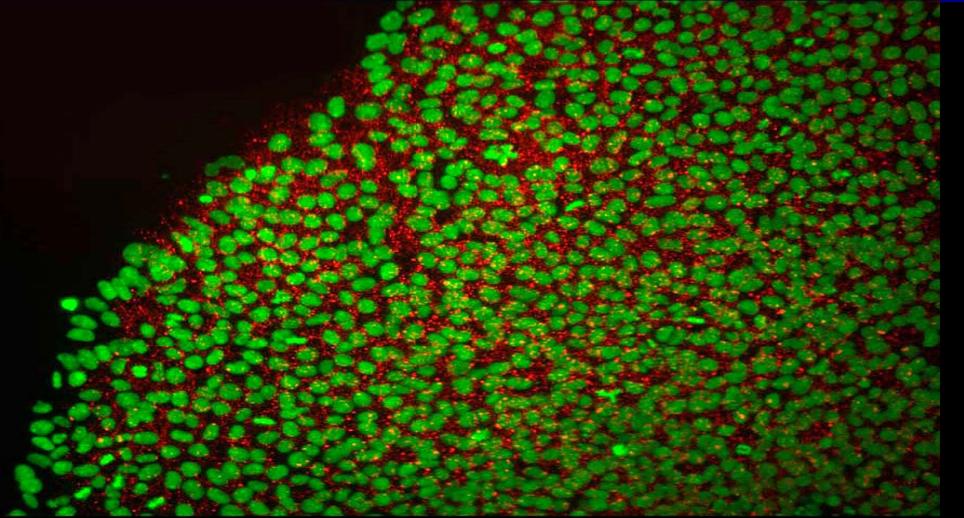


بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِیْمِ

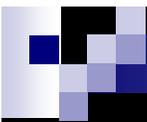
Cell tracking workshop



چرا بحث سلولهای بنیادی داغ است؟

introduction

- how an organism develops from a single cell
- how healthy cells replace damaged cells in adult organisms.
- **regenerative or reparative medicine** :
- investigate the possibility of cell-based therapies to treat disease
- This is a promising area of sciences

- 
- not just in cell-based therapies,
 - but also for screening new drugs and toxins and understanding birth defects.
 - Stem Cell Theory of Cancer

سلول هاي بنيادي اصولا سلول هاي تخصصي نشده اي هستند كه با دو مشخصه مهم از ديگر سلول ها تفكيك مي شوند:

اولا: توانايي تكثير و افزايش تعداد براي مدت طولاني را دارند.

Self - Renewal

دوم: اينكه پس از دريافت پيام هاي شيميايي معين مي توانند تمايز حاصل كنند يا به سلول هاي تخصص يافته اي با عملكردهاي خاص، مثل سلول قلبي يا عصبي تبديل شوند. عملكرد اين سلول ها در بدن اين است كه در هنگام اختلال و بيماري تكثير شده و سلول هاي جديدي به بافت ارائه مي كنند كه اساس سلول درماني را تشكيل مي دهد.

Differentiation

سلول های بنیادی بر اساس توانایی تکثیر و تمایز به انواع مختلفی تقسیم می شوند:

۱ - سلول های بنیادی **TOTIPOTENT** یا همه توانی:
این سلول ها می توانند به هر نوع سلولی در بدن تغییر پیدا کرده و تبدیل شوند. یک تخمک بارور شده در واقع یک نوع سلول بنیادی همه توانی است. سلول های تولید شده در تقسیمات تخمک بارور شده نیز همه توانی هستند.

■ ۲- سلول های بنیادی PLURIPOTENT یا پرتوانی:

■ این سلول ها که از سلول های بنیادی رویان منشأ می گیرند، حدود ۴ روز پس از لقاح به وجود می آیند و می توانند به هر نوع سلولی به جز سلول های بنیادی همه توانی و سلول های جفت تبدیل شده و تمایز حاصل کنند.

۳- سلول های بنیادی **MULTIPOTENT** یا چند توانی :

از سلول های بنیادی پرتوانی منشأ می گیرند و سلول های تخصص یافته از آنها ناشی می شوند. برای مثال سلول های بنیادی خون ساز که در مغز استخوان وجود دارند به همه انواع سلول موجود در خون تبدیل می شوند، مثل گلبول قرمز، گلبول سفید و پلاکت. یا سلول های بنیادی عصبی که می توانند به سلول های عصبی و سلول های حمایت کننده عصبی تبدیل شوند.

■ ۴- سلول های پیش ساز یا تک توانی :

این نوع سلول ها می توانند فقط به یک نوع سلول تبدیل شده و آن را تولید کنند.

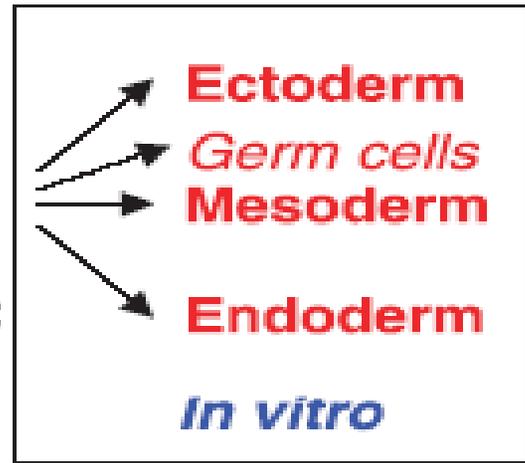
Totipotent

Zygote

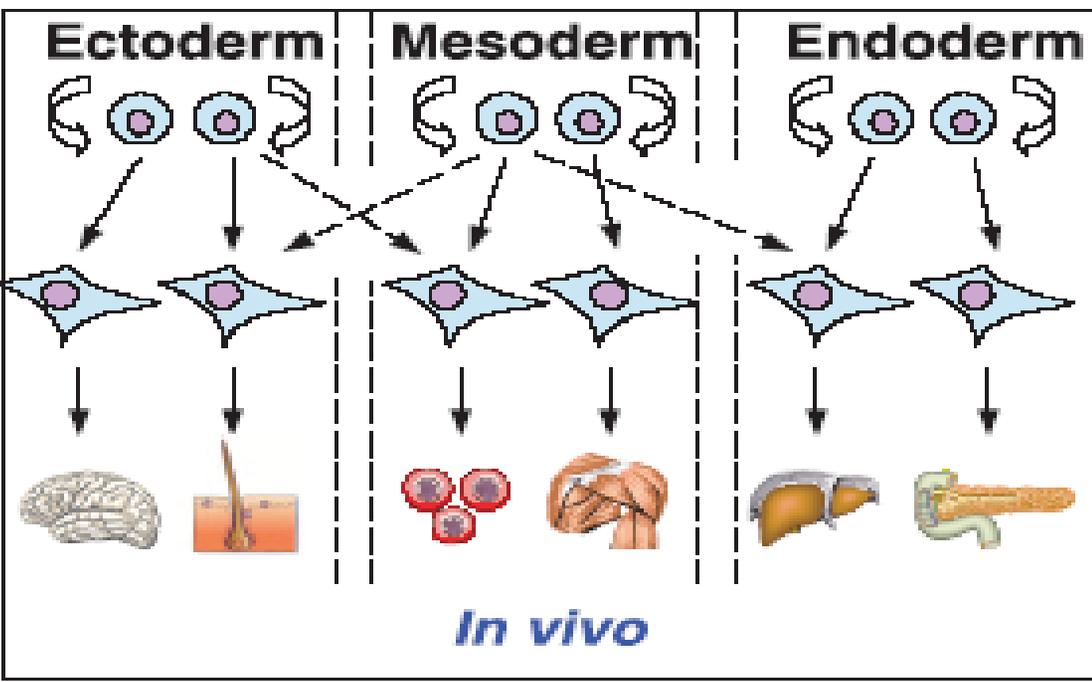
Morula

Pluripotent

Blastocyst
ICM → **ESC**
PGC → **EGC**



Multipotent



Progenitor

Organs

In vivo

کنترل رفتار سلول های بنیادی:

عوامل متعددی بر روی رفتار سلول های بنیادی اثرگذار هستند، مثل عوامل رشد و سیتوکین ها که در هر بافتی متفاوتند.

سلول های بنیادی در هر بافت، تحت تاثیر عوامل همان بافت، به سلول های همان بافت تبدیل می شوند.

تغییر این عوامل در محیط آزمایشگاه، موجب تغییر سرنوشت سلول های بنیادی می شود.

در واقع خصوصیات سلول های بنیادی به دلیل بیان يك سری ژن های خاص در آنها است و تغییر در بیان این ژن ها موجب تغییر رفتار سلول می شود.

سلول های بنیادی بالغ :

سلول های بنیادی بالغ، سلول های تمایز نیافته ای هستند که بین سلول های تمایز یافته يك بافت یا اندام وجود دارد و قادرند خود را تجدید کنند و نیز به سلول های تمایز یافته بافت تبدیل شوند. در نتیجه کار آنها بقا و تعمیر بافتی است که در آن یافت می شوند. برخلاف سلول های ES که منشاء آنها مشخص است منشاء سلول های بنیادی بالغ در يك بافت، نامشخص است.

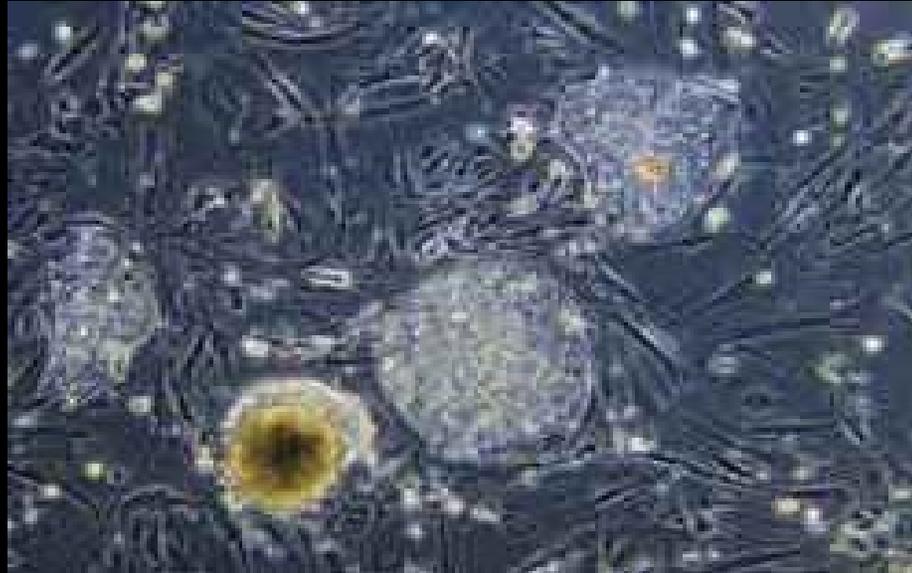
سلول های بنیادی بالغ :

■ تاریخچه کشف سلول های بنیادی بالغ به ۴۵ سال پیش برمی گردد. در سال ۱۹۶۰ میلادی، پژوهشگران متوجه شدند که مغز استخوان دارای دو نوع جمعیت سلول بنیادی است: **hsc (hematopoietic stem cell)**

که انواع سلول های خونی را می سازد. و دیگری **bone marrow** که جمعیت سلولی مخلوطی هستند که استخوان، غضروف، چربی و بافت همبند را می سازد.

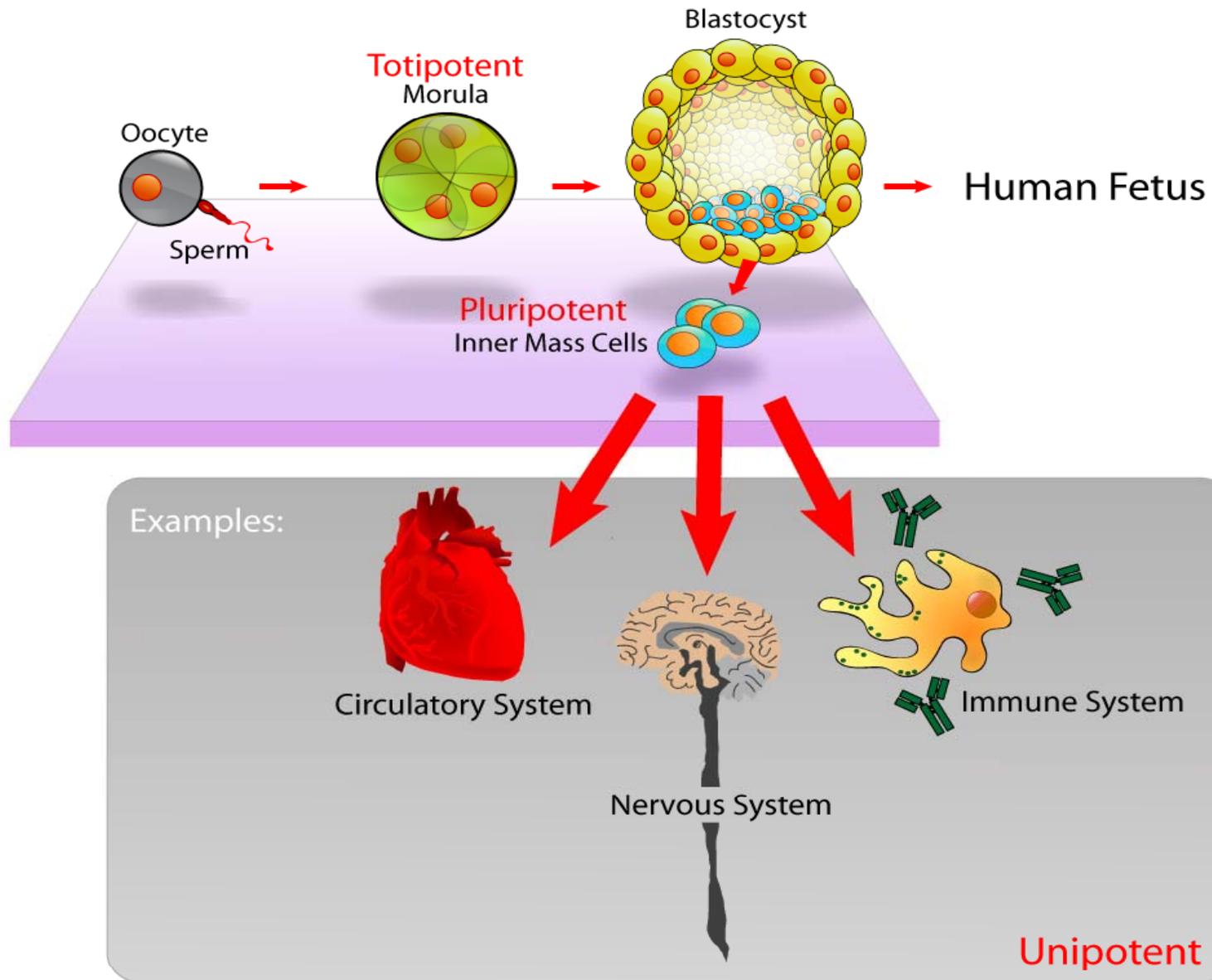
سلولهای بنیادی چه هستند و چگونه عمل می کنند

- اولین بافتی که وجود سلولهای بنیادی در آن نشان داده شد **بافت خون** بود.
- پیشرفت مطالعات نشان داد که در کلیه ی بافت های بدن نوعی از سلولها یافت می شود که توانایی تبدیل به سلول های تخصص یافته ی همان بافت را دارند و در موقع اختلال بافتی، دست به کار شده و تکثیر پیدا می کنند و به دلیل داشتن همین توانایی به آنها " سلول بنیادی" می گویند.



انعطاف پذیری سلول های بنیادی بالغ:

سلول های بنیادی بالغ به طور معمول به سلول های بافتی تبدیل می شوند که در آن قرار دارند. برای نمونه سلول های بنیادی مغز استخوان به سلول های خونی تبدیل می شوند. امروزه شماری از آزمون ها نشان داده است که امکان تبدیل سلول های بنیادی يك بافت (به طور نمونه مغز استخوان) به سلول های تخصصی بافت دیگر (به عنوان نمونه عصب) وجود دارد.



نیازهای درمانهای مبتنی بر سلول بنیادی :

■ تحقیقات سلول بنیادی انسانی ممکن است به میلیونها شخص کمک کند. که تحت تأثیر طیف وسیعی از بیماریهای انسانی لاعلاج (بیماری پارکینسون، جراحتهای نخاع، نارسایی قلبی و دیابت) قرار دارند. قبل از آنکه انتقال سلولهای مشتق شده از ES به انسانها بتواند ادامه یابد، تعدادی از موانع تجربی باید برطرف شود. این موانع عبارتند از استخراج مؤثر سلولهای ES انسانی درک تغییرات ژنتیکی و اپی ژنتیکی که با کاشت داخل آزمایشگاه رخ می دهند.

سلول درمانی چیست و چگونه از سلول های بنیادی برای سلول درمانی استفاده می شود؟

سلول درمانی در واقع عمل پیوند سلول های خویش منشا یا اتولوگ است. روشی که در حال حاضر تحت عنوان سیستم سلولی اتولوگ یا **AUTOLOGOUS CELLULAR SYSTEM** مطرح می گردد. در این روش درمانی سلول های خود فرد تکثیر شده و مجدد به محل مورد نظر تزریق می شود تا اختلال ایجاد شده رفع شود.

درمانهای مبتنی بر سلولهای بنیادی جنینی:

دو ویژگی ایجاد سلولهای ES مرتبط با سلولهای بنیادی بالغ برای درمانهای جایگزین بسیار جالب اند.

(۱) سلولهای ES انسانی به طور مشخص می توانند در محیط کشت رشد کنند.

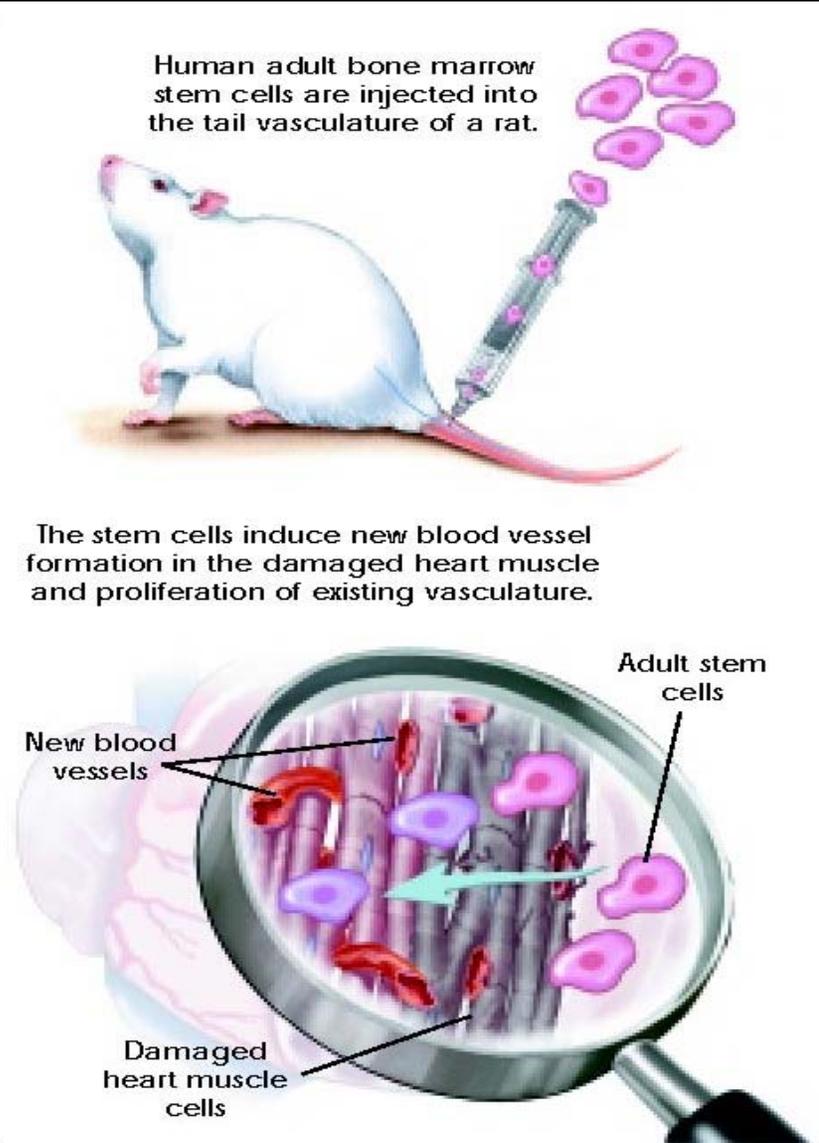
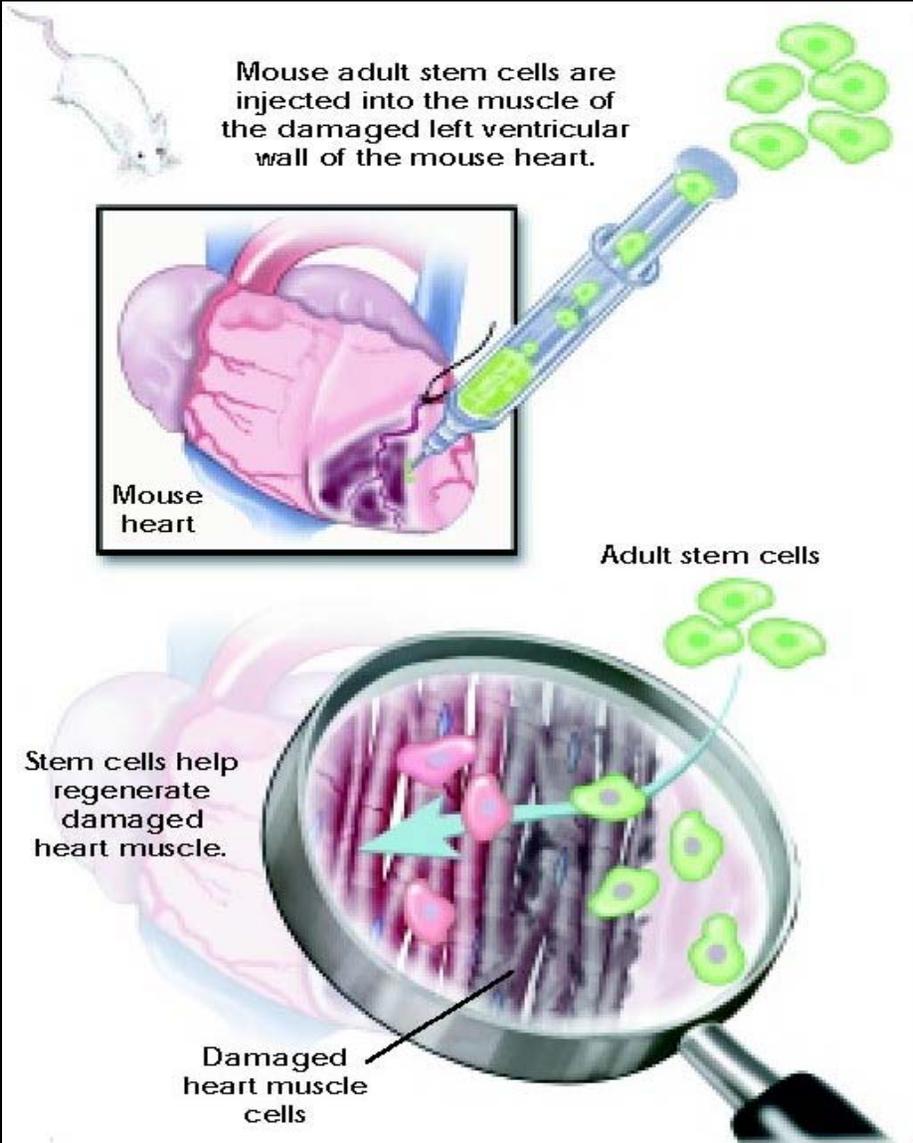
(۲) سلولهای ES می توانند به طور ژنتیکی دستکاری شده و ژنهای فاقد عملکرد می توانند به طور تئوریکال بوسیله دخول ترانس ژن به درون سلولهای ES هم بوسیله ترانس ژن کردن تصادفی یا از طریق هدف گیری ژنی

مدلهای حیوانی برای درمان سلولی

۱) سلولهای ES برای ترمیم قلبی.
عملکرد بطن چپ در موشهای مبتلا به آنفراکتوس بعد از پیوند زدن سلولهای ضرر باندار مشتق شده از سلولهای ES گزارش شده است. سلولهای عضله ای قلب پیوند زده شده، زنجیره سنگین میوزین و اکتین و تروپونین I سارکومری را بیان کردند

۲) سلولهای ES استفاده شده برای تشکیل ساختارهای عروقی در آزمایشگاه اخیراً سلولهای ES انسانی برای جداسازی سلولهای اندوتلیال به کار گرفته شدند. در طی تمایز خصوصیات رونویسی برای سلولهای اندوتلیال شناسایی شدند.

۳) سلولهای ES برای تعمیر عصبی
Brustle و همکارانش ابتدا نشان دادند که سلولهای عصبی مشتق شده از سلول ES می تواند زنده بماند. به علامت دهی محیطی پاسخ دهد، جنبه های تمایز ویژه منطقیهای را نمایش دهد.



In vitro fertilization

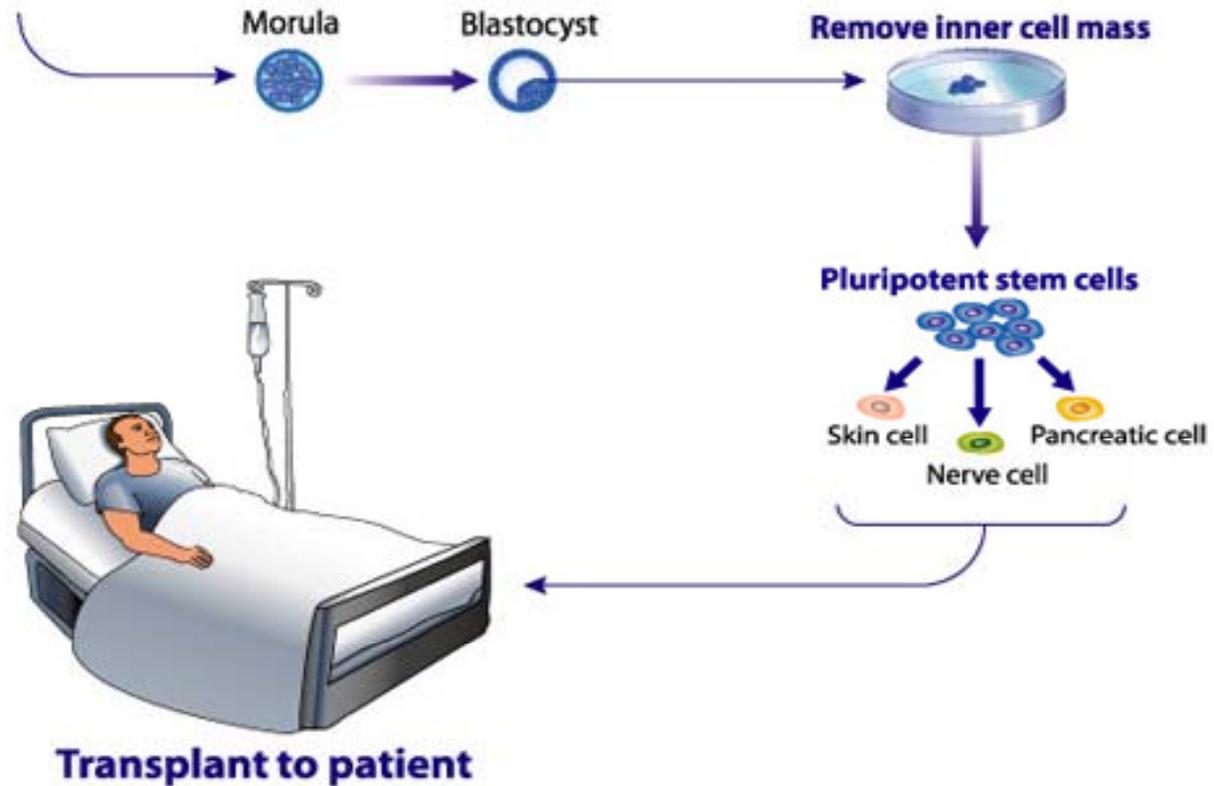


Illustration by [Cell Imaging Core](#) of the Center for Reproductive Sciences.



Stem cells

New hope for a broken heart!



- 
- Nearly all cardiovascular stem cell trials of ischemic heart failure or acute myocardial infarction have used at least one imaging modality (and often several imaging modalities) to assess patient response to treatment

Methodologies to label stem cells for tracking continue to expand.

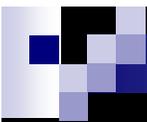
- Non-invasive imaging offers the potential to better understand the interaction of exogenous stem cells with the host to answer questions such as the
 - best cell type(s),
 - timing of delivery
 - dose
 - delivery route



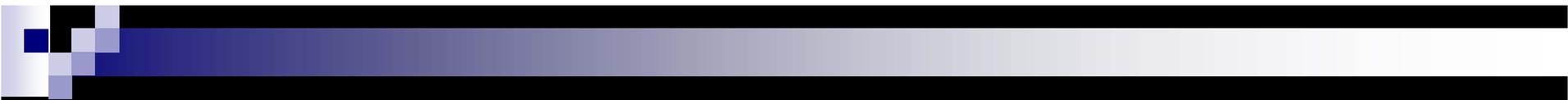
Comparison of Different Adult Stem Cell Types for Treatment of Myocardial Ischemia

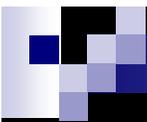
CIRCULATION. 2008 SEP 30;118(14 SUPPL):S121-9.

- 
- A comparative analysis of the efficacy of different cell candidates for the treatment of heart disease remains to be described. This study was designed to evaluate the therapeutic efficacy of 4 cell types in a murine model of myocardial infarction.

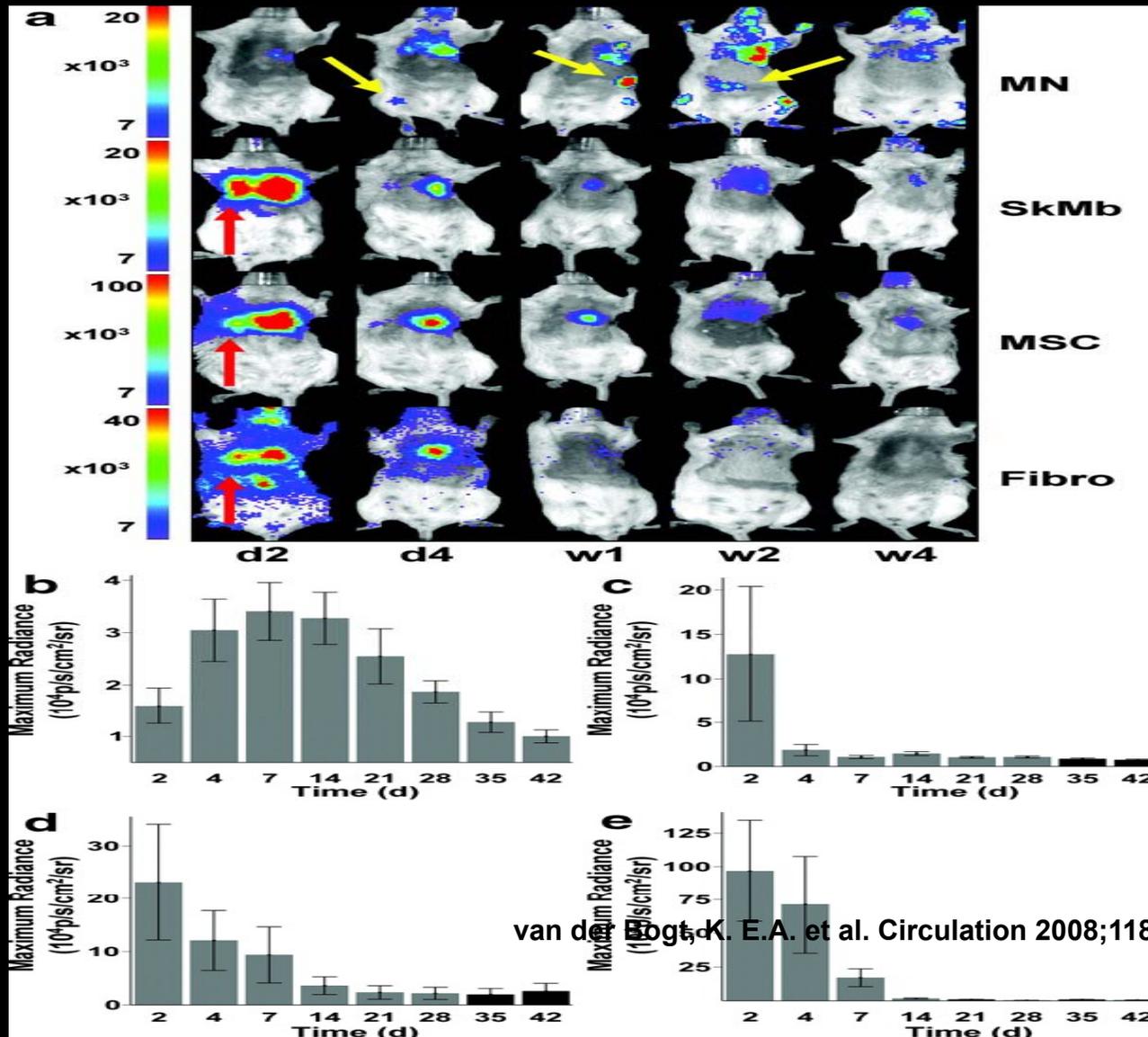
- 
- **Bone marrow mononuclear cells (MN), mesenchymal stem cells (MSC), skeletal myoblasts (SkMb), and fibroblasts (Fibro)** expressing firefly luciferase (Fluc) and green fluorescence protein (GFP) were acquired from 8-week-old male L2G mice (n=15), which were bred on FVB background and ubiquitously express green fluorescent protein (GFP) and firefly luciferase (Fluc) reporter genes driven by a β -actin promoter

- 
- Historically, exogenously expressed green fluorescent protein (GFP) has been ubiquitously used as a reporter gene in histological specimens. However, the attenuation of fluorescence across tissue layers limits GFP utility as an in vivo optical imaging reporter gene.

- 
- For in vivo reporter gene imaging, bioluminescence imaging (BLI) is commonly used to track cells transfected to express firefly luciferase. The administration of the reporter probe, D-luciferin, in the presence of ATP is catalyzed by luciferase to oxyluciferin with the release of light that can be recorded by a charge-coupled device camera.

- 
- Female FVB mice (8 weeks old) were intubated with a 20-gauge angiocath (Ethicon Endo-Surgery, Inc) and placed under general anesthesia with isoflurane (2%).
 - Myocardial infarction (MI) was created by ligation of the mid left anterior descending (LAD) artery with 8-0 ethilon suture through a left anterolateral thoracotomy as described.
 - Ten minutes afterward, the infarct region was confirmed by myocardial blanching. Injections were made at 2 sites **near the peri-infarct zone (medial and lateral zones)** with a total volume of 50 μL containing **5×10^5 cells** or PBS respective of group randomization using a Hamilton syringe with a 29-gauge needle.

Longitudinal in vivo optical bioluminescence imaging (BLI) of transplanted cell survival. a, Images from the same representative animal from each group reveal cell proliferation, death, and migration

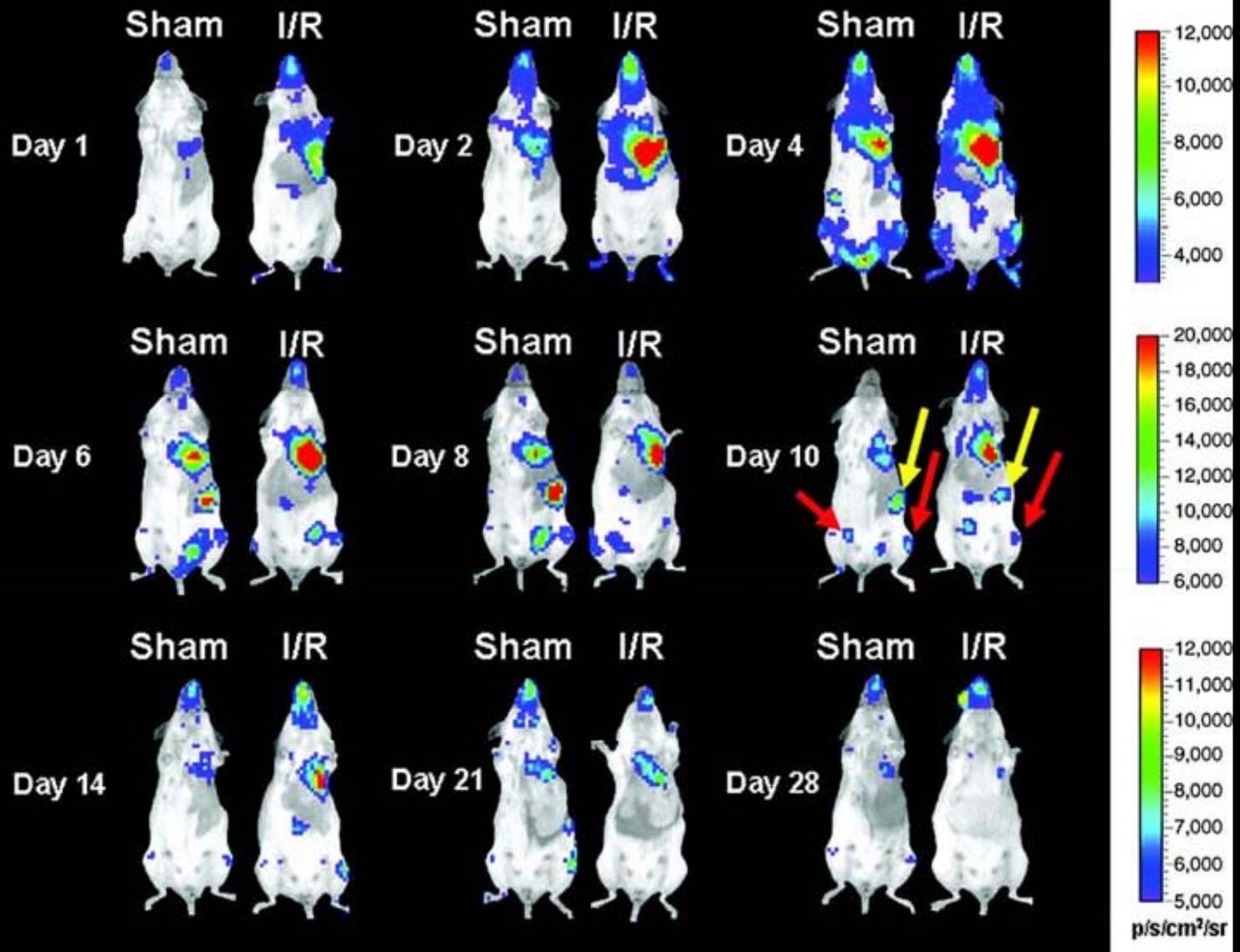


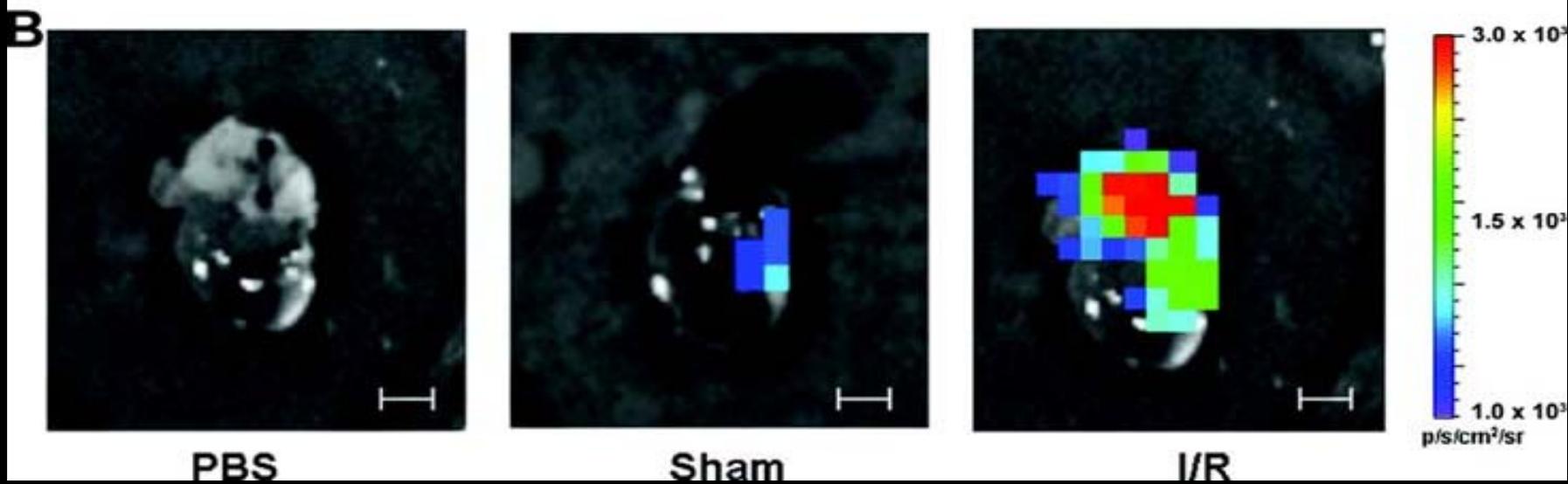
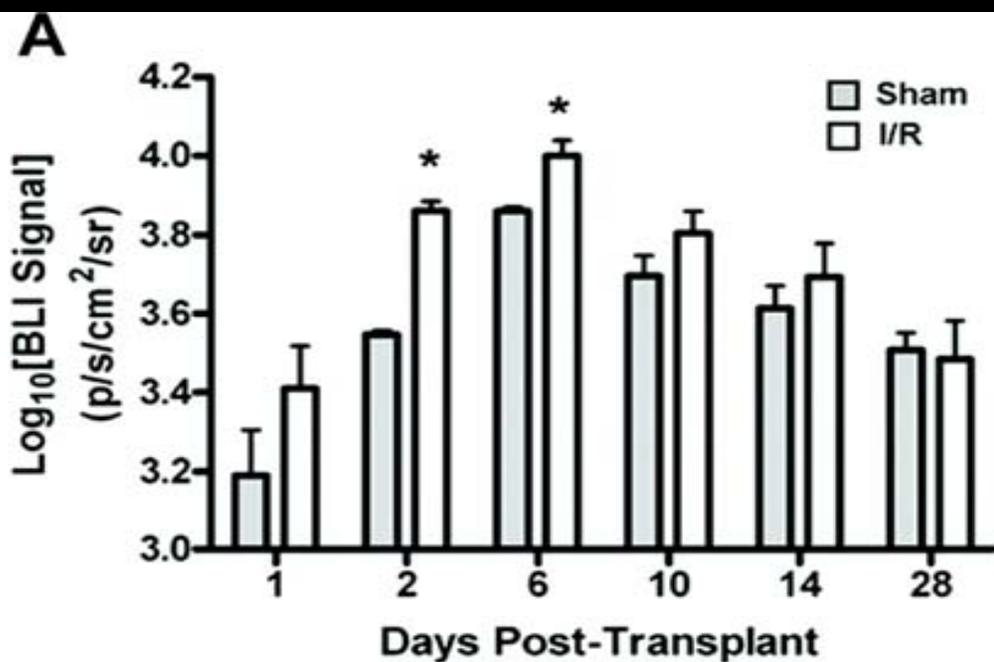
- 
- compared to SkMb, MSC, and Fibro, **MN** show **the most favorable survival pattern** after injection into the infarcted heart;
 - MN injection leads to a better, but transient, preservation of cardiac function;
 - this preservation is probably not attributable to substantial repopulation of the infarcted myocardium nor transdifferentiation into MN-derived cardiomyocytes.



Molecular Imaging of Bone Marrow Mononuclear Cell Homing and Engraftment in Ischemic Myocardium

STEM CELLS 2007;25:2677–2684







Noninvasive Quantification and Optimization of Acute
Cell Retention by In Vivo Positron Emission
Tomography After Intramyocardial Cardiac-Derived
Stem Cell Delivery

J AM COLL CARDIOL. 2009 OCT 20;54(17):1619-26

- 
- The aim of this study was to quantify acute myocardial retention of cardiac-derived stem cells (CDCs) and **evaluate different delivery methods with positron emission tomography (PET).**

- 
- Cardiac-derived stem cells (CDCs) were cultured from tissue samples derived from explanted hearts from male 3-month-old Wistar Kyoto (WKY) rats
 - **In vitro ^3H -FDG labeling:** 10^5 cells were incubated in glucose-free medium for 1 h and exposed to $2 \mu\text{Ci/ml}$ of ^3H -FDG
 - Female WKY rats ($n = 85$ total) underwent left thoracotomy under general anesthesia, and MI was produced by permanent ligation of the left anterior descending coronary artery and the cells were injected as following.

Study groups

- Cells were injected intramyocardially after the induction of cardiac arrest
- Cells were lysed with sonication after labeling and before injection
- Cells were suspended in PBS and injected intramyocardially
- Cells were suspended in PBS containing 100 $\mu\text{mol/l}$ of BDM to locally suppress contractility at the injection site
- After intramyocardial cell injection, the epicardial side of the injection site was sealed by Fibrin Glu
- Intramyocardial delivery of cells was performed during slowing of ventricular rate by IV injection of adenosine
- Cell delivery was performed during IV adenosine injection and subsequently the injection site was sealed epicardially by FG

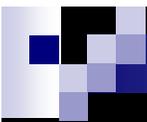
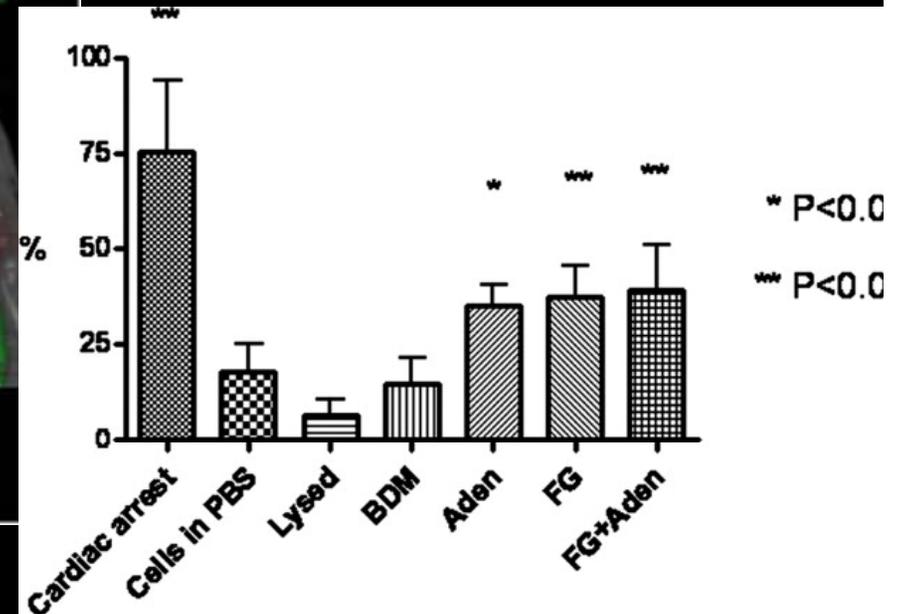
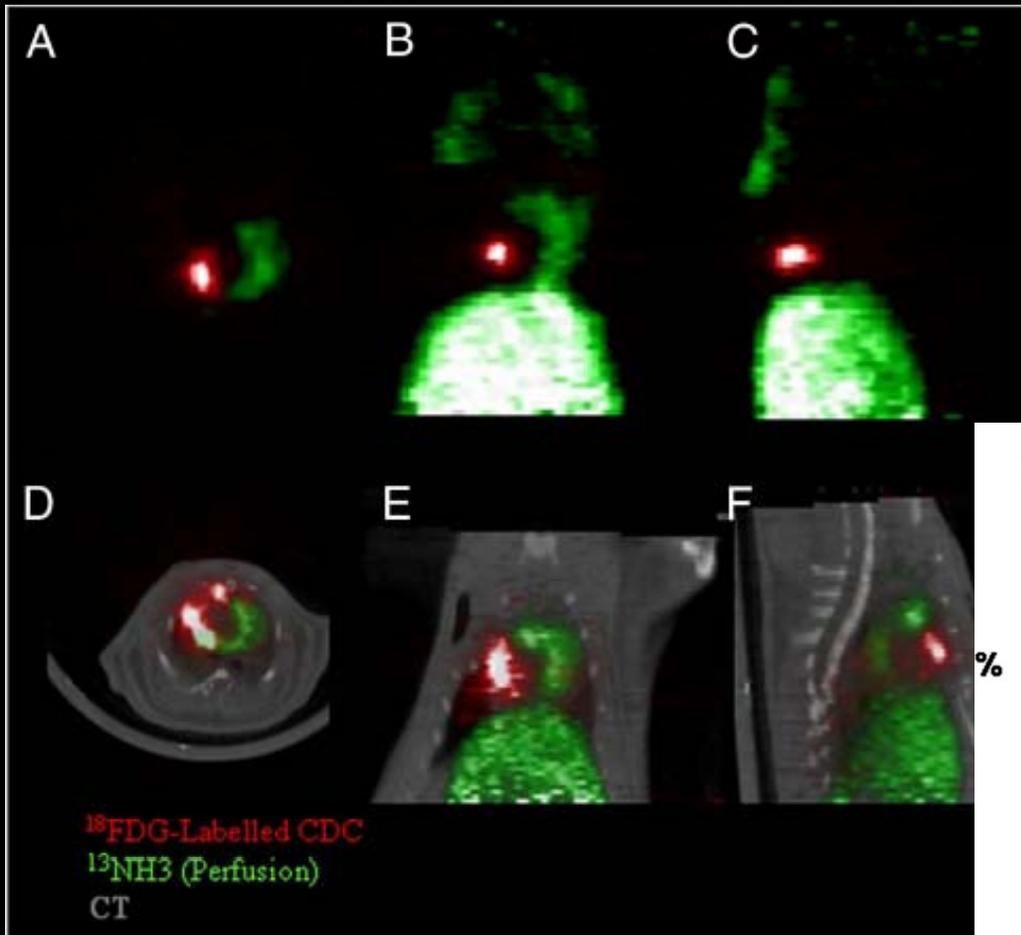
- 
- Circulating proangiogenic progenitor cells isolated from peripheral blood and cultivated for 3 days were labeled with radioactive indium oxine (^{111}In -oxine).
 - Radiolabeled proangiogenic progenitor cells were administered to patients with previous myocardial infarction and a revascularized infarct vessel at various stages after infarction (5 days to 17 years).
 - Viability of the infarcted myocardium was determined by ^{18}F -fluorodeoxyglucose–positron emission tomography

Figure 1. Detection of ^{18}F FDG Labeled Cells Injected in the Myocardium by Micro-PET
(A) Transverse, **(B)** coronal, **(C)** sagittal image orientation. In a different experiment, fusion of computed tomography (CT) and micro-positron computed tomography (PET) images provides more detailed anatomical information. **(D)** Transverse, **(E)** coronal, **(F)** sagittal image orientation.

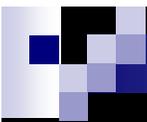


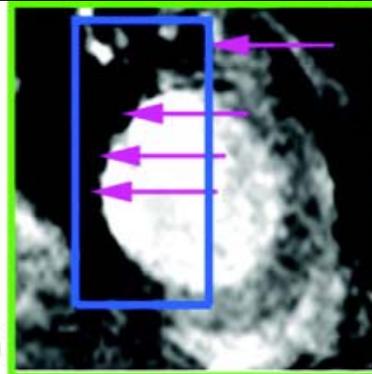
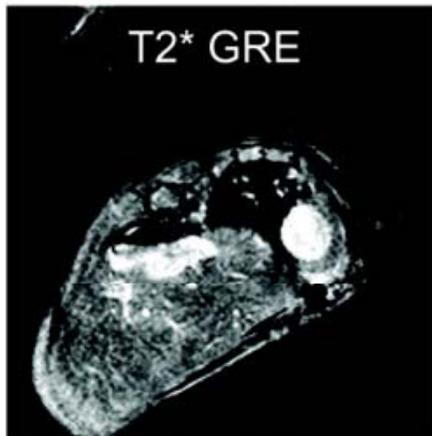
- 
- In vivo PET permits accurate measurement of CDC retention early after intramyocardial delivery.
 - Sealing injection sites with FG or lowering ventricular rate by adenosine might be clinically translatable methods for improving stem cell engraftment in a beating heart.



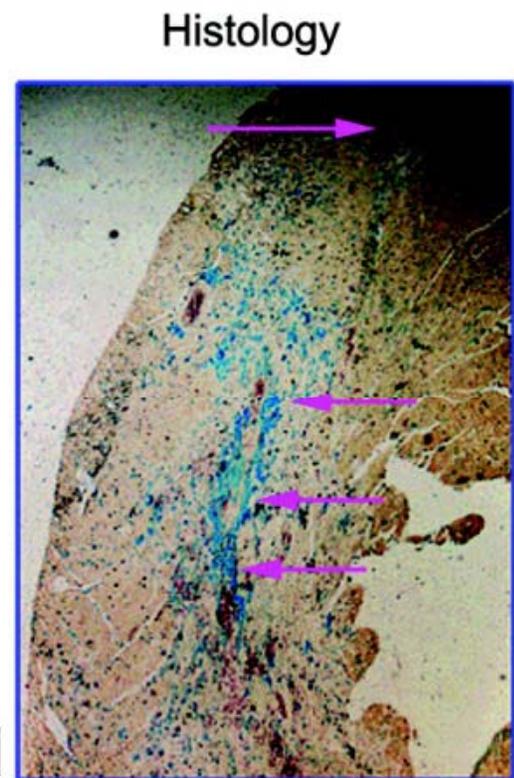
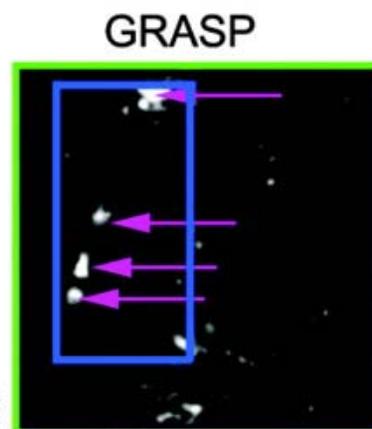
Serial in vivo positive contrast MRI of iron oxide-labeled embryonic stem cell-derived cardiac precursor cells in a mouse model of myocardial infarction

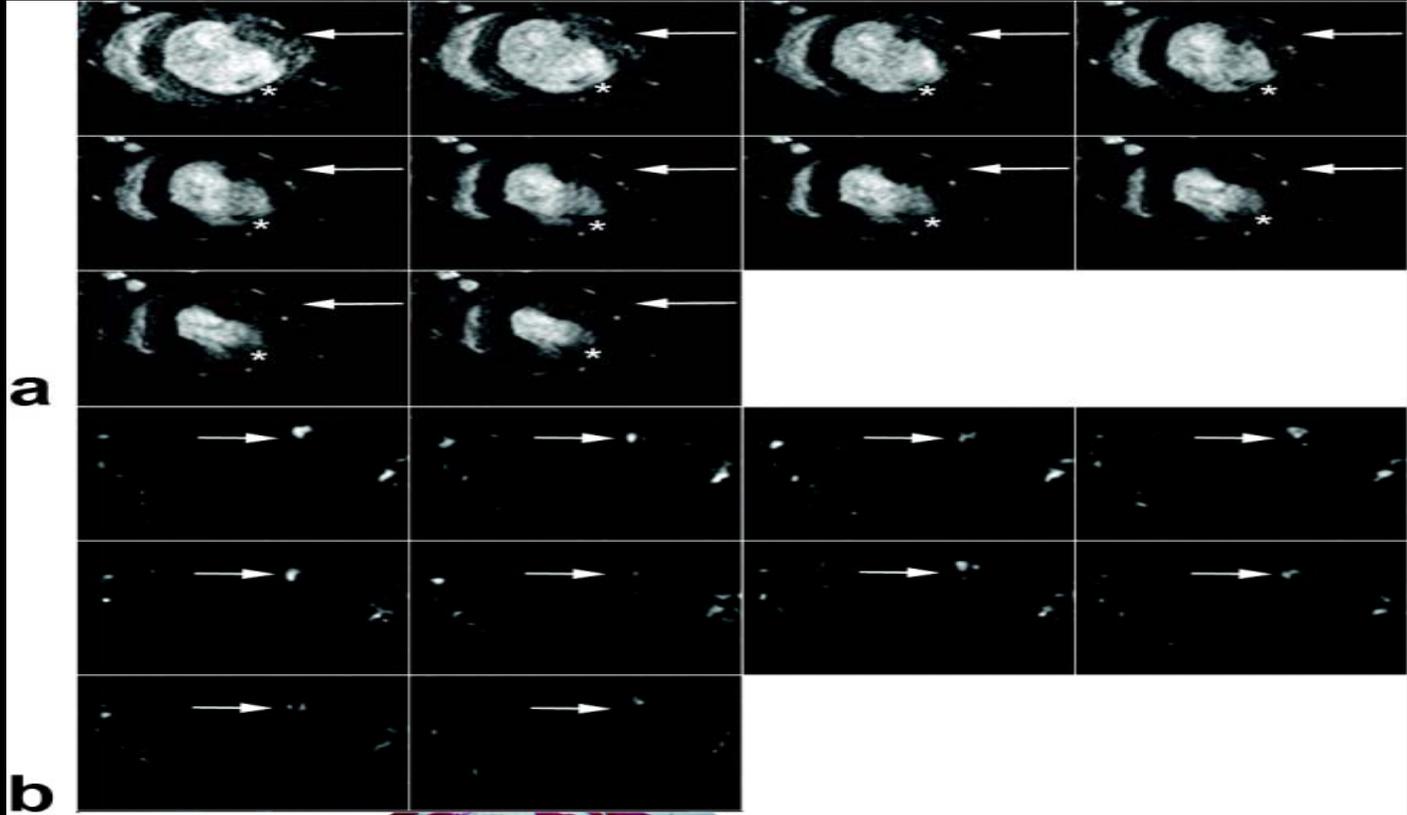
MAGN RESON MED. 2008 JUL;60(1):73-81

- 
- The aim of the current study was to test a positive contrast MR technique using reduced z-gradient rephasing (GRASP) to aid in dynamically tracking stem cells in an in vivo model of mouse myocardial infraction.
 - Ferumoxides and protamine sulfate were complexed and used to magnetically label embryonic stem cell-derived cardiac-precursor-cells (ES-CPCs).
 - A total of 500,000 ES-CPCs were injected in the border zone of infarcted mice and MR imaging was performed.
 - Following imaging, mice were sacrificed for histology and Perl's staining was used to confirm iron within myocardium. Good correlation was observed between signal loss seen on conventional *T* images, bright areas on GRASP, and the presence of iron on histolog



1 week post stem cell implantation





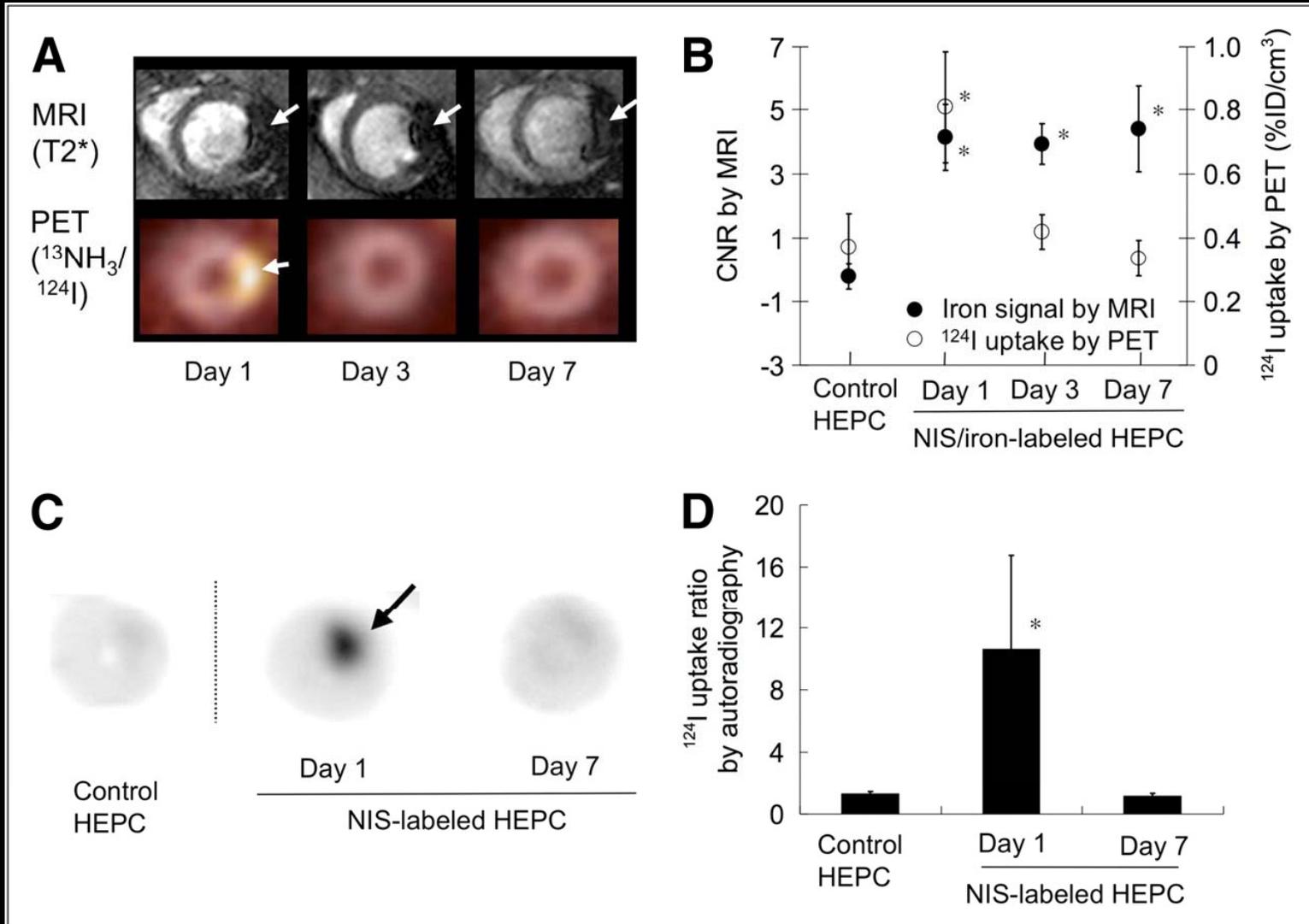


**Combined Reporter Gene PET and Iron Oxide MRI
for Monitoring Survival and Localization of
Transplanted Cells in the Rat Heart**

JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE VOL. 50 NO. 7 1088-1094

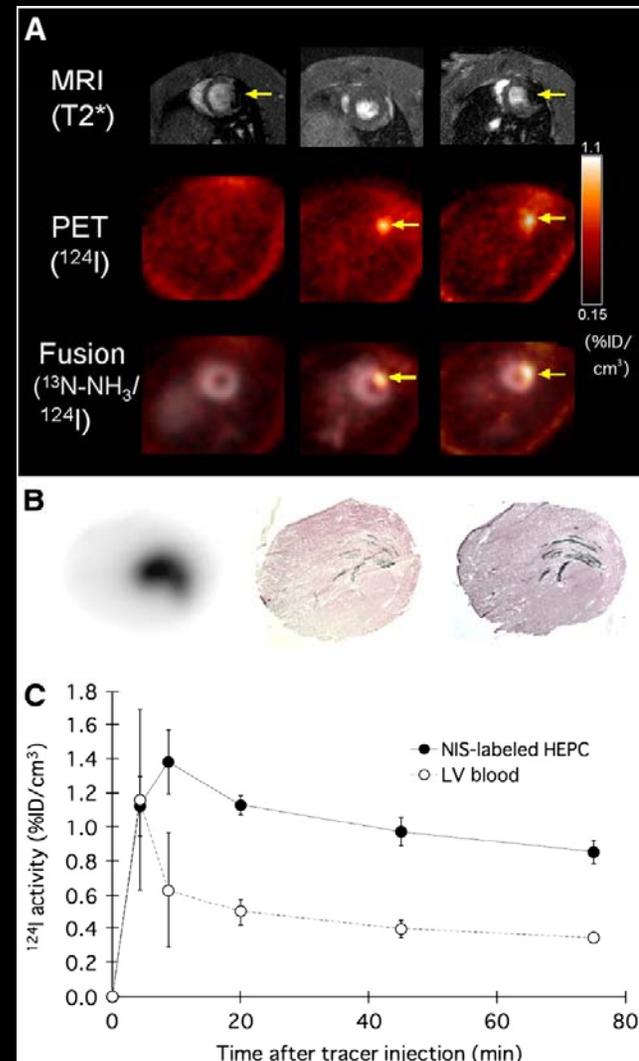
- 
- for in vivo monitoring of cell engraftment and survival after cardiac cell transplantation therapy.
 - This study assessed the usefulness of combined PET and MRI for monitoring cell engraftment and survival after cell transplantation.
 - **Methods:** Human endothelial progenitor cells (HEPCs), derived from CD34+ mononuclear cells of umbilical cord blood, were retrovirally transduced with the sodium iodide symporter (NIS) gene for reporter gene imaging by ^{124}I -PET and labeled with iron oxides for visualization by MRI.

Representative MR and PET images of rat thorax 1 d after cell transplantation. Donor cells were labeled with iron (left), NIS only (middle), or both iron and NIS (right).



Results from longitudinal imaging of transplanted HEPCs labeled with both iron oxides and NIS gene

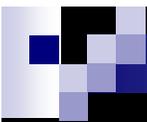
- A) Representative short-axis images of rat on days 1, 3, and 7 after transplantation. (B) Time course of mean (\pm SD) MRI and PET signal. Contrast-to-noise ratio by MRI at site of cell injection was stable over 7 d, but ^{124}I uptake decreased rapidly and was not detectable on day 7 after cell engraftment ($*P < 0.001$). (C and D) Results of autoradiography confirmed changes in ^{124}I signal by PET. Representative autoradiograph (C) and bar graph of mean (\pm SD) ^{124}I uptake ratio (D) demonstrate rapid decrease of uptake signal as early as 3 d after transplantation





**Pilot Trial on Determinants of Progenitor Cell
Recruitment to the Infarcted Human Myocardium**

CIRCULATION. 2008;118:1425-1432

- 
- mononuclear cells were purified from venous blood (250 mL) and ex vivo cultured for 3 days
 - 10^6 CPCs were resuspended in a final volume of 5 mL growth factor and serum-free X-VIVO-10 medium were labeled with 25 MBq ^{111}In -oxine (half-life, 2.8 days; energy, 171 keV, 245 keV, 37 MBq/mL, Tyco Healthcare, Neustadt, Germany)
 - after arterial puncture, patients received both 10^6 radiolabeled CPCs via an over-the-wire balloon catheter advanced into the coronary artery supplying the infarct territory.



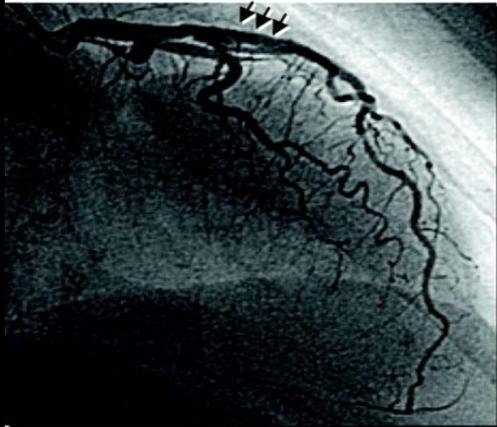
- **Monitoring of ^{111}In Activity**

Whole-body scintigraphy was used to detect radioactivity of infused ^{111}In -oxine-labeled CPC. Gamma camera studies using the same region of interest were performed at 3 time points: 1 hour, 24 hours, and 3 or 4 days after intracoronary infusion of labeled CPCs

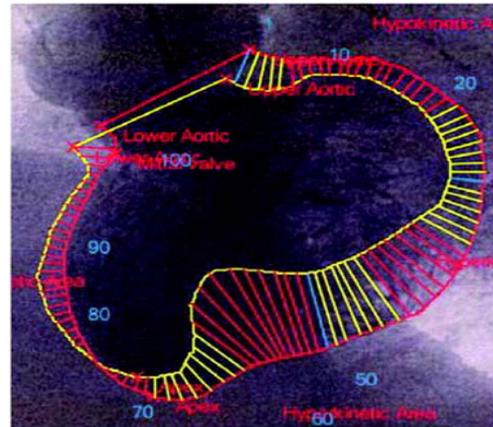
- **FDG-PET** was performed with a whole-body PET scanner for **Viability measurement of the infarcted myocardium**

Example of ^{111}In uptake in patient after an anterior AMI (cell administration 5 days after acute PCI)

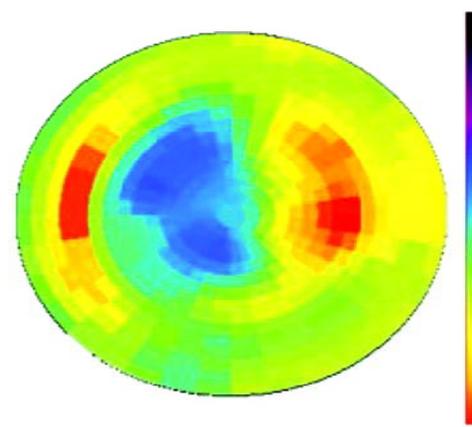
A Coronary angiogram



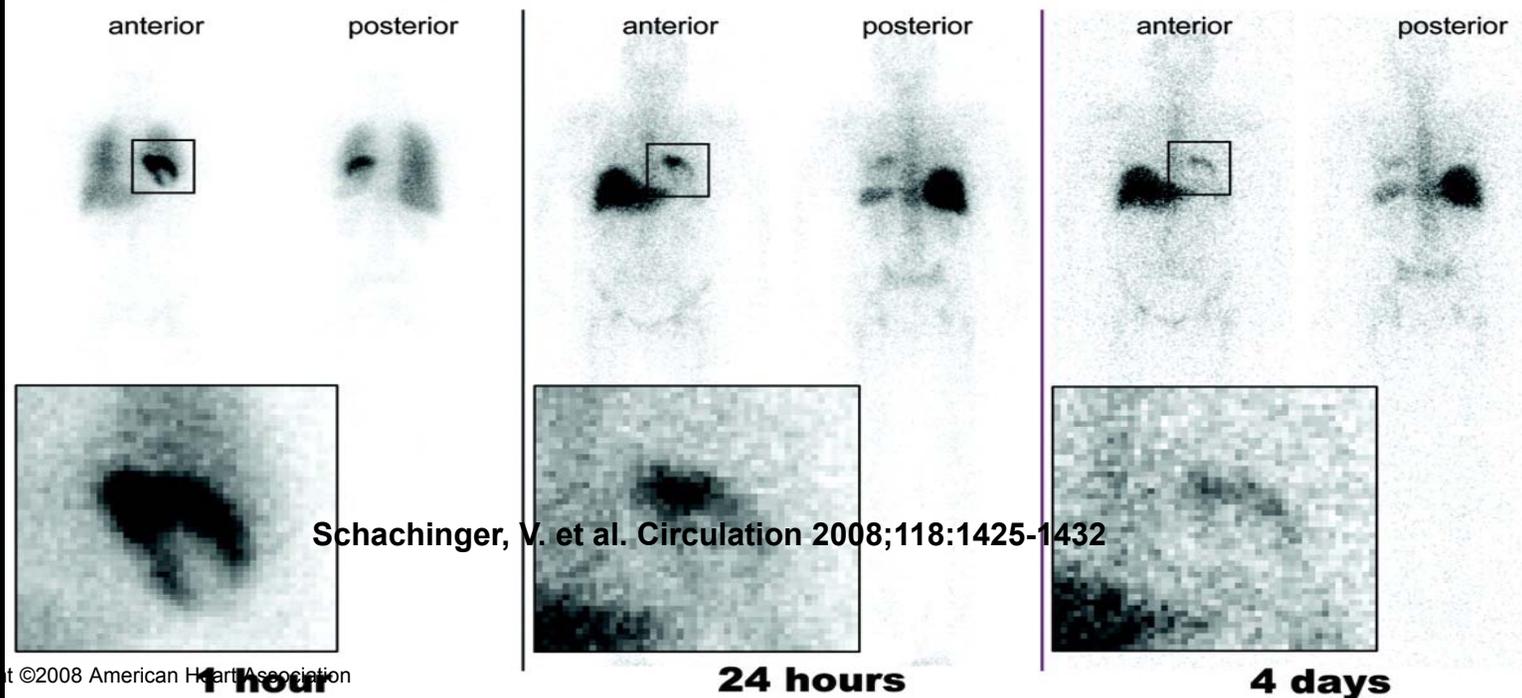
B LV angiogram



C FDG-PET



D Gamma camera (^{111}In activity)



Schachinger, V. et al. *Circulation* 2008;118:1425-1432

