

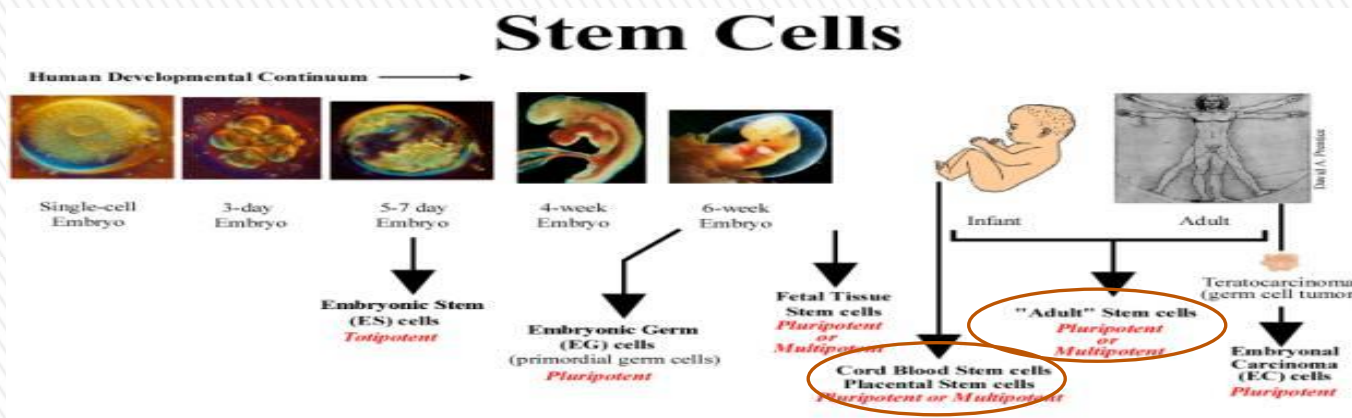


Mezenchymalne komórki macierzyste w leczeniu stwardnienia rozsianego – fakty i mity

Dr n.med. Mariola Świderek-Matysiak
Katedra i Klinika Neurologii UM w Łodzi

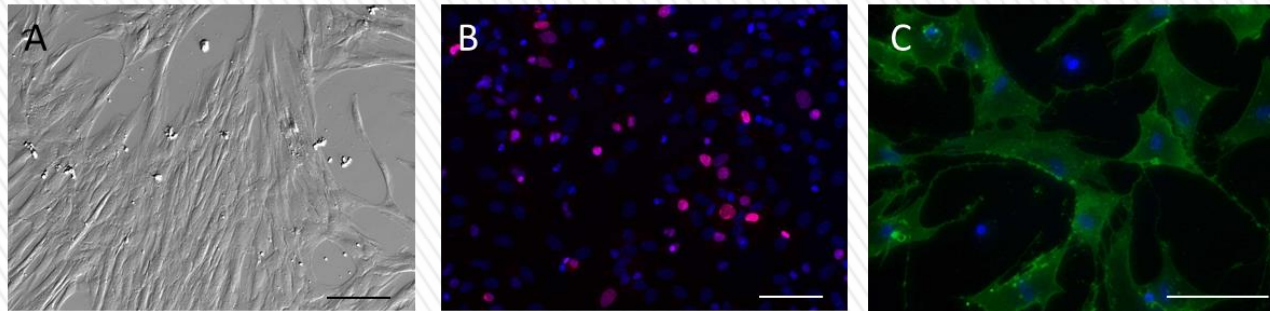
Komórki macierzyste – charakterystyka :

- ❑ ESC, mogące potencjalnie zróżnicować się w każdy rodzaj komórek, jednak wprowadzone do dorosłego organizmu, zamiast integrować się, tworzą potworniaki.
- ❑ **Dorośle komórki macierzyste**, chociaż posiadają ograniczoną zdolność różnicowania w różne tkanki, wykazują cechy dające im przewagę nad komórkami embrionalnymi w zastosowaniu w terapii.
- ❑ nie tworzą potworniaków,
- ❑ mogą być pobrane z własnego organizmu pacjenta, dzięki czemu nie istnieje ryzyko ich odrzucenia (co mogłoby mieć miejsce po podaniu ESC)
- ❑ pozyskanie dorosłych komórek macierzystych nie wiąże się ze zniszczeniem embrionu, nie wywołuje zatem wątpliwości natury etycznej.



Mezenchymalne komórki macierzyste

- Odkryte w 1968 r przez Friedensteina jako populacja podobnych do fibroblastów, adherujących do plastiku komórek szpiku kostnego, posiadających zdolność różnicowania się do osteocytów
- Mogą być pozyskiwane ze szpiku kostnego, tkanki tłuszczowej, krwi obwodowej, krwi pępowinowej i łożyska
- Zdolność do ekspansji w hodowlach *in vitro*



Phase contrast image of hMSC derived from bone marrow (A). Immunostaining of hMSC culture for marker of proliferation Ki67 (B), MSC marker CD90 (C). Cells nuclei were stained with Hoechst 33252 (blue). Scale bars are 50 μ m.

Dr hab Joanna Wojtkiewicz UWM w Olsztynie



International Society of Cellular Therapy, 2006

1. MSC muszą adherować do plastiku w standardowe hodowli
2. MSC muszą wykazać ekspresję powierzchniowych markerów takich jak: CD73, CD90 i CD 105 oraz brak ekspresji: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79alfa, CD19 i HLA-DR
3. MSC muszą mieć zdolność różnicowania w kierunku osteoblastów, adipocytów i chondroblastów *in vitro*



Mezenchymalne komórki macierzyste w

EAE – FAKTY

Terapia dożylnym podaniem MSC skutkowałą poprawą kliniczną, zmniejszeniem zapalenia, demielinizacji i uszkodzenia aksonów

Mechanizm działania:

- **Immunosupresyjny** efekt na limfocyty T, komórki NK i komórki prezentujące antygen

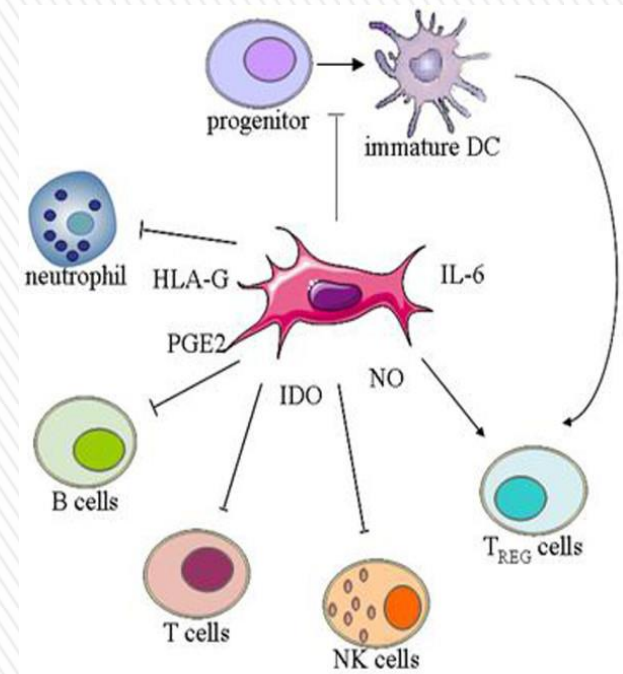
(Zappia et al,2005; Krampera et al,2003; Karussis et al,2005;)

- MSC działają poprzez **czynniki wydzielane** m.in. PGE2, indolamino-2,3-dioxygenaza, TGF-beta, HGF, NO

(Nasef et al,2007; Dazzi et al,2008; Shiraishi et al,2008; Matysiak et al, 2011)

- MSC hamują proliferację komórek B, ekspresję receptorów dla chemokin, produkcję immunoglobulin

(Corcione et al,2006)



» Mechanizm neuroaksonalnego uszkodzenia w SM

- Bezpośredni atak autoreaktywnych przeciwciał czy cytotoksycznych limf. T CD8, makrofagów, enzymów proteolitycznych, cytokin, NO czy wolnych rodników
- Uszkodzenie aksonów wtórne do ostrej lub przewlekłej demielinizacji, brak czynników troficznych i/lub zaburzona regeneracja aksonów przez działanie inhibitorów wzrostu aksonów związanych z mieliną jak MAG czy Nogo A.

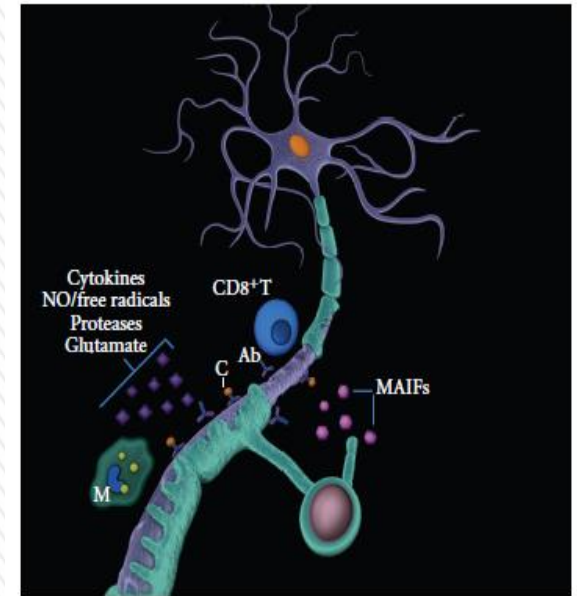


FIGURE 1: The mechanisms of neuroaxonal damage in multiple sclerosis. Legend: NO: nitric oxide; M: macrophage; C: complement; Ab: antibody; CD8⁺T: CD8⁺T-lymphocyte; MAIFs: myelin-associated inhibitory factors.

Dujmovic, 2011



FAKTY:

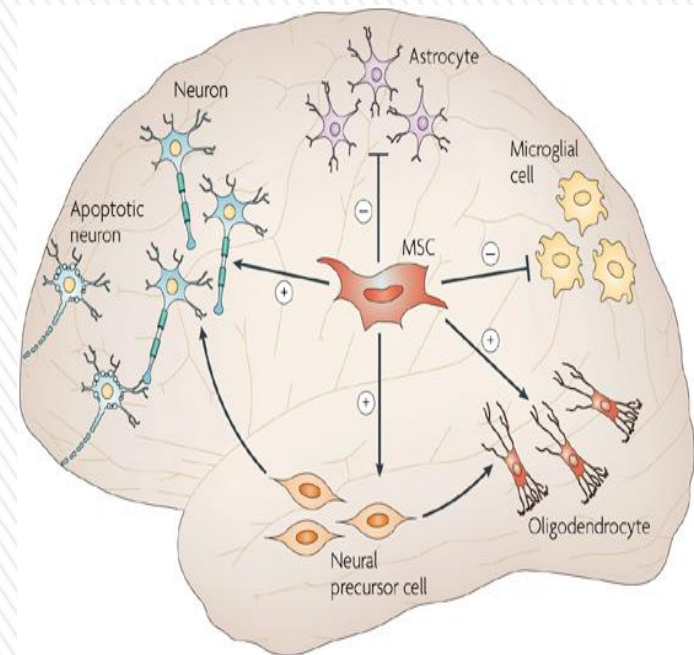
- MSC dostarczają czynników niezbędnych dla endogennych komórek – hamują gliozę, zwiększa się proporcja oligodendrocytów i ich progenitorów (Rivera et al,2006;

Bai et al,2009)

- MSC lokalizowano w OUN biorcy, zwłaszcza w obszarach zapalnej demielinizacji (Karussis et al,2005)
- Neuroprotekcja – zwiększona produkcja BDNF (brain – derived neurotrophic factor), HGF (Bai et al, 2012)

MITY:

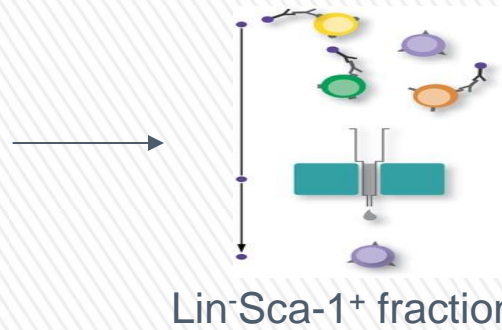
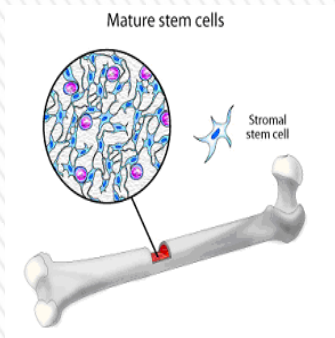
MSC uważano za źródło komórek z potencjałem do osiedlania w miejscach zapalenia czy uszkodzenia, w rzeczywistości nie udowodniono *in vivo* różnicowania czy integrowania się MSC z komórkami mózgowia o znaczeniu klinicznym



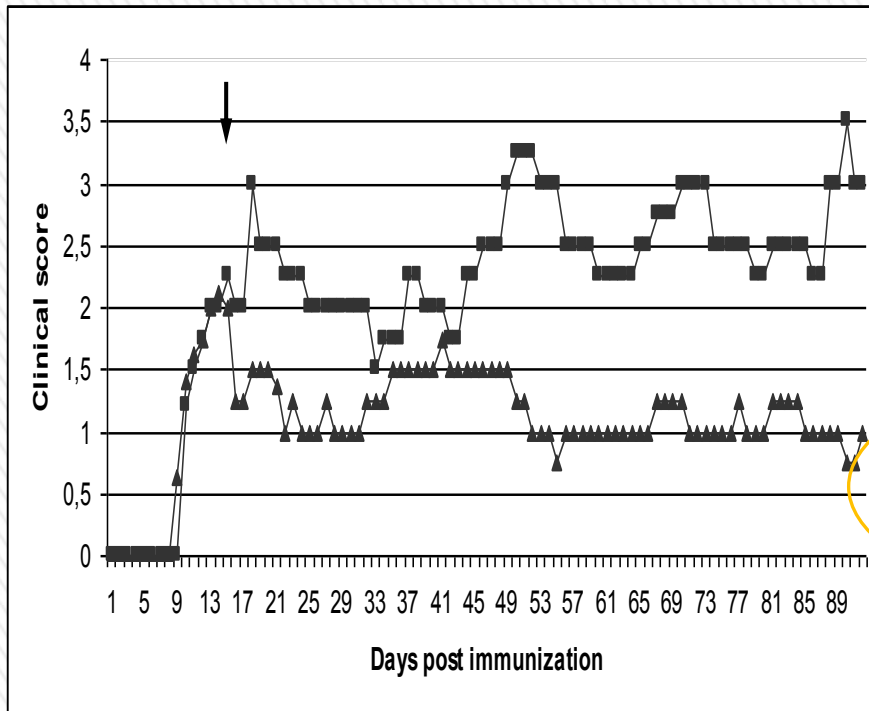
Nature Reviews | Immunology



Bezwzględna korzyść w EAE - MS ciągle niewiadoma

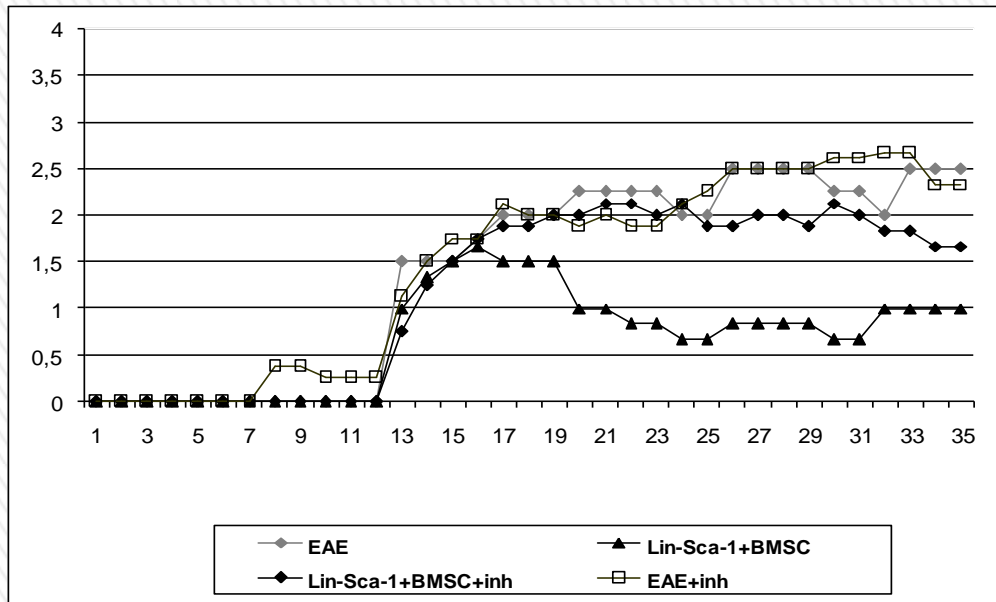
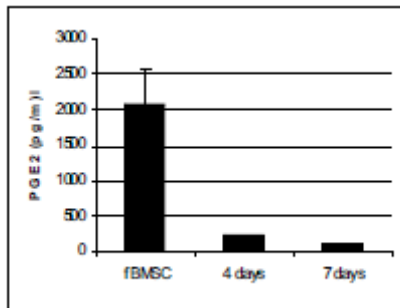
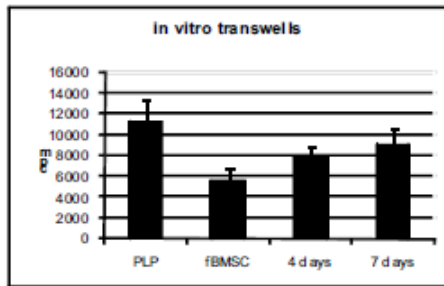
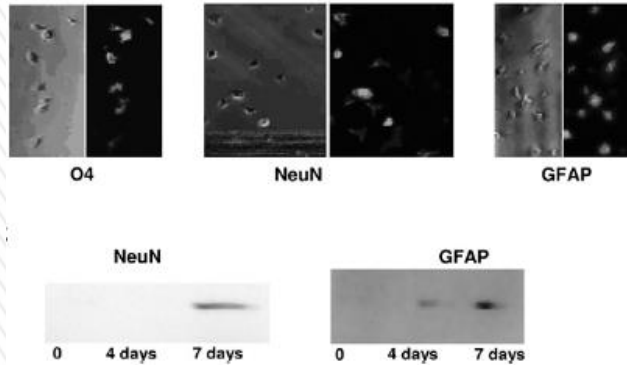


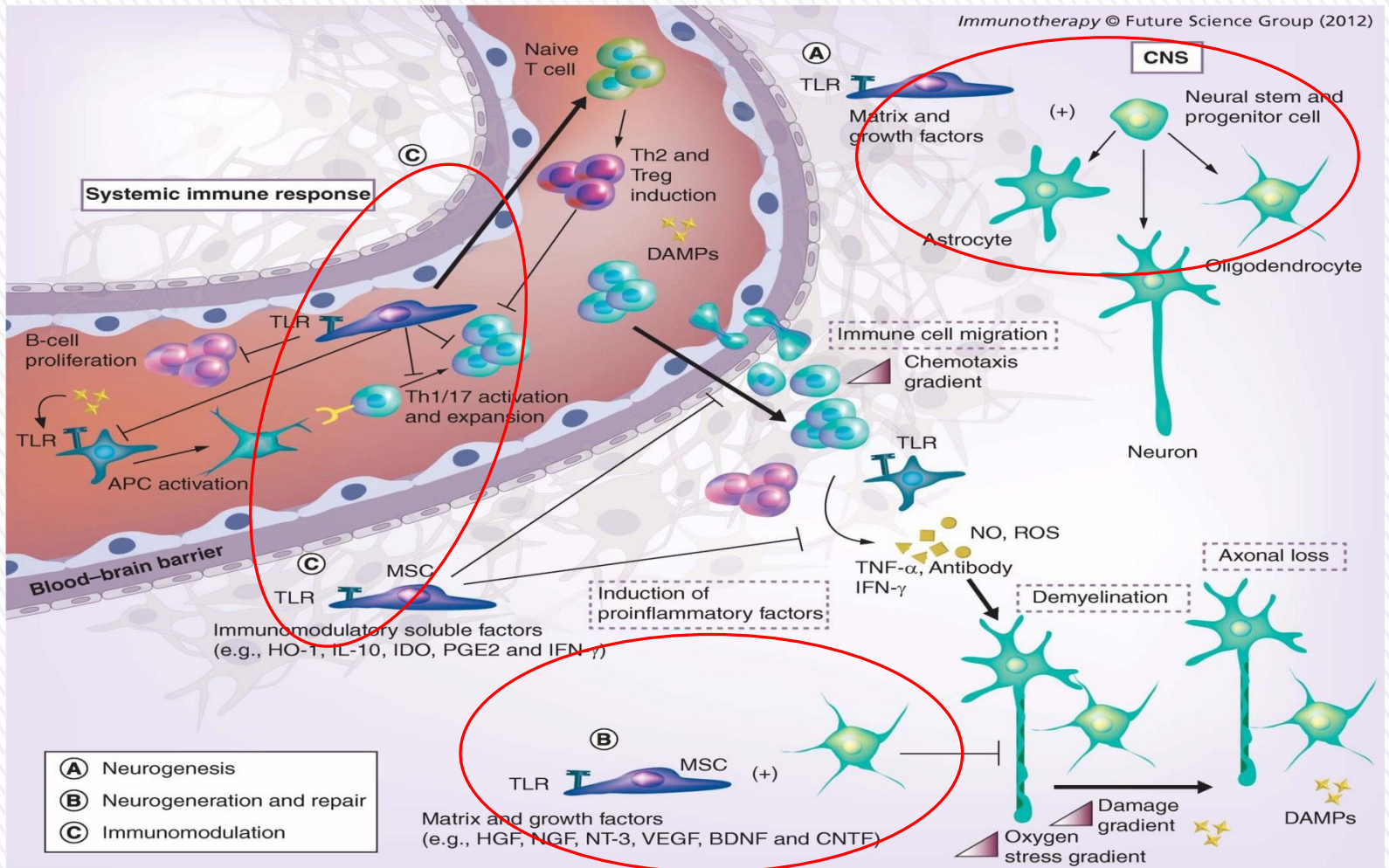
Transplantation of 2×10^6 cells iv at the onset of disease

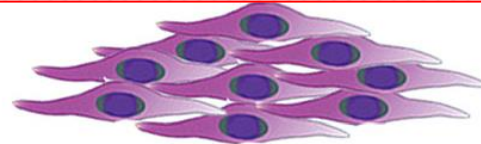


Immunoregulatory function of bone marrow mesenchymal stem cells in EAE depends on their differentiation state and secretion of PGE2

Matysiak et al, *J Neuroimm* 2011













MSCs from bone marrow, adipose tissue etc.





Differentiation

Endoderm	 Epithelial cells	 Islet cells
Mesoderm	 Osteoblast	 Cardiac muscle
Ectoderm	 Neuron	 Glial cells

Bioactive molecules secretion

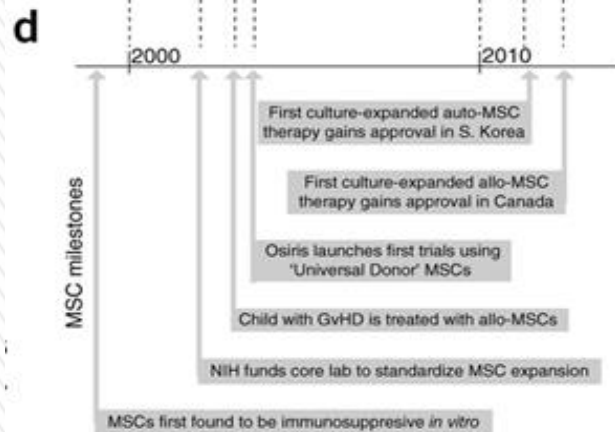
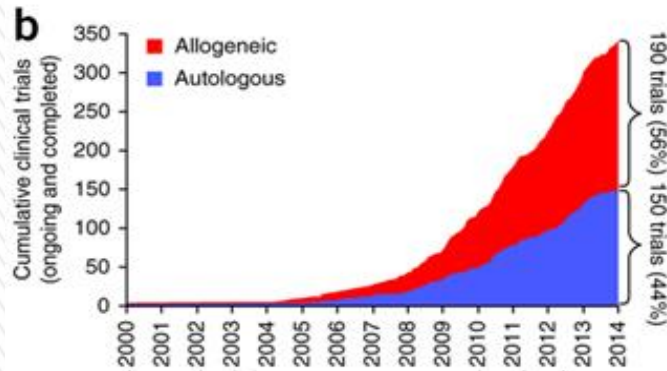
Migration and engraftment

Immunomodulation

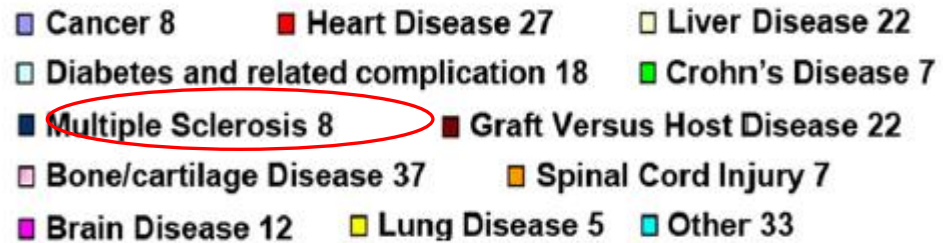
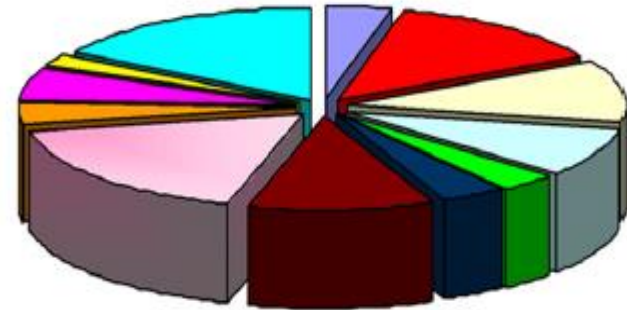
 T cell	↓ Proliferation ↓ Cytotoxicity
 Dendritic cell	↓ Maturation ↓ Activation
 B cell	↓ Proliferation ↓ IgG secretion
 NK cell	↓ Proliferation ↓ Cytotoxicity

Inflammation ↓
Tissue repair ↑

Cell-based therapy in the field of regenerative medicine



Clinical trials of MSCs are classified by disease types (by 2011/12/13 n=206)



Wang et al, 2012

Ankrum et al, Nature Biotech 2014



Terapia komórkowa SM:

Potencjalne źródło komórek :

Komórki mezenchymalne szpiku kostnego

łatwo dostępne, autologiczne, potencjał terapeutyczny, bezpieczny profil

Przeszczepy *auto* czy *allogeniczne*:

- MSC – bardzo niska immunogenność – niska ekspresja MHC I, MHC II i molekuł kostymulujących
- Allo-MSC indukowana odpowiedź immunologiczna (przeciwciała, aktywacja komplementu) stanowi ograniczenie przy planowaniu wielokrotnych podań MSC
- „bankowanie MSC” – komórki od zdrowych dawców – doniesienia o mniejszym potencjale terapeutycznym MSC izolowanych od pacjentów z toczeniem czy poddanych intensywnej chemioterapii
- MSC izolowane od pacjentów z SM, w tym po terapii interferonem-beta, fenotypowo nie różniły się istotnie od komórek osób zdrowych – pojedyncze doniesienia, małe grupy pacjentów – 2013r – doniesienie – BM-MSC pacjentów z SM charakteryzowały się mniejszym potencjałem immunosupresyjnym i mniejszą ekspresją genów m.in. TGFB1 i HGF



» Adipose-Derived Stem Cells

- » Mezenchymalne komórki izolowane z tkanki tłuszczowej- podobne do fibroblastów, adherujące, zdolność do różnicowania w inne linie komórkowe
- » Bardzo wydajne – 1 ml tkanki tłuszczowej w 3-4 pasażu, może dać bilion komórek
- » Również niska immunogenność i zbliżony profil immunoregulacji
- » Doniesienia o immunostymulacji (komórki z 1-2 pasażu) !
- » Doniesienia o stymulacji wzrostu nowotworów

Badania kliniczne w cukrzycy, RZS, colitis ulcerosus potwierdziły bezpieczeństwo i skuteczność

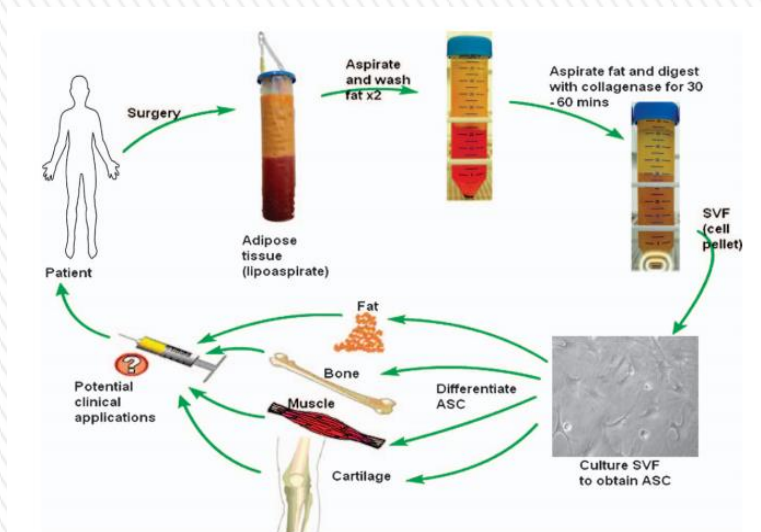
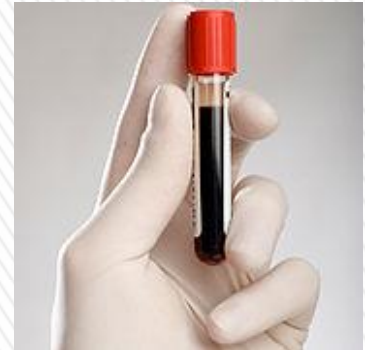


Fig. 1. Summary of cycle of human adipose-derived stem cell (ASC) isolation and differentiation for clinical usage. SVF, stromal vascular cell fraction.



Krew pępowinowa - zróżnicowana populacja komórek zawierająca:

1. Komórki hematopoetyczne
2. Mezenchymalne komórki macierzyste
3. Nie-hematopoetyczne komórki macierzyste fenotypowo zbliżone do komórek embrionalnych



UC-MSC- morfologicznie i fenotypowo duże podobieństwo do BM-MSC

- trudno je wyizolować, ale większe zdolności proliferacyjne
- nie tworzą potworniaków
- pozyskiwanie nie wymaga procedury inwazyjnej
- etycznie aprobowane
- możliwość wielokrotnych podań allogenicznych (bardzo niska immunogenność)



» Krew pępowinowa jest pobierana po odpepnieniu z naczynia pępowiny, po uzyskaniu zgody rodziców. Może być przechowywana w prywatnych bankach krwi pępowinowej, gdzie dostępna jest dla dawcy lub jednie spokrewnionych osób.

»

Polski Bank Komórek Macierzystych (Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie)

przechowuje krew pępowinową po uzyskaniu zgody na pobranie jak banki komercyjne lub rodzice zrzekają się praw do dysponowania krwią dziecka (nie ponoszą wtedy kosztów), krew ta może być wykorzystywana dla wszystkich potrzebujących biorców.



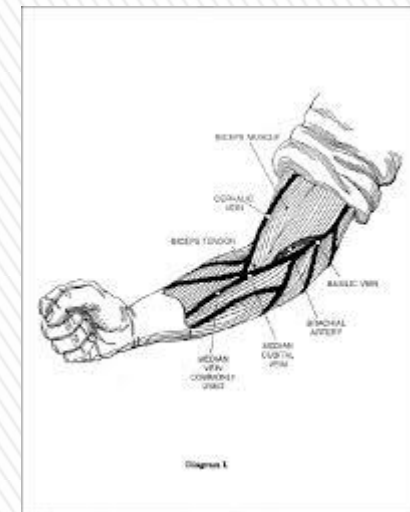
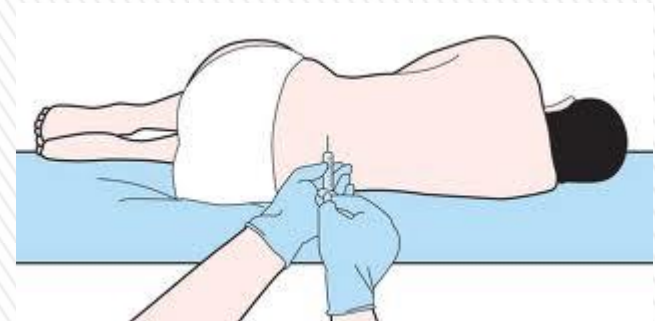
Krew pępowinowa może być przechowywana min. 50 lat w ciekłym azocie w temp. -196 st.C



Droga podania komórek:

! wieloogniskowość uszkodzenia mózgu i rdzenia w SM

- » W przeprowadzonych badaniach klinicznych komórki podawano iv, dokanałowo (it) lub iv plus it
- » EAE – podanie iv lub it podobne wyniki (Morando, 2012)
- » RR-MS iv *versus* SP i PP-SM it
- » it – mniejsza ilość MSC wydaje się być skuteczna
- » it- podrażnienie opon, jeden przypadek przejściowej encefalopatii z napadami padaczkowymi (podano 100 mln MSC)



Moment przeszczepienia komórek:

! choroba przewlekła wielofazowa

aktywna faza choroby? powtarzana procedura

Optymalnie – postępująca choroba z przewlekłym zapaleniem + neurodegeneracją (SP-MS ? PP-MS?)



RR-MS – duża aktywność, bez reakcji na stosowane leczenie

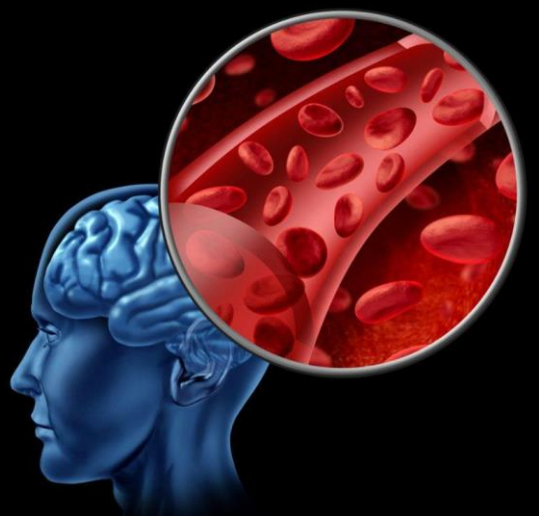
Dawki MSC:

EAE - 1mln/mysz (20 gram)

Człowiek – 50 mln/kg

Obecnie stosowane dawki w badaniach klinicznych 1-2 mln/kg iv , przy podaniu dokanałowym 15-60 mln MSC





Pobranie szpiku kostnego w znieczuleniu miejscowym
Izolacja MSC: zgodnie z European Group for Blood
and Bone Marrow Transplantation
Izolacja jednojądrowych komórek szpiku i hodowla w
medium z FBS ; komórki są wielokrotnie pasażowane
i gdy liczba komórek osiąga około 2×10^6 /kg są
zamrażane w DMSO

- » Komórki są charakteryzowane przy pomocy cytometrii przepływowej na obecność CD73, CD90 i CD 105 i brak CD34, CD45, CD14 i CD3 (<2%)
- » **Brak patogenów !!!**



Bezpieczeństwo stosowania MSC w SM

Toksyczność związana z infuzją MSC – reakcje alergiczne związane z FBS w hodowli MSC, dimetylosulfotlenek (DMSO) w medium do zamrażania

Infekcje (łagodne dróg oddechowych i moczowych)

Ektopowe tworzenie tkanek – nie obserwowano

Nowotwory - nie obserwowano

Autoimmunizacja lub paradoksalne zaostrzenie

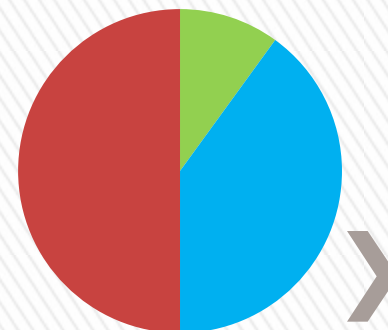
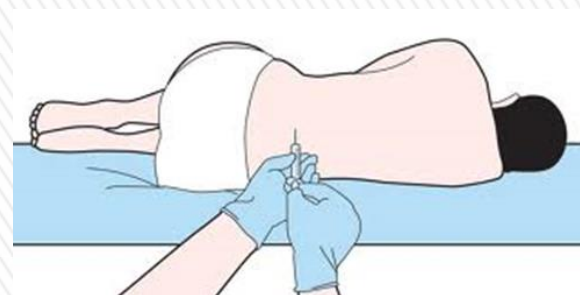
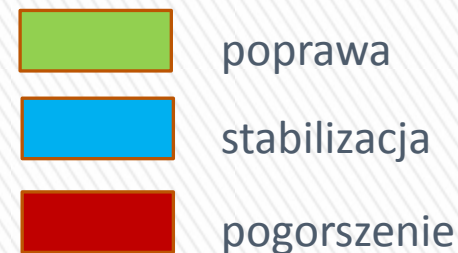
choroby- zaobserwowano przypadek rozsianego zapalenia mózgu w 6h po kolejnej (3) infuzji autologicznych MSC podanych dokanałowo



MSC w SM - badania kliniczne

Moyeddin Bonab *et al* (Tehran Iran;
Hematology-Oncology & BMT Research Center)
J Immunol 2007

- » **10 pacjentów** – postępujący SM, bez poprawy nawet po leczeniu MTX
- » EDSS 3.5-6; dokanałowo **autologiczne MSC** (intrathecally - it); obserwacja 13-26 mc;
- » **1 poprawa (EDSS z 5 do 2.5); 4 bz; 5 pogorszenie o 0.5 do 2.5**
- » MRI po 12mc – 7 bz; 2 dodatkowe zmiany; 1 mniejsza ilość zmian
- » Brak AE



Riordan *et al* (Medistem Inc, San Diego , Ca, USA; University of California) J Translational Medicine 2009- **non-expanded adipose MSC (SVF – stromal vascular fraction)**-

frakcja zawierająca mezenchymalne komórki macierzyste, regulatorowe limfocyty T, preadipocyty, makrofagi M2 – potencjał anty-zapalny. Molekularnie podobne do MSC ze szpiku, pozyskiwane na drodze liposukcji

» **3 pacjentów-**

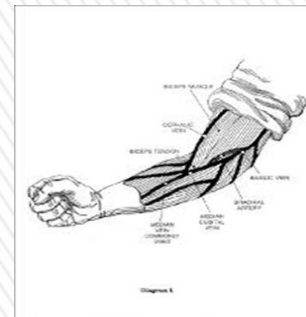
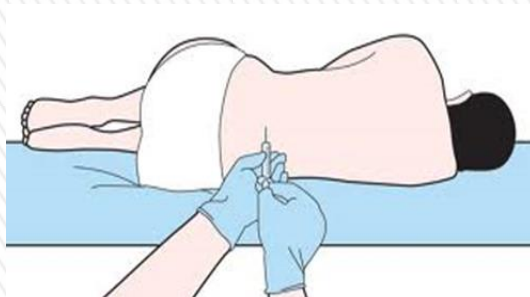
1.RR-MS – 2 iniekcje iv 28 milionów SVF, ale także kilka iniekcji it i iv MSC – **poprawa stanu neurologicznego** , MRI bz

2.RR-MS- 2 iniekcje SVF i wiele jak wyżej – **poprawa równowagi, objawów depresyjnych**

MRI bz

3.RR-MS iv ; **znacząca poprawa stanu neurologicznego**

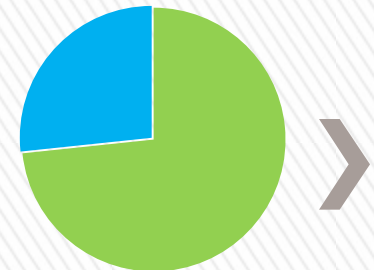
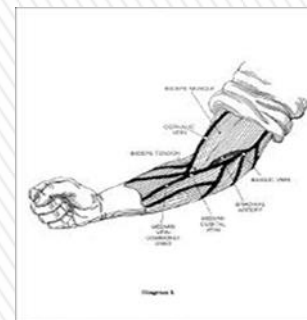
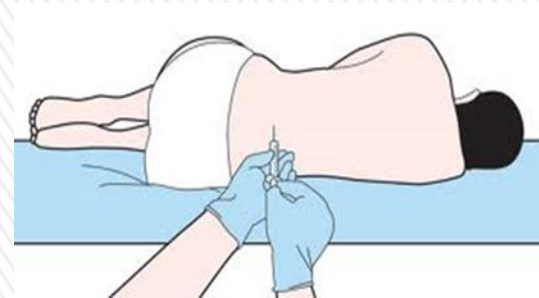
» Brak AE



Karussis *et al.* (Jerusalem , Israel) *Arch Neurol* 2010 – faza I / II ;

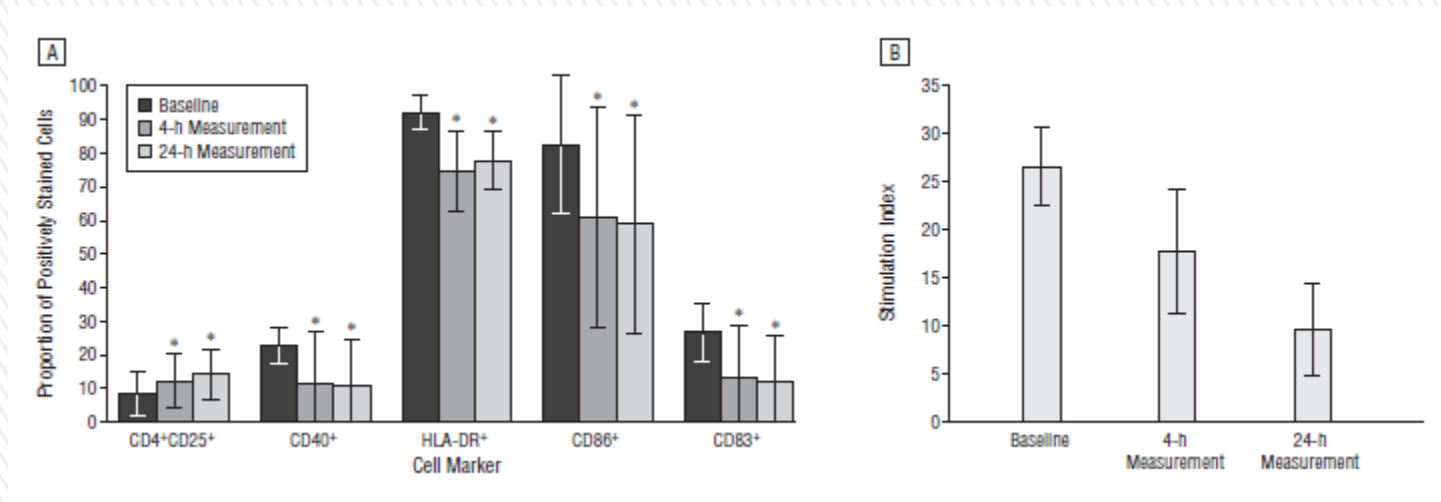
15 pacjentów (RR, SP i PP)– średni czas choroby 10.7; **EDSS 6.7**

- » Wszyscy pacjenci otrzymywali **autologiczne MSC it** na drodze punkcji lędźwiowej , średnio 63.2×10^6 komórek w 2ml NaCl
- » Dodatkowo **5 pacjentów otrzymało iv** 23.4×10^6
- » AE – gorączka, ból głowy, podrażnienie opon, ból pleców
- » **EDSS po 6 m-cach 5.9**; 4 pacjentów bz; 5 poprawa o 0.5 EDSS, 1 o 1 EDSS, 3 o 1.5 EDSS, 1 o 2 EDSS i 1 o 2.5 EDSS



RM-w ciągu 6-mcy obserwacji nie zanotowano nowych zmian T2 ani Gd(+)

Wpływ podania MSC na układ immunologiczny pacjentów:



Yamout *et al.* (Beirut, Lebanon) *J Neuroimmunol* 2010-
autologiczne BM-MSC

10 pacjentów dokonałowo, baseline EDSS 4.0-7.0

aspirowano 20ml szpiku kostnego, MSC w 5ml podawane it, u 3 pacjentów nie uzyskano wystarczającej ilości komórek mimo dwukrotnego pobrania szpiku

5 pacjentów poprawa 0.5-1.0 EDSS po 3-6 mcach

1 bz

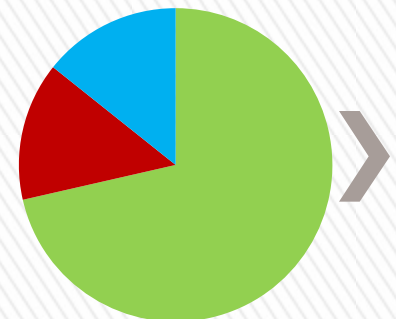
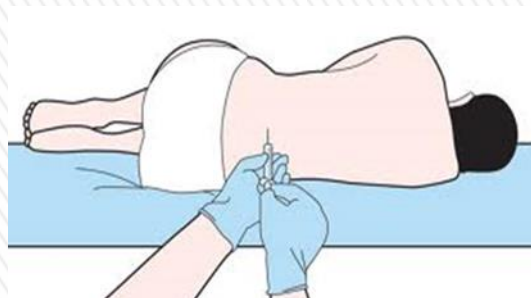
1 pogorszenie o 0.5

Po roku poprawa u 3 o 0.5, stabilizacja u 3

OCT 4 pacjentów – bz 3; pogorszenie 1, po roku 3 bz

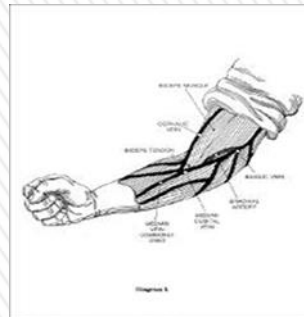
MRI – 3mc 5/7 pacjentów nowe zmiany, 3/7 wzmocnienie po Gd

Brak AE



Connick et al. (kilka ośrodków z Wielkiej Brytanii) faza II *The Lancet* 2012
SP MS z zajęciem drogi wzrokowej (klinicznie lub elektrofizjologicznie potwierdzone) EDSS 2.0-6.5 – 11 zrekrutowanych pacjentów, 1 wycofał zgodę,
10 otrzymało leczenie- śr EDSS 6.1, czas choroby 14.4

- » **iv autologiczne BM-MSC** średnio 1.6×10^6 komórek/kg
- » 1 pacjent wysypka krótko po podaniu MSC; 2 pacjentów łagodna infekcja w czasie 3-4 tyg po podaniu MSC
- » Brak SAE
- » Poprawa ostrości widzenia i WPW (latencja). Nie obserwowano zmian w widzeniu barw, polu widzenia, RNFL
- » Poprawa w EDSS



Bonab M et al. (Tehran Iran; Hematology-Oncology & BMT Research Center) Curr Stem Cell Res Ther 2012

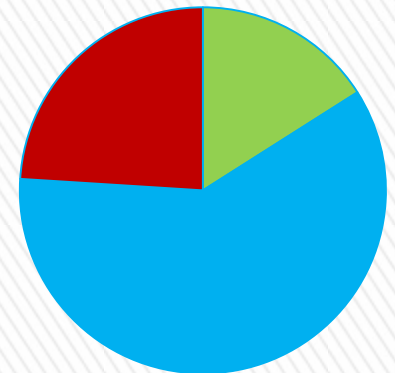
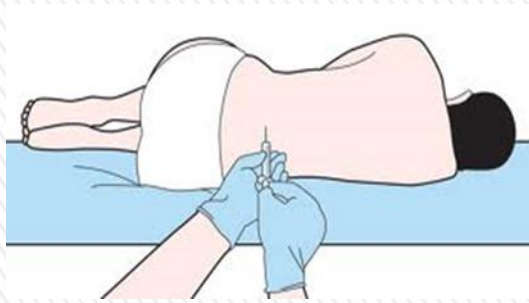
25 pacjentów z przewlekle postępującą postacią SM, nie reagujący na konwencjonalne leczenie EDSS 4.0-6.5

Pojedyncze podanie dokanałowe śr. 29 mln komórek

Obserwacja 12 miesięcy: **śr EDSS 22 pacjentów zmienił się z 6.1 na 6.3**; poprawa 4 pacjentów; stabilizacja 15 pacjentów, pogorszenie 6

Ocena MRI: 15 bz; 6 nowe zmiany w T2 lub Gd(+)

AE: stany podgorączkowe, nudności, bóle głowy; brak SAE



Liang *et al.* (Chiny) *Mult Scler* 2009

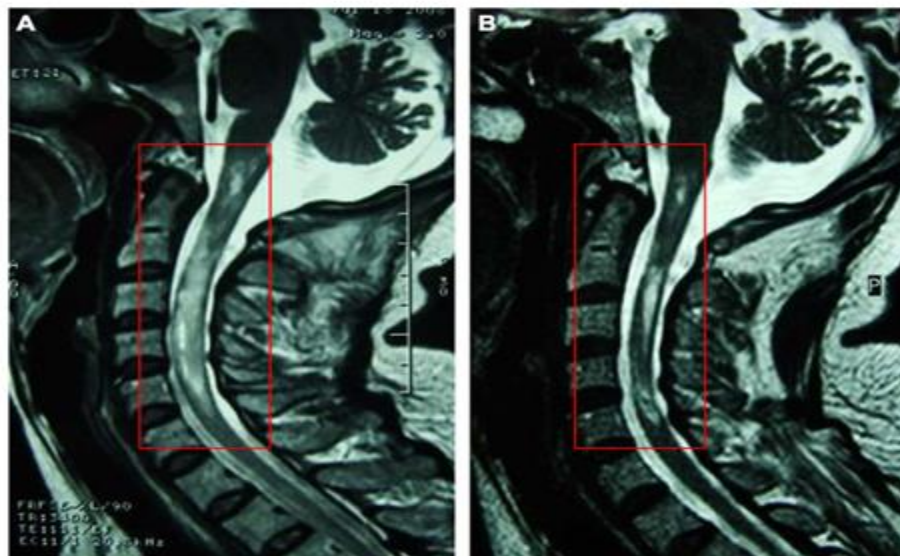
UC-MS (umbilical cord derived MSC)

55-letnia pacjentka , z rozpoznaniem PP-MS, 8 miesięcy od początku choroby tetrapareza , EDSS 8.5

it 1×10^7 i iv 2×10^7 , wcześniej cyclofosamid 600mg przez 3 dni

Poprawa w EDSS w ciągu 5 m-cy do 5.5

Zmniejszenie liczby zmian w MRI, szczególnie w rdzeniu szyjnym



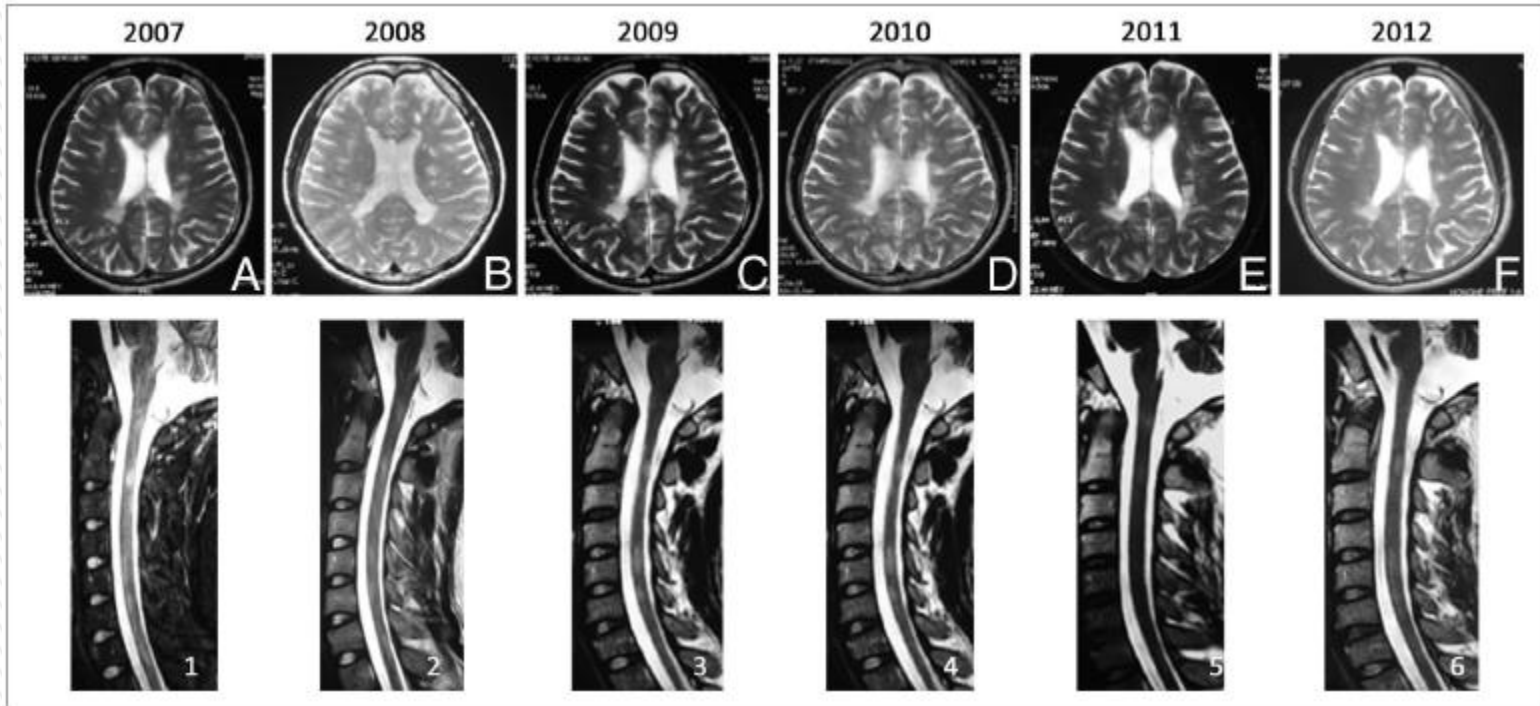


Transplantation of umbilical cord and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a patient with relapsing-remitting multiple sclerosis

Zong-liu Hou¹, Ying Liu¹, Xi-Hong Mao¹, Chuan-yu Wei¹, Ming-yao Meng¹, Yun-hong Liu¹, Zara Zhuyun Yang^{2,3}, Hongmei Zhu^{2,3}, Martin Short⁴, Claude Bernard³, and Zhi-cheng Xiao^{2,4,*}

Table 1. Summary of MSC treatment, adverse events, and clinical disability score (EDSS)

	Date	Source MSC	Route	Dose	Adverse events	EDSS
Pre-treatment	6/9/2006	-	-	-	-	3.0
1	26/11/2008	BM	iv	1.32×10^7	Nil	3.5
		BM	it	6.3×10^5	Nil	
2	19/02/2009	BM	iv	6.0×10^7	Nil	
		BM	it	1.4×10^7	Nil	
3	7/05/2009	BM	iv	8.9×10^7	Nil	2.5
4	4/08/2009	UC	iv	1.2×10^8	Dizziness, headache	
5	8/01/2010	BM	it	1.47×10^5	Nil	2.5
6	29/08/2010	UC	iv	3.27×10^8	Rash, Fever	
7	22/04/2011	UC	iv	1.4×10^8	Dizziness, Headache	
8	29/12/2011	UC	iv	1.54×10^8	Headache	2.0
Post-treatment	12/07/12	-	-	-	-	2.0



Co wiemy na podstawie badań na modelach zwierzęcych i badań klinicznych na ludziach?

- » Po infuzji iv MSC trafiają głównie do płuc, ale też wątroby, nerek, kości, mięśni, serca, śledziony, węzłów chłonnych, grasicy i szpiku kostnego.
- » Korzystny efekt terapii MSC głównie poprzez immunomodulację na obwodzie
- » Efekt troficzny
- » Klinicznie korzystny efekt terapii MSC utrzymuje się do 1 roku

Na podstawie obserwacji pacjentów leczonych z powodu odrzucania przeszczepu

Konieczność wielokrotnych infuzji 

Wzrost ryzyka uczulenia i reakcji alergicznych, zwłaszcza przy przeszczepach allogenicznych



Perspektywy terapii MSC w SM

clinicaltrials.gov

Obecnie zarejestrowanych jest 16 badań klinicznych z wykorzystaniem MSC

- dłuższa obserwacja chorych
- większe grupy pacjentów
- kontrola placebo – badanie Mesenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS) 1-2mln/kg iv MSC vs placebo (medium), po 6 m-cach *vice versa*

