



**EMC SZPITALE**

Szpital św. Anny w Piasecznie

# **Możliwości wykorzystania komórek macierzystych w leczeniu chorób układu oddechowego**

**Tadeusz Płusa**

**Oddział Chorób Wewnętrznych i Chorób Płuc**



**EMC SZPITALE**  
Szpital św. Anny w Piasecznie

# Odkrycie komórek macierzystych

2005 r. – dr Carla Kim, Children's Hospital Boston

Bronchioalveolar stem cells (BASCs)  
(adult mouse)

Badania nad cząsteczkami,  
które mają zdolność regulacji wzrostu  
i aktywności BASCs w ludzkich płucach

**Komórka  
macierzysta**

**Plastyczność i zdolność różnicowania się  
w komórki innych typów**

**Komórka  
toti  
potencjalna**

**Każdy typ  
komórek,  
w tym łożysko**

**Komórka  
pluri  
potencjalna**

**Każdy typ  
komórek**

**Komórka  
multi  
potencjalna**

**Komórki  
o podobnych  
cechach**

**Komórka  
uni  
potencjalna**

**Jeden typ  
komórek**

# Stem cells

**Mają zdolność odnawiania się  
poprzez dzielenie się**

**Mają zdolność różnicowania się  
i przyjmowania cech struktur  
komórkowych i tkanek**

**Komórki mogą być przeszczepiane  
do innego organizmu,  
gdzie kontynuują dzielenie się  
i replikację**

# Types of stem cells

**Embryonic stem cells  
(ESC)**



**Pluripotentne, uzyskiwane z blastocytów  
(3-5 dzień po zapłodnieniu)**

**Tissue-specific stem cells  
(somatic or adult)**



**„Somatic or adult stem cells”  
– różnicują się w określone tkanki**

**Mesenchymal stem cells  
(MSC)**



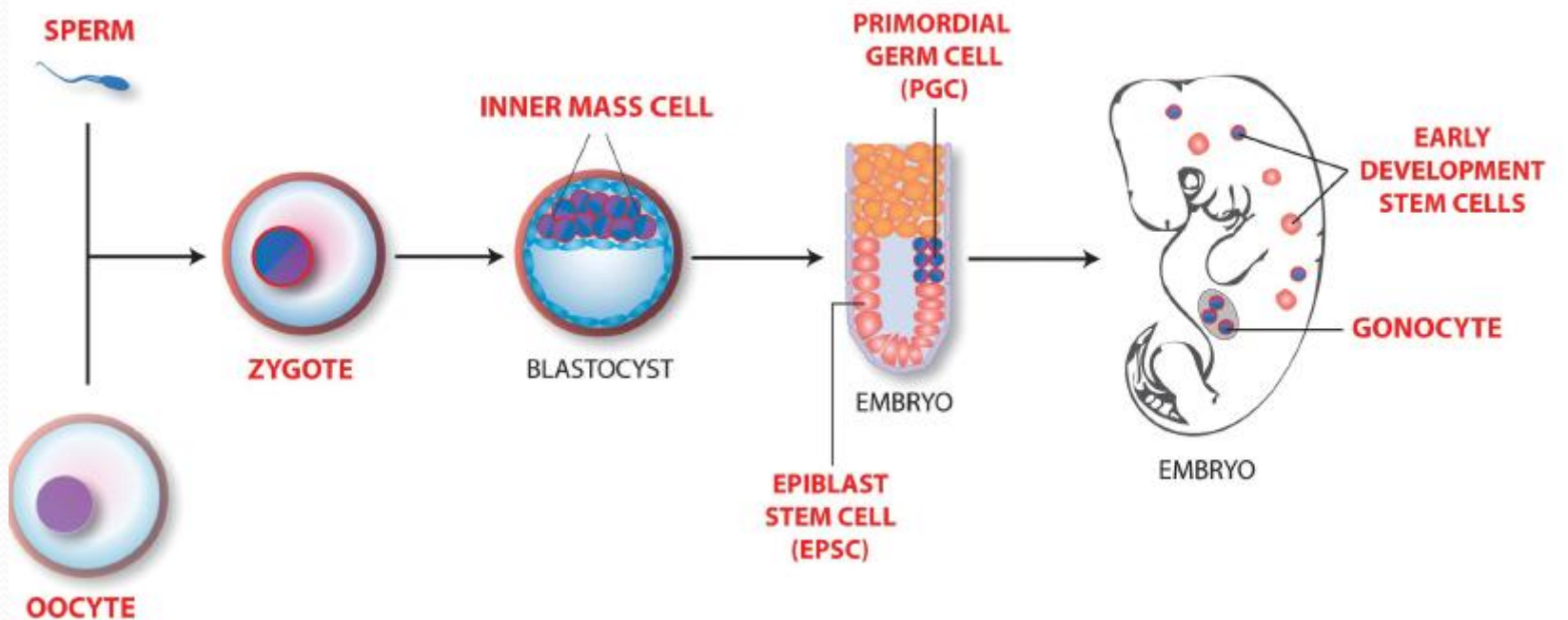
**“Stromal cells” – zależne od miejsca  
izolacji i przeznaczenia**

**Induced pluripotent stem cells  
(iPS)**



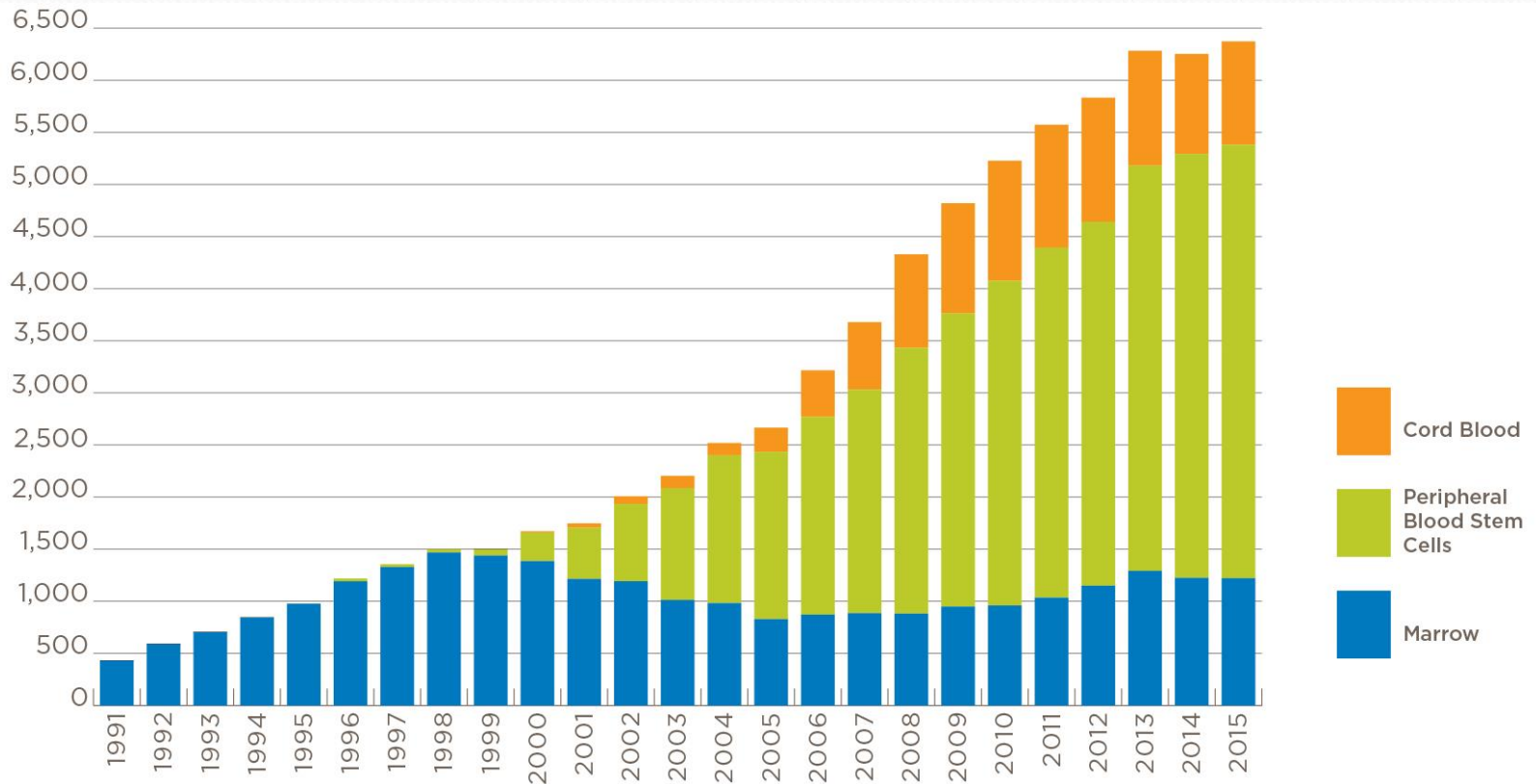
**Szczególnie przydatne w  
badaniach nad nowymi lekami**

# Very small embryonic-like stem cells (VSELS)



MZ Ratajczak, et al.: Very small embryonic-like stem cells (VSELS) represent a real challenge in stem cell biology: recent pros and cons in the midst of a lively debate. *Leukemia* (2014) 28, 473–484

# Transplants by cell source



Source: National Marrow Donor Program/Be The Match FY 2015



# Stem cell treatment basics



## Harvest

A small blood or bone marrow sample is taken from the patient.



## Separate

The stem cells are separated from the other cells of the sample.



## Return

The concentrated stem cells are returned into the bloodstream.

# How do stem cells target the lungs?



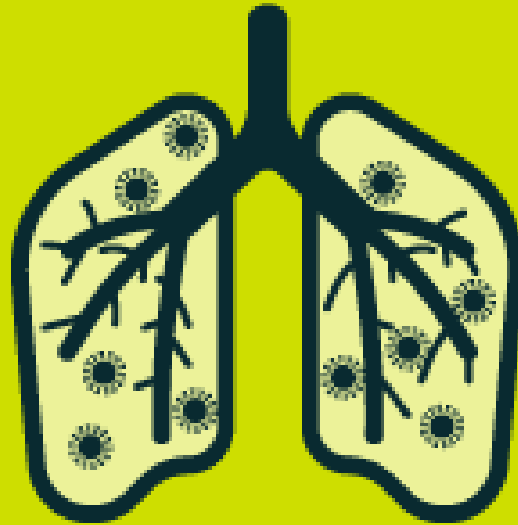
## Passage

The bloodstream pushes the stem cells through the right chamber of the heart, and to the lungs.



## Pulmonary Trap

The stem cells are trapped naturally by the lungs where they begin to regenerate damaged lung tissue.

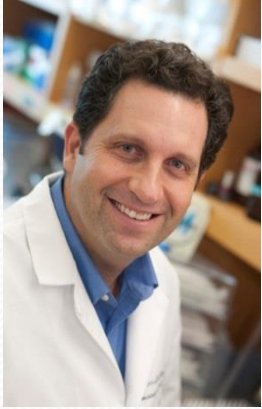


## Pulmonary Trap

The stem cells are trapped naturally by the lungs where they begin to regenerate damaged lung tissue.

**“The pulmonary trap” is a happy opportunity to slow down the progenitor cell circulation with hope to use they potential ability for repair the lung tissue and to stop the progression of chronic lung disease.**

# Jak komórki macierzyste zagnieżdżają się w płucach?



Darrell Kotton  
Boston Center  
for Regenerative  
Medicine

**Po pierwsze – konieczna jest prawidłowa metoda izolacji i podawania komórek**

**Po drugie – konieczne jest wyłonienie cząsteczek umożliwiających stymulowanie komórek do odpowiedniej przemiany**

**Po trzecie – konieczne jest potwierdzenie poprawności procesu (knock-in reporter gene Nkx2-1)**

**“All these researchers have stem cells sitting in their freezers waiting for a way to differentiate them into lung tissue”**



**Lungs from a 14.5-day-old mouse embryo. The intense green glow shows a high expression of a gene called Nkx2-1 in the developing lung tissue. Photo by Laertis Ikonomou**

Kotton DN, Fine A.: Lung stem cells. *Cell Tissue Res*, 2008; 331(1):145-56.

# VERMONT STEM CELL CONFERENCES

The University of Vermont College of Medicine, in collaboration with the NHLBI, Alpha-1 Foundation, American Thoracic Society, Cystic Fibrosis Foundation, European Respiratory Society, International Society for Cellular Therapy, and the Pulmonary Fibrosis Foundation

**2005, 2007, 2009, 2011, 2013, 2015**

**University of Vermont**

**The current understanding of the role of stem and progenitor cells in lung repair after injury.**

The goals of the conference were to summarize:

- the current state of the field,
- debate current controversies,
- future research directions and opportunities for basic and translational research in cell-based therapies for lung diseases.

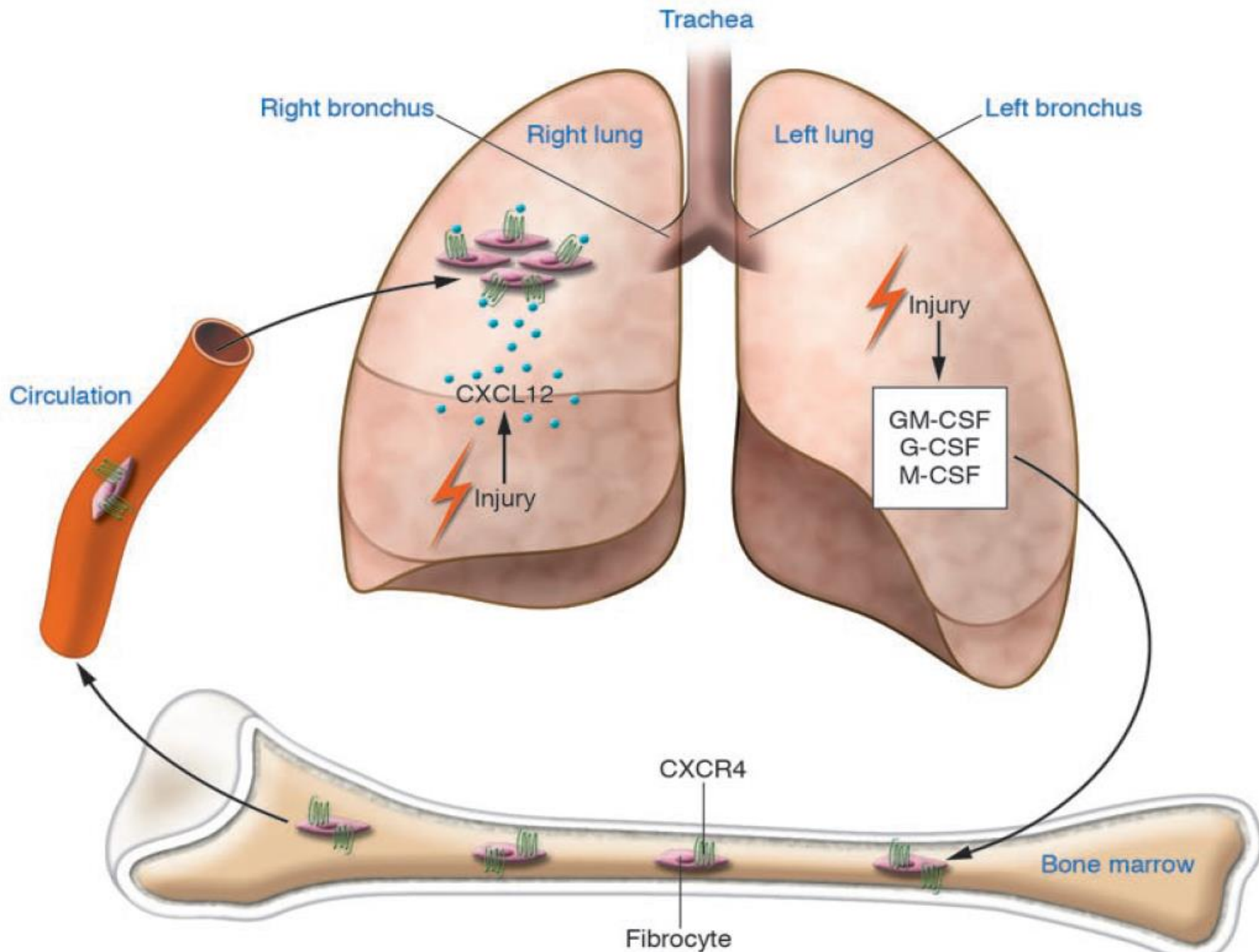
# “stem” and “progenitor” cells

## Endogenous adult tissue-specific stem cells

- mają zdolność odnawiania się,
- stymulują wytwarzanie komórek siostrzanych tzw. “transit amplifying cells”, które są bardziej wyspecjalizowane dla danego narządu

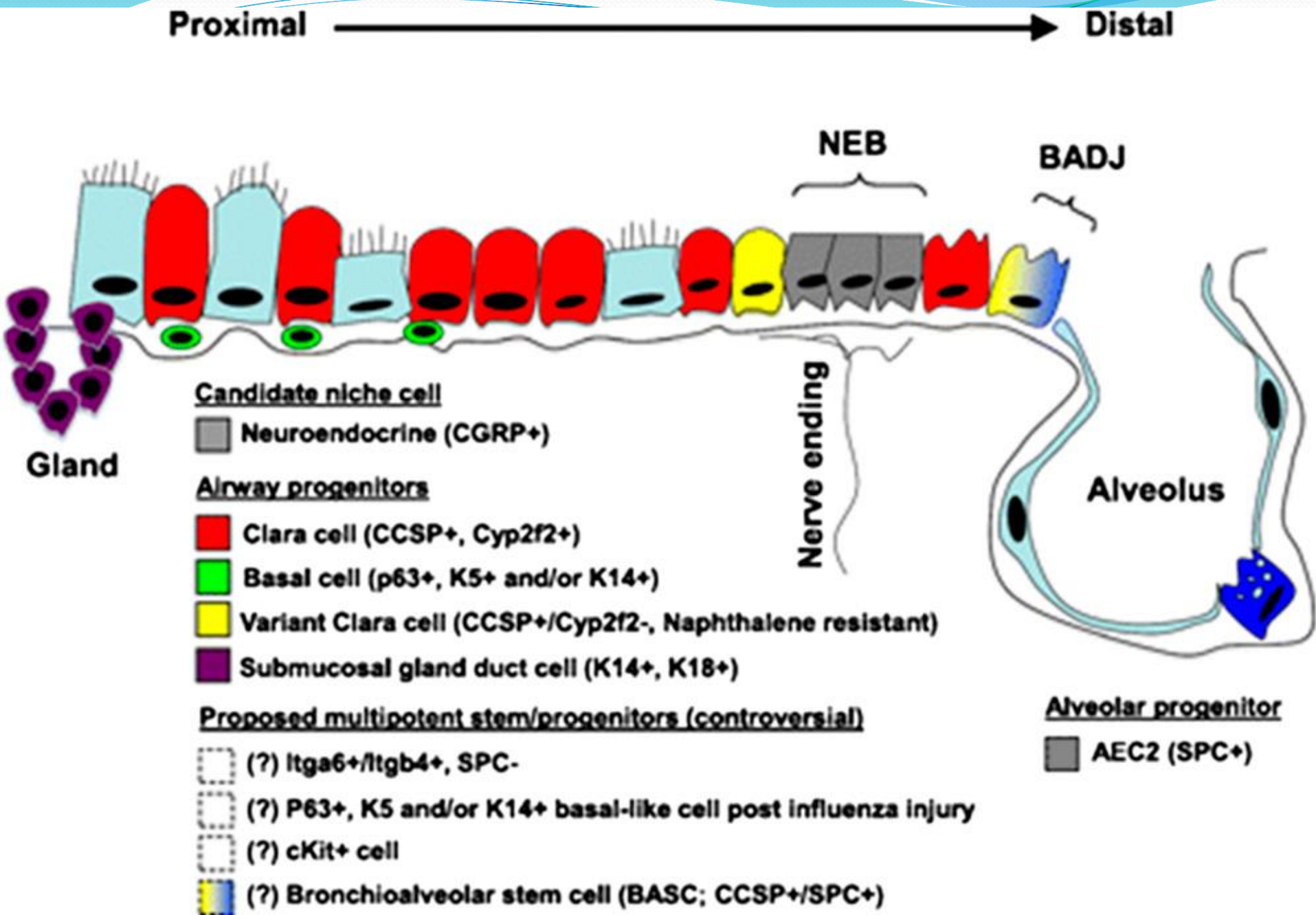
## Adult endogenous progenitor cells

- nie mają zdolności odnawiania się,
- swoiste komórki dla danej tkanki,
- mogą się różnicować w bardziej wyspecjalizowane komórki,
- “facultative progenitor cells”





# Schematic of proposed lung epithelial candidate stem or progenitor cells



# Mesenchymal stem cells (MSCs)

## Multipotent adult progenitor cells

### Izolowane ze:

- szpiku kostnego
- krwi pępowinowej
- tkanki tłuszczowej

### Różnicują się w:

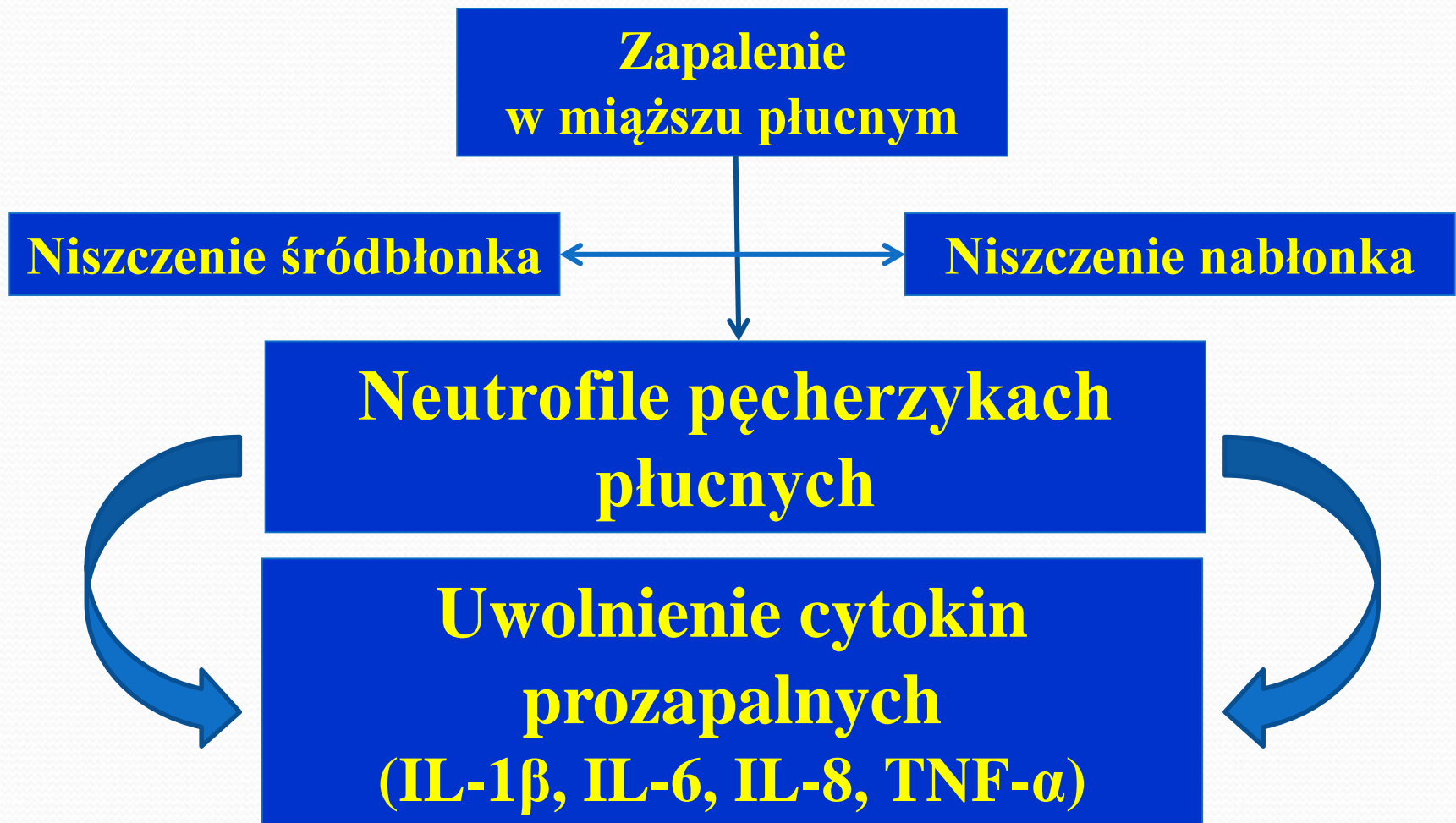
- chrząstkę
- tkankę tłuszczową
- ??????

**Modulują odpowiedź na uraz i zakażenie  
(hamują TNF- $\alpha$  i nasilają wytwarzanie IL-10)**

**Promują proces naprawczy**

Gupta N, Su X, Popov B, *et al.*: Intrapulmonary delivery of bone marrow derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxininduced acute lung injury in mice. *J Immunol.* 2007; **179**(3): 1855–63.

# ARDS



# ARDS

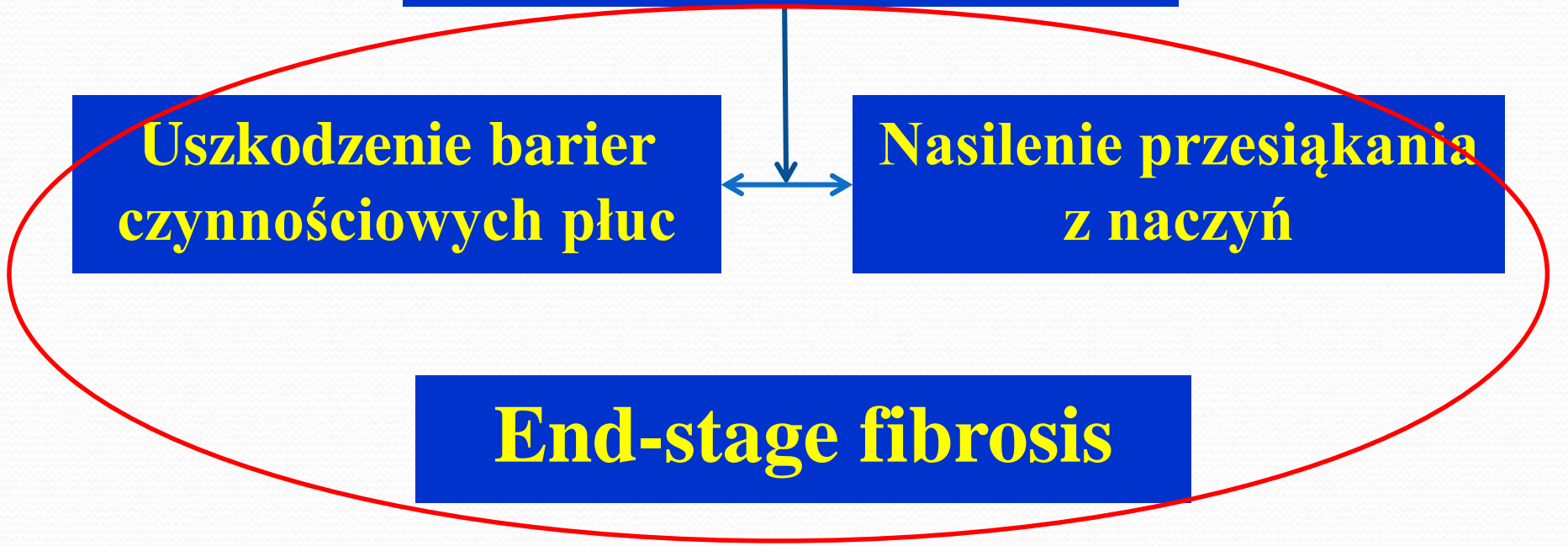
**Wolne rodniki tlenowe**  
(reactive oxygen species)

**Uszkodzenie barier  
czynnościowych płuc**

**Nasilenie przesiąkania  
z naczyń**

**End-stage fibrosis**

**Mesenchymal stem cells (MSCs)**



# Działanie immunomodulujące MSC



Shahd Horie , John G. Laffey: Recent insights: mesenchymal stromal/stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome. F1000 Research, 2016; 5:1-8.

# MSCs wykazują skuteczność w badaniach przedklinicznych

**ARDS**

**Ventilator-induced  
lung injury (VILI)**

**Zapalenia płuc**

**Sepsa**

Shahd Horie , John G. Laffey: **Recent insights: mesenchymal stromal/stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome. F1000 Reaserch, 2016; 5:1-8.**

## Działanie MSC w badaniach na modelach przedklinicznych

Injury setting	Cell therapy	Effects
<b>Unmodified MSC therapy</b>		
<i>Escherichia coli</i> -induced ALI in mice <sup>16</sup>	Mouse bone marrow MSCs 5 × 10 <sup>5</sup> cells/mL/22g IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Increased survival</li> <li>- Decreased lung edema and lung histology score</li> <li>- Decreased oxidative stress injury (decreased myeloperoxidase activity and malondialdehyde levels)</li> </ul>
<i>E. coli</i> pneumonia in rats <sup>17</sup>	hBM MSCs 10 and 20 million per kilogram IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Increased oxygenation and survival</li> <li>- Decreased lung histology score and bacterial load</li> <li>- Frozen delivery of cells is effective</li> <li>- Increased phagocytosis and LL-37 release <i>in vitro</i></li> </ul>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> administration and smoke inhalation in sheep <sup>18</sup>	hBM MSCs 5 and 10 million per kilogram IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Increased oxygenation</li> <li>- Decreased lung edema</li> <li>- No adverse effects observed</li> </ul>
Repair after ventilator-induced lung injury in rats <sup>21</sup>	hBM MSCs 1–10 million per kilogram intra-tracheally and IV	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Increased blood oxygenation and lung compliance</li> <li>- Decreased lung edema and histologic injury</li> <li>- Decreased bronchoalveolar lavage CINC-1 and IL-6</li> <li>- Lowest efficacious dose is 2 million per kilogram</li> </ul>
<i>Ex vivo</i> lungs under prolonged ischemic conditions <sup>23</sup>	hBM MSCs 5 million per kilogram IV	Decreased edema in human lungs rejected for transplantation
<b>Modified MSC therapy</b>		
Lipopolysaccharide-induced endothelial injury <i>in vitro</i> <sup>24</sup>	MSCs overexpressing ACE2	Enhanced decrease in endothelial damage, edema, and TNF-α and IL-6 concentrations when compared with naïve MSCs
Bleomycin-induced ALI in mice <sup>25</sup>	Human umbilical cord MSCs overexpressing ACE2	Enhanced decrease in TNF-α, interferon-gamma, transforming growth factor-beta, and IL-1β, IL-2, and IL-6 and enhanced increase of superoxide dismutase and IL-10 when compared with naïve MSCs

Shahd Horie , John G. Laffey: **Recent insights: mesenchymal stromal/stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome.** *F1000 Research*, 2016; 5:1-8.

# START

## (Stem cells in ARDS Treatment)

**Badanie I/II fazy nad zastosowaniem MSC  
(bone marrow-derived human MSC - hMSC) w ARDS  
(rekrutacja chorych)**

\*\*\*

**U chorych z ostrą niewydolnością nerek w I fazie badania wykazano pełne bezpieczeństwo chorych otrzymujących wlewy hMSCs po zabiegach kardiochirurgicznych z dużym ryzykiem rozwinięcia niewydolności nerek.**

Espinoza F, Aliaga F, Crawford PL.: Overview and perspectives of mesenchymal stem cell therapy in intensive care medicine. Rev Med Chil, 2016;144(2):222-31.



# MSCs w POChP

## MSC podawane dożylnie lub dotchawiczo

Shigemura et al. (Japan) w 2006 r. Większość badań publikowano w 2014 r.

Shigemura N, Okumura M, Mizuno S, Imanishi Y, Nakamura T, Sawa Y. Autologous transplantation of adipose tissue-derived stromal cells ameliorates pulmonary emphysema. *Am J Transplant.* 2006; 6 (11):2592–600.

**Badania na modelach zwierzęcych wykazały znamiennej stymulację procesów naprawczych i poprawę czynności płuc.**

**Zmniejszenie napływania neutrofilów i makrofagów, wytwarzania cytokin prozapalnych (IL-1 $\beta$  and IL-6) oraz znamienne stymulowanie cytokin przeciwzapalnych (IL-10) i czynników wzrostu (VEGF, HGF, EGF i TGF- $\beta$ )**

**MSCs mogą być rozważane w terapii u chorych na POChP (z rozedmą)**

Xiangde Liu<sup>1</sup>, Qihong Fang<sup>2</sup>, Huijung Kim: Preclinical Studies of Mesenchymal Stem Cell (MSC) Administration in Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD): A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, June 9, 2016; 1-17

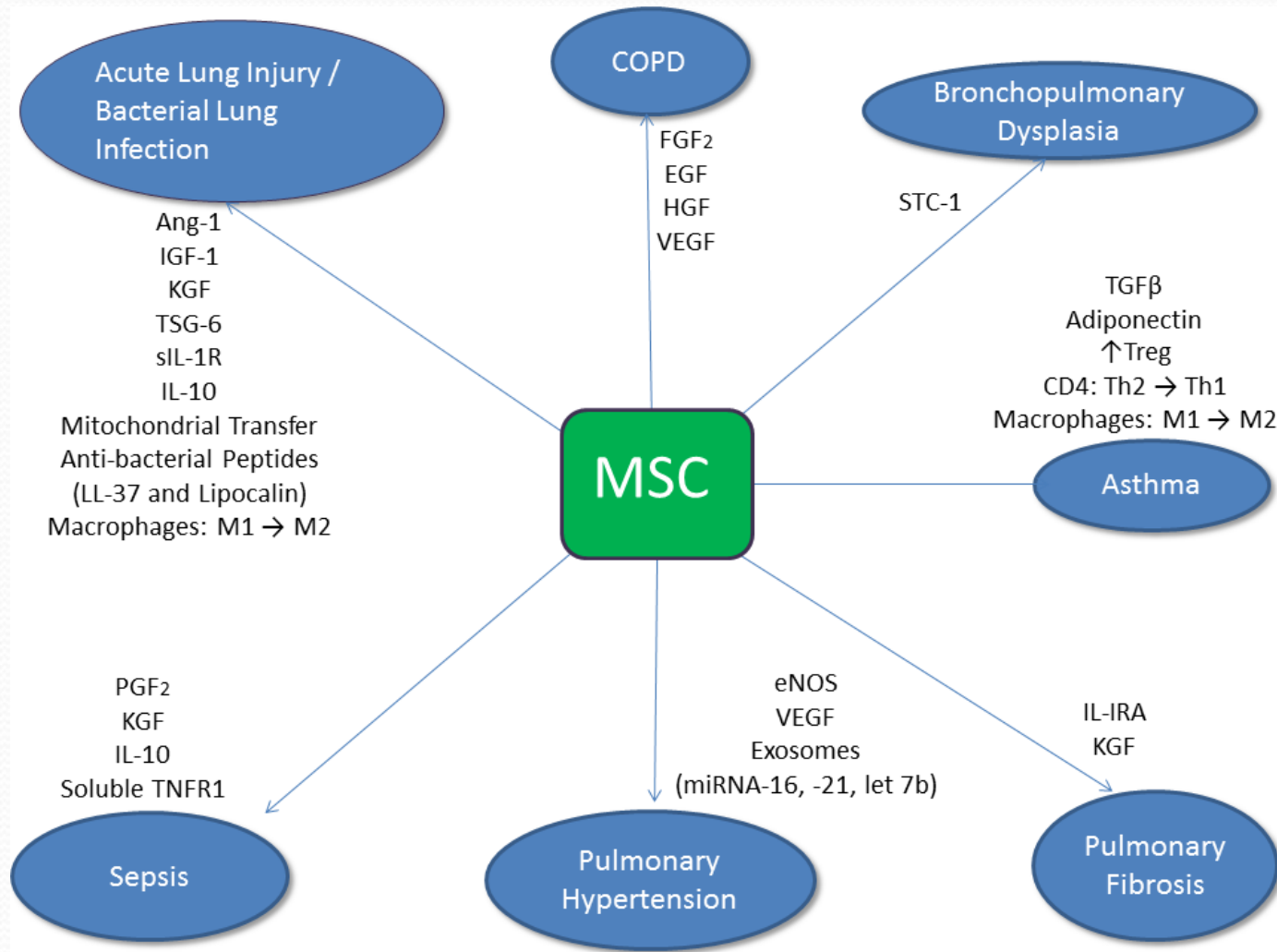
# POChP a leczenie komórkami macierzystymi

**Nie obecnie dostępnej terapii z użyciem komórek macierzystych u chorych na POChP**

**Leczenie komórkami macierzystymi jest nowym kierunkiem dla chorych na POChP**

- Redukcja zapalenia w drogach oddechowych , aby zapobiec dalszemu niszczeniu mięszu**
- Budowanie nowej, zdrowej tkanki w płucach, która może zastąpić elementy zniszczone**
- Stymulowanie tworzenia nowych kapilarów i małych naczyń w płucach, które mogą poprawić czynność narządu**

# The range of *in vitro* immune-modulating effects described for mesenchymal stromal (stem) cells (MSCs)



Stem Cells. 2014 January ; 32(1): 16–25. doi:10.1002/stem.1506.

# Embryonic stem cells (ESCs)

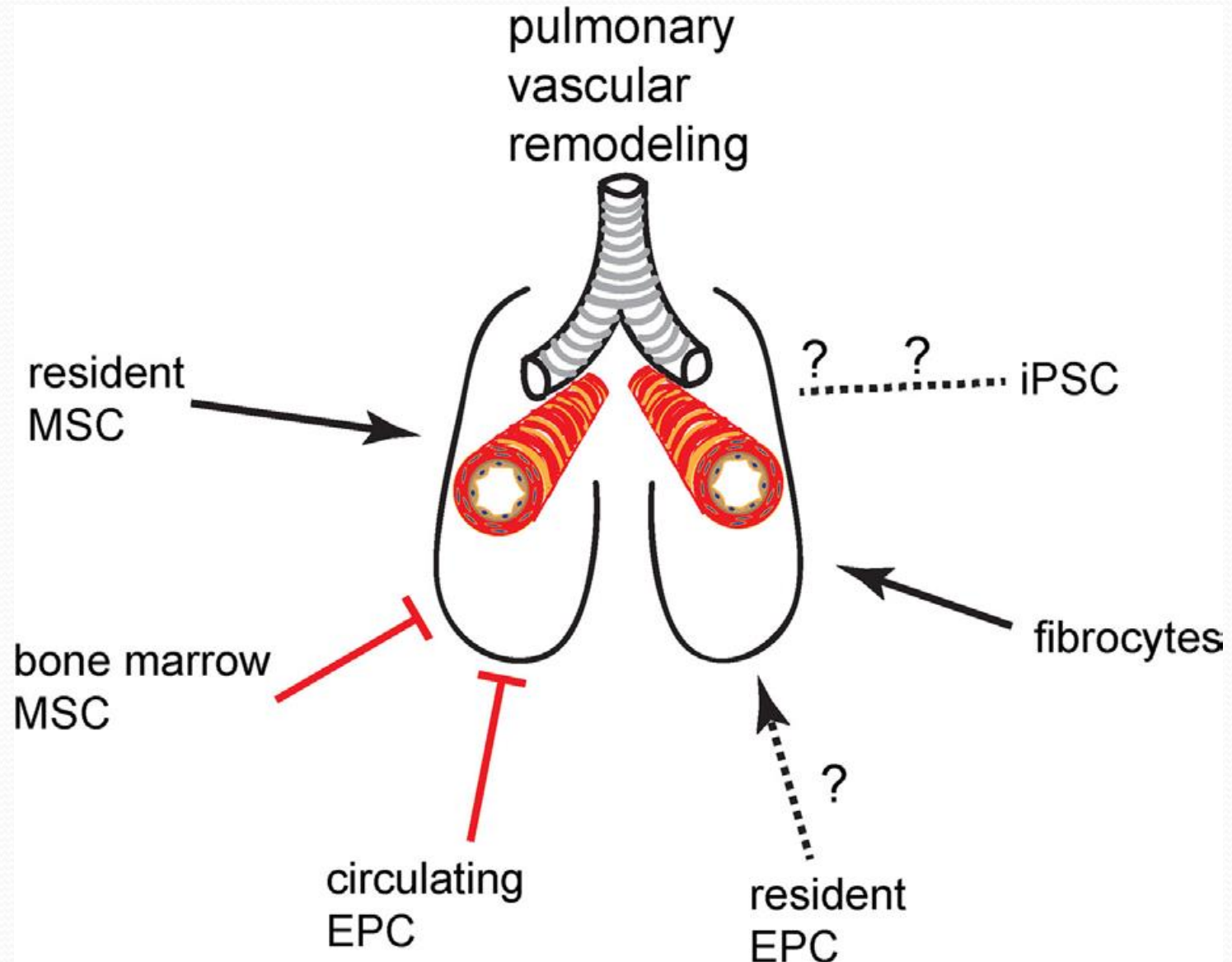
**Mają zdolność różnicowania się w lung epithelial cells**

**Nowa terapia z wykorzystaniem komórek macierzystych w leczeniu chorób wrodzonych i nabytych dróg oddechowych i mięszu płuc.**

**Postęp w badaniach jest powolny, bo różnicowanie ESCs jest najtrudniejsze spośród innych badanych SCs**

Mokhber Dezfouli MR et al.: **The Therapeutic Potential of Differentiated Lung Cells from Embryonic Stem Cells in Lung Diseases.** *Curr Stem Cell Res Ther*, 2017;12(1):80-84.

# Wpływ pobudzający i hamujący komórek progenitorowych na remodeling naczyń płucnych



# Human lung resident stem/progenitor cells

Cell type	Cell markers
Tracheal basal epithelial cells	NGFR <sup>+</sup> /ITGA6 <sup>+</sup>
Type II alveolar cells	HTII-280 <sup>+</sup>
Airway epithelial cells	CD151 <sup>+</sup> /TF <sup>+</sup>
Airway epithelial cells	SP/CD45 <sup>-</sup>
Lung epithelial cells	c-kit <sup>+</sup> (CD117)
Lung epithelial cells	Ecad/Lgr6 <sup>+</sup>
L-MSCs	CD73 <sup>+</sup> /CD90 <sup>+</sup> /CD105 <sup>+</sup>

L-MSC: Lung mesenchymal stem cells.

Micheu MM, et al.: **Stem/progenitor cells and obstructive sleep apnea syndrome - new insights for clinical applications.** *World J Stem Cells* 2016 October 26; 8(10): 332-341

# Badania nad krążącymi ECP u chorych z OSAS leczonych CPAP

Ref.	Study design	EPCs phenotype	CPAP effect on EPCs number
Jelic <i>et al</i> <sup>[61]</sup>	Adults, both genders, flow cytometry	CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> VEGFR2 <sup>+</sup>	Normalized after 4 wk of CPAP
Jelic <i>et al</i> <sup>[62]</sup>	Adults, both genders, flow cytometry	CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> VEGFR2 <sup>+</sup>	Normalized after 4 wk of CPAP
Murri <i>et al</i> <sup>[63]</sup>	Adults, both genders, flow cytometry	CD45 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> VEGFR2 <sup>+</sup>	Values returned to control values after 1 mo of CPAP
Simpson <i>et al</i> <sup>[67]</sup>	Adults, men, flow cytometry	CD34 <sup>+</sup> KDR <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> KDR <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup>	Unchanged
Kizawa <i>et al</i> <sup>[68]</sup>	Adults, men, flow cytometry	CD133 <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD202b <sup>+</sup> CD45 <sup>-</sup>	Values decreased after 12 wk of CPAP treatment
Chou <i>et al</i> <sup>[70]</sup>	Adults, both genders, flow cytometry	CD34 <sup>+</sup>	Mobilization ratio in patients with OSAS tended to decline

EPC: Endothelial progenitor cell; OSAS: Obstructive sleep apnea syndrome; CPAP: Continuous positive airway pressure.

Micheu MM, et al.: **Stem/progenitor cells and obstructive sleep apnea syndrome - new insights for clinical applications.** *World J Stem Cells* 2016 October 26; 8(10): 332-341

# MSC redukuje ALI po A/H5N1

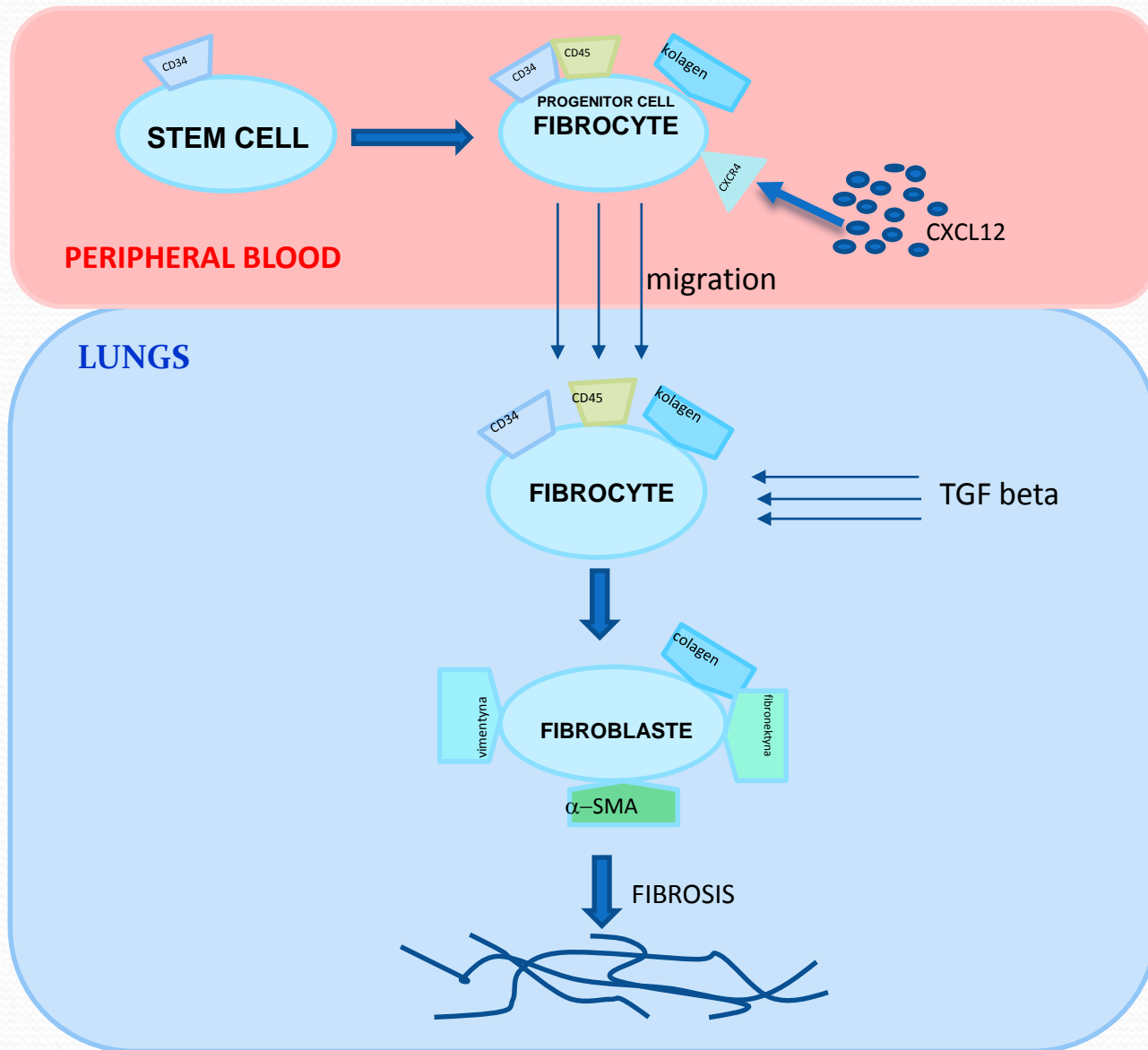


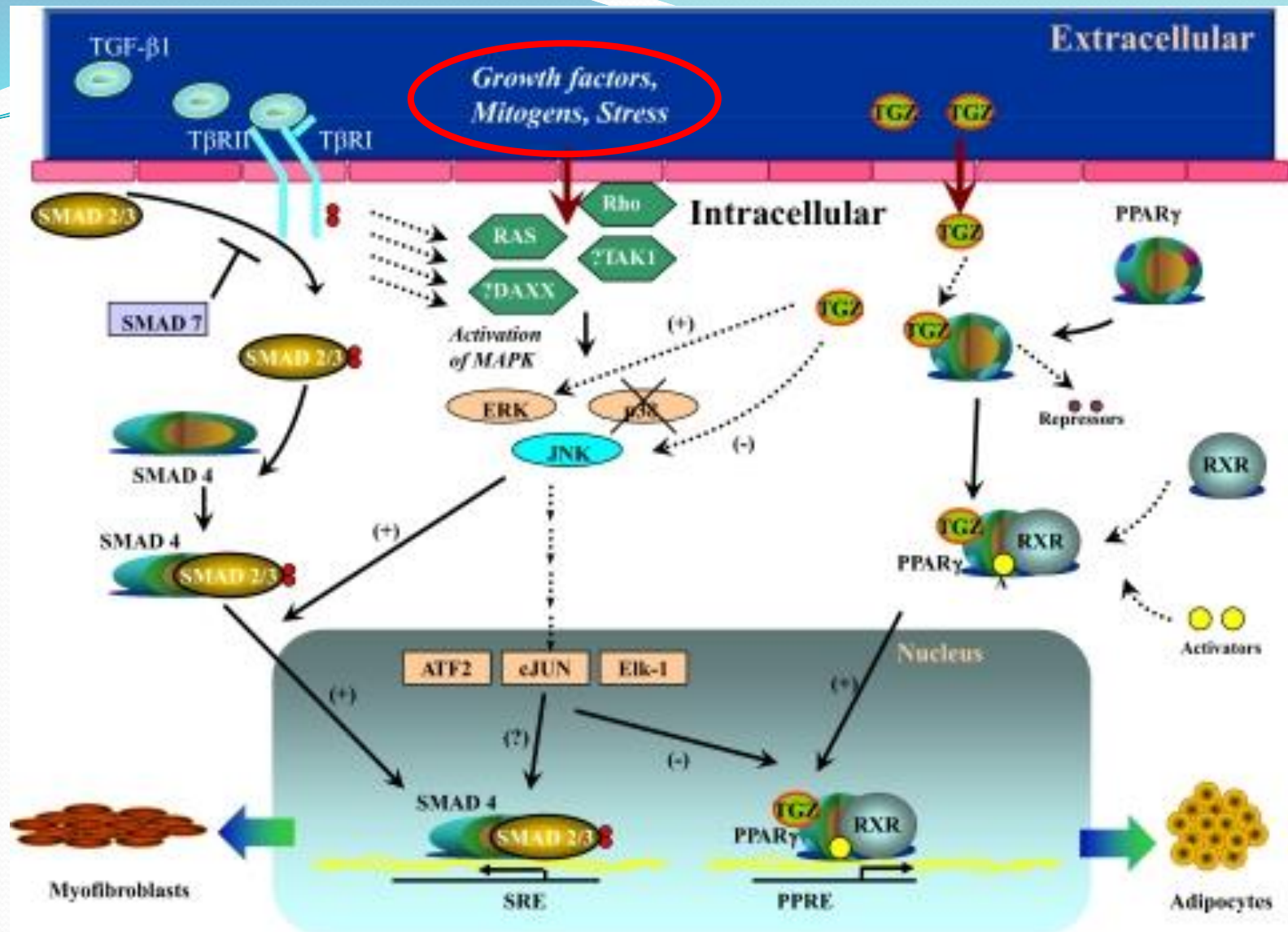
**Zwiększenie przeżycia zakażonych A/H5N1 myszy**

Chana MCW, et al.: Human mesenchymal stromal cells reduce influenza A H5N1-associated acute lung injury in vitro and in vivo. PNAS, 2016; 113(13): 3621–3626

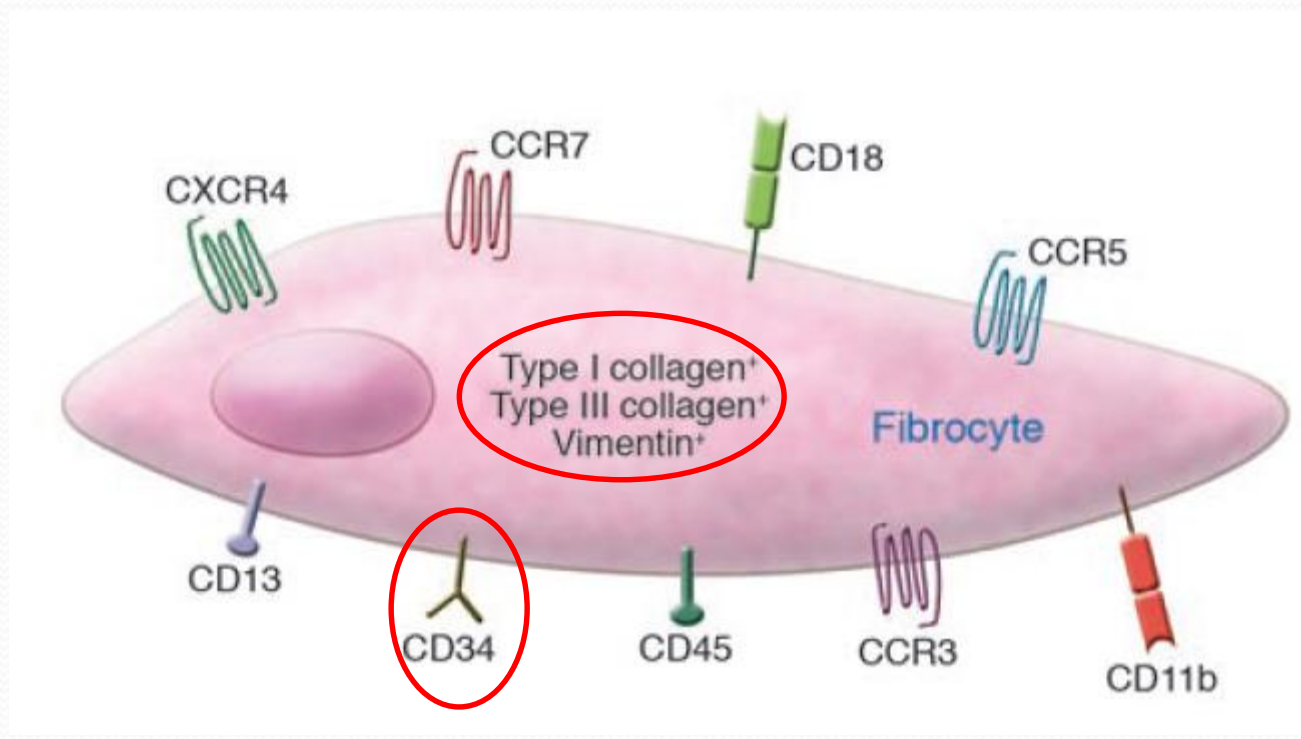


# Fibrocyty w sarkoidozie





The different signaling pathways that participate in fibrocyte differentiation into  $\alpha$ SMA-expressing myofibroblasts or differentiation into aP2-expressing adipocytes.



Markers associated with human fibrocytes. Human fibrocytes express ECM components (type I collagen, type III collagen, and vimentin). They also express a range of cell surface markers, including the common leukocyte antigen CD45, the hematopoietic stem cell antigen CD34, the adhesion molecules CD11b and CD18, the pan-myeloid antigen CD13, and the chemokine receptors CCR3, CCR5, CCR7, and CXCR4.

# **Fibroblasty znajduwane w płucach pochodzą z trzech źródeł**

**Fibroblasty rezydujące**

**Fibroblasty różnicujące się z  
komórek nabłonka pęcherzyków**

**Komórki progenitorowe  
wytwarzane w szpiku kostnym**

Strieter R, Keeley E, Hughes M, et al.: The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *J Leuk Biol*, 2009; 86: 1111-1118.



*Meet the staff at the Dorothy P. and Richard P. Simmons Center for Interstitial Lung Disease at University of Pittsburgh Medical Center.*

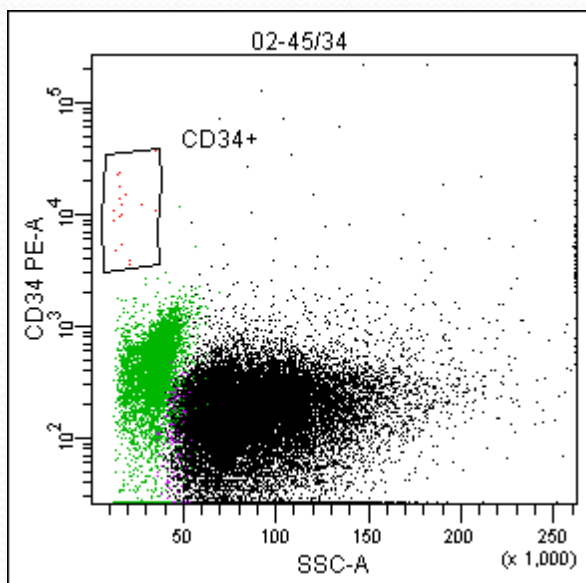
**„Fibrocyt”  
jest charakteryzowany przez  
fenotyp  
(collagen+/vimentin+/CD34+)**

**Fibrocyty są mezenchymalnymi komórkami  
progenitorowymi obecnymi we krwi obwodowej,  
które mają zdolność ekspresji  
CD34, CD45, receptorów kolagenu i wimentyny.**

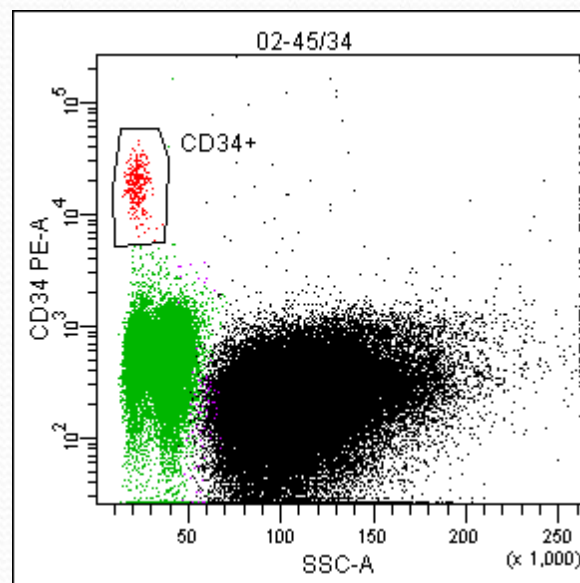


FACSCanto II Beton Dickinson

# Ekspresja antygeny CD34+ we krwi obwodowej badanej w cytometrze przeplywowym



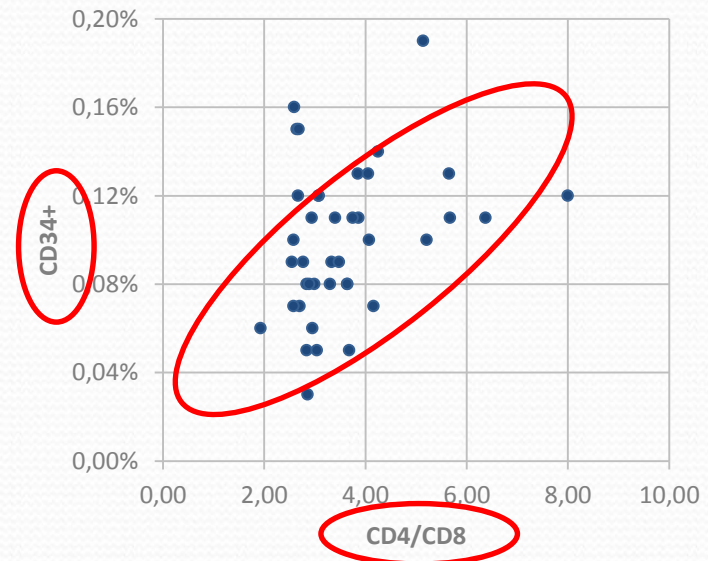
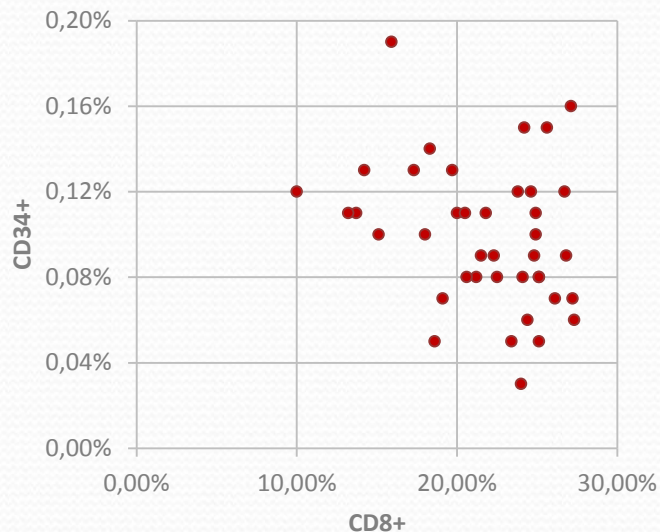
controls	
Population	%Total
CD34+	0.057



sarcoidosis	
Population	%Total
CD34+	0.258

Flusa T, Chelstowska S.: CD34+ progenitor cells in sarcoidosis.  
*Pol Merkur Lek*, 2015; 38(227):250-3.

# Korelacje między liczbą komórek CD34+ i CD8+ oraz CD4/CD8 we krwi obwodowej



**Dodatnia korelacja między CD34+ i wskaźnikiem CD4/CDE8.**

Flusa T, Chełstowska S.: CD34+ progenitor cells in sarcoidosis.  
*Pol Merkur Lek*, 2015; 38(227):250-3.



# Treatment for interstitial lung disease near Buffalo, NY



## **Stem Cell Therapy near Buffalo, NY.**

**At just over 3 hours' drive from Buffalo, Pittsburgh, PA, leads lung disease research with programs like those at the Simmons Center for Interstitial Lung Disease at the University of Pittsburgh.**

**\*\*\***

**Klinika Lung Institute w Pittsburgu leczy chorych na choroby śródmiąższowe płuc, POChP, rozedmę, postępujące włóknienie płuc i sarkoidozę.**

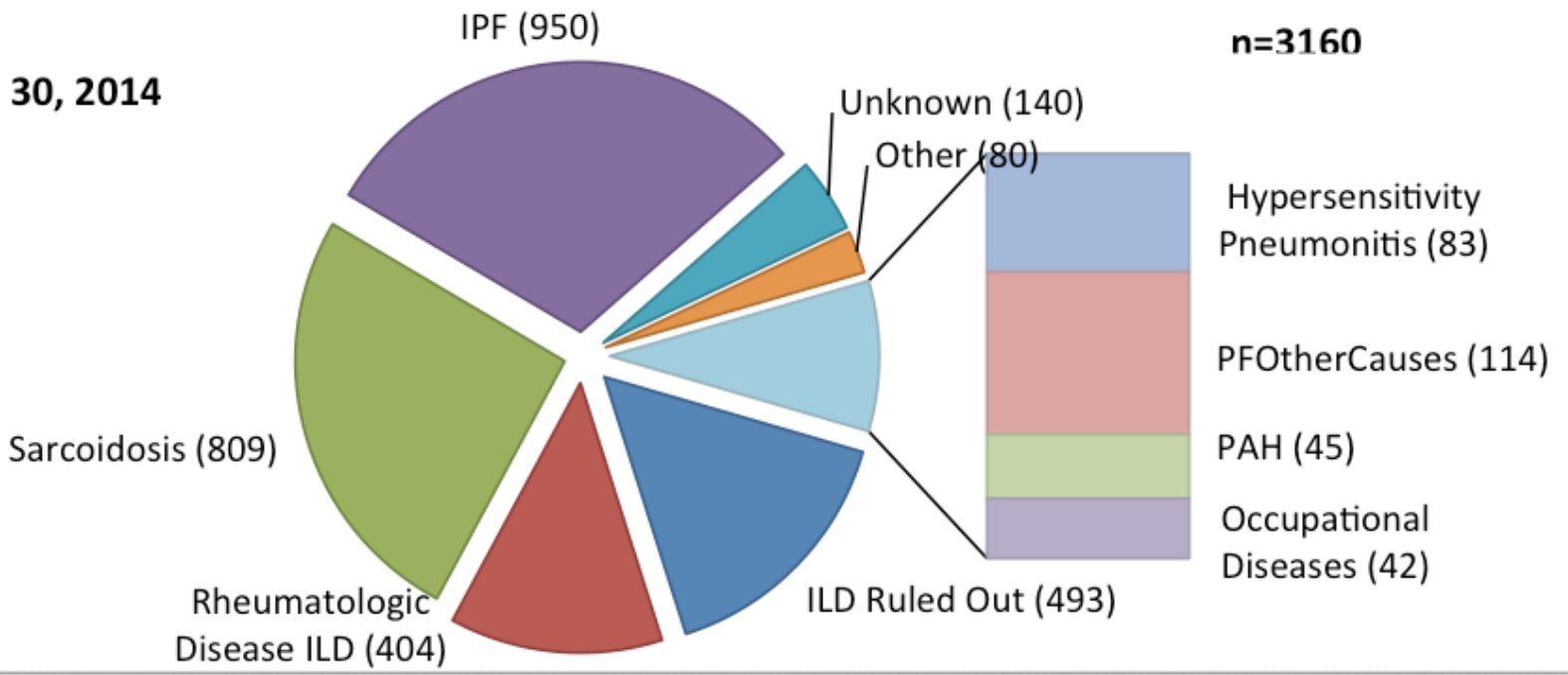


THE DOROTHY P. & RICHARD P.  
**SIMMONS CENTER**  
FOR INTERSTITIAL LUNG DISEASE

# Distribution of Simmon Center Clinical Patients

April 30, 2014

n=3160



# Placenta-derived mesenchymal-like cells in chronic pulmonary sarcoidosis

**Działanie  
immunosupresyjne  
na limfocyty T**

**PDA-001 cells with  
phenotype CD34-, CD10+,  
CD105+ and CD200+.**

**Działanie  
immuno-  
modulacyjne**

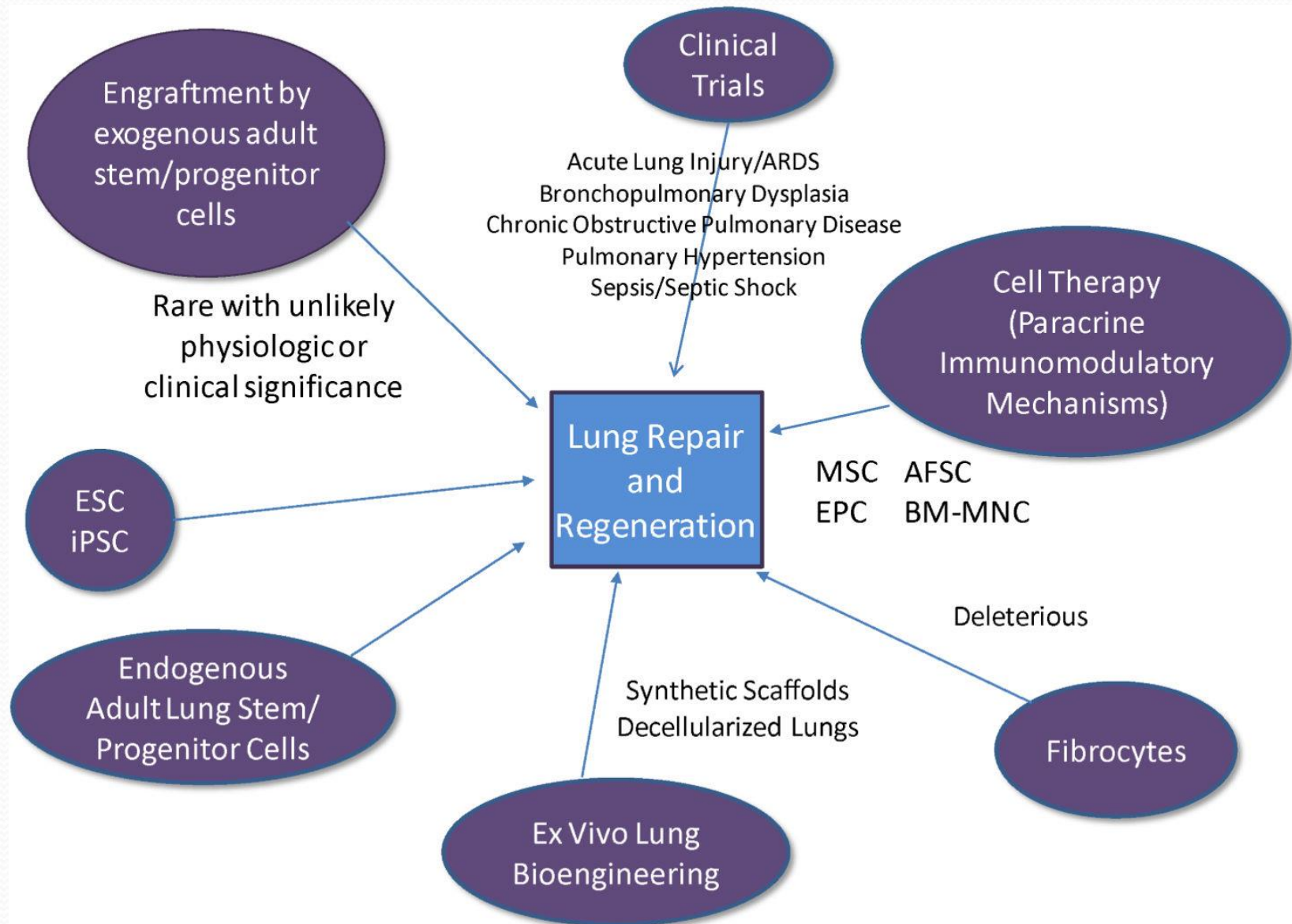
**4 chorych otrzymało iv. dwa  
razy po 150 mln PDA-001  
cells w 240 ml dextranu-40**

**Po wykonanych wlewach miernemu podwyższeniu uległo ciśnienie płucne.  
W BAL potwierdzono obecność komórek  
CD10+CD49c+C105+.**

**Po roku obserwacji nie stwierdzono zmian w wartościach FVC,  
ale u 2 chorych uzyskano ustąpienie zmian radiologicznych  
i odstawiono sterydy**

**Baughman RP, Culver DA, Jankovi V, et al.: Placenta-derived mesenchymal-like cells (PDA-001) as therapy for chronic pulmonary sarcoidosis: a phase 1 study. Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis, 2015;32(2):106-14.**

# Various stem cell, cell therapy and *ex vivo* bioengineering approaches for lung diseases



# Ocena ryzyka i korzyści

**Powikłania – wczesne i późne nie do końca znane mogą generować nieoczekiwane trudne problemy**

**Wynik wątpliwy leczenia doświadczalnego może spowodować dyskwalifikację z dalszych badań**

**Koszty leczenia są znaczne i do końca nieokreślone.**

**Koszty transportu i pobytu.  
Firmy ubezpieczeniowe?**

