

Próby kliniczne z użyciem komórek macierzystych pochodzenia mięśniowego w medycynie regeneracyjnej

Prof. dr hab. med. dr h.c. Maciej Kurpisz

Instytut Genetyki Człowieka PAN, Poznań

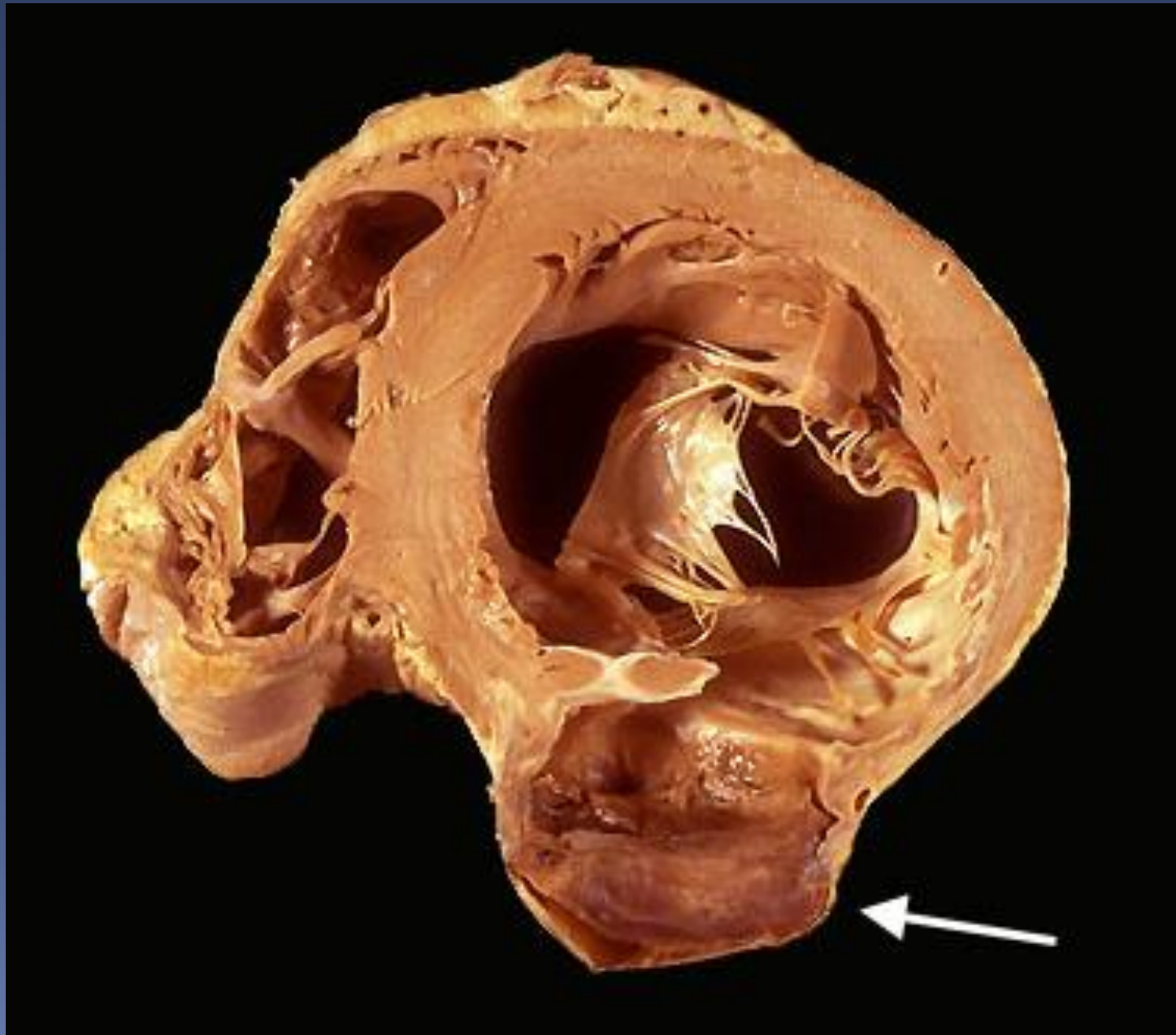


Warszawa, 7 maja 2013 r.





Post MI myocardial injury



Loss of cardiomyocytes is the main problem

Possible cell sources

- Embryonic stem cells (*Klug et al., 1996*)
- Cardiomyocytes (*Li et al., 1998*)
- Muscle cell lines (*Robinson et al., 1996*)
- **Autologous skeletal myoblasts** (*Taylor et al., 1998*)
- Fibroblasts (*Hutcheson et al., 2000*)
- Bone marrow stem cells (*Fuchs et al., 2001*;
Strauer et al., 2002)
- Mesenchymal stem cells (MAPC) (*Amado et al., 2005*)
- Adipocytes (*Miyahara et al., 2006*)

Superiority of autologous cells

	Autologous	Allogenic	Stem cells
Immunosupression	No	Yes	Yes
Carcinogenicity	No	?	Yes
Availability	Yes	?	?
Ethical problems	No	Yes	Yes

Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans

Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M,
Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P.

Circulation 2002; 106: 1913-1918.

Myoblast transplantation for heart failure

Menasché P, Hagège AA, Scorsin M, Pouzet B,
Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT,
Marolleau JP.

The LANCET 2001; 357(9252): 279-280.

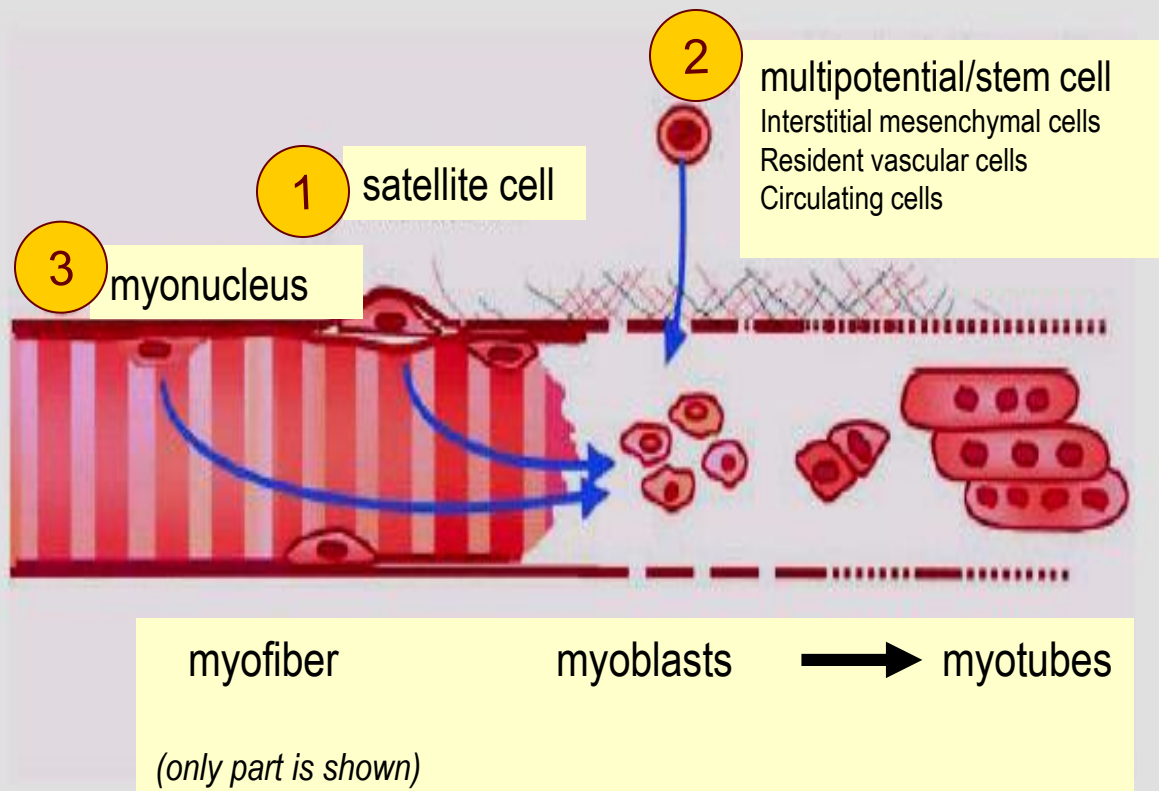
The POZNAN 1st Trial

Native, autologous human myoblasts

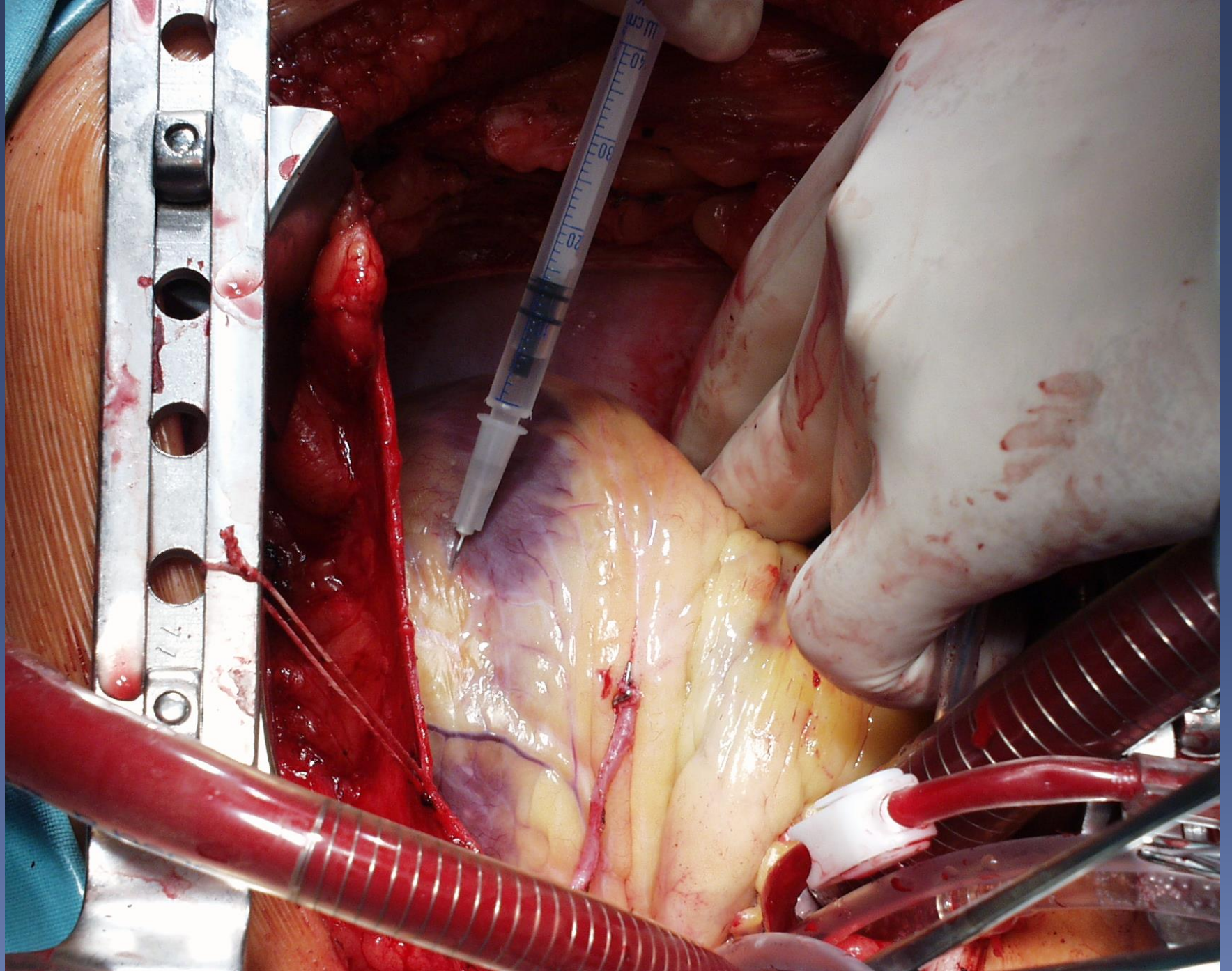
Direct injection to open heart; CABG

*Voivodeship Hospital in Poznan and
Institute of Human Genetics Polish Academy of Sciences,
Poznan, POLAND*

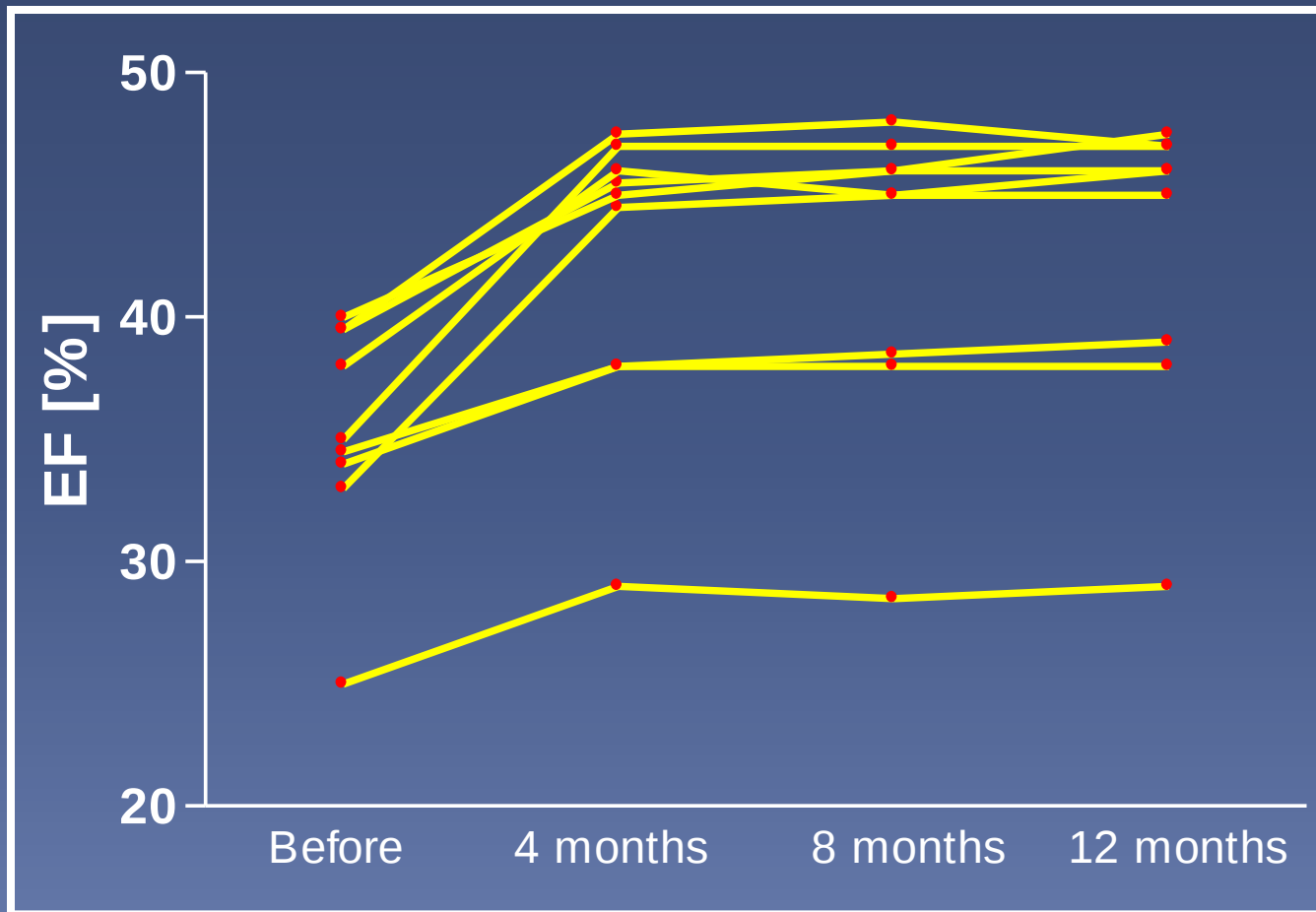
Mioblasty – komórki macierzyste mięśni szkieletowych



- Izolowane z pobranego wycinka tkanki (*vastus lateralis*)
- Łatwe w hodowli
- Unipotencjalne



LV ejection fraction after autologous myoblast transplantation – 12 months follow up



Late Breaking Clinical Trial

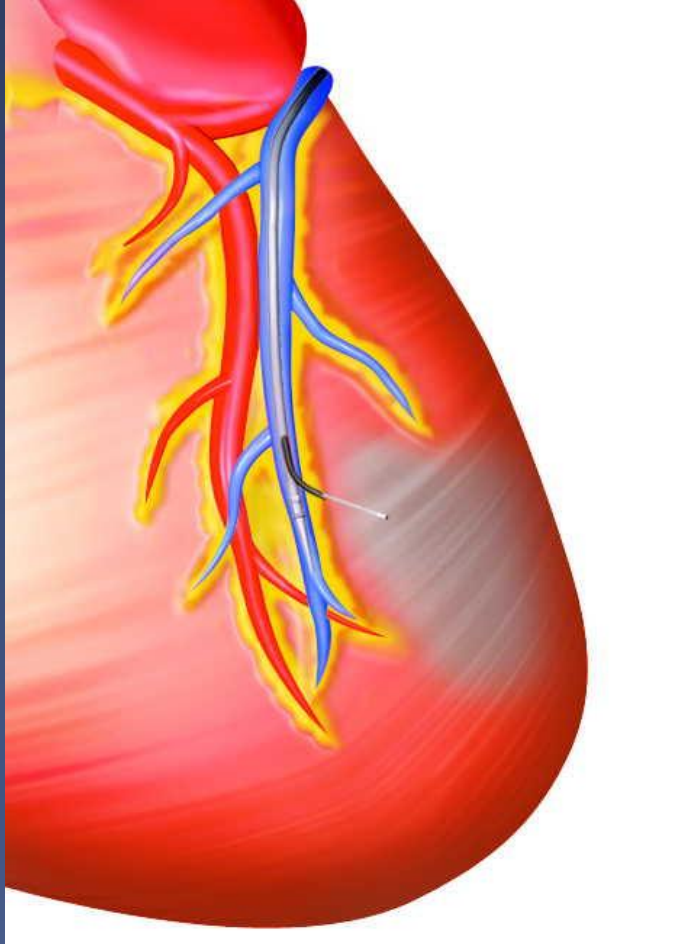


Percutaneous Transvenous Transplantation of Autologous Myoblasts in the Treatment of Postinfarction Heart Failure

The POZNAN Trial

Siminiak T, Fisz D, Jerzykowska O, Rozwadowska N, Kurpisz M.

*Poznan University of Medical Sciences and
Institute of Human Genetics Polish Academy of Sciences,
Poznan, POLAND*

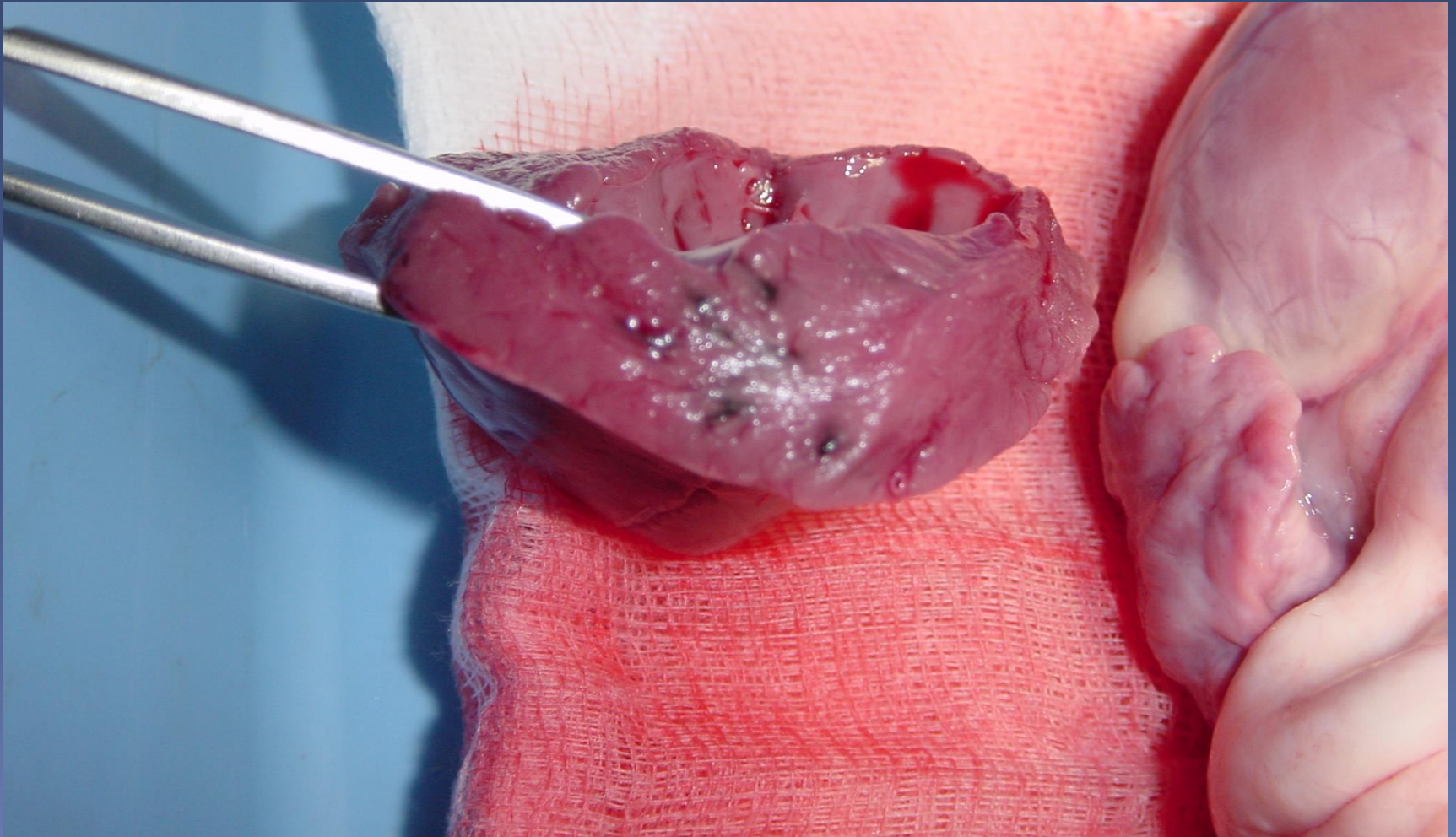


TransAccess®
MicroLume™
Intramyocardial
Injection System

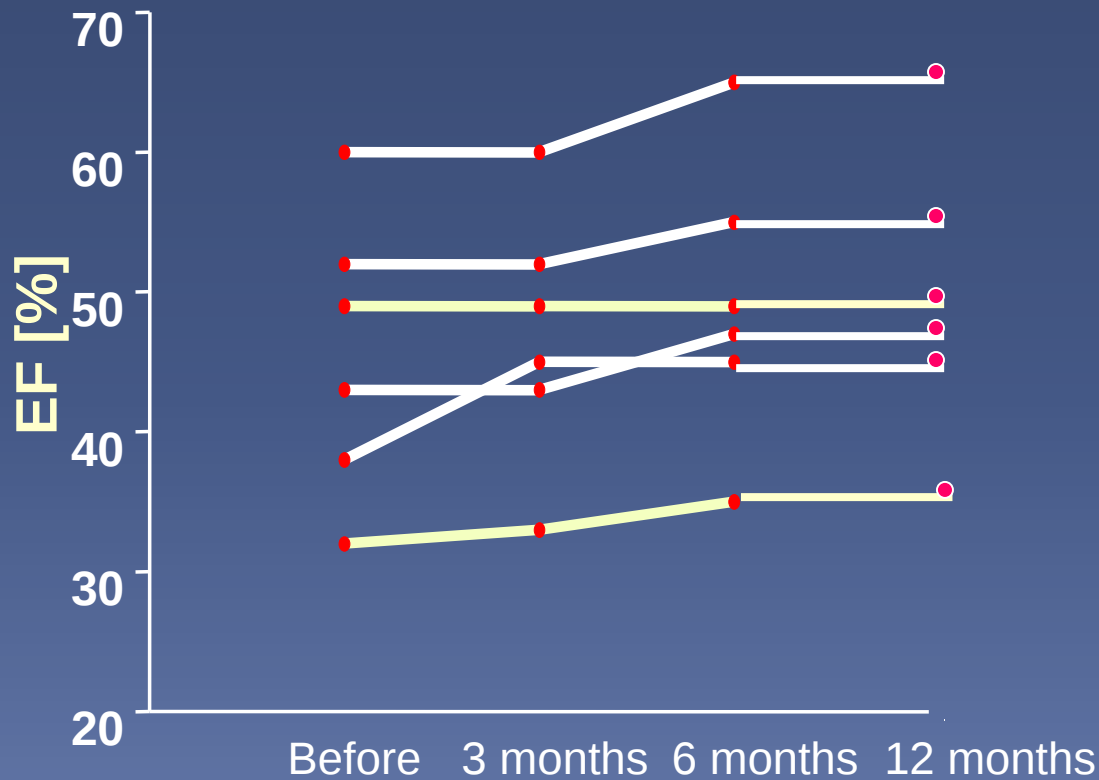


TransVascular Inc.

Dye injections at experimental model



Ejection fraction changes



Increase in EF 3-8% in 4 out of 6 cases: Phase II/III trials needed

Controversies

myoblasts vs cardiomyocytes

- ✓ implanted cells make a proper orientation and alignment with cardiomyocytes
- ✓ myoblast display well defined striations respective to heart tissue
- ✓ yet they do not transdifferentiate into cardiomyocytes nor express cardiac specific genes (connexin 43, N-cadherin)
- ✓ no 'gap junction' formation and electromechanical coupling

Controversies

myoblasts vs cardiomyocytes

- ✓ there is synchronous contraction with cardiomyocytes although arrhythmic episodes occur several months
- ✓ what does the arrhythmia signify ?!
- ✓ physical link between the cellular graft and extracellular matrix ?!
- ✓ apoptosis and angiogenesis ?!

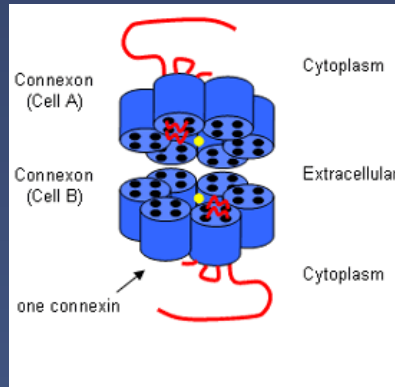
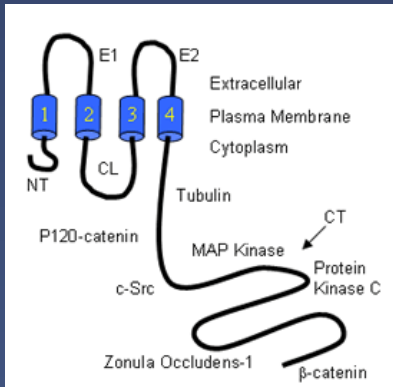
The POZNAN 3rd Trial

Genetically modified human myoblasts
with connexin 43

NOGA system delivery and electronavigation

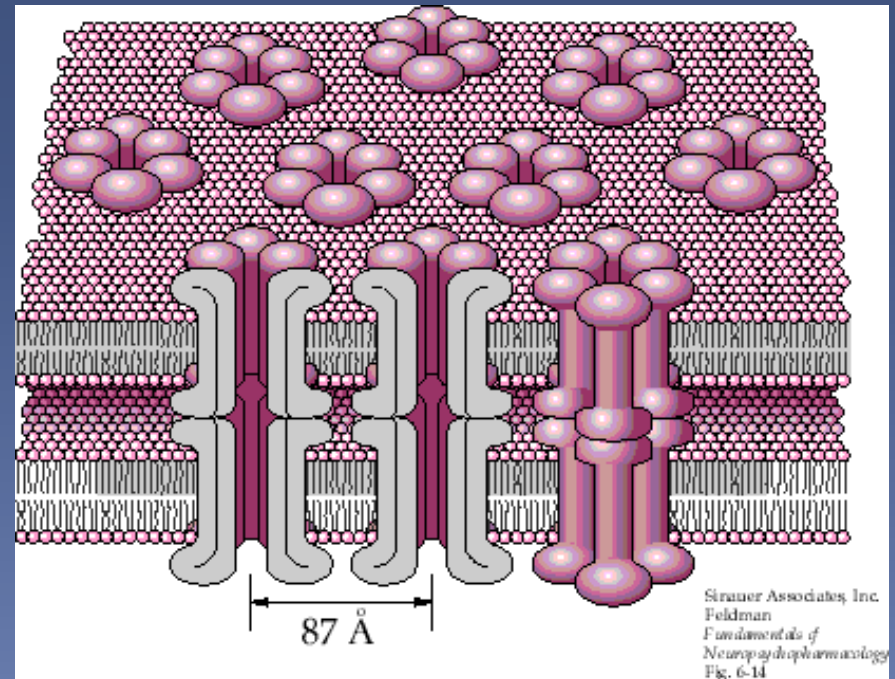
*Poznan University of Medical Sciences and
Institute of Human Genetics Polish Academy of Sciences,
Poznan, POLAND*

Architecture of „gap junction”



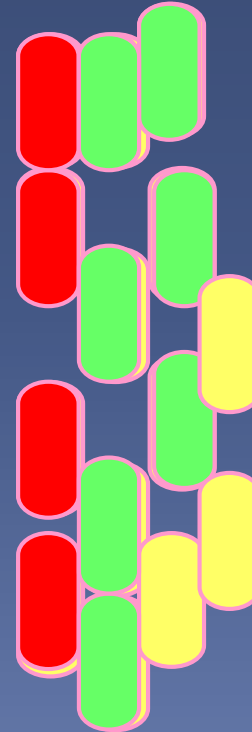
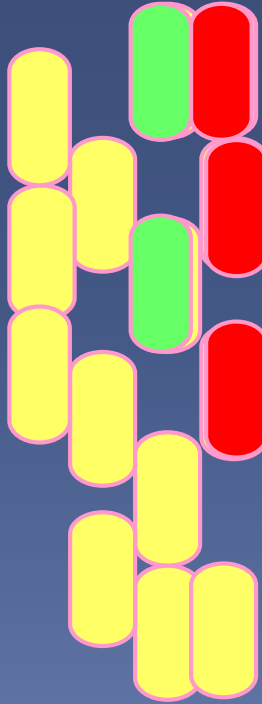
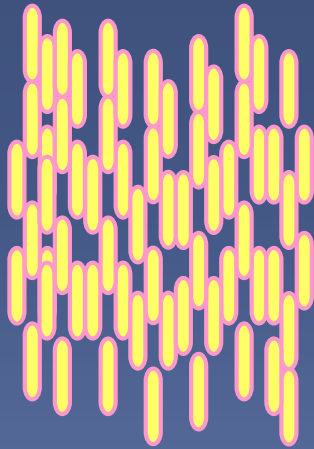
- connexin 43 (*MIM:121014*)
- connexon (hexamer)
- gap junction

- expressed in the heart
- present in intercalated discs
- expression altered in pathological conditions

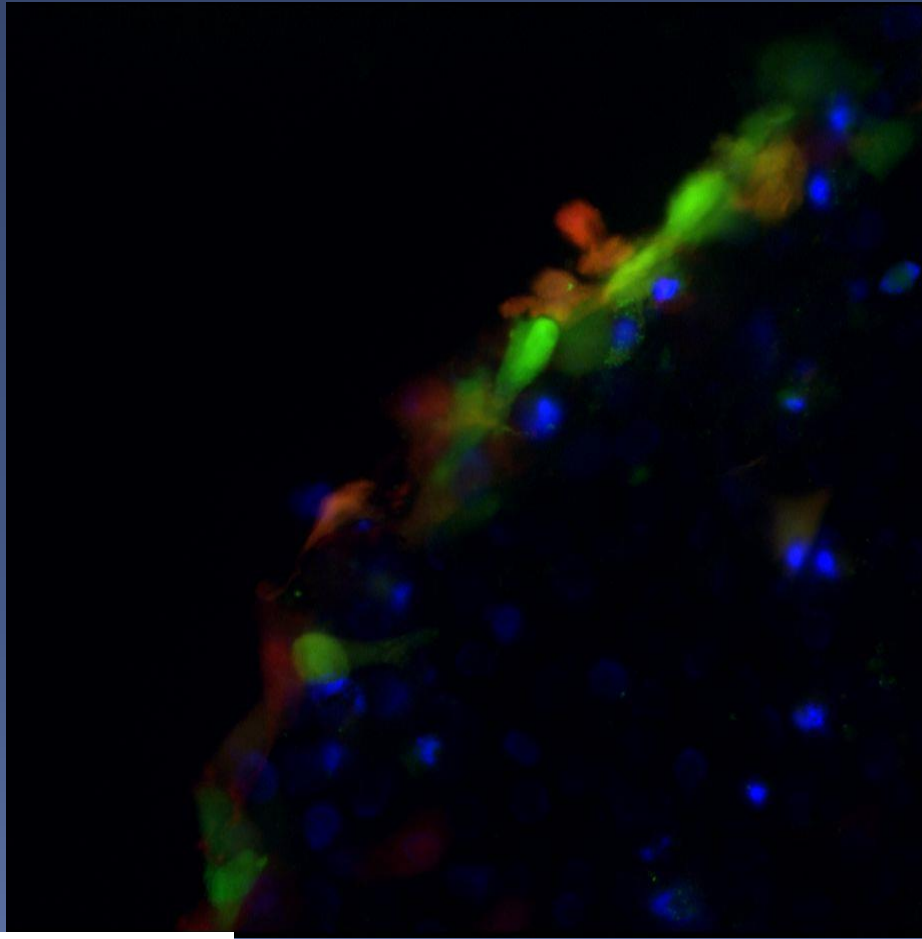


Functional *in vitro* studies

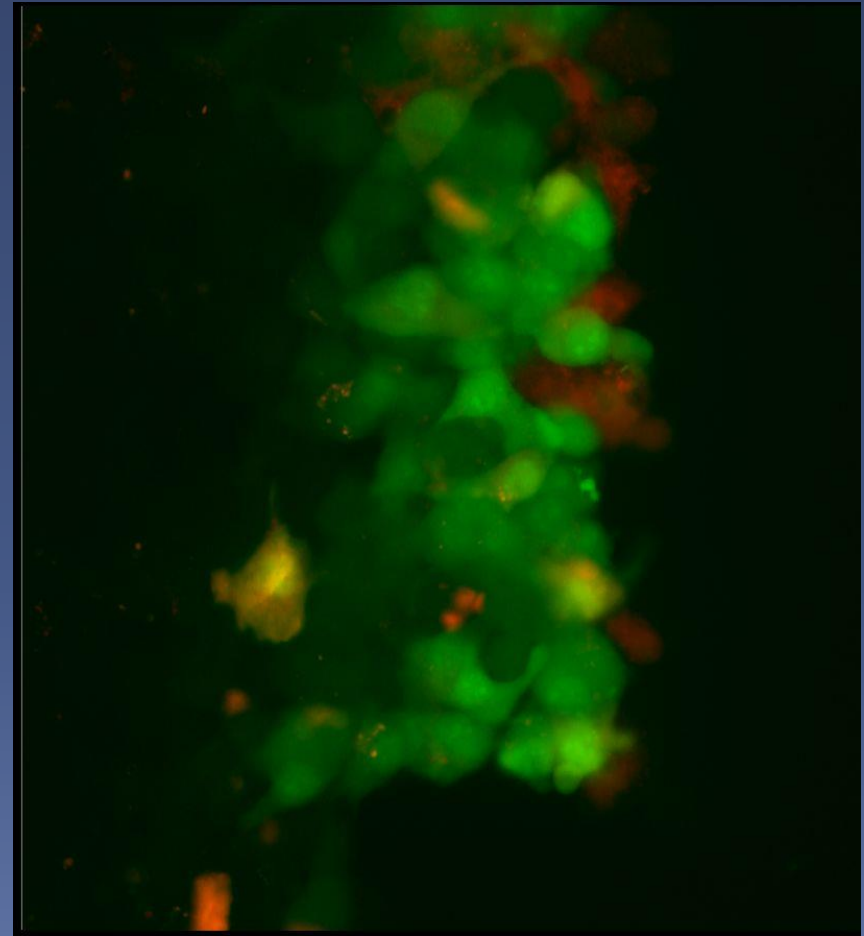
- Test scrape-loading
- Functional evaluation of „gap junction”



Scrape-loading



WT



CX3

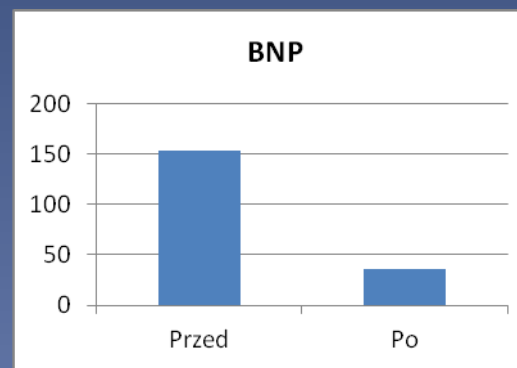
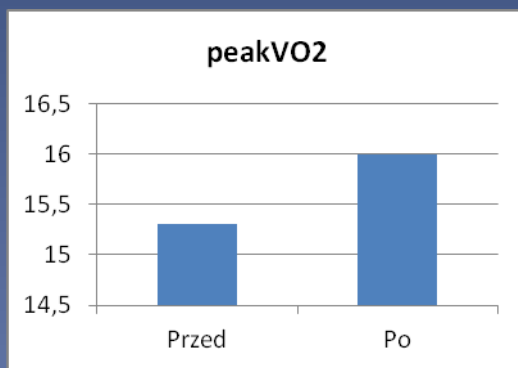
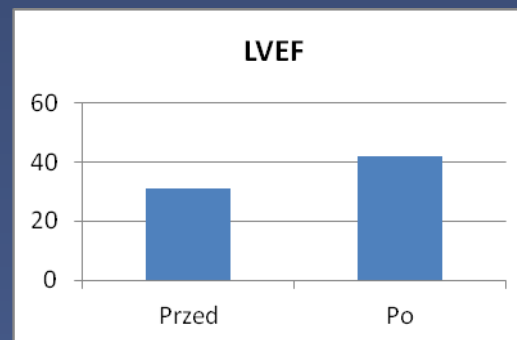
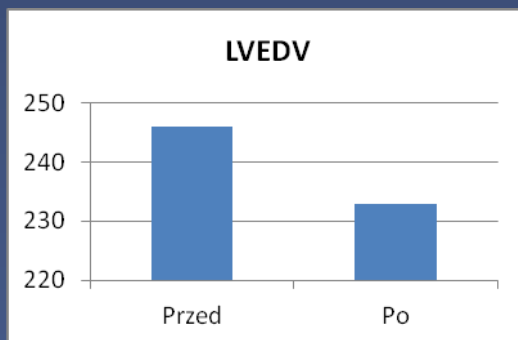
Grupa badana	
Pacjenci poddani przesiewowi	16
Niepowodzenie na etapie przesiewu	11
Pacjenci włączeni do badania / płeć	5 / mężczyźni
Pacjenci poddani leczeniu w ramach badania	5
	WW, 65 lat
	TM, 55 lat
	AG, 66 lat
	JC, 68 lat
	HB, 67 lat
Pacjenci, u których wykonano badanie kontrolne	AG, TM

Obserwacja kontrolna

Ocena wybranych parametrów laboratoryjnych, echokardiograficznych, wysiłkowych:

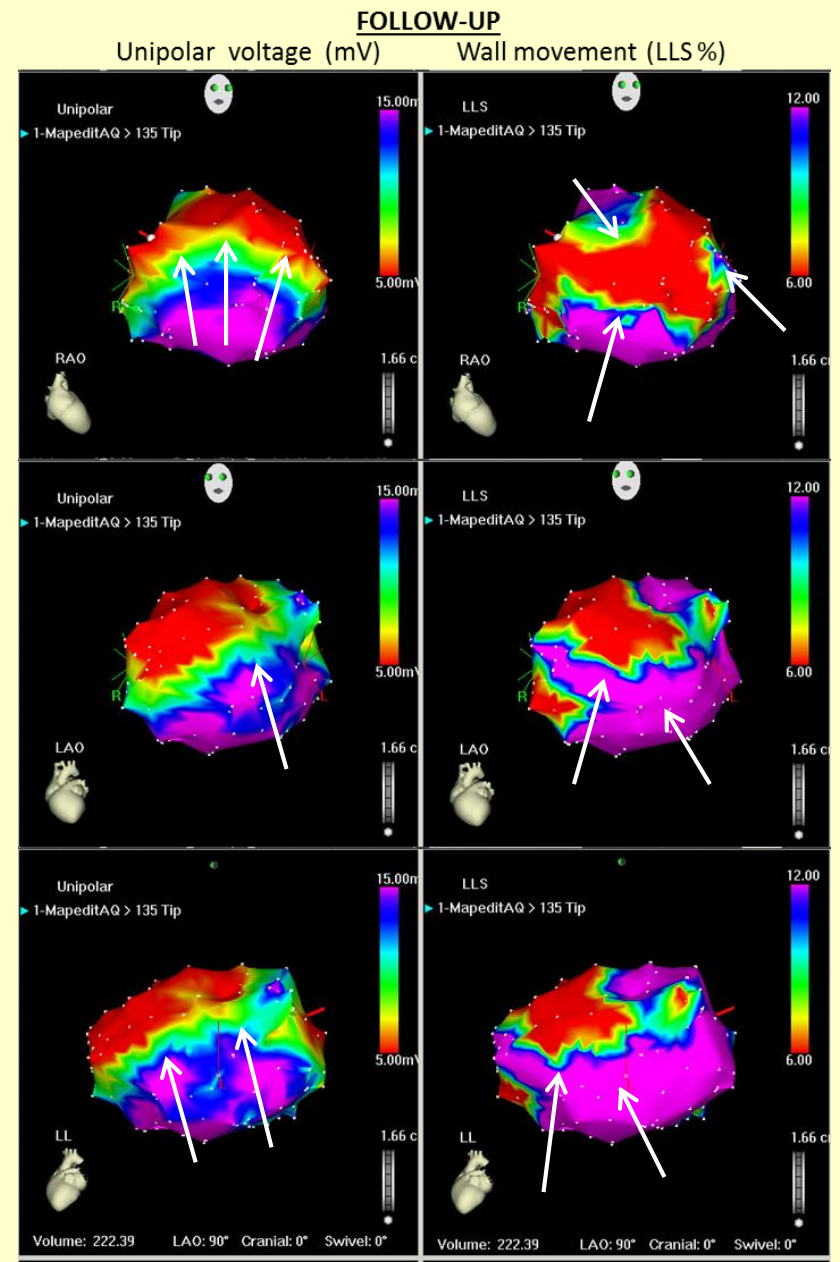
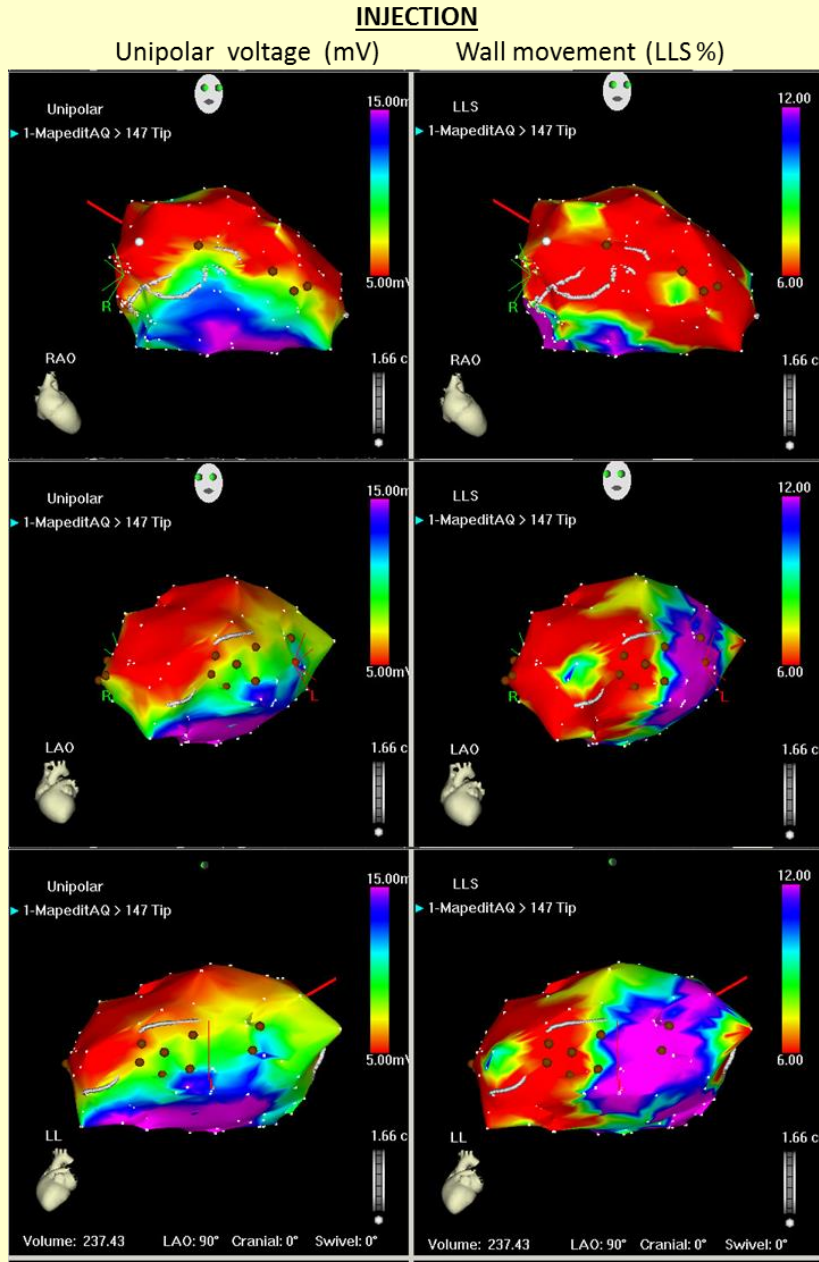
Pacjent AG

Pacjent z pozawałowym uszkodzeniem mięśnia sercowego, po CABG, przezskórnych interwencjach wieńcowych, z wszczepionym kardiowerterem-defibrylatorem, z cukrzycą typu 2 i otyłością brzuszną. W badaniach kontrolnych (8 miesięcy po podaniu komórek) stwierdzono przyrost frakcji wyrzutowej lewej komory i poprawę wydolności wysiłkowej. Ponadto obserwowano zmniejszenie spoczynkowego stężenia BNP i objętości końcoworozkurczowej lewej komory.

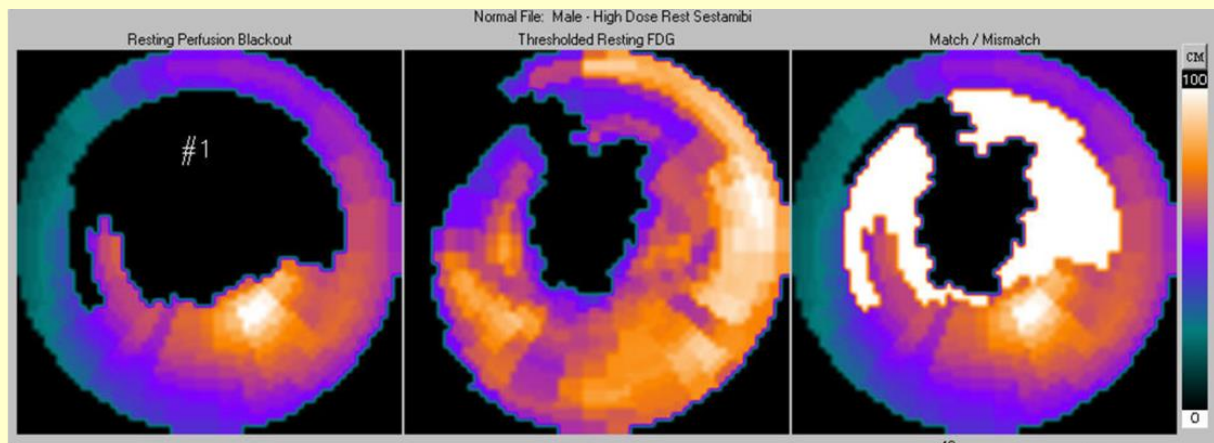


LVEDV – objętość końcoworozkurczowa lewej komory; LVEF – frakcja wyrzutowa lewej komory;
peakVO2 – szczytowe pochłanianie tlenu podczas testu wysiłkowego;
BNP – stężenie przedsionkowego peptydu natriuretycznego typu B w osoczu w spoczynku

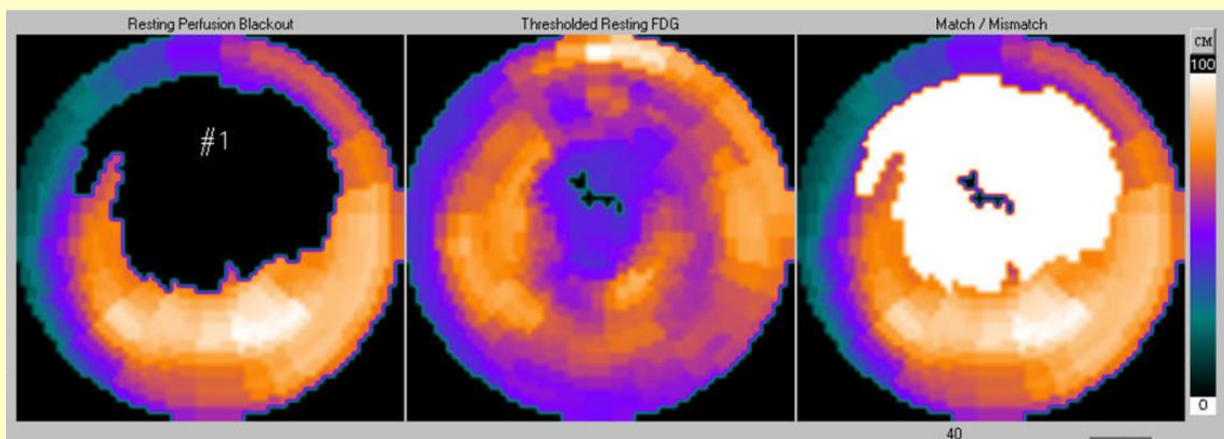
Na poniższej rycinie strzałkami zaznaczono regresję blizny elektrycznej oraz miejsca, w których obserwuje się poprawę kurczliwości



Ocena żywotności mięśnia sercowego (z zastosowaniem pozytonowej tomografii emisyjnej) poprzez porównanie z zaburzeniami perfuzji przed i po podaniu komórek



PRZED



PO

Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34⁺CXCR4⁺ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial

Tendera M, Wojakowski W, Ruzylo W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, Musiałek P, Piwowarska W, Nessler J, Buszman P, Grajek S, Breborowicz P, Majka M, Ratajczak MZ; REGENT Investigators

Eur Heart J 2009; 30(11): 1313-1321.

Improvement of left ventricular function in patients with acute myocardial infarction after infusion of bone marrow stem cells (BMSC)

Grajek S.
Lesiak M.
Popiel M.
Bręborowicz P.
Pyda M.
Skorupski W.
Straburzyńska-Migaj E.
Cieśliński A.

**First Department
of Cardiology**

Gil L.
Sawiński K.
Czyż A.
Kozłowska M.
Komarnicki M.

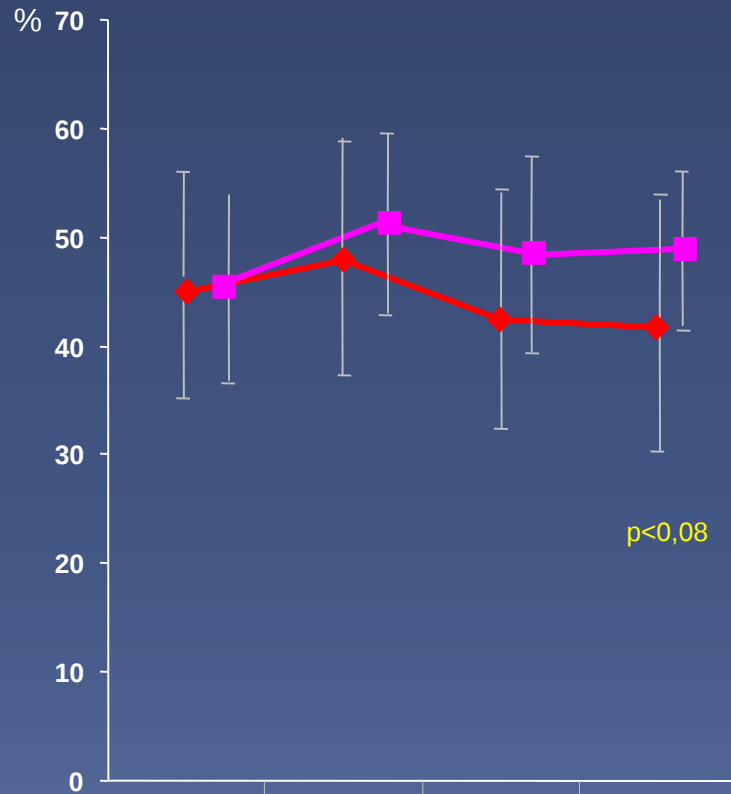
**Department
of Hematology**

Czepczyński R.
Oleksiak R.
Sowiński J.

**Department
of Endocrinology**

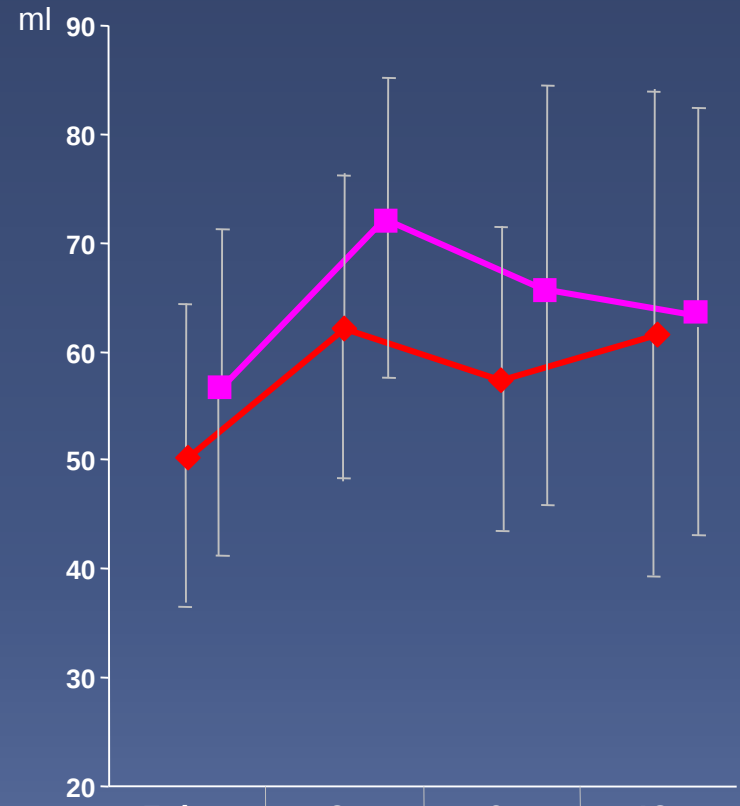
Poznan University of Medical Sciences, Poland

LV Ejection Fraction (4 chamber apical view)



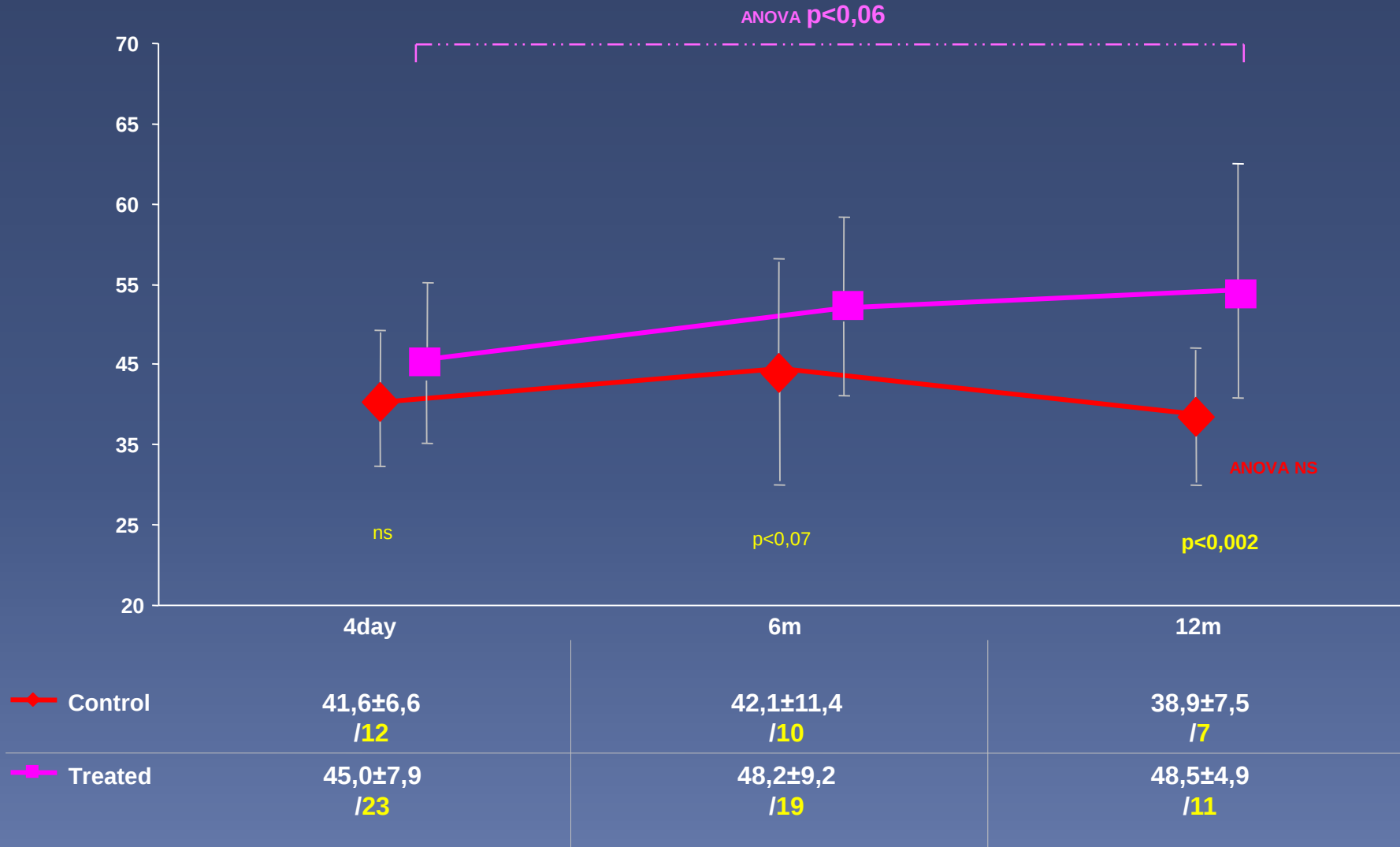
	7 days	3m	6m	12m
Control	45,0±9,6 /12	47,9±10,9 /11	42,4±10,5 /10	41,7±11,3 /9
Treated	45,4±8,2 /23	50,7±8,2 /19	48,5±8,9 /20	48,8±6,6 /12

SV_{ml} (ECHO)



	7 days	3m	6m	12m
Control	50,2±13,4 /12	62,2±13,5 /11	57,4±13,5 /10	61,5±22 /9
Treated	56,6±14,7 /23	72,0±19,7 /19	65,5±19,2 /20	63,5±19 /12

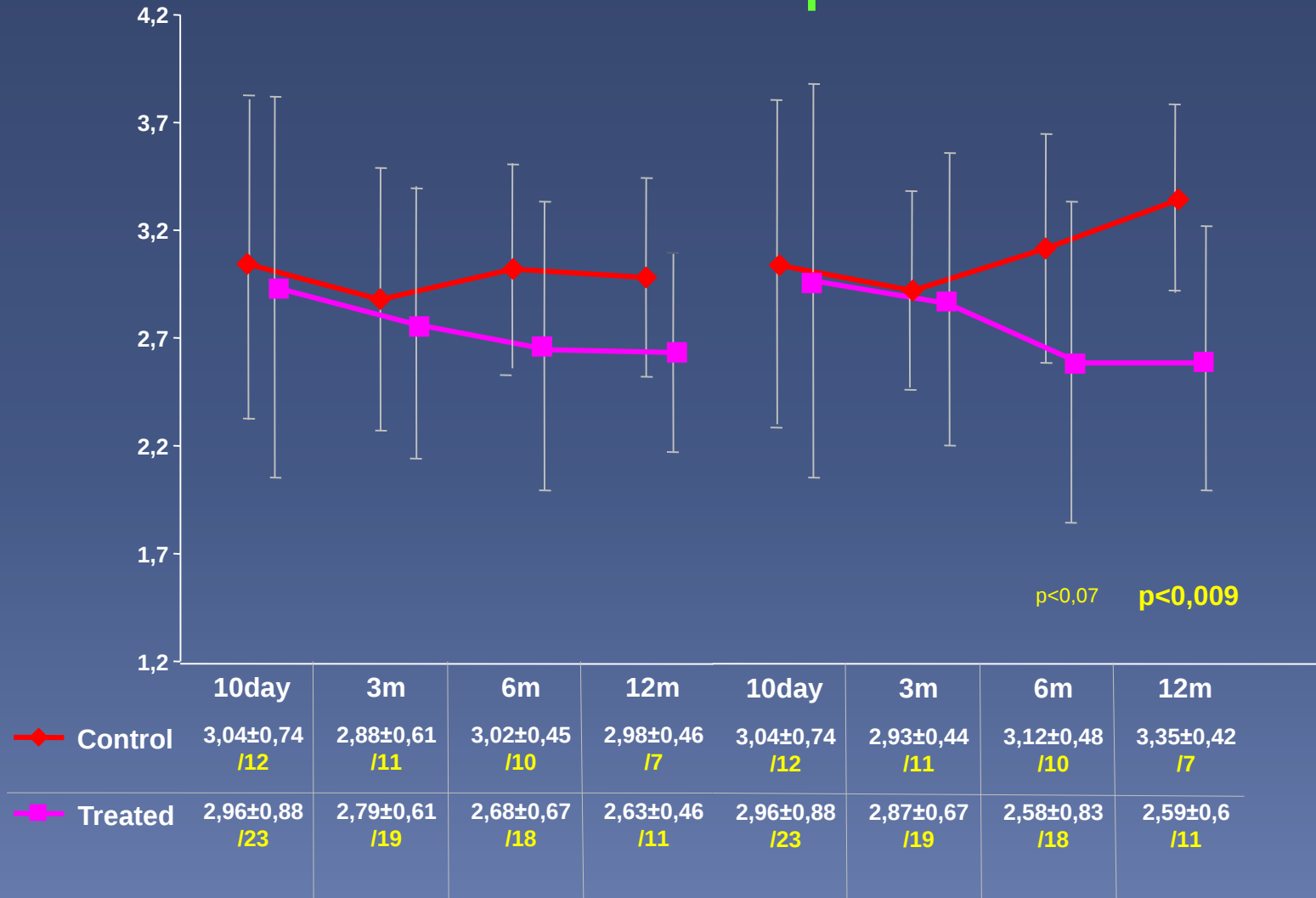
Radionuclide ventriculography (RNV) - EF



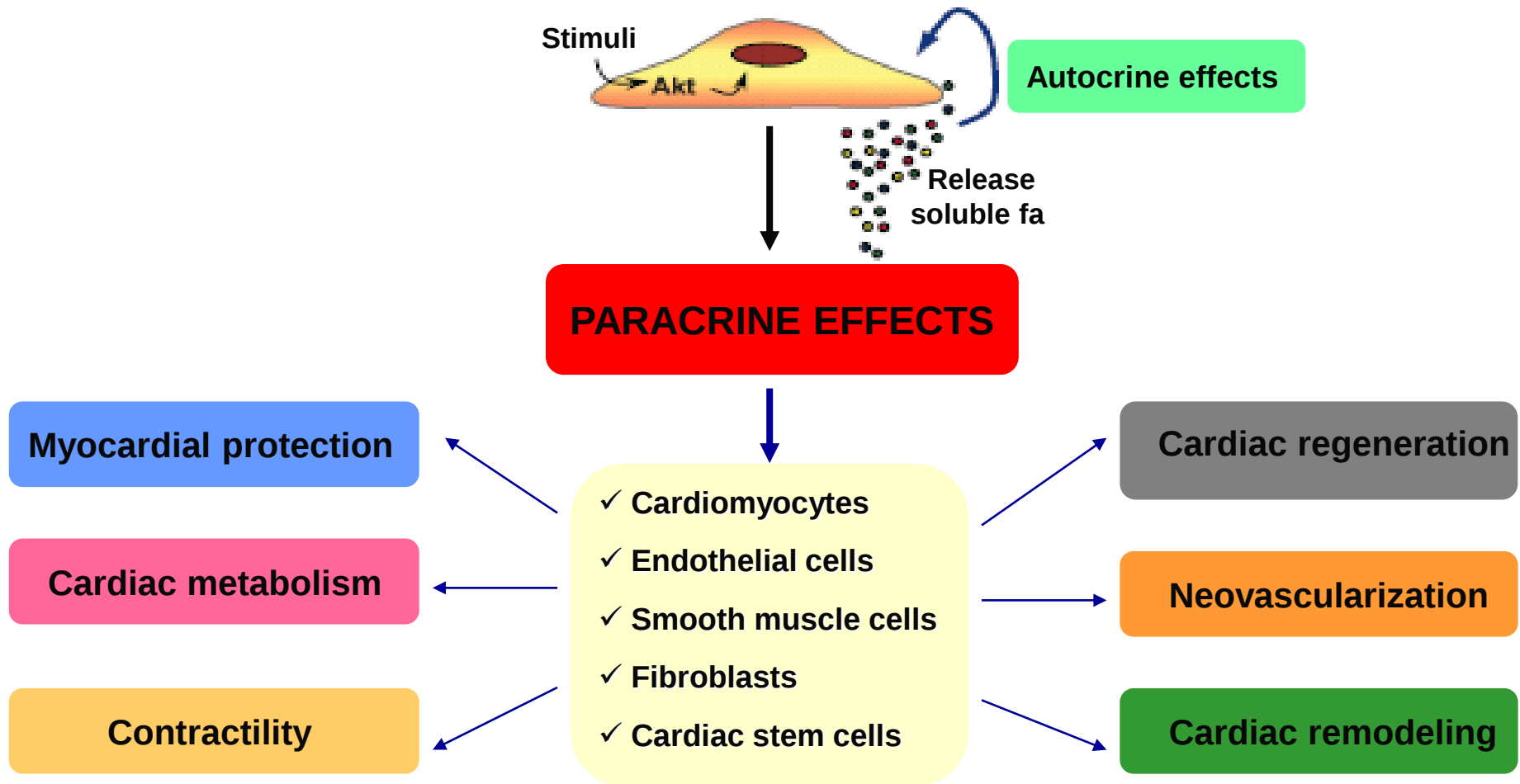
ROI Perfusion Index Tc-99m-MIBI SPECT

Rest

Dipiridamol



Adult Stem Cell



Paracrine/autocrine mechanisms in stem cell signaling and therapy.

ASCs release biologically active substances in a temporal and spatial manner in response to specific environmental stimuli such as ischemia. These factors influence the microenvironment by exerting paracrine actions on different cell types, leading to tissue protection, repair, and regeneration. The putative factors may also exert autocrine actions modulating the biology of stem cells including self-renewal and proliferation.

Putative paracrine factors secreted by ASCs

Putative secreted factor	Abbreviation	Proposed function
Adrenomedullin	ADM	Cytoprotection
Angio-associated migratory protein	AAMP	Angiogenesis
Angiogenin	ANG	Angiogenesis; cell proliferation
Angiopoetin-1	AGPT1	Cell migration; vessel stabilization
Bone morphogenetic protein-2	BMP2	Development
Bone morphogenetic protein-6	BMP6	Cell differentiation; growth
Connective tissue growth factor	CTGF	Angiogenesis; cell growth
Endothelin-1	EDN1	Cytoprotection; cell proliferation
Fibroblast growth factor-2	FGF-2	Cell proliferation and migration
Fibroblast growth factor-7	FGF7	Cell proliferation and stabilization
Hepatocyte growth factor	HGF	Cytoprotection; angiogenesis; cell migration
Insulin-like growth factor-1	IGF-1	Cytoprotection; cell migration; contractility
Interleukin-1	IL-1	VEGF induction
Interleukin-6	IL-6	VEGF induction
Interleukin-11	IL-11	Cytoprotection
Kit ligand/stem cell factor	KITLG (SCF)	Cell proliferation and migration
Leukemia inhibitory factor	LIF	Cell proliferation; cytoprotection
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	Cell proliferation; inflammatory response
Matrix metalloproteinase-1	MMP1	Loosens matrix; tubule formation
Matrix metalloproteinase-2	MMP2	Loosens matrix; tubule formation
Matrix metalloproteinase-9	MMP9	Loosens matrix
Monocyte chemoattractant protein-1	MCP-1	Monocyte migration
Macrophage-specific colony-stimulating factor	M-CSF	Monocyte proliferation/migration
Placental growth factor	PGF	Cell proliferation
Plasminogen activator	PA	Degrading matrix molecules
Platelet-derived growth factor	PDGF	Cell proliferation and migration
Pleiotrophin	PTN	Cell proliferation
Secreted frizzled-related protein-1	SFRP1	Development
Secreted frizzled-related protein-2	SFRP2	Development
Stem cell-derived factor-1	SDF-1	Progenitor cell homing
Thrombospondin-1	THBS1	Cell migration
Thymosin- β 4	TMSB4	Cell migration; cytoprotection
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1	TIMP-1	Cell migration
Tissue inhibitor of metalloproteinase-2	TIMP-2	Cell migration
Transforming growth factor- β	TGF- β	Vessel maturation; cell proliferation
Tumor necrosis factor- α	TNF- α	Degrade matrix molecules; cell proliferation
Vascular endothelial growth factor	VEGF	Cytoprotection; proliferation; migration; angiogenesis

Projekt „Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie”

Realizacja, patronat, partnerstwo projektu:



KOORDYNACJA:



Zadania badawcze

Projekt "Innowacyjne metody wykorzystania komórek macierzystych w medycynie" składa się z 9 zadań badawczych:

Zadanie 1: Molekularne mechanizmy regulujące fizjologię i patologię VSELs

Zadanie 2: Rola VSELs w mechanizmie endogennej odpowiedzi patofizjologicznej na ostre zaburzenia organiczne i funkcjonalne homeostazy organizmu

Zadanie 3: Poszukiwanie nowych markerów mysich, szczurzych oraz ludzkich komórek VSELs w celu optymalizacji ich pozyskiwania dla celów badawczych oraz klinicznych

Zadanie 4: Optymalizacja regeneracyjnego potencjału miogennego oraz angiogennego komórek macierzystych, w tym komórek VSELs

Michał Zembala • Dr n. med., Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii i Transplantologii SUM, Śląskie Centrum Chorób Serca w Zabrzu

Piotr Wilczek • Dr n. med., Fundacja Rozwoju Kardiologii w Zabrzu

Tomasz Cichoń, Ryszard Smolarczyk • Dr n. med., Zakład Biologii Molekularnej, Centrum Onkologii, Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie Oddział w Gliwicach

Sercowe komórki macierzyste Szansa dla serca, szansa dla Śląska

Rok 2010 naukowcy Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrzu, Instytutu Onkologii w Gliwicach oraz Fundacji Rozwoju Kardiologii w Zabrzu, skupieni wokół problemu regeneracji serca rozpoczęli z entuzjazmem i radością, ale także z nie małą obawą i niepokojem. Śląskie Centrum Chorób Serca tworząc konsorcjum naukowe z Instytutem Onkologii w Gliwicach oraz Fundacją Rozwoju Kardiologii w Zabrzu otrzymało dofinansowanie ze środków Unii Europejskiej w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka (poddziałanie 1.3.1), w wysokości 7,8 mln złotych na rozwój i realizację programu naukowego dotyczącego regeneracji mięśnia sercowego z wykorzystaniem sercowych komórek macierzystych.

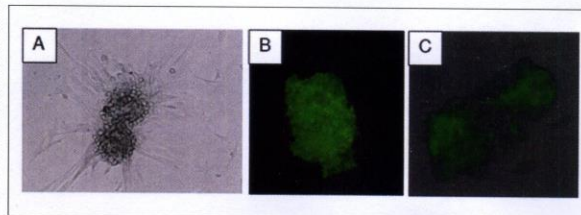
Projekt, którego czas trwania przewidziano na lata 2010-2014, zatytułowany „Sercowe komórki macierzyste i progenitorowe - nowa metoda regeneracji uszkodzonego serca” współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka,

dotyka komórek, których potencjał regeneracyjny wydaje się mieć olbrzymie znaczenie w odbudowie uszkodzonego mięśnia sercowego, zakłada skuteczną izolację i hodowlę tychże komórek in vitro oraz aplikację w modelu niedokrwienia u myszy otwierając drogę do dalszych badań doświadczalnych i klinicznych. Co ważne, projekt ten stanowi fragment szerszego Projektu Badawczego, wychodzącego daleko poza okres 5 lat, mającego na celu przygotowanie silnych fundamentów pod pierwsze kliniczne zastosowanie sercowych komórek macierzystych.

Projekt podzielono na trzy etapy, z czego dwa pierwsze realizowane będą ze środków UE: pierwszy, który skupia się na izolacji i hodowli komórkowej z fragmentów eksplantowanego mięśnia sercowego człowieka, z dokładną charakterystyką materiału in vitro, drugi, który zakłada szereg doświadczeń na zwierzętach laboratoryjnych, dokumentujących regeneracyjny potencjał CSC, oraz etap trzeci, którego fundamentem będą wyniki otrzymane we wcześniejszych etapach – badanie kliniczne, przeprowadzo-

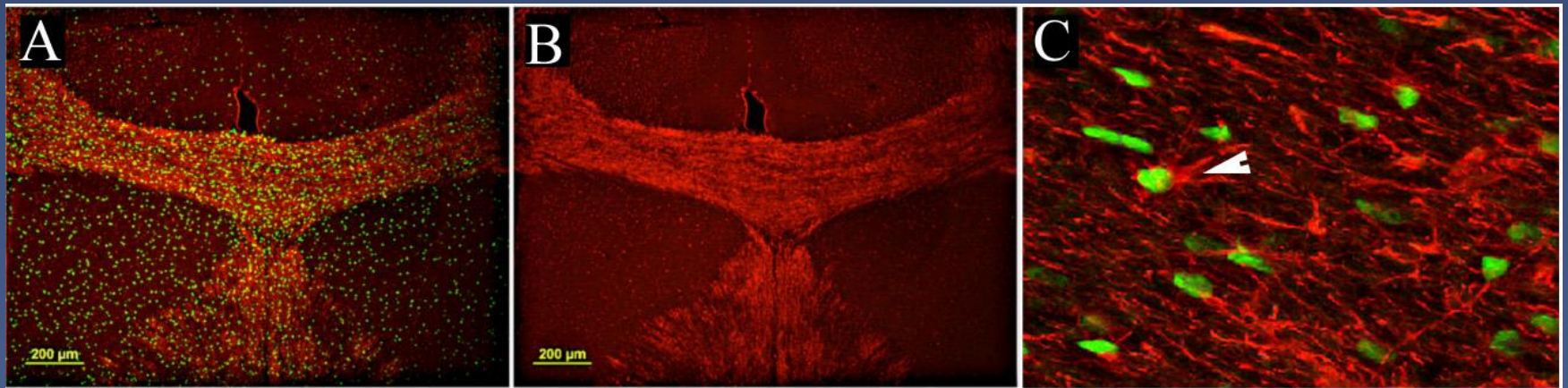
ne na wyselekcjonowanej grupie chorych, pozbawionych innych opcji leczenia, oceniając możliwość i bezpieczeństwo oraz skuteczność implantacji autologicznych CSC do niewydolnego serca ludzkiego. Należy bowiem pamiętać, iż pomimo bardzo dużego postępu w leczeniu farmakologicznym przewlekłej niewydolności serca (wprowadzenie inhibitorów konwertazy angiotensyny, inhibitorów receptorów beta-adrenergicznych, statyn) a także postępu w kardiologii inwazyjnej i kardiologii (kardiodefibrilatory, chirurgiczny remodeling lewej komory – SVR, systemy wspomagania lewej komory – LVAD) złotym standardem leczenia zaawansowanej postaci niewydolności układu krążenia pozostaje transplantacja serca. Mechaniczne urządzenia mające wspomóc lub zastąpić uszkodzone serce nie są dostatecznie rozpowszechnione, a ich stosowanie łączy się z szeregiem ograniczeń. Stąd rośnie zainteresowanie alternatywnymi sposobami regeneracji mięśnia sercowego.

Celem terapii komórkowej jest wprowadzenie nieodróżnionych komórek do serca (chirurgicznie lub przezskórnym) i poprzez ich różnicowanie odтворzenie elementu kurczliwego mięśnia sercowego. Współczesna medycyna dysponuje plejadą komórek nieodróżnionych, które w zależności od zdolności proliferacyjnych i potencjału regeneracyjnego, znalazły zastosowanie w wielu dziedzinach sztuki lekarskiej. W terapii chorób serca z różnym efektem stosowano dotychczas komórki hematopoetyczne (zarówno w postaci nieocyszczonych jak i puryfikowanych – np. komórki mezenchymalne), śródbłonkowe komórki pro-



Ryc. Komórki w hodowli wtórnej pozytywne o charakterze macierzystych komórek sercowych: A – tworzące sfery CSC B, C – reakcja pozytywna względem receptora c-kit.

Planowane interwencje w ośrodkowym układzie nerwowym
Wykorzystanie komórek krwi pępowinowej i komórek glejowych



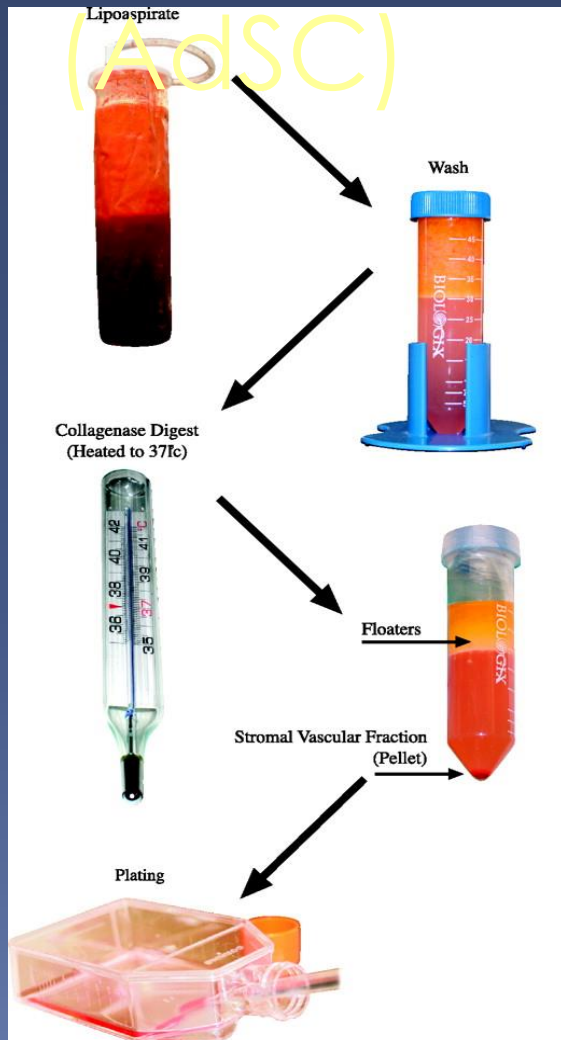
Human glial progenitors transplanted into the rodent central nervous system reveal vast migration over the entire neuraxis, as shown by green staining of a HuNu – human-specific marker (A,) and robust myelination as shown by red staining against MBP (A,B). This myelin-specific marker is absent in shiverers. (C) Transplanted cells were found to differentiate frequently toward GFAP-positive astrocytes (GFAP – red; HuNu – Green).

ASC (Adult Stem Cells)

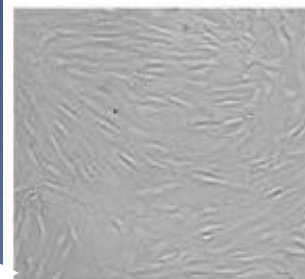
- Uzyskane z dorosłego organizmu - autologiczne
- Różny potencjał do różnicowania (pluri-, multi-, unipotentne)
- Najczęściej stosowane
 - komórki szpiku (mezenchymalne/niefrakcjonowane)
 - komórki mezenchymalne z tkanki tłuszczowej
 - komórki macierzyste mięśni szkieletowych
- Liczne badania kliniczne - 3038



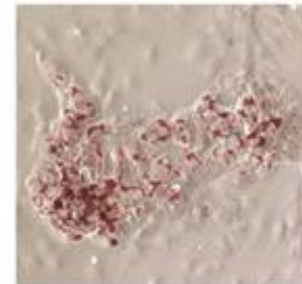
Komórki macierzyste izolowane z tkanki tłuszczowej



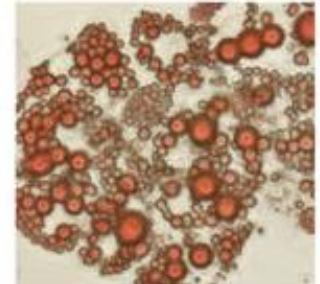
- Izolowane z lipoaspiratów
- Różnicują w : chondrocyty, kardiomiocyty, komórki nerwowe, komórki kości, komórki wydzielające insulinę



Undifferentiated ASC
5x Orig. Mag.

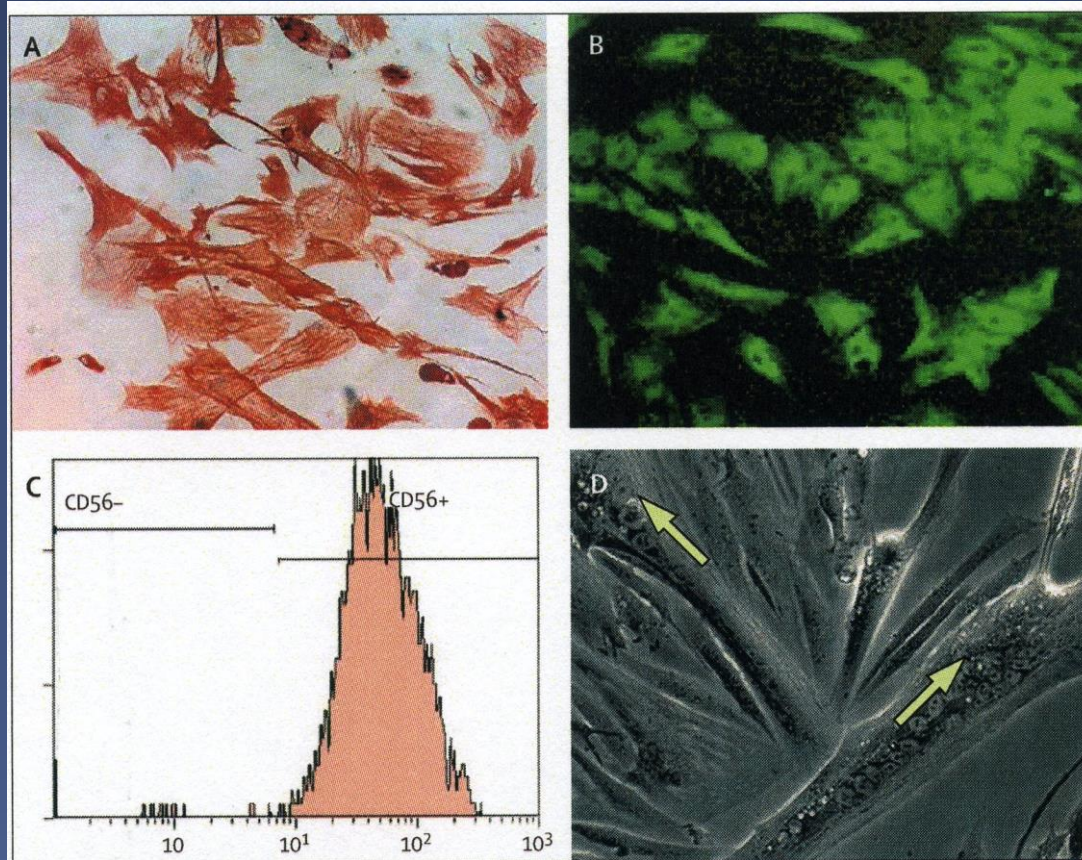


ASC Differentiating
into Fat Cells
Stained with Oil Red O
5x Orig. Mag.



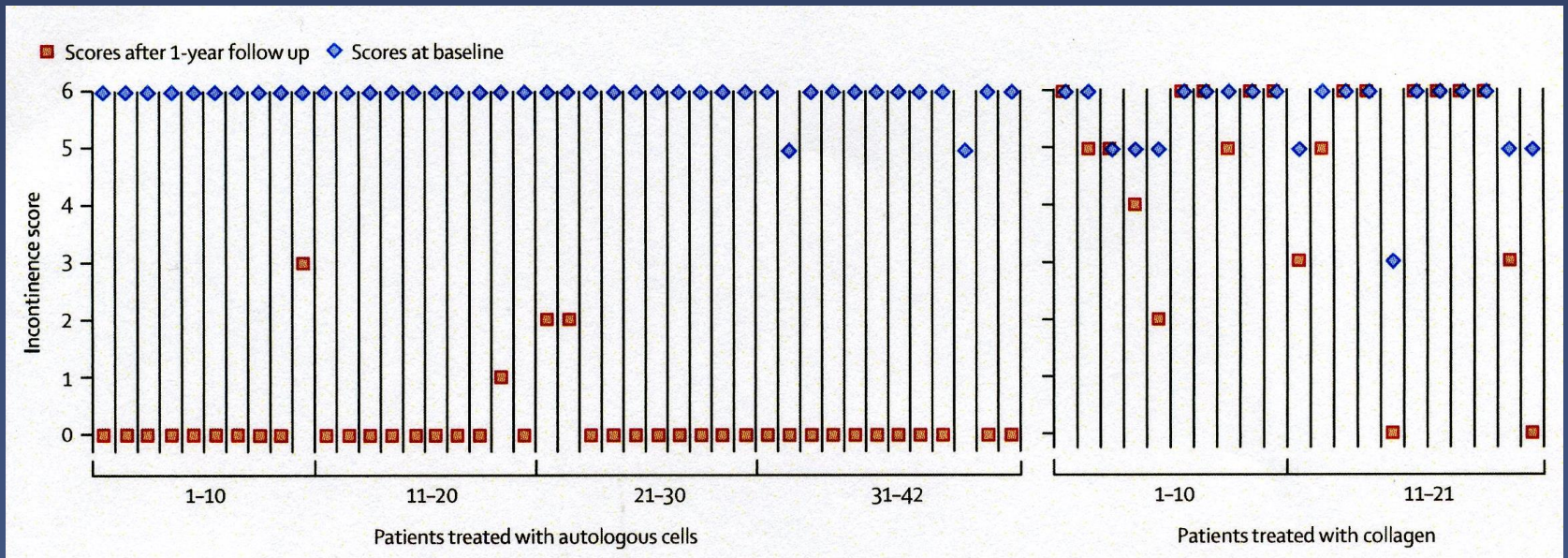
Close-up of
Differentiating ASC
20 x Orig. Mag.

Myoblast and sphincters

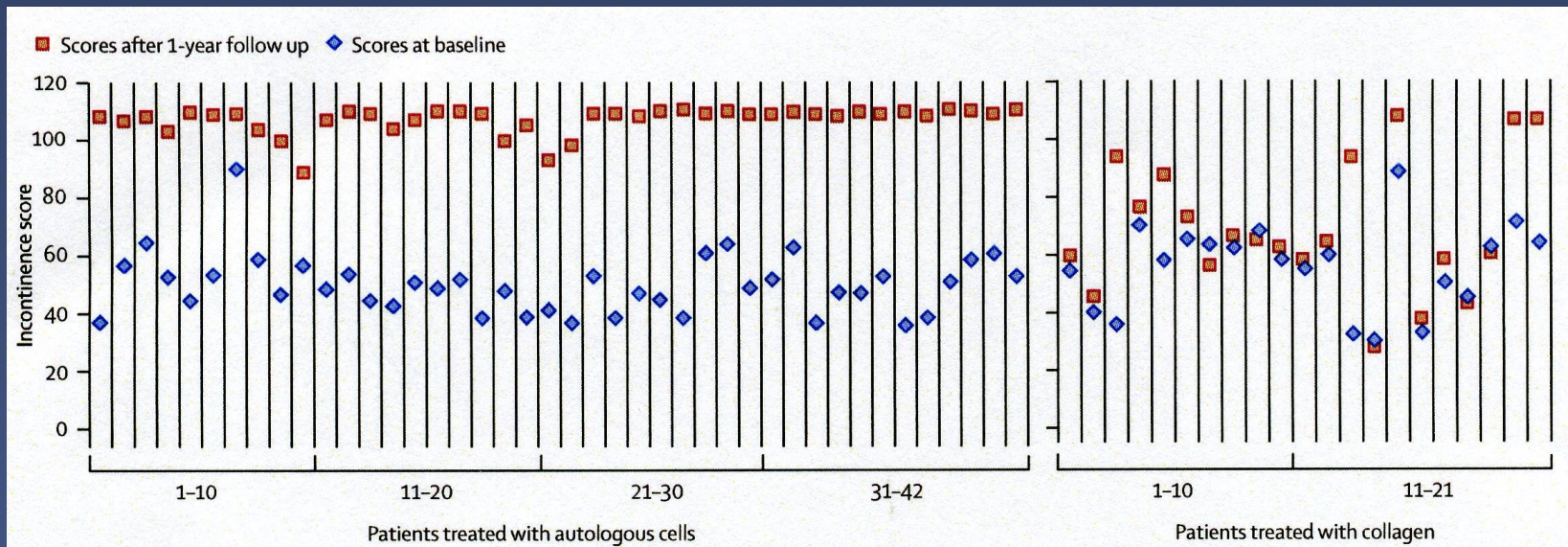


Characterisation of cells

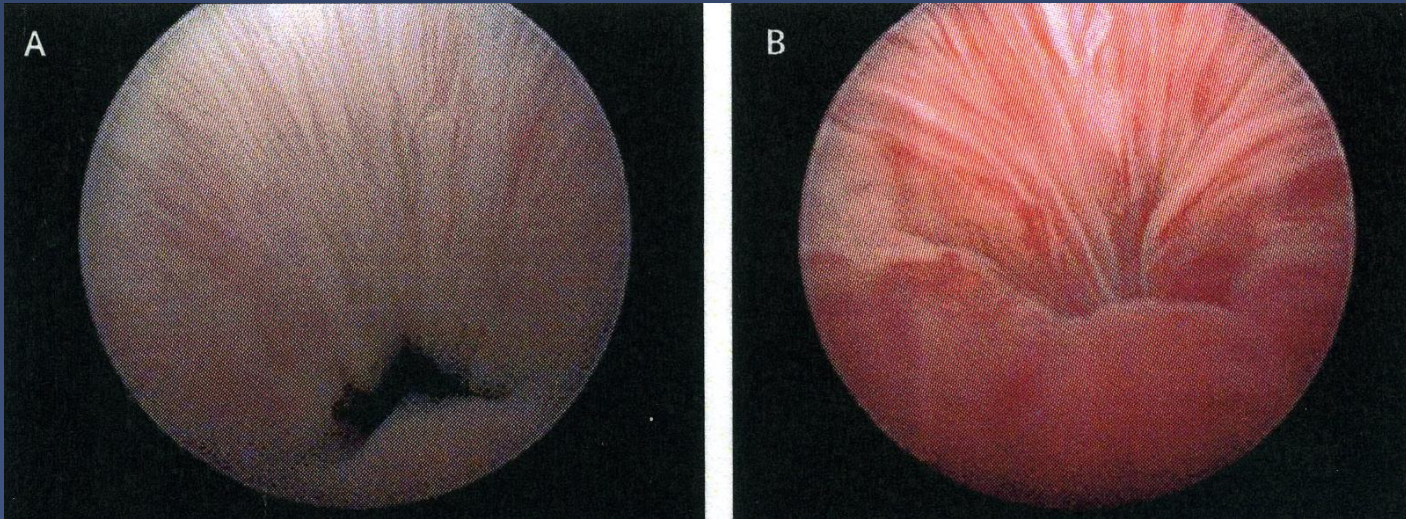
Strasser et al., Lancet 2007; 369:2179-2186.



Incontinence score before and after treatment.
Blue marks represent baseline scores and pink marks are scores after 1 year of follow-up



Quality-of-life scores before and after treatment.
Blue marks represent baseline scores and pink marks are scores after 1 year of follow-up



Endoscopic view of the urethal mucosa

Successful implantation of autologous muscle-derived stem cells in treatment of faecal incontinence due to external sphincter rupture

Romaniszyn M, Rozwadowska N, Nowak M, Malcher A, Kolanowski T, Walega P, Richter P, Kurpisz M.

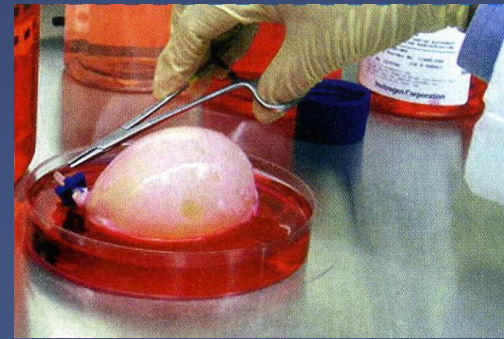
Int J Colorectal Dis, Published online 3 April 2013

	FISI Score	Mean Resting Pressure (MRP)	Maximum Squeeze Pressure (MSP)
Before	30	21 mmHg	73 mmHg
6 weeks	30	25 mmHg	89 mmHg
12 weeks	17	31 mmHg	87 mmHg
18 weeks	12	30 mmHg	89 mmHg
12 months	6	38 mmHg	92 mmHg

Perspektywy

Całkowita rekonstrukcja

Pęcherz moczowy



Penis - ciała jamiste

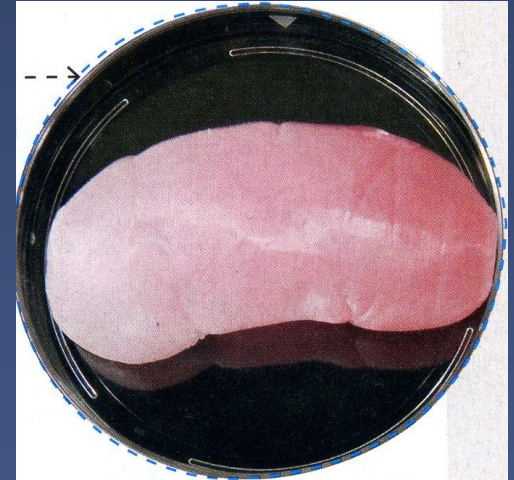
Drukowanie 3D

Chrząstka stawowa

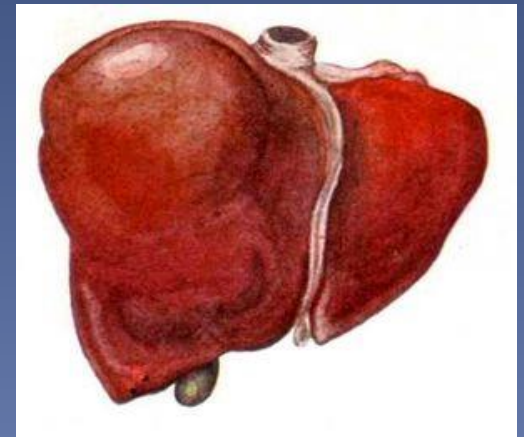
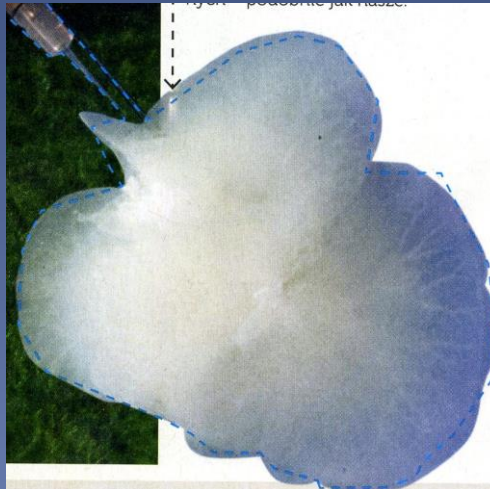


Rusztowania kolagenowe

nerka



wątroba



ROZMOWA O ZDROWIU: By leczyć się lepiej – Krzysztof Bukiel

01 • 2013

Gazeta Lekarska

PISMO IZB LEKARSKICH

Nauka

Europa dopuszcza lek do terapii genowej

25 października 2012 r. Komisja Europejska dopuściła do sprzedaży preparat o nazwie **Glybera**. To pierwszy lek w Unii Europejskiej, który działa poprzez dostarczenie genu dla lipazy lipoproteinowej.