

Received: 2012.02.20
Accepted: 2013.10.25
Published: 2014.02.14

Od komórek prekursorowych do komórek przeprogramowanych: ewolucja kardiomioplastyki*

From precursor to reprogrammed cells: evolution of cardiomyoplasty

Stanisław Szala¹, Sybilla Matuszczak¹, Justyna Czapla¹, Ewa Wiśniewska²

¹ Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Gliwicach

² Katedra i Oddział Kliniczny Kardiologii i Transplantologii Śląskiego Centrum Chorób Serca w Zabrzu

Streszczenie

Zawał mięśnia sercowego to ograniczona martwica tkanek spowodowana niedotlenieniem. Na skutek zawału ginie od 0,5 do 1 miliarda kardiomiocytów (CM), komórek mających zdolność spontanicznego skurczu. Ponieważ ludzkie serce ma ograniczoną zdolność do regeneracji, podejmowane są różne próby zwiększania liczby kardiomiocytów w pozawałowym sercu. Próby te polegają na transplatacji do mięśnia sercowego: 1) mioblastów szkieletowych i kardiomiocytów; 2) komórek progenitorowych/macierzystych teoretycznie mających zdolność do różnicowania się w kierunku kardiomiocytów; 3) komórek pluripotentnych: embrionalnych komórek macierzystych (ESC) i indukowanych komórek macierzystych (iPSC) różnicujących się do kardiomiocytów, a także na 4) przeprogramowaniu *in situ* fibroblastów do aktywnych kardiomiocytów czy 5) stymulacji proliferacji kardiomiocytów *in situ* za pomocą czynników farmakologicznych. Z tych pięciu propozycji teoretycznych na uwagę zasługują propozycje: druga, czwarta i piąta. Doświadczenia przedkliniczne i kliniczne wskazują na niewielką zdolność do różnicowania komórek progenitorowych (propozycja druga). Niemniej, pojawiające się podczas terapii efekty parakryne wywołane przez transplataowane komórki poprawiają funkcję uszkodzonego zawałem serca. Rozwiązaniem pozwalającym zwiększyć liczbę CM, jest tzw. zabieg przeprogramowania *in situ* fibroblastów do aktywnych kardiomiocytów (propozycja czwarta), a także stymulacja *in situ* proliferacji spoczynkowych kardiomiocytów (propozycja piąta). Wydaje się, że optymalnym rozwiązaniem terapeutycznym (zwiększającym frakcję wyrzutową lewej komory i zmniejszającym bliznę pozawałową) może się stać połączenie czynników stymulujących efekty parakryne z przeprogramowaniem fibroblastów.

Słowa kluczowe:

zawał • regeneracja mięśnia sercowego • kardiomiocyty • transplatawanie komórek progenitorowych • efekty parakryne • przeprogramowanie fibroblastów

Summary

Myocardial infarction is underoxygenation-driven limited necrosis of heart tissues which results in elimination of ca. 0.5 to 1 billion spontaneously contracting cardiomyocytes (CM). Since the ability of human heart to regenerate is limited, efforts have been undertaken to increase the number of cardiomyocytes in post-infarction myocardium. Theoretically, such proposals might involve trans-

*Publikacja została sfinansowana z projektu POIG.01.03.01-00-169/09 finansowanego przez Unię Europejską.

<p>Key words:</p>	<p>plantation of 1) skeletal myoblasts and cardiomyocytes, or 2) progenitor/stem cells, theoretically capable of differentiating into cardiomyocytes, or 3) pluripotent cells such as embryonal stem cells (ESC) and induced pluripotent stem cells (iPSC) differentiating into cardiomyocytes. The efforts to increase CM could also involve 4) <i>in situ</i> reprogramming of fibroblasts into active cardiomyocyte-like cells, or 5) stimulating <i>in situ</i> proliferation of cardiomyocytes using pharmacological agents. Only three proposals merit closer scrutiny (2, 4 and 5). However, preclinical and clinical data have demonstrated weak ability of progenitor cells to differentiate (proposal 2). Nevertheless, transplanted cell-induced paracrine effects accompanying such therapy do improve functioning of the damaged heart muscle. The proposals that would permit the number of CM to be increased include <i>in situ</i> reprogramming of fibroblasts into active cardiomyocytes (proposal 4), as well as <i>in situ</i> stimulation of quiescent cardiomyocytes' proliferation (proposal 5). It appears that an optimized therapeutic solution (increasing left ventricular ejection fraction and decreasing the post-infarct scar) might combine agents stimulating paracrine effects and reprogramming of fibroblasts.</p> <p>infarction • heart muscle regeneration • cardiomyocytes • transplanting progenitor cells • paracrine effects • fibroblast reprogramming</p>
<p>Full-text PDF:</p> <p>Word count:</p> <p>Tables:</p> <p>Figures:</p> <p>References:</p>	<p>http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1088354</p> <p>2632</p> <p>1</p> <p>2</p> <p>56</p>

Adres autora: prof. dr hab. Stanisław Szala, Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, ul. Wyrbrzeże Armii Krajowej 15, 44-101 Gliwice; e-mail: sszala@io.gliwice.pl

WSTĘP

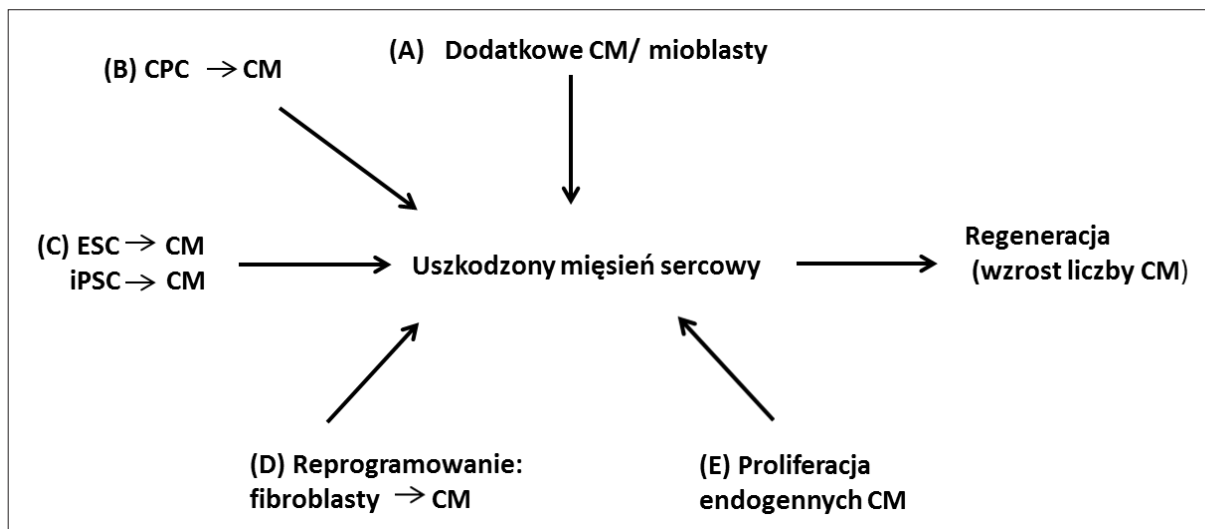
Zawał mięśnia sercowego to ograniczona martwica tkanek spowodowana niedotlenieniem. Zmiany morfologiczne w zawałe mięśnia sercowego przebiegają od martwicy skrzepowej poprzez fagocytozę obumarłych włókien przez makrofagi aż do powstania skolegenizowanej blizny [16]. W pozawałowym mięśniu sercowym ginie od 0,5 do 1 miliarda kardiomiocytów, komórek zdolnych do spontanicznego skurczu [26]. Czy tak rozległe ubytki kardiomiocytów w pozawałowym mięśniu sercowym można uzupełnić? Czy w mięśniu sercowym u ludzi zachodzi proces regeneracji, odtworzenia brakujących kardiomiocytów?

Zdolność do regeneracji amputowanego koniuszka serca (20% masy komory) zaobserwowano u ryb (*Danio rerio*), a także u jednodniowych myszy [25,26]. U siedmiodniowych myszy zdolność ta jednak zanika [42]. Regeneracja u ryb i jednodniowych myszy polega głównie na proliferacji preegzystujących kardiomiocytów. W regeneracji pozawałowego serca u dorosłych myszy około 15% kardiomiocytów powstaje z komórek progenitorowych [26].

Zarówno zdolność komórek progenitorowych/macierzystych do różnicowania się w kierunku kardiomiocytów, jak i do proliferacji jednojądrzastych, diploidalnych kardiomiocytów, maleje z wiekiem [26]. Mimo występowania w sercu tzw. progenitorowych komórek serca CPC (cardial progenitor cells), u dorosłych osobników obserwuje się

raczej ubytki kardiomiocytów niż wzrost ich liczby. Liczba proliferujących, jednojądrzastych diploidalnych kardiomiocytów w sercu wyższych organizmów jest stosunkowo niska. U zdrowych myszy proliferuje zaledwie 0,0006% kardiomiocytów [26]. U myszy z zawałem, na granicy tkanki prawidłowej z blizną pozawałową, liczba dzielących się kardiomiocytów wzrasta do 0,0083%. Wydaje się oczywistym, że zwiększając liczbę aktywnych kardiomiocytów powinno się uzyskać poprawę pracy mięśnia sercowego. Tylko w jaki znaczący sposób można zwiększyć w pozawałowym mięśniu sercowym liczbę aktywnych kardiomiocytów?

Istnieje kilka możliwych sposobów powiększenia ich liczby (ryc. 1). Pierwszym z nich jest transplantacja do uszkodzonego mięśnia sercowego komórek mających zdolność kurczenia się: kardiomiocytów lub mioblastów mięśni szkieletowych [36]. Sposób drugi polega na wprowadzeniu do uszkodzonego mięśnia sercowego progenitorowych komórek CPC, które mogłyby się różnicować do funkcjonalnych kardiomiocytów [9]. Trzecia propozycja jest pewną odmianą wersji drugiej i polega na wprowadzeniu do uszkodzonego mięśnia sercowego pluripotentnych komórek macierzystych różnicujących się do kardiomiocytów [33]. Czwarty sposób polega na przeprogramowaniu *in situ* fibroblastów do aktywnych, diploidalnych kardiomiocytów [20]. Rozwiązanie piąte to stymulacja proliferacji spoczynkowych, jednojądrzastych, diploidalnych kardiomiocytów *in situ* za pomocą czynników farmakologicznych [26]. W artykule omówimy sposoby zwiększania



Ryc. 1. Schemat pięciu potencjalnych rozwiązań terapeutycznych, których celem jest uzyskanie wzrostu liczby kardiomiocytów w pozawałowym sercu; A - transplantacja do mięśnia sercowego komórek kurczliwych: mioblastów szkieletowych i kardiomiocytów; B - transplantacja komórek progenitorowych/macierzystych zdolnych do różnicowania się w kierunku kardiomiocytów; C - transplantacja komórek pluripotentnych ESC i iPSC różnicujących się do kardiomiocytów; D - transdiferencjacja *in situ* fibroblastów do aktywnych kardiomiocytów; E - stymulacja proliferacji kardiomiocytów *in situ* za pomocą czynników farmakologicznych

liczby kardiomiocytów w pozawałowym sercu oraz przedyskutujemy konsekwencje ich stosowania.

PODSTAWOWE ZAŁOŻENIA TERAPEUTYCZNE

Pierwsza propozycja terapeutyczna polega na transplantacji do pozawałowego mięśnia sercowego komórek kurczliwych: mioblastów mięśni szkieletowych lub kardiomiocytów [34,36]. Okazało się jednak, że przeszczepiane do mięśnia sercowego mioblasty nie były w stanie integrować elektrofizjologicznie z endogennymi kardiomiocytami znajdującymi się w sercu [30,36]. Nieintegrowane egzogenne mioblasty wywoływały niebezpieczną arytmie komorową.

Do uszkodzonego zawałem fragmentu mięśnia sercowego usiłowano także wprowadzać kardiomiocyty powstałe w wyniku różnicowania *in vitro* pluripotentnych ludzkich embrjonalnych komórek macierzystych ESC (embryonic stem cells) [36]. Podobnie jak mioblasty, również wszczepione ludzkie kardiomiocyty nie integrowały ze znajdującymi się w sercu endogennymi kardiomiocytami myszy. Wprawdzie po transplantacji do mięśnia sercowego egzogenne kardiomiocyty ludzkie tworzyły ze sobą syncytium, nie mogły jednak utworzyć takiego syncytium z endogennymi kardiomiocytami myszy [26]. Kardiomiocyty ludzkie były oddzielone od kardiomiocytów myszy warstwą tkanki łącznej. Niewykluczone, że ten brak funkcjonalnej integracji wprowadzonych egzogennych ludzkich komórek z mysimi komórkami może być spowodowany różnicami w częstotliwości skurczów (u ludzi ~ 80/min, u myszy ~ 500/min), a także innymi przyczynami, jak choćby stanem zapalnym wywołanym przez wprowadzone ludzkie komórki [17,34].

Druga propozycja terapeutyczna polegała na wprowadzaniu (wszczepianiu) w rejon zawałowe komórek progenitorowych/macierzystych [9,23,44]. Nie bez powodu zakładano,

że komórki te będą różnicowały się w kierunku kardiomiocytów (CM), a także do komórek mięśni gładkich (SM) i komórek śródbłonkowych (EC). W badaniach tych usiłowano wykorzystać przede wszystkim progenitorowe komórki CPC, tzw. rezydujące, występujące w mięśniu sercowym, jak i komórki CPC występujące w szpiku kostnym. W tabeli 1 przedstawiono listę, jak dotąd, poznanych progenitorowych komórek serca. Najczęściej badanymi komórkami CPC były komórki c-Kit⁺ oraz komórki, które spontanicznie tworzyły kuliste, trójwymiarowe struktury zwane kardiosferami [6,9].

Pierwsze doświadczalne próby z udziałem komórek c-Kit⁺ okazały się niezwykle obiecujące [3]. Badania sugerowały zdolność wyizolowanych z mięśnia sercowego komórek c-Kit⁺ do różnicowania *in vitro* w kardiomiocyty, a także do komórek mięśni gładkich i komórek śródbłonkowych. Wszczepiane zwierzętom o upośledzonym układzie odpornościowym ludzkie komórki c-Kit⁺ miały się różnicować do komórek CM oraz EC i tworzyć swego rodzaju chimeryczne mysie serca zawierające ludzkie kardiomiocyty oraz ludzkie naczynia krwionośne. Rezultaty tych badań stały się podstawą projektu klinicznego (NCT00474461).

Niestety, inne badania wskazywały na znacznie mniejszą zdolność regeneracji mięśnia sercowego pod wpływem wszczepianych komórek c-Kit⁺ [54]. Jeszcze inne prace podawały nawet w wątpliwość zdolność komórek c-Kit⁺ do różnicowania [56]. Także pochodzenie komórek c-Kit⁺ stało się przedmiotem kontrowersji. Niektórzy uważają, że komórki c-Kit⁺ są pochodzenia szpikowego i pojawiają się w sercu dopiero w następstwie zawału [52]. Komórki c-Kit⁺ mają brać udział w tzw. przejściu angiogennym w uszkodzonym mięśniu sercowym [15].

Podobnie komórki progenitorowe tworzące kardiosfery wzbudziły kontrowersje [10,31]. Pojawiły się nawet do-

Tabela 1. Fenotypowe cechy rezydentnych komórek progenitorowych CPC

Komórki progenitorowe	Swoiste antygeny	Potencjał do różnicowania
c-Kit ⁺ (wg [6])	c-Kit ⁺ , Lin ⁻ , CD45 ⁻ , (także: Gata4 ⁺ , Gata5 ⁺ , Mef2fc ⁺ , Nkx2.5 ⁺)	CM, SMC, EC
SP/CPC (<i>Side Population Cells</i>) (wg [6])	ABCG2 ⁺ , Sca1 ⁺ , CD45 ⁻ , c-Kit ⁺ , CD34 ⁺ , CD31 ⁻ Gata4 ⁺ , Mef2fe ⁺ , Nkx2.5 ⁺	CM, SMC, EC
Sca1 ⁺ (wg [6])	Sca1 ⁺ , c-Kit ⁺ , CD34 ⁺ , CD45 ⁺ (niektóre: CD31 ⁺ , Gata4 ⁺ , Mef2fc ⁺ , Nkx2.5 ⁺ , TEF-1 ⁺)	CM, SMC, EC
CS/CDS (<i>Cardiosphere</i>) (wg [6])	Sca1 ⁺ , c-Kit ⁺ , CD34 ⁺ , CD31 ⁺	CM, EC
SSEA-1 (<i>Stage – Spheric Embryonic Antigen-1 Isl-1</i>) (wg [6])	SSEA-1 ⁺ (Nkx2.5 ⁺ , Gata4 ⁺ u noworodków, u dorosłych OCT3/4 ⁺)	CM, SMC, EC
Isl-1 ⁺ (wg [6])	Isl-1 ⁺ , Nkx2.5 ⁺ , Flk-1 ⁺	CM, SMC, EC
EPDC (<i>Epicardium – Derived Cells</i>) (wg [6])	WT-1 ⁺ , Tbx18 ⁺ , Raldh2 ⁺ , Gata5 ⁺ (niektóre: c-Kit ⁺ lub Flk-1 ⁺)	Fibroblasty, SMC, EC, CM
CStC (<i>Cardiac Stromal Cells</i>) (wg [48])	CD105 ⁺ , CD73 ⁺ , CD29 ⁺ , CD44 ⁺ , CD13 ⁺ , CD34 ⁻ , CD45 ⁻ , CD14 ⁻	Adipocyty, chondrocyty osteocyty, CM, EC

CM- kardiomiocyty; SMC- komórki mięśni gładkich; EC- komórki śródbłonkowe

niesienia sugerujące, że kardiosfery są tworzone przez fibroblasty, być może także przez kardiomiocyty [1]. Mimo tych kontrowersyjnych opinii komórki kardiosfer stały się przedmiotem badań klinicznych (NCT00893360).

Przedmiotem licznych prac były również, uważane za komórki progenitorowe/macierzyste, izolowane ze szpiku jednojądrzaste komórki BMMNC (bone marrow mononuclear cells [9]), a także będące subpopulacją komórek BMMNC, mezenchymalne komórki macierzyste MSC (mesenchymal stem cells) [13].

Wbrew wcześniejszym doniesieniom [41] okazało się jednak, że jednojądrzaste komórki izolowane ze szpiku (BMMNC) nie różnicują się do funkcjonalnych, zdolnych do spontanicznego kurczenia się, kardiomiocytów [38]. Zdaniem Balsama i wsp. [2] komórki BMMNC nie biorą udziału w regeneracji mięśnia sercowego. Pojawiły się także wątpliwości

co do różnicowania się komórek MCS do kardiomiocytów [40,47]. Mimo tych krytycznych uwag, zarówno komórki BMMNC jak i komórki MCS, stały się przedmiotem wielu badań klinicznych [9].

Obecnie uważa się, że tylko niektóre pluripotentne komórki macierzyste, takie jak ESC czy indukowane pluripotentne komórki macierzyste iPSC (induced pluripotent stem cells) mają zdolność różnicowania do funkcjonalnych, spontanicznie kurczących się, kardiomiocytów [26]. Teoretycznie komórki te po wszczepieniu do pozawałowego mięśnia sercowego powinny różnicować się do kardiomiocytów (trzecie rozwiązanie terapeutyczne).

Komórki ESC to komórki embrionalne, mające zdolność do różnicowania w rozmaite typy komórek, w tym także do komórek kardiomiocytów [37]. W procesie różnicowania *in vitro* do kardiomiocytów bierze udział wiele czynników (m.in.

aktywna i morfogenetyczne białka BMP). Końcowym „produktem” takiego procesu są w pełni funkcjonalne, kurczliwe kardiomiocyty [26]. Właśnie tak uzyskane komórki wprowadzano do uszkodzonego mięśnia sercowego (zob. rozwiązanie pierwsze). Jak na razie zaniechano prób wprowadzenia do mięśnia sercowego samych komórek ESC (choć w swoim czasie udane próby przedkliniczne z mysimi komórkami ESC zostały już przeprowadzone [33]). Na przeszkodzie stoją jednak względy etyczne i prawne (komórki ESC to komórki pochodzące z ludzkich płodów), względy biologiczne (komórki ESC mogą ujawnić teratogenne i tumorogenne właściwości), względy immunologiczne (komórki ESC indukują odpowiedź odpornościową). Z tych też powodów uważa się, że to raczej pluripotente komórki iPSC mogą nadawać się bardziej do celów terapeutycznych niż komórki ESC [39].

Komórki iPSC to zmodyfikowane genetycznie komórki fibroblastów, do których wprowadzono geny kodujące cztery czynniki transkrypcyjne: Oct4, Sox2, Klf4 i c-Myc [51]. Te cztery czynniki transkrypcyjne w swoisty sposób warunkują tzw. „macierzystość” komórek. Zmodyfikowane komórki zachowują się jak komórki macierzyste: mają zdolność do samoodnowy i różnicowania w różne typy komórek (w tym do kardiomiocytów). Względędy etyczne nie ograniczają stosowania komórek iPSC w terapii. Niemniej, podobnie jak komórki ESC, również komórki iPSC mogą indukować potworniaki oraz stymulować odpowiedź odpornościową [5,9].

Rozwiązanie czwarte polega na konwersji, przeprogramowaniu epigenetycznym komórek fibroblastów do aktywnych kardiomiocytów [20]. Czynniki stymulującymi taki proces okazały się na przykład czynniki transkrypcyjne: Gata4, Mef2c, Tbx5. Czynniki te biorą udział w powstawaniu mięśnia sercowego. Czynniki Gata4 ma być czynnikiem rozluźniającym strukturę chromatyny i umożliwiającym przyłączenie pozostałych czynników transkrypcyjnych [19]. Nowo powstające *in vitro* indukowane kardiomiocyty (iCM) mają cechy fenotypowe swoiste dla kardiomiocytów: wykazują np. charakterystyczne białka CM (m.in. α -aktyninę i troponinę T). Komórki iCM zawierają sarkomery, poprzeczne prążkowanie i mają zdolność spontanicznego kurczenia się [20]. Nie tylko te trzy („kanoniczne”) czynniki transkrypcyjne (Gata4, Mef2c, Tbx5) indukują konwersję fibroblastów do kardiomiocytów. Najnowsze badania wskazują, że wprowadzenie do tego zestawu dodatkowego czynnika Hand2 [49] lub peptydu tymozyny β 4 [45], a nawet proangiogenego czynnika VEGF [32] znacznie zwiększa wydajność przeprogramowania. Reakcję konwersji (przeprogramowania) fibroblastów do kardiomiocytów można także wywołać za pomocą innego zestawu czynników transkrypcyjnych: Mef2c, Myocd, Tbx5 [43]. Można również uzyskać z użyciem mikroRNA (zestawu zawierającego: mir-1, mir-133, mir-208, mir-499) [24]. W tym ostatnim przypadku wprowadzenie dodatkowego czynnika: inhibitora szlaku sygnałowego JAK znacznie zwiększyło wydajność reakcji przeprogramowania. Reakcja konwersji fibroblastów do funkcjonalnych kardiomiocytów jest reakcją, której powodzenie zależy od liczby komórek, do których wprowadzono docelowe geny, poziomu ekspresji wprowadzonych transgenów, a także stechiometrii powstających czynników transkrypcyjnych [7,11,50,55].

Reakcja przeprogramowania generuje funkcjonalne, integrujące z pozostałymi kardiomiocytami komórki iCM. Komórki te pod względem fenotypowym są podobne do „naturalnych” kardiomiocytów, nie są jednak identyczne [19]. Reakcja przeprogramowania przebiega dużo wydajniej *in vivo* niż *in vitro*. Przypuszczalnie istotny wpływ na tę reakcję wywiera mikrośrodowisko i czynniki wydzielane przez komórki znajdujące się w mięśniu sercowym [49]. Liczba komórek (fibroblastów), do których *in vivo* wprowadza się odpowiednie zestawy genów (wprowadzonych najczęściej za pomocą retrowirusów) waha się od 2-6% [49] aż do 35% [45] i nie odbiega od liczby komórek stransdukowanych *in vitro*. Takie liczby stransdukowanych komórek (fibroblastów) są wystarczające do wywołania wyraźnych efektów terapeutycznych: frakcja wyrzutowa lewej komory u badanych myszy wzrasta prawie dwukrotnie, natomiast blizna pozawałowa zmniejsza się prawie o połowę [49]. Podobne efekty terapeutyczne zaobserwowano w wielu doświadczeniach przeprowadzonych u myszy [21,32,45].

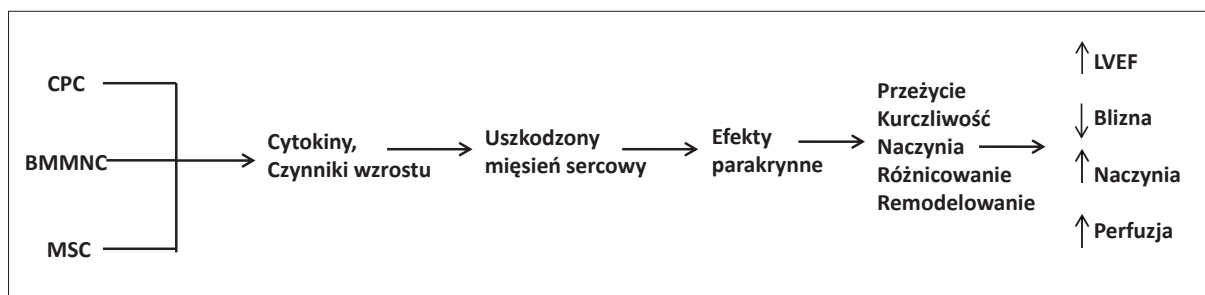
Przeprogramowanie fibroblastów można także uzyskać stosując zupełnie inny zestaw czynników transkrypcyjnych. Według Efego i wsp. wprowadzenie *in vitro* do fibroblastów czterech genów kodujących takie czynniki transkrypcyjne jak: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc („Kwartetu Yamanaki”) inicjuje proces przeprogramowania tych komórek [12]. Zahamowanie aktywności szlaku sygnałowego JAK-STAT (Janus kinase-signal and activation of transcription) hamuje pluripotente przeprogramowanie fibroblastów. Natomiast dodatek kardiogenego białka BMP4 jest niezbędny do powstania aktywnych, kurczliwych kardiomiocytów.

Reakcja przeprogramowania *in vivo* fibroblastów (stanowiących prawie 50-60% wszystkich komórek serca) do kardiomiocytów jest reakcją jeszcze nie w pełni zdefiniowaną i nie zawsze efektywną. Wymaga dokładnego zbadania. Niemniej jednak, zwiększa liczbę aktywnych kardiomiocytów w pozawałowym sercu i może mieć w przyszłości duże znaczenie terapeutyczne.

Ostatnie, piąte rozwiązanie terapeutyczne polega na stymulacji proliferacji jednojądrzastych spoczynkowych, diploidalnych kardiomiocytów wybranymi mitogenami. Okazuje się, że FGF-1 wraz z inhibitorem kinazy MAP [14], jak i czynnik wzrostowy zwany neuregulacją (NRG1) i jej receptor ErbB4 [5] stymulują proliferację kardiomiocytów. NRG1 indukują w ciągu 9 dni proliferację u około 1,7% wszystkich zróżnicowanych kardiomiocytów [5]. Dla porównania warto rozważyć, że u niższych kręgowców (np. traszek) liczba proliferujących kardiomiocytów wynosi 29%, u ryb nawet 95% [5]. I choć liczba (1,7%) proliferujących kardiomiocytów jest dużo niższa od liczby proliferujących CM u niższych organizmów, niemniej jest wystarczająca do tzw. remodelowania pozawałowego serca (zmniejszanie się hipertrofii) [5].

KRYTYCZNA OCENA PROPOZYCJI TERAPEUTYCZNYCH

Sposób pierwszy właściwie został zarzucony [26]. Drugi, choć najczęściej badany, okazał się trudny do interpretacji: wprowadzone do mięśnia sercowego komórki pro-



Ryc. 2. Komórki CPC, BMMNC, MSC indukują tzw. efekty parakryne. Efekty parakryne mogą stymulować wzrost frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF), zmniejszenie blizny pozawałowej, wzrost unaczynienia i poprawę perfuzji mięśnia sercowego

genitorowe lub uważane za macierzyste, nie różnicowały się do kardiomiocytów i ginęły w ciągu 2-3 tygodni. Jeśli nawet komórki progenitorowe różnicowały się do kardiomiocytów, to liczba nowo powstałych kardiomiocytów była niewystarczająca do poprawy funkcji uszkodzonego mięśnia sercowego [27]. Niemniej, krótko żyjące wszczepione komórki pozwalały uzyskać pewien efekt terapeutyczny (głównie wzrost frakcji wyrzutowej lewej komory) [9]. Efekty terapeutyczne utrzymywały się nawet wtedy, kiedy w pozawałowym sercu nie stwierdzano obecności wprowadzonych komórek. Trzeci sposób: zastosowanie w terapii komórek ESC i iPSC, z oczywistych względów zostało wstrzymane. Czwarty sposób: przeprogramowanie fibroblastów (głównego składnika blizny pozawałowej [17]) do aktywnych kardiomiocytów umożliwił uzyskanie dość znacznych efektów terapeutycznych. W przyszłości sposób ten może się stać podstawowym zabiegiem terapeutycznym. Niemniej, wymaga rozwiązania niektórych problemów związanych choćby ze stosowaniem retrovirusów jako nośników genów. Integrujące z genomem komórek docelowych retrovirusy mogą indukować tzw. niestabilność genetyczną i indukować powstanie nowotworów. Piąty, ostatni sposób wydaje się najprostszym, nieinwazyjnym i systemowym zastosowaniem czynników zwiększających liczbę aktywnych kardiomiocytów. Podstawową wadą pozostałych czterech sposobów jest ich inwazyjne zastosowanie.

EFEKTY PARAKRYNE STYMULOWANE PRZEZ WSZCZEPIANE KOMÓRKI

Efekty parakryne są spowodowane przez wszczepiane do pozawałowego mięśnia sercowego komórki „terapeutyczne”: wyizolowane z mięśnia sercowego rezydujące komórki CPC lub komórki progenitorowe pochodzące ze szpiku BMMNC lub MSC.

Wprowadzone do uszkodzonego mięśnia sercowego komórki, zarówno komórki „rezydentne” CPC, jak i komórki pochodzenia szpikowego, giną w dość krótkim czasie. W drugim tygodniu po transplantacji przeżywało zaledwie 2% wszczepionych komórek MSC [29], a w trzecim nie obserwowano ich obecności [22]. Przypuszcza się, że wprowadzone komórki giną z powodu stresu oksydacyjnego, stanu zapalnego, w wyniku działania cytotoksycznych cytokin uwalnianych w mięśniu sercowym, czy też braku odpowiedniej macierzy pozakomórkowej (ECM) w mięśniu

sercowym umożliwiającej odpowiednie „zasiedlenie” przeszczepianych komórek [46]. Jednak u tak „leczonych” zwierząt, u których stwierdzono znaczny ubytek wszczepionych komórek, obserwowano nieoczekiwane efekty terapeutyczne. Wyniki metaanaliz [36] wskazywały, że za efekty te (np. krótkoterminową poprawę wielkości frakcji wyrzutowej lewej komory, zmniejszenie blizny pozawałowej, wzrost liczby mikronaczyń) odpowiadają raczej endogenne komórki (m.in. kardiomiocyty, fibroblasty, komórki śródbłonkowe mikronaczyń, komórki CPC) stymulowane przez czynniki wzrostowe i cytokiny wydzielane przez wprowadzone komórki, niż przez ewentualne kardiomiocyty, które miały powstać w wyniku procesu różnicowania progenitorowych komórek (ryc. 2). Te nieoczekiwane efekty terapeutyczne określa się mianem efektów parakrynych lub parakrynym przekazywaniem sygnałów.

Zestawy wydzielanych przez komórki czynników wzrostowych i cytokin, tzw. sekretomy, wydają się charakterystyczne dla komórek „terapeutycznych”. Na przykład komórki BMMNC wydzielają głównie czynniki stymulujące angiogenezę (m.in. bFGF, VEGF, IL-1 β , HGF, SDF-1) [35]. Natomiast komórki MSC wydzielają czynniki o szerszym zakresie działania. Komórki te wydzielają czynniki, które biorą udział m.in. w protekcji istniejących komórek kardiomiocytów, np. czynnik HASF (hypoxic induced Akt regulated stem cell factor), w neowaskularyzacji (m.in. angiopoetyna 1 i 2, VEGF, bFGF, HGF) i w remodelowaniu macierzy pozakomórkowej (m.in. inhibitor metaloproteiny 1 (TIMP-1), TGF- β) [35]. Komórki CPC wydzielają głównie VEGF i HGF, czynniki indukujące angiogenezę [35].

Skład sekretomu, białek wydzielanych przez komórki transplantowane, może być w różny sposób modyfikowany [46]. Zmodyfikowane genetycznie komórki mogą wytwarzać ściśle określone zestawy białek. Na przykład komórki MSC, do których wprowadzono gen *Akt* wydzielają czynniki proangiogenne (m.in. VEGF, FGF-1, IGF-2, HGF) [18]. Komórki MSC, do których wprowadzono gen kodujący chemotaktyczne białko SDF-1, wydzielają HGF, ale jednocześnie hamują syntezę kolagenów I i III, a także metaloproteinaz MMP-2 i MMP-9 [53].

Oprócz genetycznych modyfikacji komórki, zwłaszcza komórki MSC, mogą być także „prekondycjonowane”: ich metabolizm może być modyfikowany przez hipoksję lub szok

cieplny. Sekretoryjne właściwości komórek MSC mogą być także modulowane przez różne czynniki farmakologiczne (np. estrogeny, atorwastatynę), a także przez działanie zwiększonego ciśnienia tlenu. Tak zmodyfikowane komórki, wprowadzane do mięśnia sercowego, mogą być nie tylko odporne na działanie czynników indukujących apoptozę. Wydzielając określone cytokiny i czynniki wzrostu komórki mogą również stymulować ściśle określone procesy: wzrost unaczynienia, czy nawet różnicowanie komórek prekursorowych do kardiomiocytów [35].

Komórki indukujące efekty parakryne powinny: (1) mieć zdolność przemieszczania się i rozpoznawania rejonów niedotlenionych występujących w bliżniej pozawałowej; (2) być odporne na działanie różnych czynników proapoptotycznych (przeszczepiane komórki powinny mieć stosunkowo długi czas retencji); (3) stymulować takie procesy jak angiogenezę czy ewentualnie różnicowanie komórek CPC; (4) wpływać na zmniejszenie blizny pozawałowej (zmniejszać zwłóknienie rejonów pozawałowych).

Komórki MSC nadają się najbardziej do takiej terapii „parakrynej” choćby dlatego, że są tolerowane przez układ odpornościowy (brak cząsteczek HLA klasy II). Komórki MSC są łatwe w hodowli i stabilne pod względem genetycznym. Mają zróżnicowany skład białek biorących udział w „reparacji” mięśnia sercowego.

Dokładniejsze badania wykazały, że kombinacje różnych „terapeutycznych” białek są wydzielane przez komórki w postaci tzw. egzosomów, pęcherzyków wydzielniczych o średnicy 40-100 nm otoczonych podwójną warstwą lipi-

dową [28]. W pęcherzykach tych stwierdzono występowanie nie tylko białek sekretoryjnych, ale także miRNA (mikroRNA) biorącego udział w regulacji transkrypcji różnych genów [8]. Do celów terapeutycznych proponuje się zarówno egzosomy jak i komórki terapeutyczne, głównie MSC [27].

ZAMIAST ZAKOŃCZENIA

Ten krótki przegląd metod terapeutycznych, których celem jest wzrost aktywności kardiomiocytów w pozawałowym sercu, pozwala wysunąć dwa zaskakujące wnioski:

- Transplantacja komórek progenitorowych/macierzystych nie prowadzi do wzrostu liczby komórek CM, pozwala jednak uzyskać efekty terapeutyczne (tzw. efekty parakryne), które wyraźnie poprawiają pracę uszkodzonego zawałem serca.
- Najbardziej realnym, niezwykle korzystnym rozwiązaniem terapeutycznym pozwalającym znacznie zwiększyć liczbę CM jest tzw. zabieg przeprogramowania *in situ* fibroblastów do aktywnych kardiomiocytów.

Niewykluczone, że nowym rozwiązaniem terapeutycznym może się okazać powiązanie czynników stymulujących efekty parakryne z przeprogramowaniem *in situ* fibroblastów do kardiomiocytów.

Już z tego krótkiego przeglądu metod terapeutycznych widać, że kardiomioplastyka jest w fazie swoistej ewolucji. I jak to bywa z procesami ewolucyjnymi: nigdy nie wiadomo w jakim kierunku się rozwijają.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Andersen D.C., Andersen P., Schneider M., Jensen H.B., Sheikh S.P.: Murine „cardiospheres” are not a source of stem cells with cardiomyogenic potential. *Stem Cells*, 2009; 27: 1571-1581
- [2] Balsam L.B., Wagers A.J., Christensen J.L., Kofidis T., Weissman I.L., Robbins R.C.: Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*, 2004; 428: 668-673
- [3] Bearzi C., Rota M., Hosoda T., Tillmanns J., Nascimbene A., De Angelis A., Yasuzawa-Amano S., Trofimova I., Siggins R.W., Lecapitaine N., Cascapera S., Beltrami A.P., D'Alessandro D.A., Zias E., Quaini F. i wsp.: Human cardiac stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 14068-14073
- [4] Bernstein H.S., Srivastava D.: Stem cell therapy for cardiac disease. *Pediatr. Res.*, 2012; 71: 491-499
- [5] Bersell K., Arab S., Haring B., Kühn B.: Neuregulin1/ErbB4 signaling induces cardiomyocyte proliferation and repair of heart injury. *Cell*, 2009; 138: 257-270
- [6] Bollini S., Smart N., Riley P.R.: Resident cardiac progenitor cells: at the heart of regeneration. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2011; 50: 296-303
- [7] Chen J.X., Krane M., Deutsch M.A., Wang L., Rav-Acha M., Gregoire S., Engels M.C., Rajarajan K., Karra R., Abel E.D., Wu J.C., Milan D., Wu S.M.: Inefficient reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes using Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ. Res.*, 2012; 111: 50-55
- [8] Chen T.S., Lai R.C., Lee M.M., Choo A.B., Lee C.N., Lim S.K.: Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res.*, 2010; 38: 215-224
- [9] Chong J.J.: Cell therapy for left ventricular dysfunction: an overview for cardiac clinicians. *Heart Lung Circ.*, 2012; 21: 532-542
- [10] Davis D.R., Zhang Y., Smith R.R., Cheng K., Terrovitis J., Malliaras K., Li T.S., White A., Makkar R., Marbán E.: Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PLoS One*, 2009; 4: e7195
- [11] de Carvalho A.C., Carvalho A.B.: Turning scar into muscle. *World J. Cardiol.*, 2012; 4: 267-270
- [12] Efe J.A., Hilcove S., Kim J., Zhou H., Ouyang K., Wang G., Chen J., Ding S.: Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nat. Cell Biol.*, 2011; 13: 215-222
- [13] Elnakish M.T., Hassan F., Dakhallah D., Marsh C.B., Alhaider I.A., Khan M.: Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration: translation to bedside reality. *Stem Cells Int.*, 2012; 2012: 646038
- [14] Engel F.B., Hsieh P.C., Lee R.T., Keating M.T.: FGF1/p38 MAP kinase inhibitor therapy induces cardiomyocyte mitosis, reduces scarring, and rescues function after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 15546-15551
- [15] Fazel S., Cimini M., Chen L., Li S., Angoulvant D., Fedak P., Verma S., Weisel R.D., Keating A., Li R.K.: Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J. Clin. Invest.*, 2006; 116: 1865-1877

- [16] Frasik W., Stachura J.: Choroby serca. W: Patologia: znaczy słowo o chorobie, red.: J. Stachura, W. Domagała. Polska Akademia Umiejętności, Kraków 2005, 481-521
- [17] Freund C., Mummery C.L.: Prospects for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in cardiac cell therapy and as disease models. *J. Cell Biochem.*, 2009; 107: 592-599
- [18] Gnecci M., He H., Noiseux N., Liang O.D., Zhang L., Morello F., Mu H., Melo L.G., Pratt R.E., Ingwall J.S., Dzau V.J.: Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.*, 2006; 20: 661-669
- [19] Ieda M., Fu J.D., Delgado-Olguin P., Vedantham V., Hayashi Y., Bruneau B.G., Srivastava D.: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*, 2010; 142: 375-386
- [20] Inagawa K., Ieda M.: Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiac myocytes. *J. Cardiovasc. Transl. Res.*, 2013; 6: 37-45
- [21] Inagawa K., Miyamoto K., Yamakawa H., Muraoka N., Sadahiro T., Umei T., Wada R., Katsumata Y., Kaneda R., Nakade K., Kurihara C., Obata Y., Miyake K., Fukuda K., Ieda M.: Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ. Res.*, 2012; 111: 1147-1156
- [22] Iso Y., Spees J.L., Serrano C., Bakondi B., Pochampally R., Song Y.H., Sobel B.E., Delafontaine P., Prockop D.J.: Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007; 354: 700-706
- [23] Jadczyk T., Wojakowski W.: Komórki macierzyste serca. *Kardiologia Pol.*, 2010; 68: 1163-1167
- [24] Jayawardena T.M., Egemnazarov B., Finch E.A., Zhang L., Payne J.A., Pandya K., Zhang Z., Rosenberg P., Mirosou M., Dzau V.J.: MicroRNA-mediated *in vitro* and *in vivo* direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ. Res.*, 2012; 110: 1465-1473
- [25] Kikuchi K., Poss K.D.: Cardiac regenerative capacity and mechanisms. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2012; 28: 719-741
- [26] Laflamme M.A., Murry C.E.: Heart regeneration. *Nature*, 2011; 473: 326-335
- [27] Lai R.C., Chen T.S., Lim S.K.: Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen. Med.*, 2011; 6: 481-492
- [28] Lai R.C., Yeo R.W., Tan K.H., Lim S.K.: Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnol. Adv.*, 2013; 31: 543-551
- [29] Leiker M., Suzuki G., Iyer V.S., Cauty J.M. Jr, Lee T.: Assessment of a nuclear affinity labeling method for tracking implanted mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.*, 2008; 17: 911-922
- [30] Léobon B., Garcin I., Menasché P., Vilquin J.T., Audinat E., Charpak S.: Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003; 100: 7808-7811
- [31] Li T.S., Cheng K., Lee S.T., Matsushita S., Davis D., Malliaras K., Zhang Y., Matsushita N., Smith R.R., Marbán E.: Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-matrix interactions, rationalizing their enhanced functional potency for myocardial repair. *Stem Cells*, 2010; 28: 2088-2098
- [32] Mathison M., Gersch R., Nasser A., Lilo S., Korman M., Fourman M., Hackett N., Shroyer K., Yang J., Ma Y., Crystal R.G., Rosengart T.K.: *In vivo* cardiac cellular reprogramming efficacy is enhanced by angiogenic preconditioning of the infarcted myocardium with vascular endothelial growth factor. *J. Am. Heart Assoc.*, 2012; 1: e005652
- [33] Ménard C., Hagège A.A., Agbulut O., Barro M., Morichetti M.C., Brasselet C., Bel A., Messas E., Bissery A., Bruneval P., Desnos M., Pucéat M., Menasché P.: Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a pre-clinical study. *Lancet*, 2005; 366: 1005-1012
- [34] Menasché P.: Cardiac cell therapy: lessons from clinical trials. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2011; 50: 258-265
- [35] Mirosou M., Jayawardena T.M., Schmeckpeper J., Gnecci M., Dzau V.J.: Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2011; 50: 280-289
- [36] Mummery C.L., Davis R.P., Krieger J.E.: Challenges in using stem cells for cardiac repair. *Sci. Transl. Med.*, 2010; 2: 27ps17
- [37] Murry C.E., Keller G.: Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, 2008; 132: 661-680
- [38] Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D., Williams D.A., Field L.J.: Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 2004; 428: 664-668
- [39] Nelson T.J., Martinez-Fernandez A., Terzic A.: Induced pluripotent stem cells: developmental biology to regenerative medicine. *Nat. Rev. Cardiol.*, 2010; 7: 700-710
- [40] Noiseux N., Gnecci M., Lopez-Illasaca M., Zhang L., Solomon S.D., Deb A., Dzau V.J., Pratt R.E.: Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol. Ther.*, 2006; 14: 840-850
- [41] Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 2001; 410: 701-705
- [42] Porrello E.R., Mahmoud A.I., Simpson E., Hill J.A., Richardson J.A., Olson E.N., Sadek H.A.: Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*, 2011; 331: 1078-1080
- [43] Protze S., Khattak S., Poulet C., Lindemann D., Tanaka E.M., Ravens U.: A new approach to transcription factor screening for reprogramming of fibroblasts to cardiomyocyte-like cells. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2012; 53: 323-332
- [44] Przybycień K., Kornacewicz Jach Z., Machaliński B.: Komórki macierzyste w klinicznych badaniach kardiologicznych. *Kardiologia Pol.*, 2011; 69: 601-609
- [45] Qian L., Huang Y., Spencer C.I., Foley A., Vedantham V., Liu L., Conway S.J., Fu J.D., Srivastava D.: *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 2012; 485: 593-598
- [46] Ranganath S.H., Levy O., Inamdar M.S., Karp J.M.: Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*, 2012; 10: 244-258
- [47] Rose R.A., Jiang H., Wang X., Helke S., Tsoporis J.N., Gong N., Keating S.C., Parker T.G., Backx P.H., Keating A.: Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes *in vitro*. *Stem Cells*, 2008; 26: 2884-2892
- [48] Rossini A., Frati C., Lagrasta C., Graiani G., Scopece A., Cavalli S., Musso E., Baccarin M., Di Segni M., Fagnoni F., Germani A., Quaini E., Mayr M., Xu Q., Barbuti A. i wsp.: Human cardiac and bone marrow stromal cells exhibit distinctive properties related to their origin. *Cardiovasc. Res.*, 2011; 89: 650-660
- [49] Song K., Nam Y.J., Luo X., Qi X., Tan W., Huang G.N., Acharya A., Smith C.L., Tallquist M.D., Neilson E.G., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N.: Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 2012; 485: 599-604

- [50] Srivastava D., Ieda M.: Critical factors for cardiac reprogramming. *Circ. Res.*, 2012; 111: 5-8
- [51] Takahashi K., Yamanaka S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126: 663-676
- [52] Tallini Y.N., Greene K.S., Craven M., Spealman A., Breitbach M., Smith J., Fisher P.J., Steffey M., Hesse M., Doran R.M., Woods A., Singh B., Yen A., Fleischmann B.K., Kotlikoff M.I.: c-kit expression identifies cardiovascular precursors in the neonatal heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 1808-1813
- [53] Tang J., Wang J., Guo L., Kong X., Yang J., Zheng F., Zhang L., Huang Y.: Mesenchymal stem cells modified with stromal cell-derived factor 1 α improve cardiac remodeling via paracrine activation of hepatocyte growth factor in a rat model of myocardial infarction. *Mol. Cells*, 2010; 29: 9-19
- [54] Tang X.L., Rokosh G., Sanganalmath S.K., Yuan F., Sato H., Mu J., Dai S., Li C., Chen N., Peng Y., Dawn B., Hunt G., Leri A., Kajstura J., Tiwari S., Shirk G., Anversa P., Bolli R.: Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction. *Circulation*, 2010; 121: 293-305
- [55] Yoshida Y., Yamanaka S.: Labor pains of new technology: direct cardiac reprogramming. *Circ. Res.*, 2012; 111: 3-4
- [56] Zaruba M.M., Soonpaa M., Reuter S., Field L.J.: Cardiomyogenic potential of C-kit⁺-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation*, 2010; 121: 1992-2000

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.