDICINI –

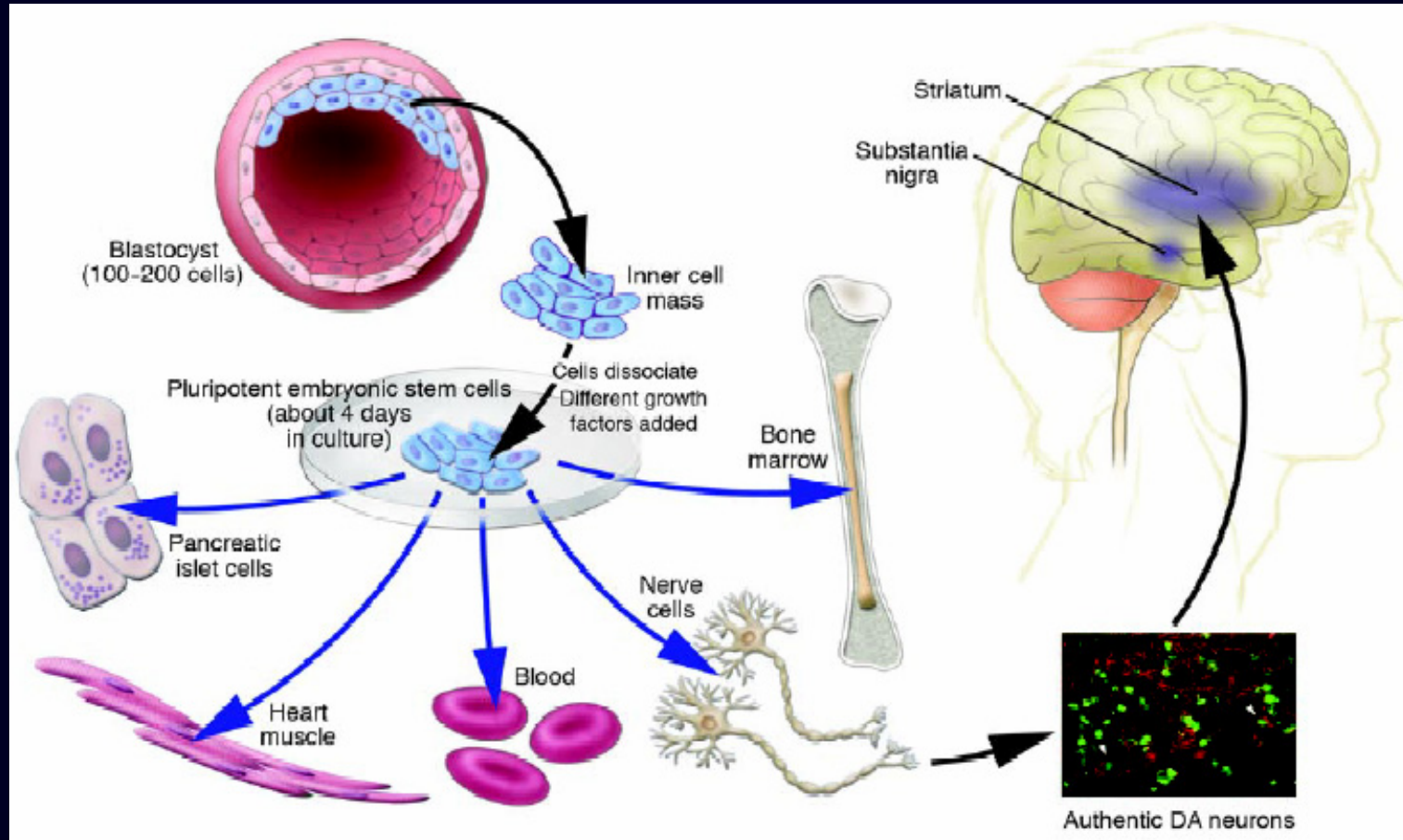
živčevje

Bolezni živčevja

- Alzheimerjeva bolezen
- Parkinsonizem
- Mielinizacija živčnih vlaken (Studer et.al. 1998; Watts et.al 2002)
- Nadomeščanje nevronov, astrocitov in celic glie po možganski kapi (Hofstetter, 2005)
- Poškodbe hrbtenjače – številni podatki študij na živalih

PARKINSONOVA BOLEZEN - študije

Diferenciacija EMC v nevrone, injiciranje v možgane podgan s Parkinsonovo bol., ↓ poškodb (Ben-Hur et.al. 2004)

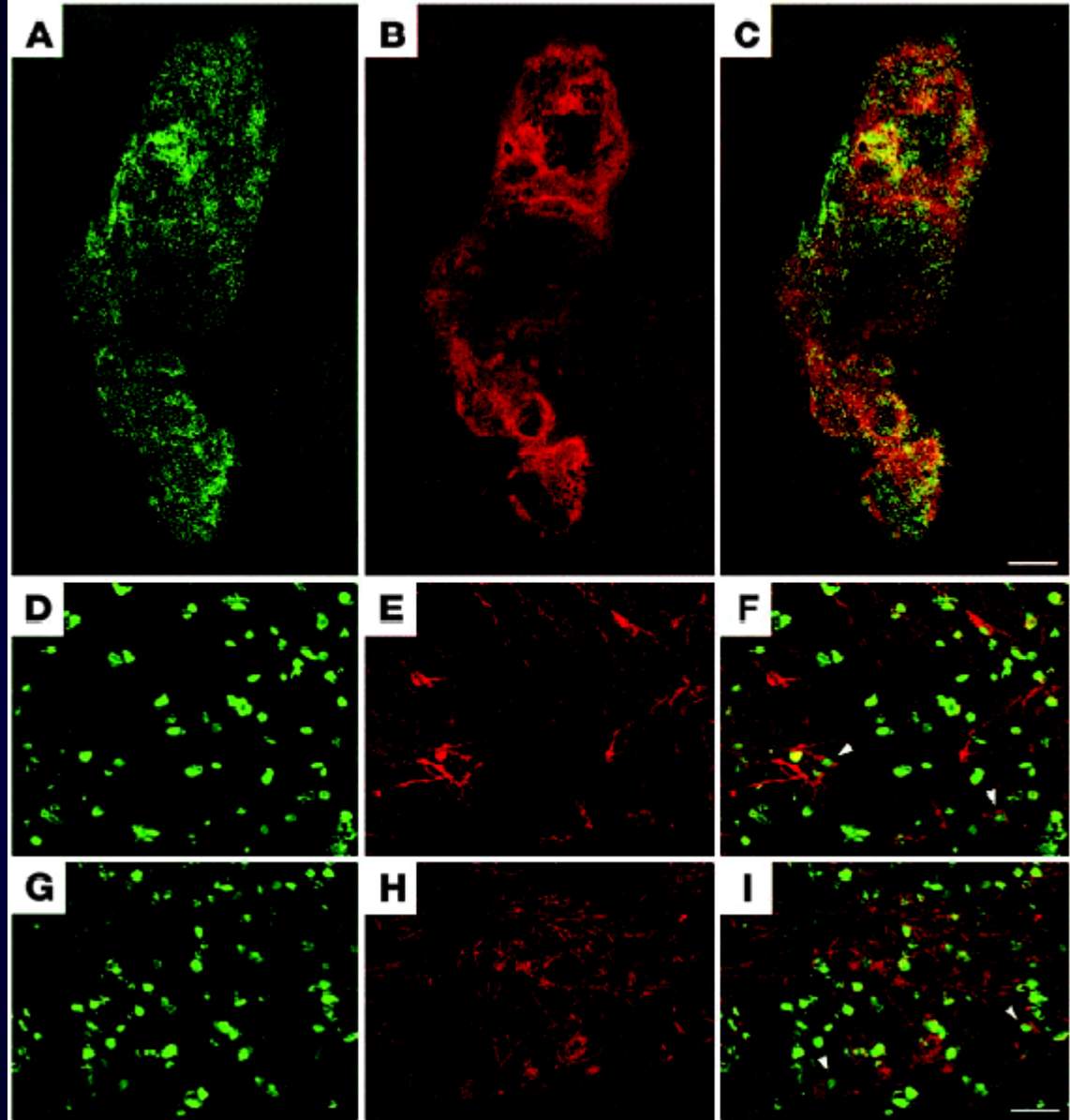


Survival of ES cell–derived DA neurons in the striatum.

(A–C) Grafted cells (BrdU-labeled, green) survived and differentiated into DA neurons (TH-positive, red) along the needle tract (merged image C).

Scale bar: 500 μm .

(D–I) Colocalization (arrows in F and I) of BrdU (D, F, G, and I, green) and TH (E and F, red) or DAT (H and I, red) shows that graft-derived cells have dopaminergic character. Scale bar: 50 μm .



Takagi Y. et al. Dopaminergic neurons generated from monkey embryonic stem cells function in a Parkinson primate model. *J. Clin. Invest.* 115:102-109, (2005)

ALZHEIMERJEVA BOLEZEN

- Presaditev EMC v poškodbe možganov, obnovljena zmožnost učenja in pomnenja pri primatih (Grigoryan et.al. 2000)

MS

Mielinizacija živčnih vlaken (Studer et.al. 1998; Watts et.al 2002)

CVI

Nadomeščanje nevronov, astrocitov in glia celic po možganski kapi (Hofstetter, 2005)

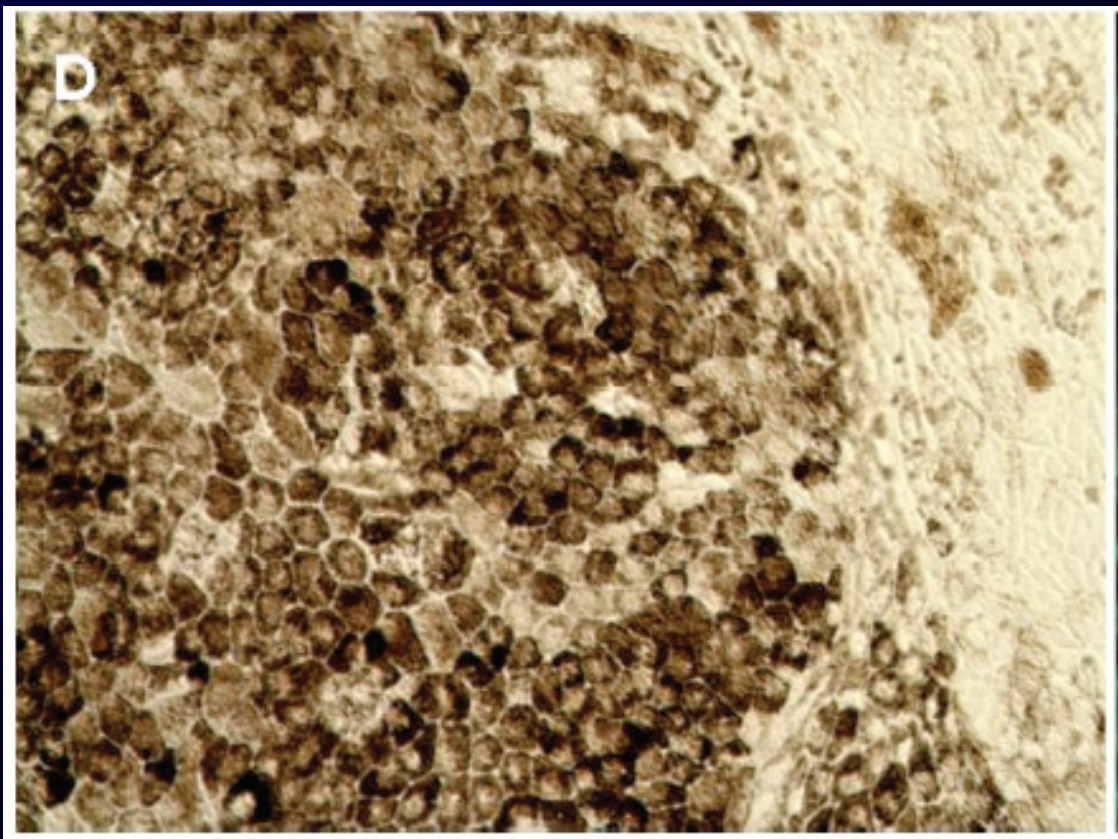
ZDRAVLJENJA VIDA S CELIČNO TERAPIJO

Izguba vida:

starost, poškodbe živca, izgube pigmentnih celic ali povezav teh celic z drugimi - najpogostejša nevrodegenerativna motnja

Vir celic:

- celice očesne mrežnice
- Schwanove celice
- matične celice
(UMC, MMC, EMC)





Superman



Actor Christopher Reeve dies

Reeve had become an advocate for spinal cord injury research. Superman star Christopher Reeve, who lobbied for medical research after being paralysed in a fall nine years ago, has died aged 52.

Reeve was paralysed in 1995 when he broke his neck after being thrown from a horse. He later became an advocate for spinal cord injury research.

F.D.A. Approves a Stem Cell Trial

By ANDREW POLLACK

Published: January 23, 2009



*the federal government will allow the world's first test in people of a therapy **derived from human embryonic stem cells**.*

*Geron's trial with embryonic stem cells will involve people with **severe spinal injuries**, and will mostly test the therapy's safety.*

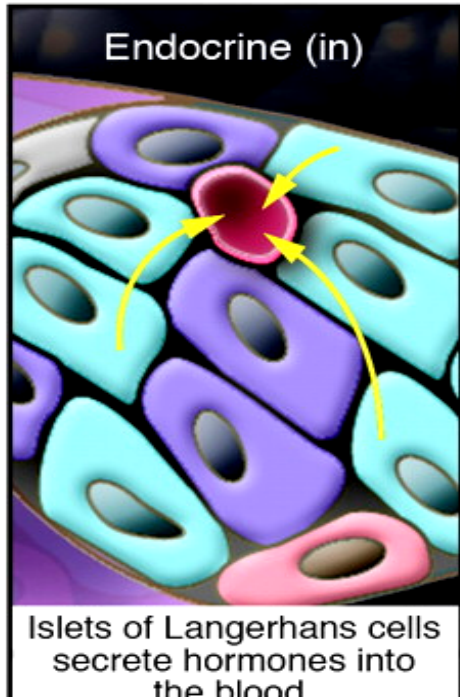
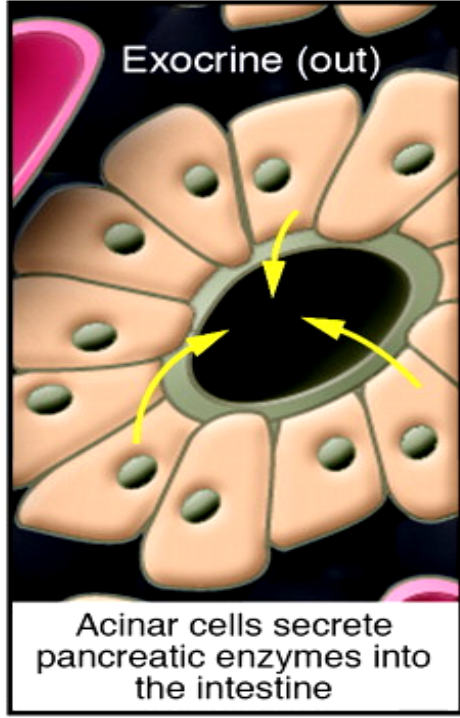
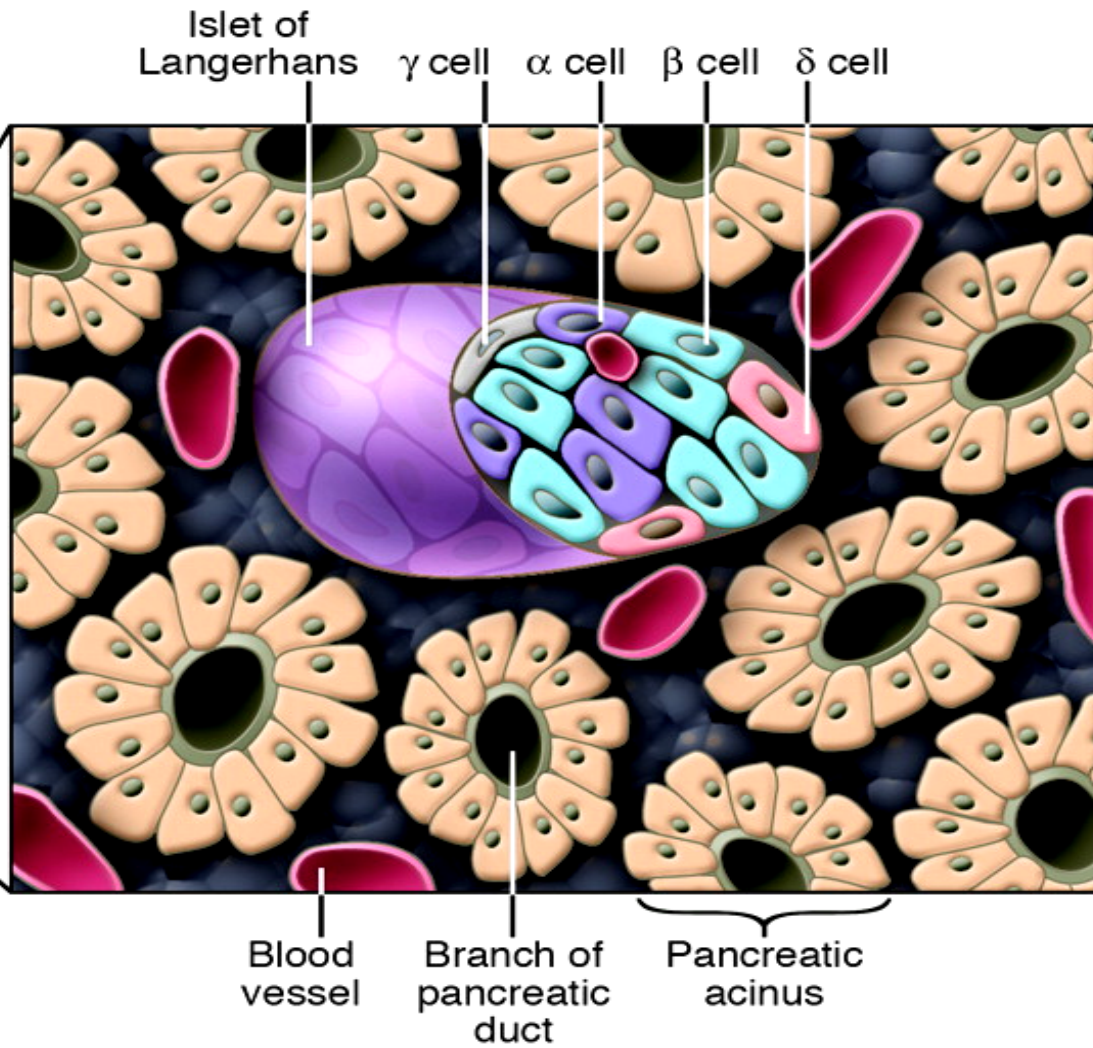
Federal drug regulators said that political considerations had no role in the decision. Nevertheless, the move coincided with the inauguration of President Obama, who has pledged to remove some of the financing restrictions placed on the field by President George W. Bush.

KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC V HUMANI MEDICINI –

diabetes

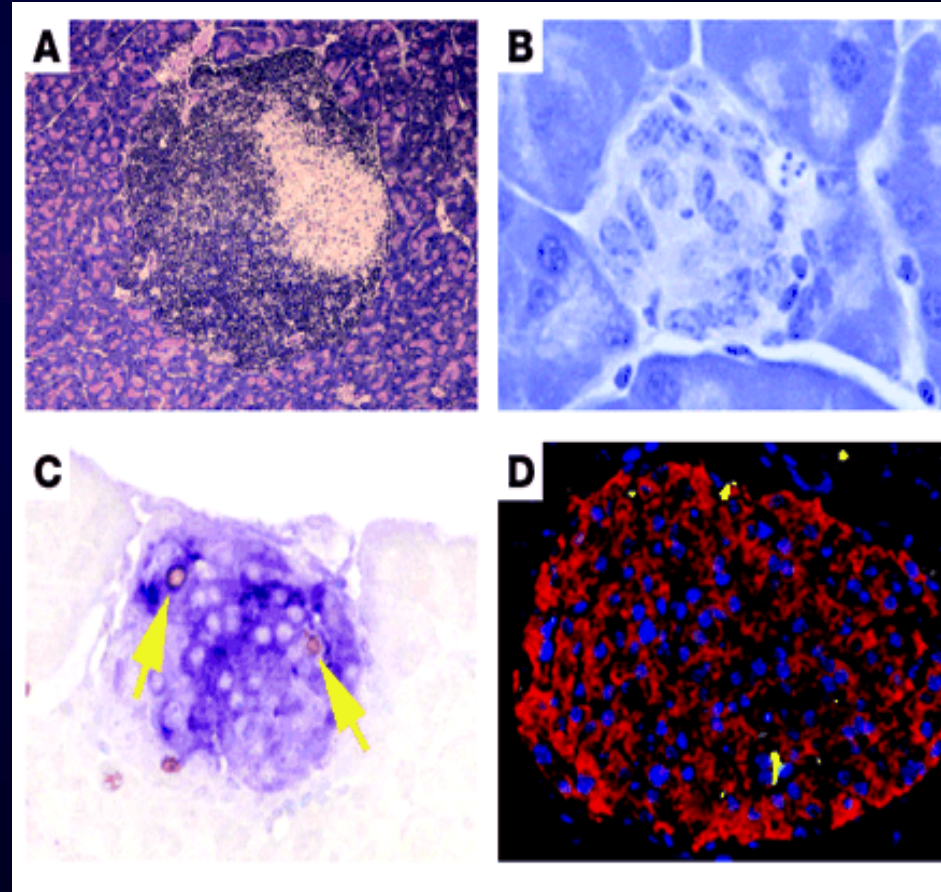
DIABETES

- In vitro in in vivo gojenje aktivnih Langerhansovih otočkov
- Ekspanzija β celic (pre malo učinkovito)
- Ekspanzija MC, predvsem EMC (Soria et.al. 2001) in KMC (Chen et.al. 2004)



Regeneracija β -celic v NOD miših z diabetesom

- A) Infiltracija limfocitov T v Langerhansove celice - po 20 tednih 85% miši kazalo znake diabetesa (200x povečava)
- B) Uspešna presaditev MC kostnega mozga – ni znakov avtoimunske aktivnosti, ni znakov tvorbe inzulina (400x povečava)
- C) Rumene puščice kažejo deleče se celice, ki proizvajajo inzulin (modro) (400x povečava)
- D) 3-4 tedne po presaditvi KM so miši obnovile produkcijo inzulina (rdeče celice) (200x povečava)



KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC V HUMANI MEDICINI –

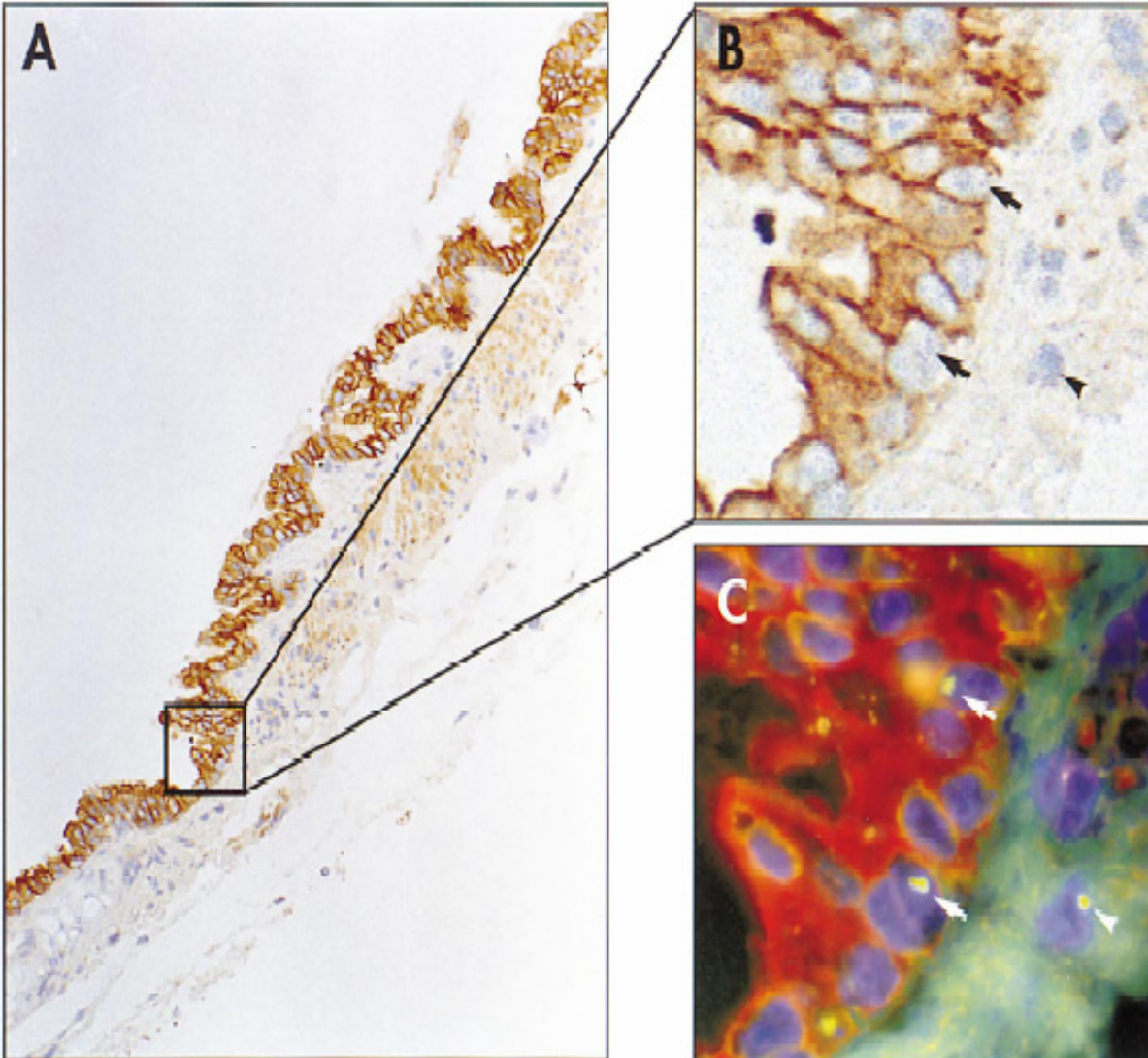
pljuča

Table 2: Major lung diseases potentially treatable by stem cell manipulation.

Disease Category	Injured, Depleted, or Deranged Cellular Compartment*	Therapeutic Goals
Congenital lung hypoplasia Chronic lung disease of prematurity Pulmonary emphysema	Alveolar epithelium, Interstitial fibroblast, Capillary endothelium,	Generate alveolar septa Restore complex three dimensional structure
Neonatal RDS Adult RDS	Alveolar epithelium, Capillary endothelium	Enhance surfactant production Reinforce endothelial and epithelial barriers
Pulmonary fibrosis	Alveolar epithelium, Interstitial fibroblast	Prevent alveolar epithelial loss Inhibit fibroblast proliferation
Asthma	Airway epithelium, Myofibroblasts, Airway smooth muscle	Create an anti-inflammatory environment Inhibit airway wall remodeling Inhibit smooth muscle hypertrophy and hyperplasia
Cystic fibrosis	Airway epithelium	Deliver functional CFTR
Bronchiolitis obliterans	Airway epithelium	Reinforce the epithelium against toxic, viral or immunologic injury
Lung cancer	Epithelium	Detection, monitoring or treatment based on molecular regulation of stem cell proliferation and differentiation

RDS = respiratory distress syndrome, CFTR= cystic fibrosis transmembrane conductance regulator *Each cell type listed in this column is affected in all of the specific conditions listed in the left hand column

Imunohistokemično barvanje in FISH analiza sapnic



(A in B) svetlobni mikroskop, obarvano imunohistokemično z Ab Cam5.2, ki se specifično veže na citokeratine 8, 18, in 19.

Pozitivno obarvane epitelne celice so rjavkaste, kar je posledica naknadnega barvanja z hematoksilinom.

Puščica: epitelne celice z Y kromosomom dajalca - . ne izražajo citokeratinov, verjetno MC darovalca, ki so se naselile v epitelu sapnic.

(C) Fluorescenčna mikroskopija: s FISH tehniko označeni Y kromosomi (rumeno zeleno obravani) znotraj jedra celic (barvano z DAPI).

KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC V HUMANI MEDICINI

srce in ožilje

SRCE IN MC

- Bolezni srca in ožilja najpogostejši vzrok smrti
- Ireverzibilna poškodba srca po 20' ishemije
- Poškodovani kardiomiociti, vaskularne celice, fibroblasti, živci
- Nekroza, nato vnetje (N, MF), granulacija in brazgotina (2 mes.)
- Tanjšanje stene in dilatacija vetriklov, kontraktilna disfunkcija

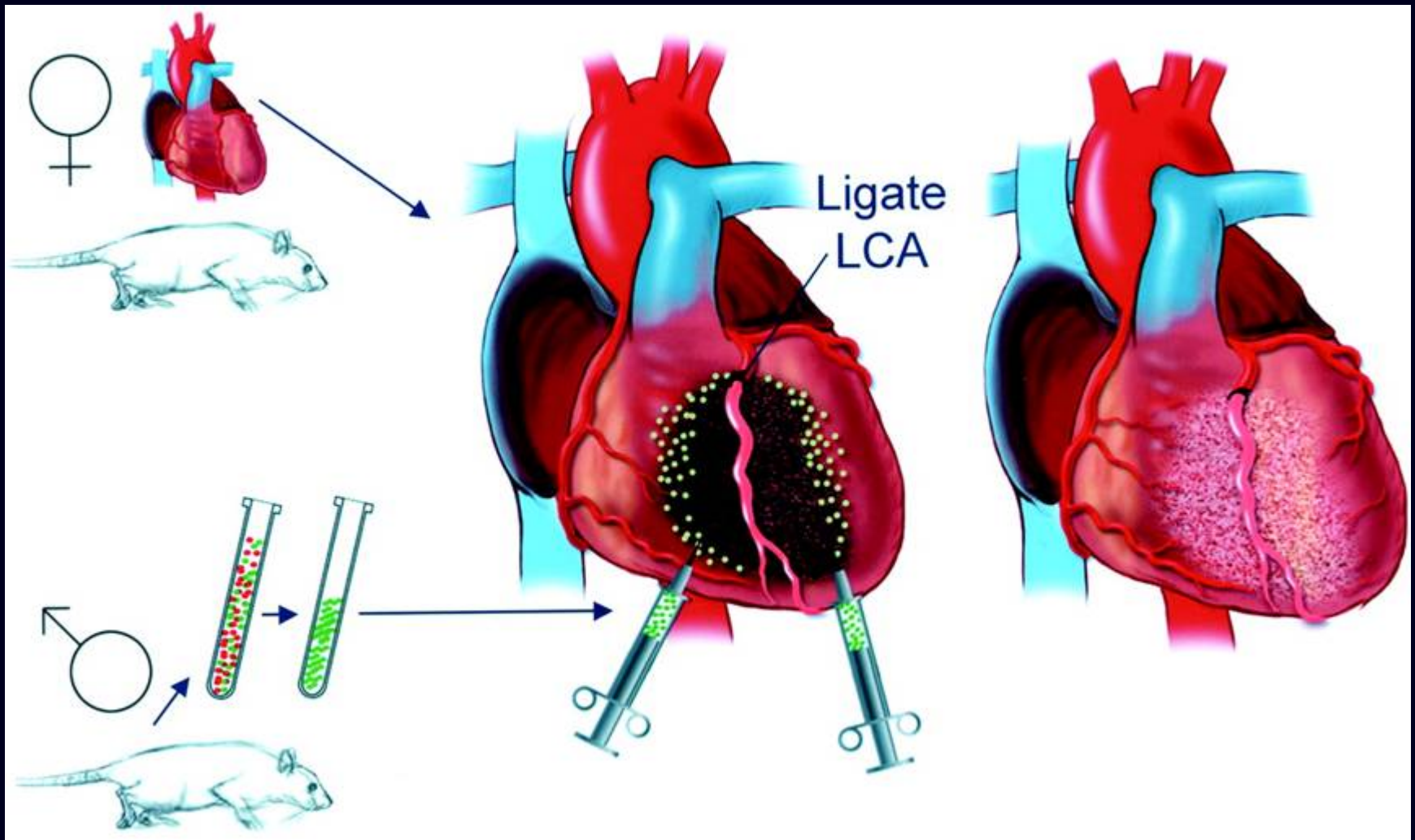
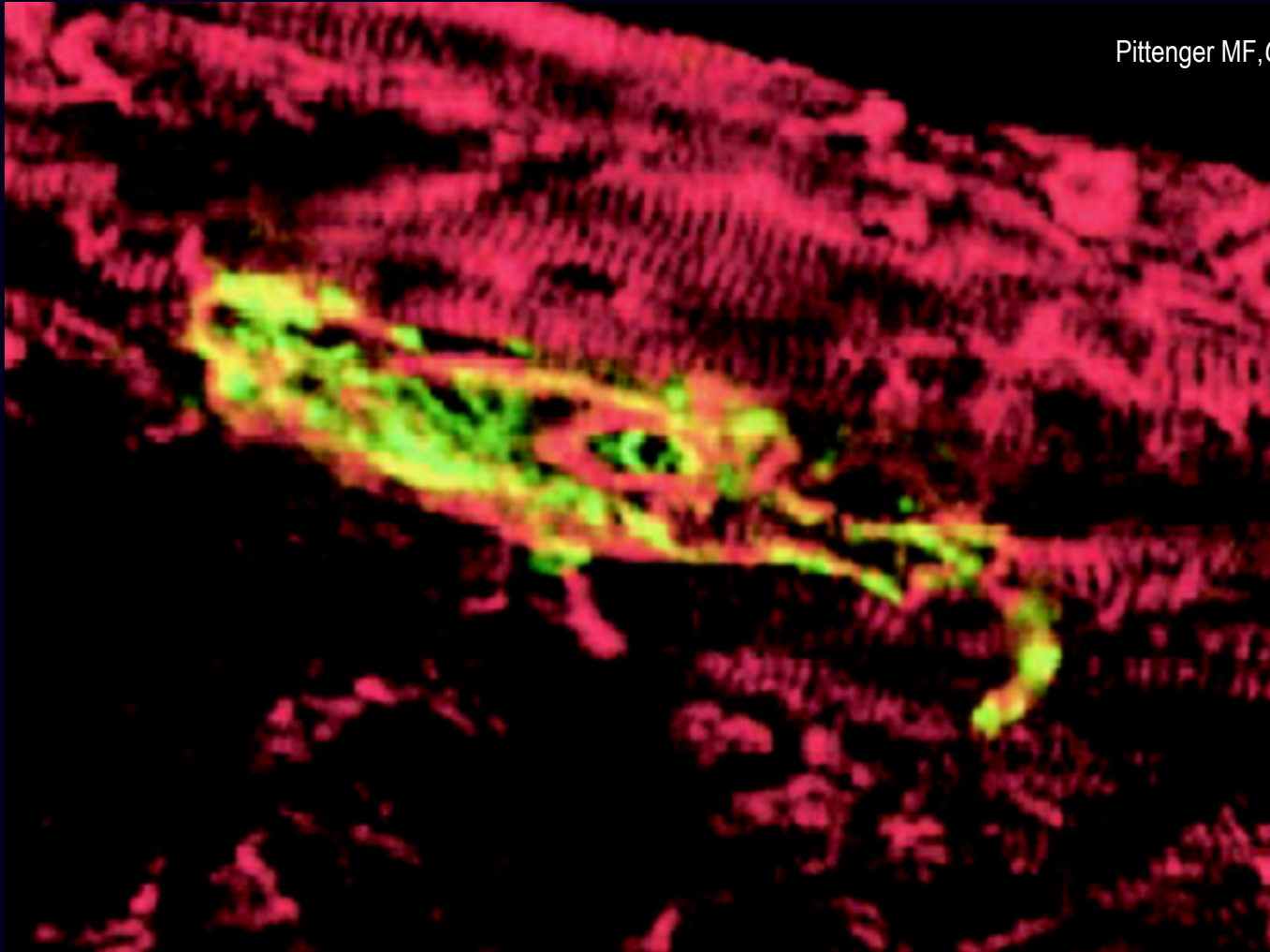


Figure 2. Myocardial infarction is induced in adult female mice by ligation of LCA.

BMSCs from adult eGFP transgenic male mice are enriched by flow cytometry

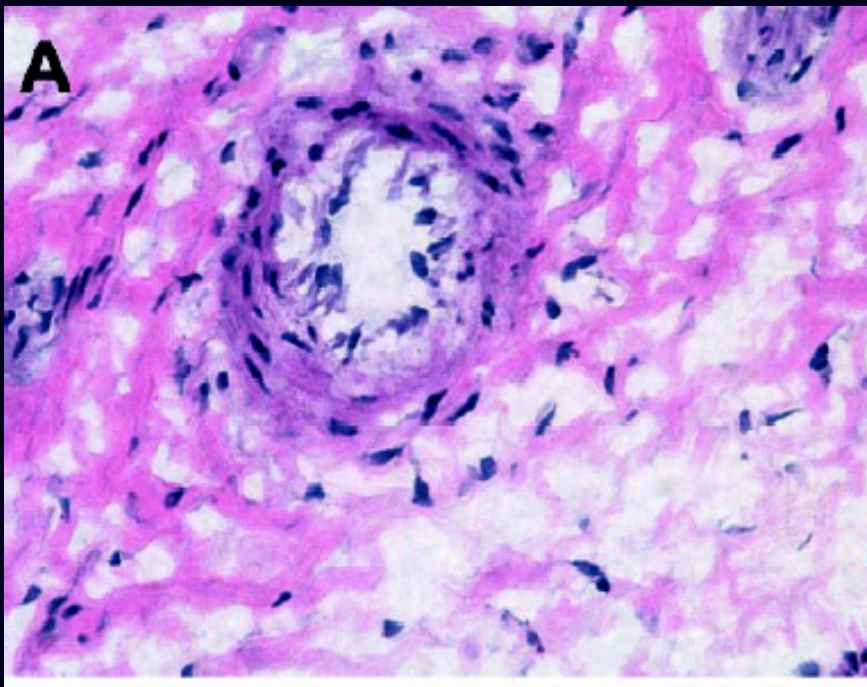
Lin⁻ c-kit⁺ subpopulation consists of both stem and progenitor cells. Drawing by Darryl Leja (National Human Genome Research Institute, NIH, Bethesda, Md).

MMC - prisotne v ventriklu odrasle miši



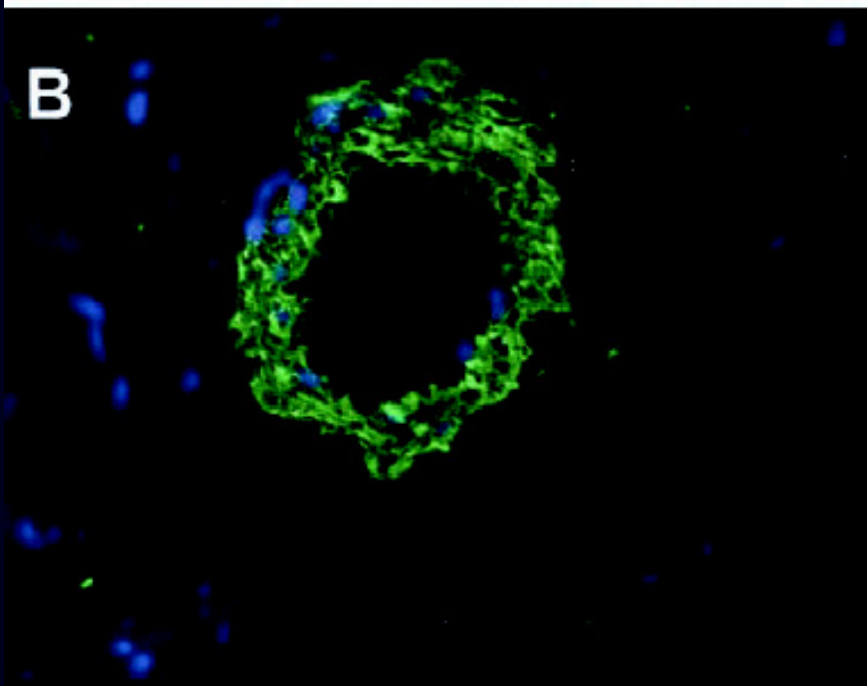
Pittenger MF, *Circ Res.* 2004;95:9-20

- MMC označene z Ab proti produktu *gal* (zeleno)
- kardiomiociti označeni z Ab, ki prepoznavajo dezmin (rdeče)



Prisotnost MMC in njihova funkcija pri angiogenezi poškodovanega tkiva

Imunohistokemično barvanje podganje srčne mišice po infarktu



Modro: MMC so pred IV injiciranjem v podgano označili z DAPI (modro).

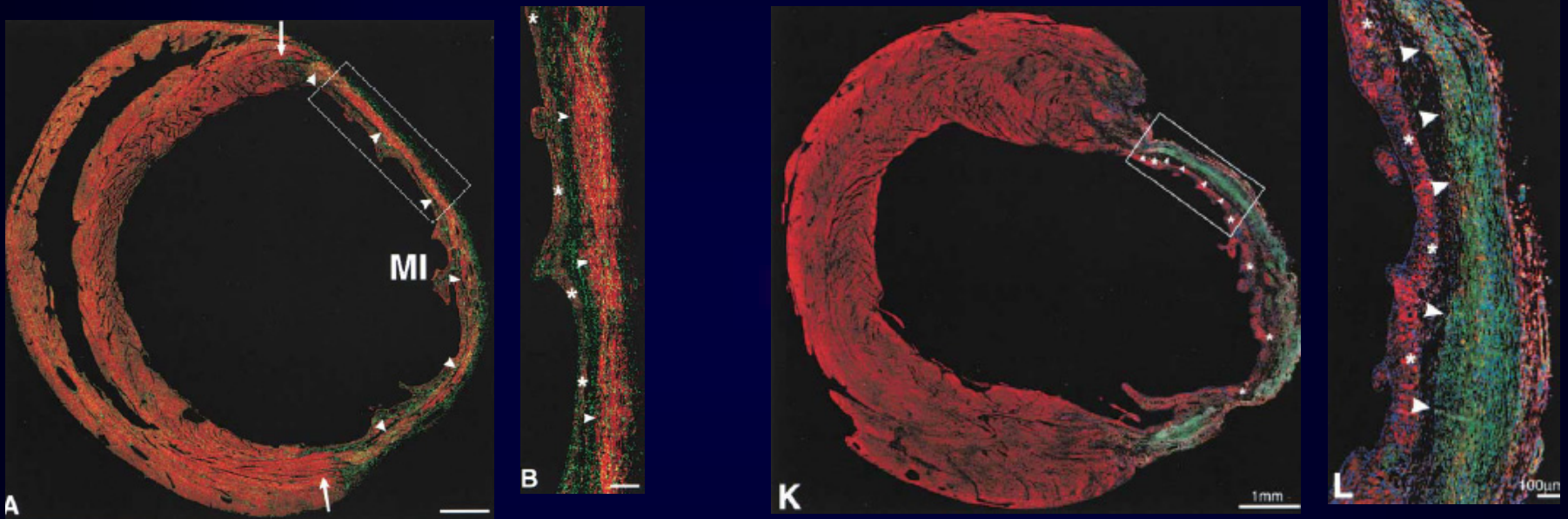
Zeleno: mišični aktin, značilen za gladke mišice (razvijajoča se žila)

Apliciranje MC :

Operativno ali preko katertra

Infuzija MC v koronarno arterijo infarktnege predela ali

Izplavljanje MC iz kostnega mozga z G(M)-CSF – naravni proces migracije MC v predel poškodbe



Slika prikazuje predel injiciranja matičnih celic (c-kit) v predel infarktnege miokarda (rdeče obarvano –miozin, zeleno matične celcie EGFP)

Miokard 20 dni po implantaciji matičnih celic (c-kit) (rdeče obarvano – miozin, zeleno - matične celcie z EGFP, modro – propidijev jodid)

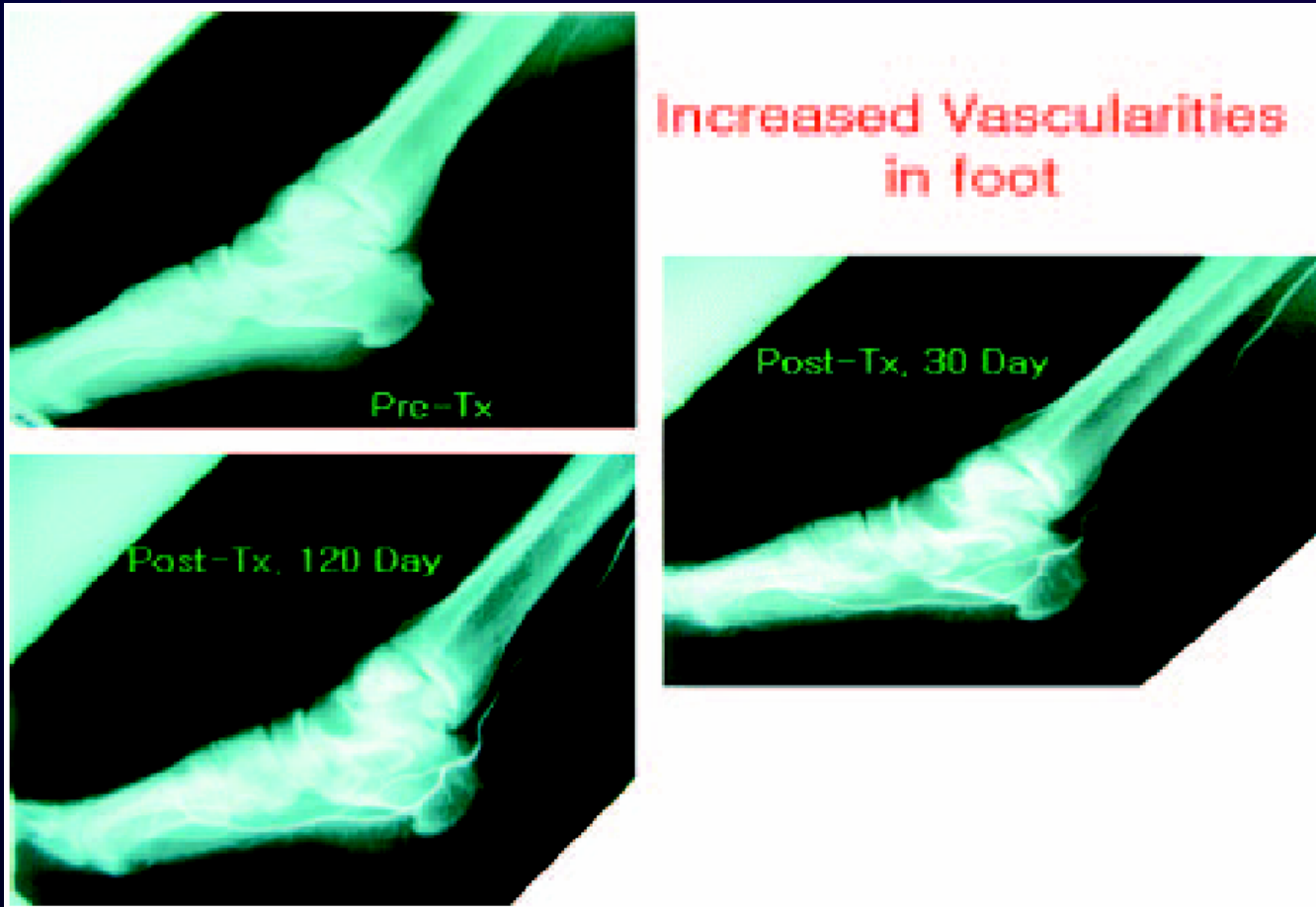
MC IN SRCE – HUMANE ŠTUDIJE

- Y+ kardiomiocite našli v srcih dajalk srca (cirkulirajoči progenitorji bolnika) in obratno (pri BMT)
- Y+ celice tudi v vaskularnih stenah koronark (cirkulirajoči endotelijski progenitorji)
- Ta repopulacija prešibka za ozdravitev po MI

Klinične študije -srce

- Tehnično možno, relativno varno
- Relativno malo zapletov
- Povečana kontraktilna funkcija, povečana perfuzija (le do 14%)
- Ni bilo dvojno slepih študij

UMC in Buergerjeva bolezen



Successful Stem Cell Therapy Using Umbilical Cord Blood-Derived Multipotent Stem Cells for Buerger's Disease and Ischemic Limb Disease Animal Model
Sung-Whan Kim, Hoon Han, Gue-Tae Chae, Sung-Hoon Lee, Sun Bo, Jung-Hee Yoon, Yong-Soon Lee, Kwang-Soo Lee, Hwon-Kyum Park and Kyung-Sun Kang
Stem Cells 2006;24:1620-1626; originally published online Feb 23, 2006;
DOI: 10.1634/stemcells.2005-0365



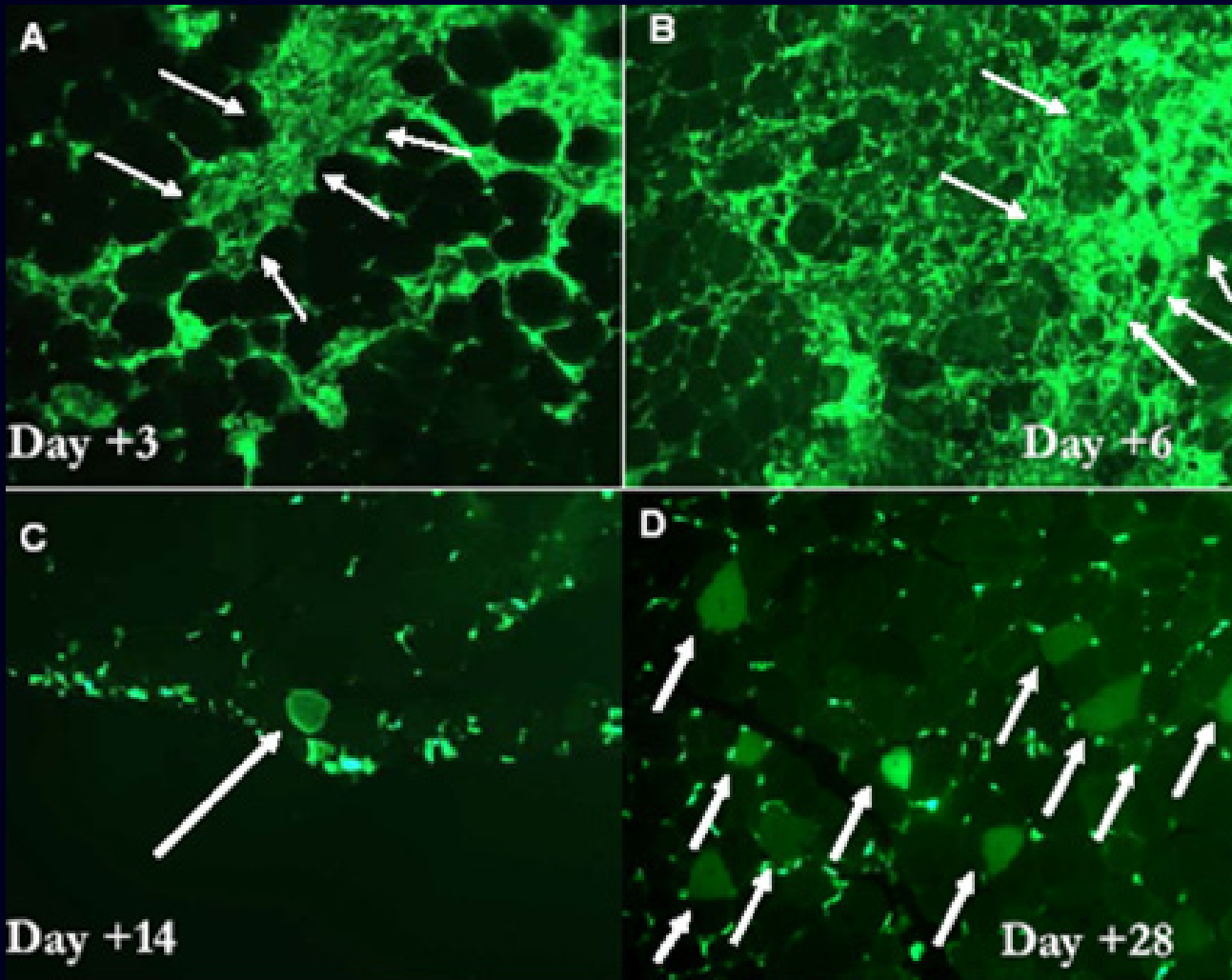
KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC V HUMANI MEDICINI

mišice in veziva

MC ZA SKELETNO MIŠIČJE

- Rast in obnavljanje skeletnega mišičja poteka:
 - s satelitnimi mišičnimi progenitorji
 - z nediferenciarnimi MC iz drugih tkiv
- MC iz KM lahko migrirajo v področja poškodbe mišičja in diferencirajo v miocite - regeneracija tkiva

PREOBRAZBA CELIC KM V SKELETNO MIŠICO

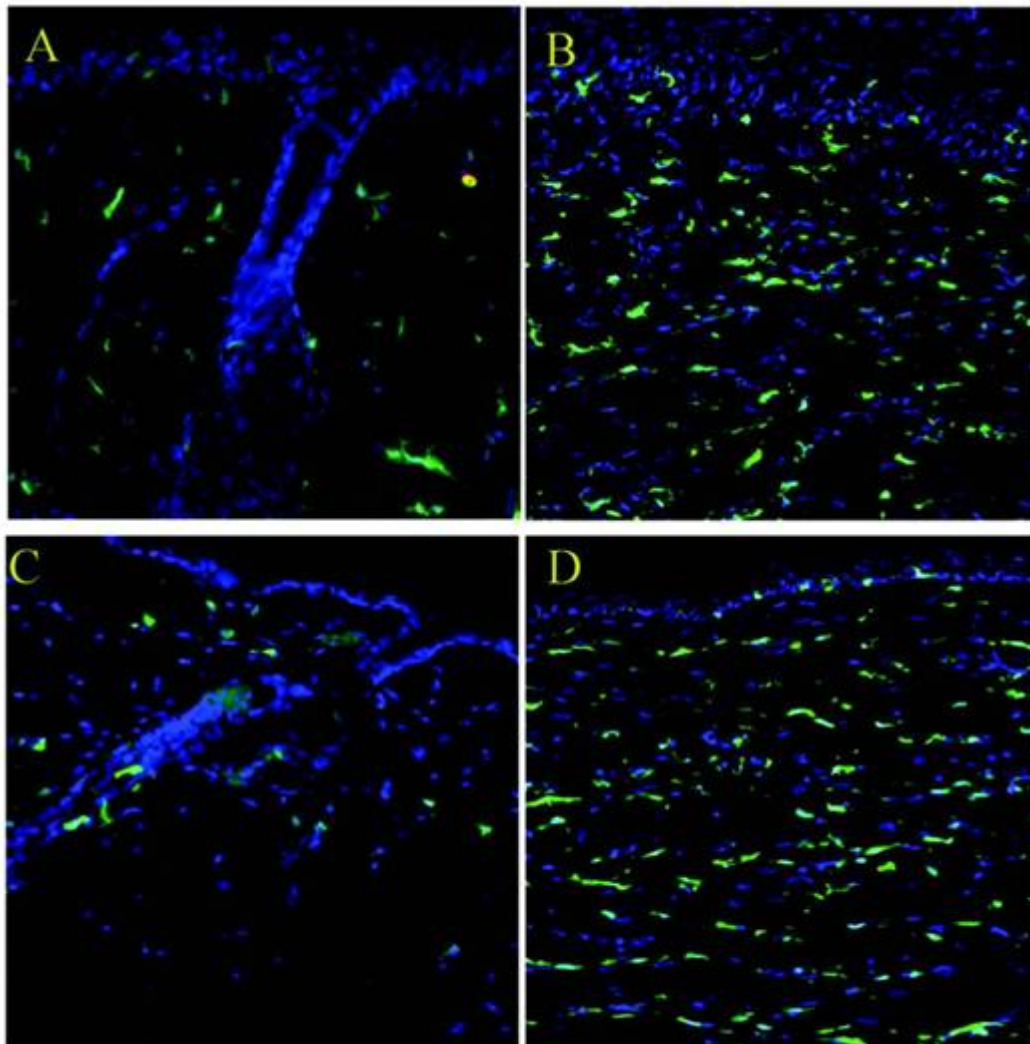


Cardiotoxin injured anterior tibialis muscle in a GFP to C57BL/6 transplant model

A,B: infiltracija hematopoetskih celic v poškodbo (puščice)

C,D: nastanek GFP+ miocitov

MMC IZ KM PRI CELJENJU RAN



(A): lezija na koži miši kamor so vbrizgali KMC himerne miši (EGFP)

(B): 42 dni po poškodbi vidimo EGFP+ celice po celotnem podkožju, kjer je prišlo do regeneracije poškodbe s KMC

(C): lezija na koži miši kamor so vbrizgali MMC himerne miši (EGFP).

(D): 42 dni po poškodbi vidimo EGFP+ celice po celotnem podkožju, kjer je prišlo do regeneracije poškodbe z MMC.

okrajšave:

EGFP: enhanced green fluorescent protein;

KMC: krvotvorna matična celica

MMC: mezenhimska matična celica.

KOŽA

- Zdravljenje globokih in obsežnih opeklin (Rasulov et.al. 2005)
- Uspešna osamitev, presaditev in usemerjena diferenciacija v kožne, lasne, lojne folikle (model golih miši)
- MMC, epitelne MC in MAPC za kožne nadomestke
- MC kože za zdravljenje plešavosti (Blanpain et.al.2004)

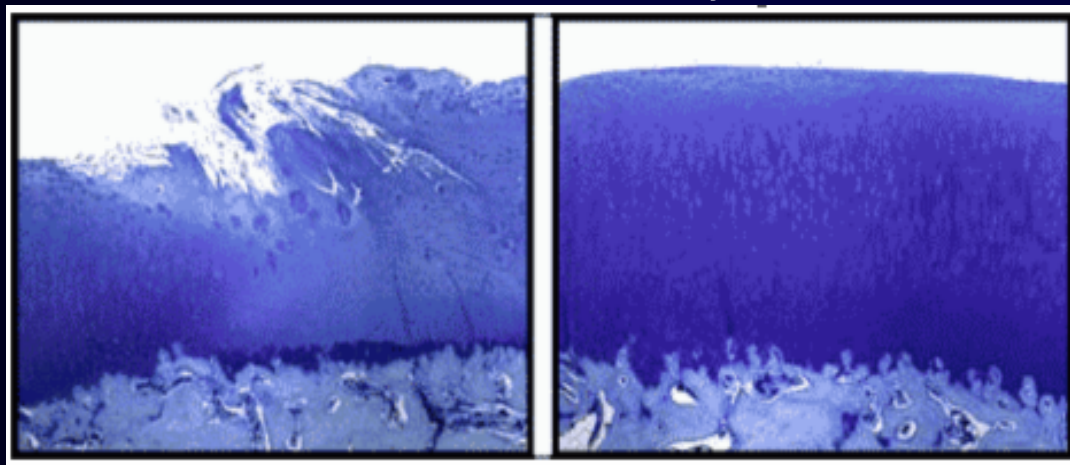


POŠKODBE HRUSTANCA

- MMC za zdravljenje in nadomeščanje obrabe hrustanca
- regeneracija meniskusa
- preprečujejo osteoartritis

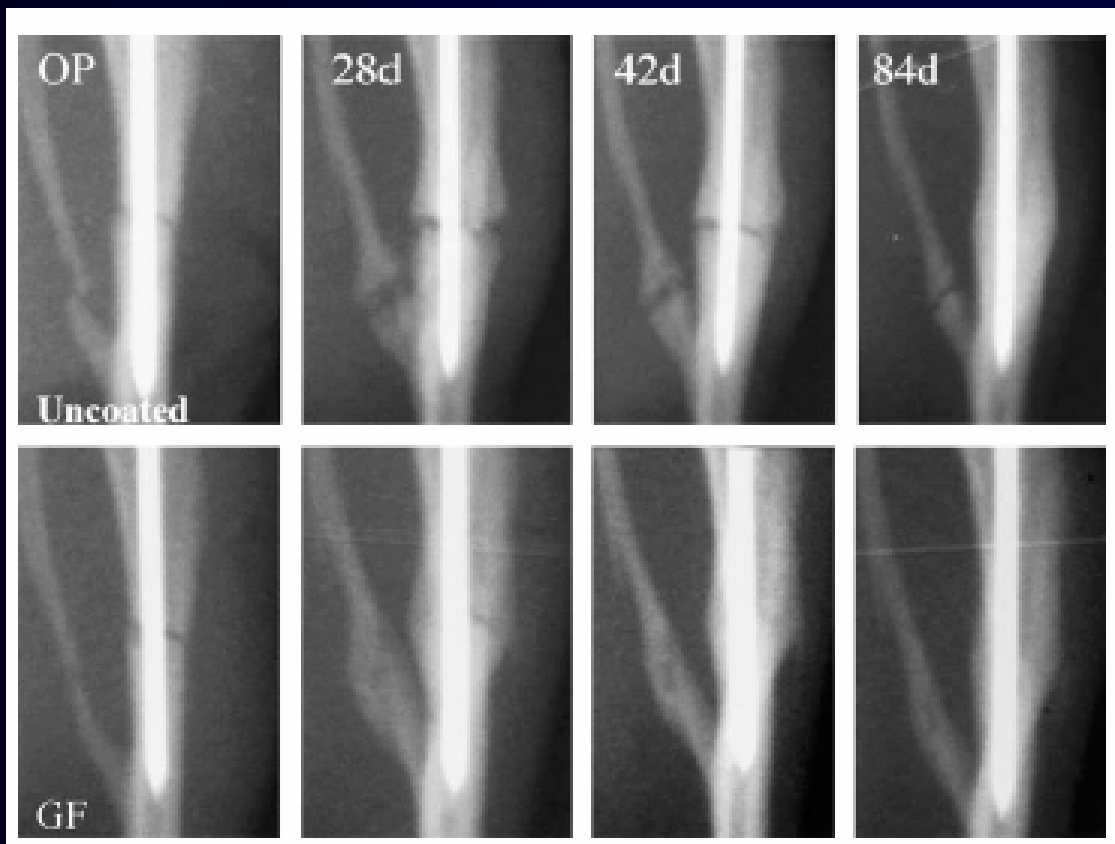
kontrolni meniskus

meniskus z
injiciranimi MMC



<http://www.osiristx.com>

MC ZA ZDRAVLJENJE ZLOMOV



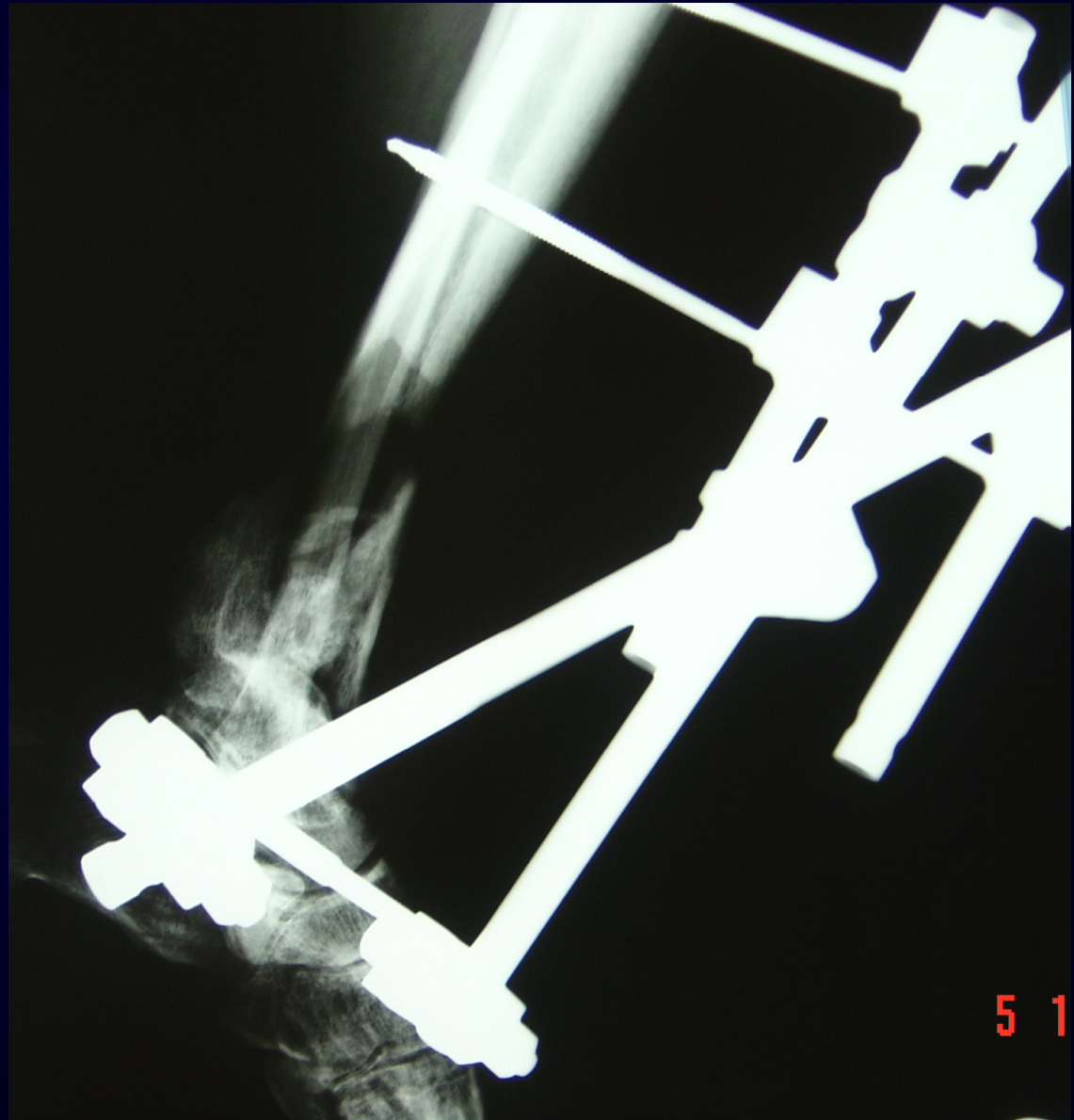
Izboljšana regeneracija kosti

Pospešeno celjenje

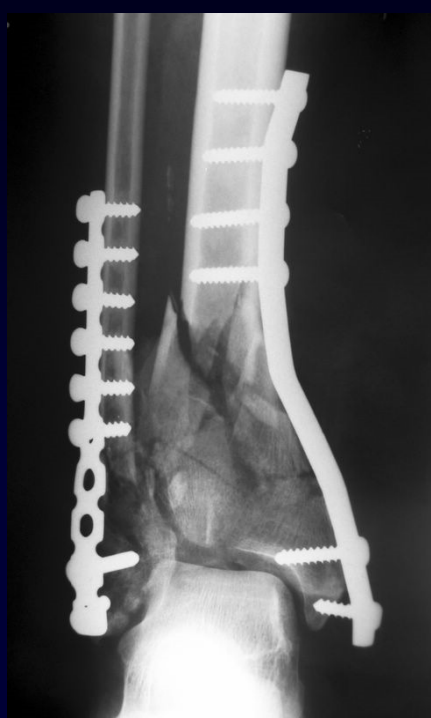
Povečano ožiljanje kosti

Povečanje vsebnosti kolagena

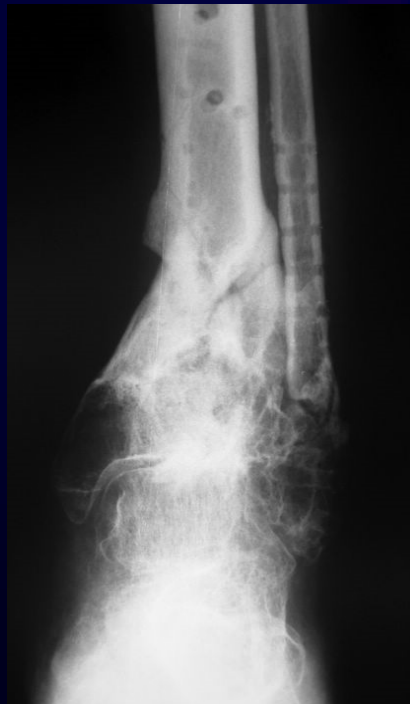
J3-6290 Zdravljenje nezaceljenih zlomov kosti z uporabo trombocitnih rastnih dejavnikov in avtolognih matičnih celic



5 1



A) Predoperativno

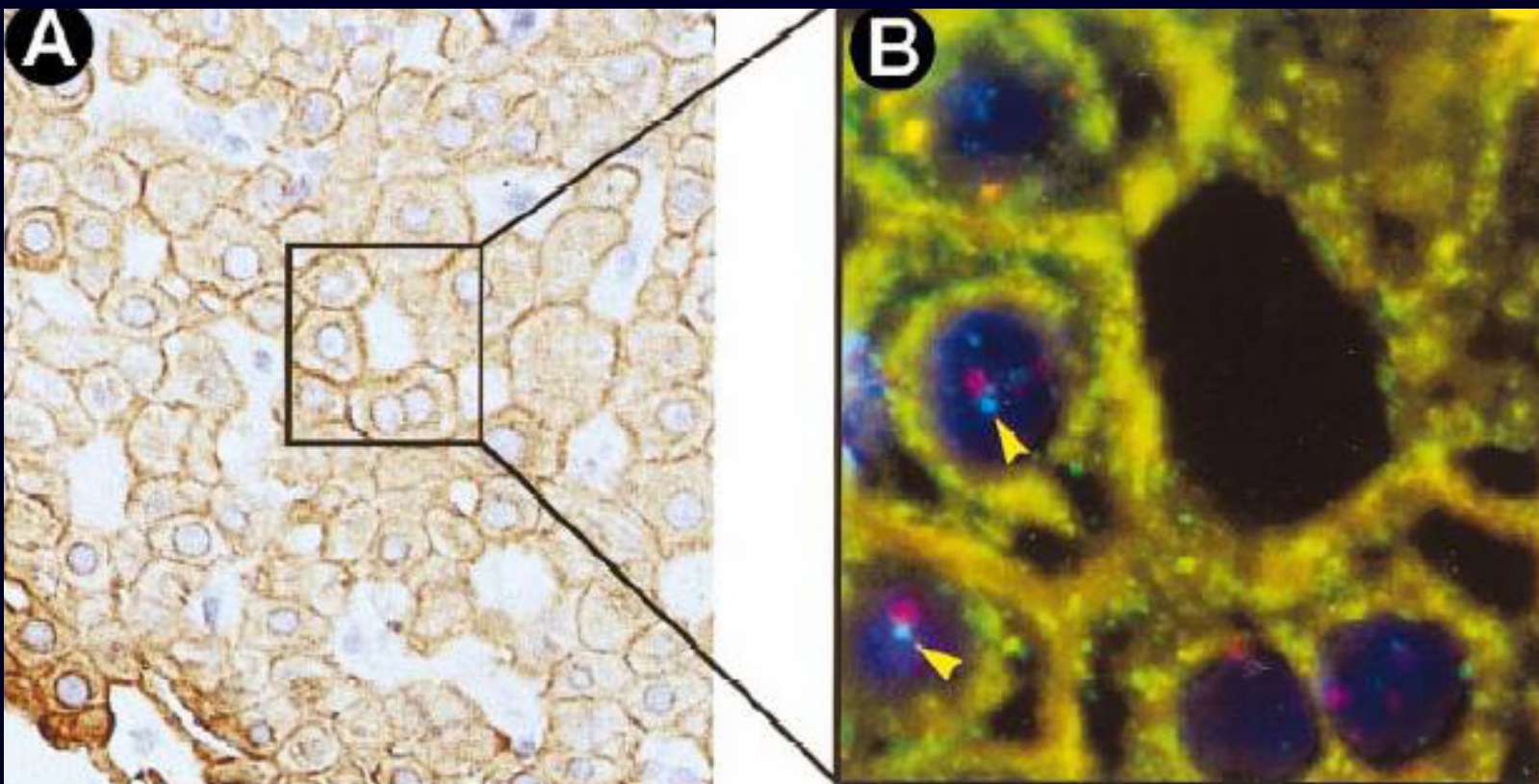


B) Postoperativno – 12 m.

KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC V HUMANI MEDICINI

jetra in prebavila

MC IN BOLEZNI JETER



(A) Imunohistokemično barvanje z MAb CAM5.2 (citokeratini) moškega presadka KM v jetrih ženske bolnice. Jetrne celice že kažejo fibrozo zaradi hepatitisa C.

(B) FISH tehnika barvanja X (rdeče) in Y kromosomov (modro)

Characterization and Clinical Application of Human CD34⁺ Stem/Progenitor Cell Populations Mobilized into the Blood by Granulocyte Colony-Stimulating Factor

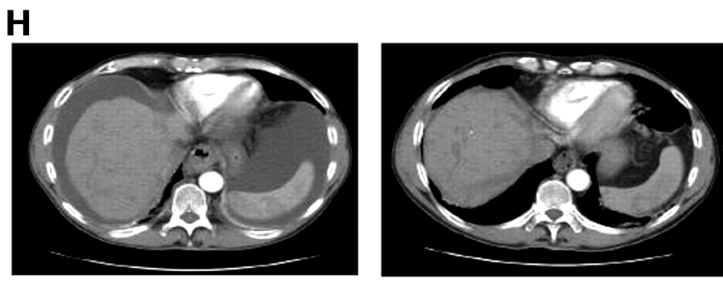
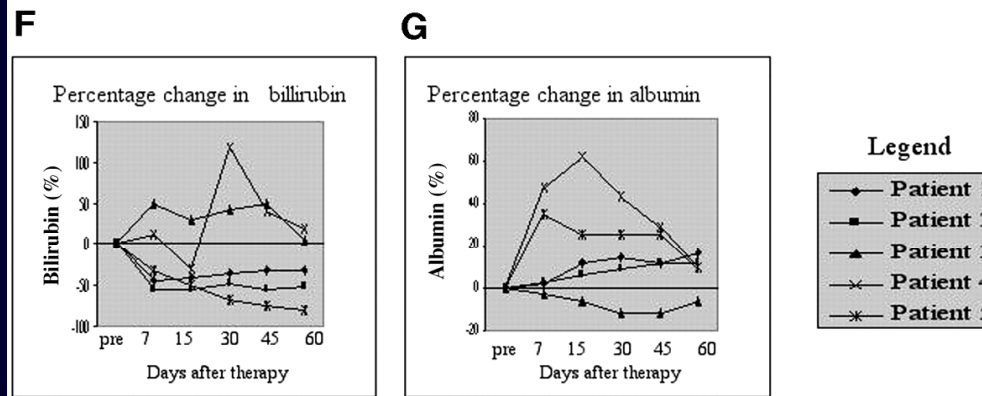
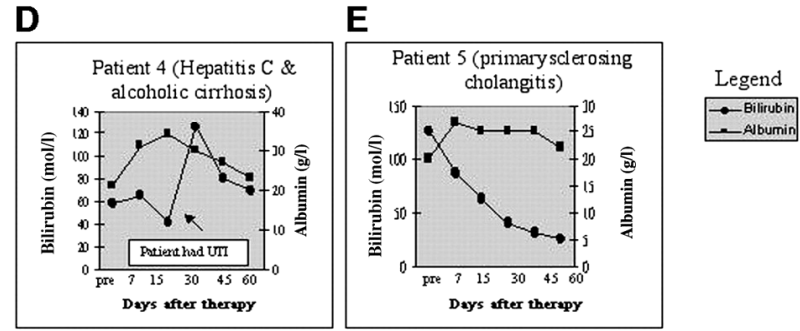
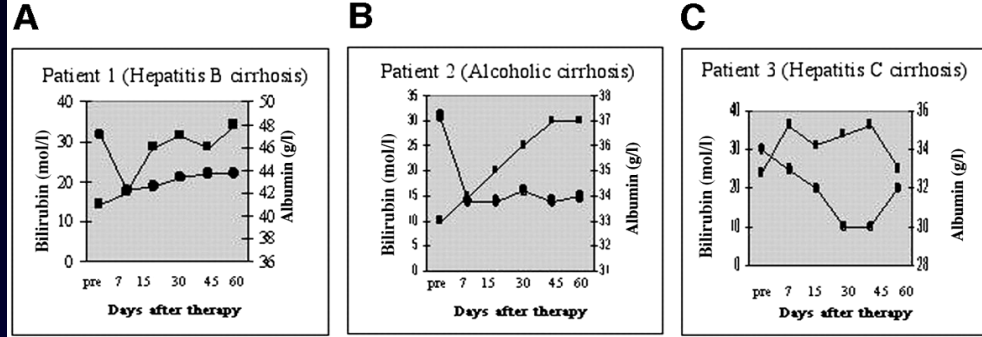
MYRTLE Y. GORDON,^{a,b} NATAŠA LEVIČAR,^a MADHAVA PAL,^a PHILIPPE BACHELLIER,^a IOANNIS DIMARAKIS,^a FAISAL AL-ALLAF,^a HANANE M'HAMDI,^a TAMARA THALJI,^a JONATHAN P. WELSH,^a STEPHEN B. MARLEY,^a JOHN DAVIES,^a FRANCESCO DAZZI,^a FEDERICA MARELLI-BERG,^a PAUL TAIT,^a RAYMOND PLAYFORD,^a LONG JIAO,^a STEEN JENSEN,^a JOANNA P. NICHOLLS,^{a,b} AHMET AYAV,^a MAHROKH NOHANDANI,^a FARZIN FARZANEH,^c JOOP GAKEN,^c RIKKE DODGE,^d MALCOLM ALISON,^e JANE F. APPERLEY,^a ROBERT LECHLER,^c NAGY A. HABIB^{a,b}

^aFaculty of Medicine, Imperial College London, Hammersmith Campus, London, United Kingdom; ^bLiverCyte Limited, London, United Kingdom; ^cFaculty of Medicine, Kings, Guy's and St. Thomas's Medical School, King's College Campus, King's College, London, United Kingdom; ^dHarvard Medical School, Joslin Diabetes Center, Boston, Massachusetts, USA; ^eThe Royal London Hospital, Diabetes and Metabolic Medicine, London, United Kingdom

MC za zdravljenje jetrne ciroze

Klinična študija 1. na ljudeh:

- izolacija CD34 celic iz periferne krvi
- osamitev omnicitov (EMC: Rex-1, Oct-4, Nanog; KMC: CD34, CD133, CXCR4)
- infuzija v poškodovana jetra skozi portalno veno ali jetrno arterijo
- sledenje bolnikov na 15 dni in merjenje parametrov
- 2 meseca po inplantaciji CT in ultrazvok jeter



Gordon, M. Y. et al. Stem Cells 2006;24:1822-1830

Figure 5. Post-transplant follow-up of patients in phase I trial

KLINIČNA UPORABA MATIČNIH CELIC V HUMANI MEDICINI

imunomodulacija in genska terapija

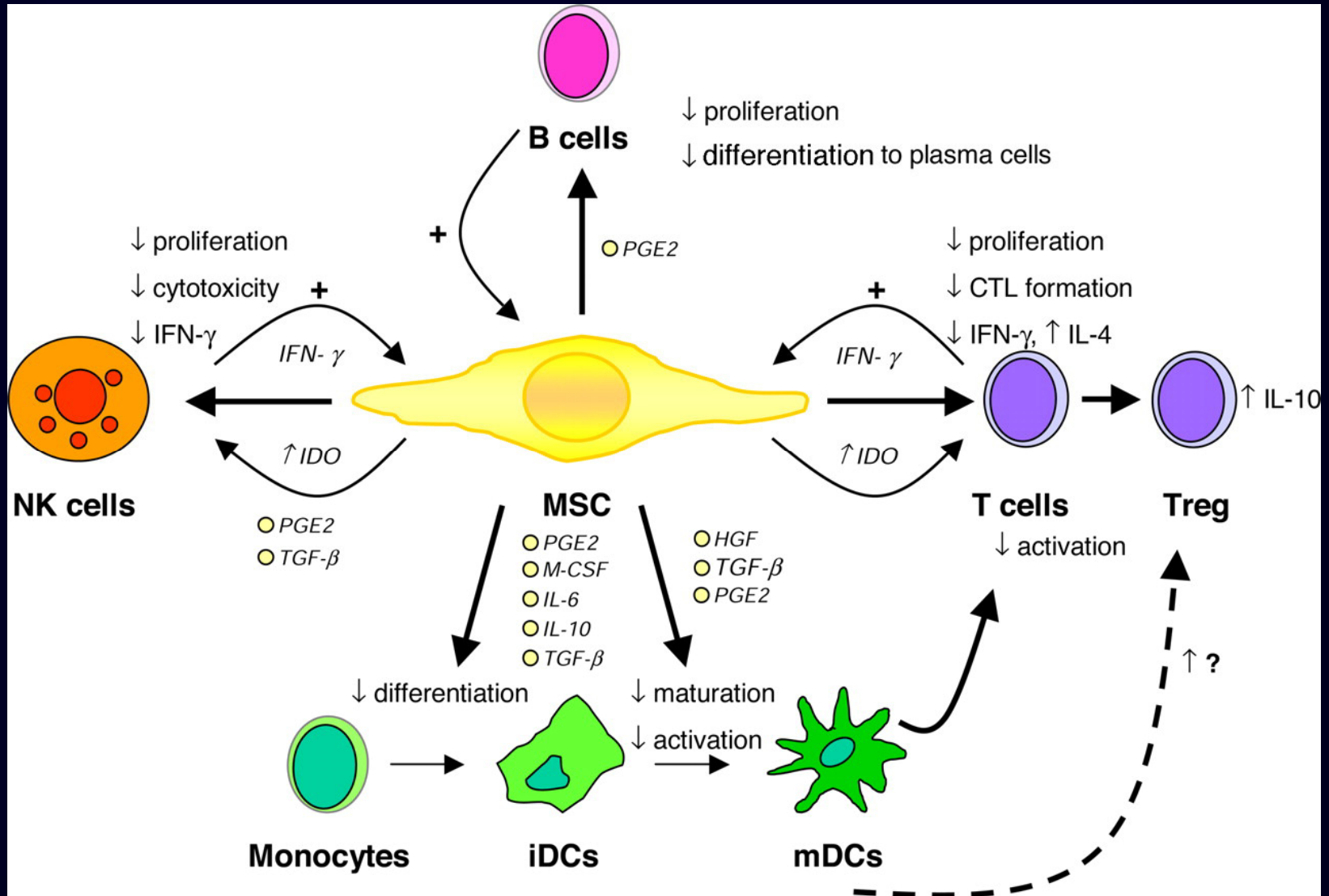
IMUNOMODULACIJA Z MMC

- MMC imajo imunosupresivne lastnosti
- V mešanih kulturah zavirajo rast limfocitov
- Zavirajo vnetni odziv sprožen s strani CTL in celic NK
- Inhibirajo aloreaktivnost, preprečujejo GVHD

UPORABA:

- Zdravljenje akutne oblike GVHD
- Preprečevanje avtoimunskega vnetnega odziva
- Pospešujejo hematopoezo in prijetje KMC

Immunomodulatory effects of MSCs



L: endoskopija črevesa
bolnika z GVHD

D: endoskopija istega črevesa
2 tedna po prejetju MMC



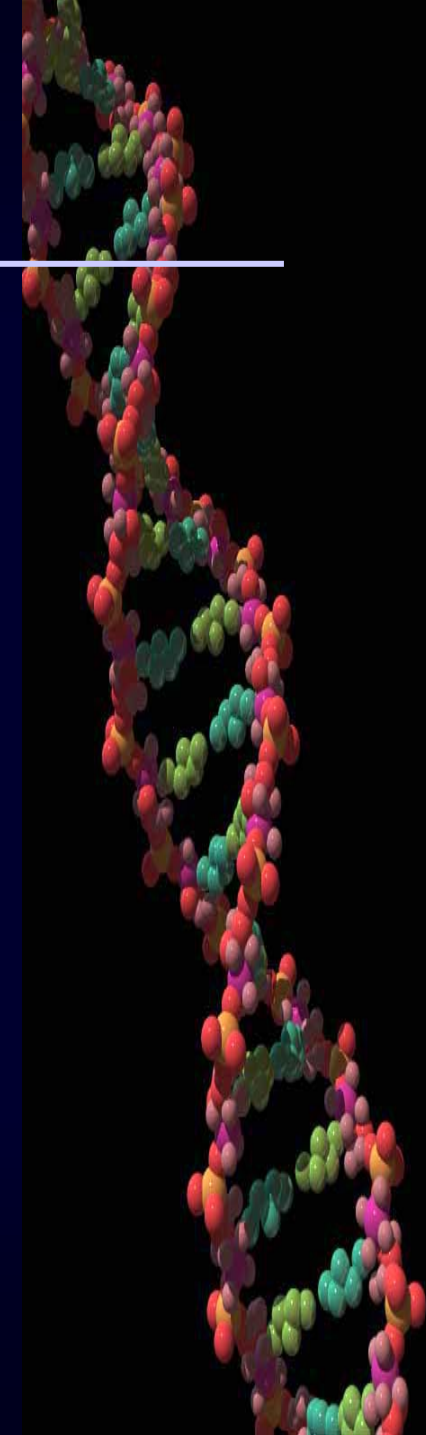
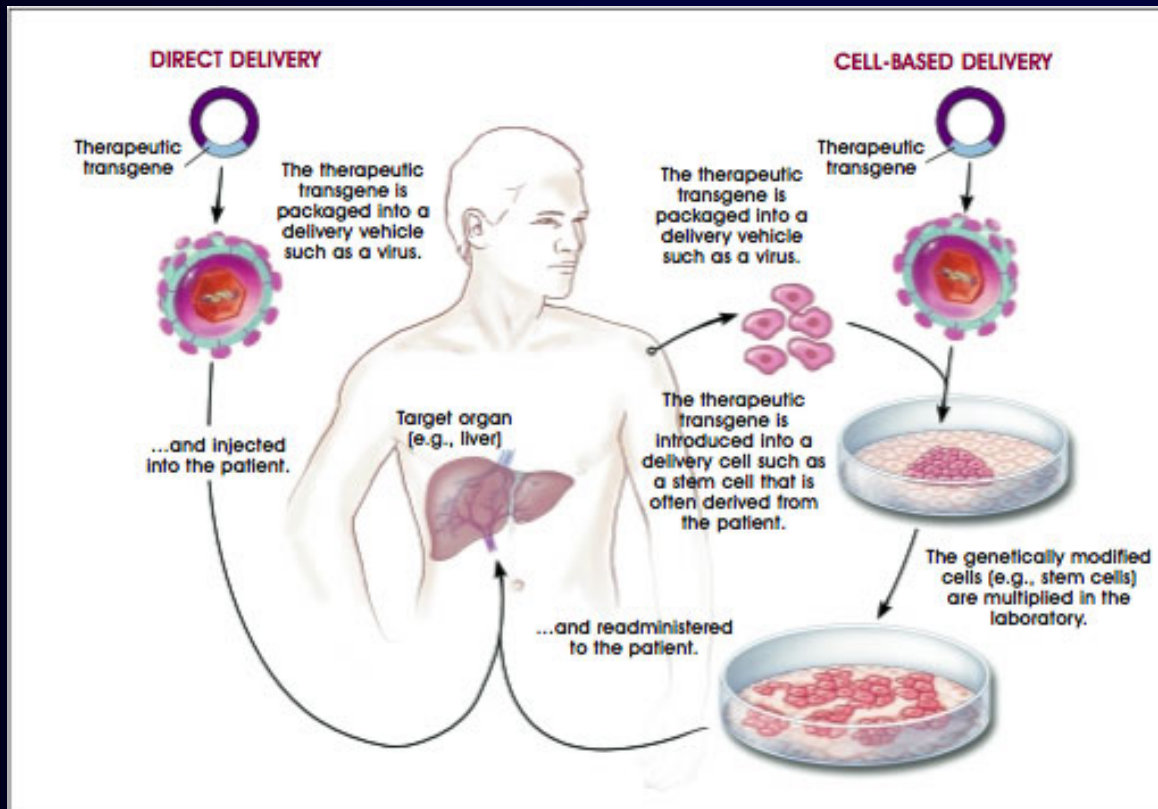
Endoskopska primerjava črevesa pri bolniku, ki je razvil GVHD, pred in po zdravljenju z MMC. Z modro je obkrožena razjeda, ki je posledica GVHD

<http://www.osiristx.com>

GENSKO ZDRAVLJENJE

MC idealne tarče za gensko zdravljenje

- lahko dostopne
- možna manipulacija, gojenje



POTENCIALNE NEVARNOSTI UPORABE MC

- Tkivna neskladnost pri presaditvah KMC
- Neprimerna fenotipska diferenciacija
- Uporaba brezserumskega medija za gojenje MC
- Nediferencirane EMC povzročajo teratome
- Lobstein, Recamier's (1829), Virchow (1853), Cohnheim (1889):
 - tumorji kosti izvirajo iz hrustančnih celic rastne ploščice
 - embrionalni ostanki generirajo vse oblike tumorjev in raka


ESC lines: some have signs of neoplastic progression

- Expressing pluripotency markers at high levels
- High proliferative capacity
- Growth factor independence
- Increase of frequency of tumor initiating cells
- Niche independence
- Chromosomal abnormalities as revealed by genomic hybridisation techniques (not by standard cytogenetics)

RAZVOJ V PRIHODNOSTI



- Identifikacija celičnih podvrst (markerji + DNA)
- Optimizacija postopkov za osamitev MC
- Izboljšati vodenje diferenciacije MC
- Nadzor preživetja in proliferacije MC
- Identifikacija faktorjev ki vplivajo na izplavljanje in homing
- Identifikacija faktorjev, ki v organih po presaditvi MC povzročajo vnetne in fibrozne odgovore



TAKE
TWO STEM
CELLS AND CALL
ME IN THE
MORNING.

STAYSKAL
2001 TAMPA
TRIBUNE