

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
MEDICINSKI FAKULTET  
DOKTORSKE AKADEMSKE STUDIJE

Smer: Kardiologija

Predmet: Metodologija istraživanja u biomedicinskim naukama

Kurs: Metode istraživanja in vivo i in vitro

Mentor: prof. dr Miodrag Stojković

PRIMENA STEM ĆELIJA U TERAPIJI AKUTNOG INFARKTA MIOKARDA

Sladjana Raković

Dr Sladjana Raković

E-mail: [sladjarakovic@yahoo.com](mailto:sladjarakovic@yahoo.com)

Kragujevac, 2007. godine

## PRIMENA STEM ĆELIJA U TERAPIJI AKUTNOG INFARKTA MIOKARDA

Akutni infarkt miokarda (AIM) je oblik koronarne bolesti srca koji nastaje zbog potpune okluzije koronarne arterije. Najčešći uzrok naglog prekida koronarne cirkulacije je aterosklerotična lezija, praćena rupturom endotela i trombozom. Pošto je subendokardni miokard tkivo sa visokim metaboličkim potrebama, pa je stoga i najosetljivije na ishemiju, ireverzibilno oštećenje kardiomiocita nastupa već nakon 15-20 minuta od koronarne okluzije. Ishemija koja nastaje, progredira do nekroze miokarda, a ceo proces prolazi kroz fazu najpre funkcionalnih, potom anatomskih promena i završava se gubitkom srčanog tkiva. Fibroziranje i stvaranje ožiljka, dovodi do remodelovanja neishemičnog tkiva (uglavnom komora), koje počinje u prvim satima i nastavlja se danima i mesecima nakon inicijalnog događaja. Ovaj proces dovodi do dilatacije komora i progresivnog slabljenja funkcije srca.

Akutni infarkt miokarda predstavlja urgentno stanje koje zahteva neodložnu terapiju, koja u zavisnosti od veličine infarkta, stanja pacijenta i faze u kojoj je započeta može biti:

- rutinska terapija - podrazumeva primenu kiseonika, gliceril-trinitrata, analgeziju i sediranje pacijenata
- interventna terapija - sa ciljem da se rastvaranjem tromba zaustavi proces nekroze i smanji veličina infarkta. U tom smislu se koristi antikoagulantna terapija (heparin, niskomolekulski heparini), antiagregaciona terapija (acetil-salicilna kiselina) i trombolitička terapija (primena streptokinaze, urokinaze, alteplaze- indicovana u prvih 6 časova od inicijalnog događaja). Procedure kojima se obezbeđuje mehanička revaskularizacija miokarda su perkutana transluminalna koronarna angioplastika (PTKA) i urgentni by-pass, hirurška intervencija koja se koristi uglavnom kod mehaničkih komplikacija AIM.

Međutim, svi navedeni terapijski protokoli sa svojim prednostima i nedostacima, imaju za cilj da spreče dalju nekrozu i smanje veličinu infarkta, ali nastalo oštećenje je ireverzibilno i ožiljak koji se formira je trajan.

Znajući da je akutni infarkt miokarda vodeći uzrok smrti kod oba pola i da dovodi do ireverzibilnog oštećenja i smanjenja funkcije srca, bilo je potrebno tragati za novim metodama lečenja.

Najznačajnija otkrića, kao i budućnost terapijskih mogućnosti, jesu u oblasti regenerativne medicine, odnosno primena stem ćelija u lečenju ovog oboljenja.

Osnovna specifičnost ovih ćelija je njihova sposobnost da se dele, pod određenim uslovima se diferenciraju u određene ćelijske linije i preuzimaju specifične ćelijske funkcije, kao i veliki regenerativni potencijal, odnosno sposobnost samoobnavljanja za dugi vremenski period.

*Izvori stem ćelija* mogu biti *adultni organi* kao što su koštana srž, skeletni mišići, jetra, krvni sudovi, mozak ili se mogu koristiti *embrionalne stem ćelije* (1).

Adultne stem ćelije se izdvajaju od drugih ćelija u adultnim tkivima, kultiviraju, pod dejstvom selektivnih i specifičnih faktora rasta diferenciraju i preuzimaju specifične funkcije određenog tkiva.

Embrionalne matične ćelije (hESC) su *pluripotentne*, mogu se diferencirati u sve tipove ćelija, odnosno u ćelije koje se nalaze u tkivima porekla sva tri klicina lista.

Adultne matične ćelije su *multipotentne*, odnosno mogu dati neke ćelijske linije, ali ne sve. To bi bila i osnovna razlika između ovih ćelija. Pored toga, i jedne i druge imaju svoje prednosti i nedostatke, što ih čini manje ili više pogodnim za terapijsku primenu.

Sposobnost hESC da se *diferenciraju u sve tipove ćelija* predstavlja njihovu osnovnu prednost. One *lako rastu u kulturi*, pa se mogu dobiti u velikom broju, što je od velikog značaja za terapiju.

Transplantacija hESC od donora recipijentu, može pokrenuti imunološke procese i uzrokovati *reakciju odbacivanja*, što predstavlja osnovni problem kod primene ovih ćelija.

Sa druge strane ova karakteristika je osnovna prednost primene adultnih stem ćelija. Prilikom transplantacije, one nisu izvor imunoloških reakcija, jer je pacijent sam izvor ovih ćelija. One se izoluju iz koštane srži, izdvajaju iz mešavine raznih ćelija i ubrizgavaju u srčano tkivo. Upravo ova karakteristika otvara neke nove mogućnosti u terapiji u budućnosti, kao što je izolovanje ovih ćelija kod pacijenata kod kojih je procenjeno da postoji povećani rizik da obole od AIM, zamrzavanje i čuvanje do trenutka kada će biti potrebno da se upotrebe (1,2).

Nedostatak adultnih stem ćelija je njihova *ograničena diferencijacija* u različite ćelijske tipove, *retke* su u adultnim tkivima i *teže rastu u uslovima in vitro*, pa se ne mogu dobiti u tako velikom broju kao embrionalne.

Prva istraživanja u ovoj oblasti su vršena na animalnim modelima, na kojima je bolest eksperimentalno indukovana.

Jedan od primera je ispitivanje stem ćelija u terapiji AIM na modelu miša (3). Ispitivana je sposobnost ovih ćelija da se diferenciraju u kardiomiocite, endotelne ćelije i glatke mišićne ćelije krvnih sudova.

U tu svrhu su korišćene ćelije koštane srži (BMSCs- Bone Marrow Stem Cells), koje mogu da se diferenciraju u tkiva porekla sva tri klicina lista (endoderm, ektoderm, mesoderm).

Ishemija je indukovana postavljanjem ligature u predelu descedentne grane leve koronarne arterije (LCA). 5 časova nakon postavljanja ligature u područje ishemije ubrizgane su BMSCs, obeležene zelenim fluorescentnim proteinom eGFP (green fluorescent protein), kako bi bilo omogućeno praćenje distribucije ovih ćelija u miokardnom tkivu (Slika 1) (4).

Evaluacija procesa regeneracije je vršena 9 dana nakon intervencije. Praćeni su sledeći parametri:

- prisustvo obeleženih ćelija, odnosno eGFP pozitivnost u kardiomiocitima, glatkim mišićnim ćelijama i endotelnim ćelijama, da bi se utvrdilo postojanje *migracije* stem ćelija.
- ekspresija kardijalno-specifičnog transkripcionog faktora, miozina i drugih proteina koji su inače specifični za kardiomiocite, praćena je radi pokazivanja postojanja *diferencijacije*
- ćelije koje su posedovale spontanu kontraktilnu aktivnost su pozitivno identifikovane koristeće markere sa antitelima na miozin teški lanac, alfa-aktinin, desmin i troponin (svi proteini su nadjeni u srčanom tkivu)
- električna aktivnost, promena nivoa kalcijuma u ćeliji i kontraktilni odgovor na kateholaminsku stimulaciju
- vrednosti end-dijastolnog pritiska leve komore su merene u cilju ispitivanja poboljšanja funkcije nakon primene ovih ćelija .

Za sve ove parametre vršeno je poredjenje sa kontrolnom grupom.

Značajna otkrića na animalnim modelima su ostvarena i u ispitivanju *faktora mikrookoline* koji su uključeni u migraciju stem ćelija, na osnovu čega su predložene dve mogućnosti. Jedan od stavova zasnovan je na tome da prisustvo nekroze u miokardnom tkivu izaziva otpuštanje određenih signala u cirkulaciju, koji mobilišu stem ćelije iz pula koštane srži. Nakon mobilizacije, receptori ćelija oštećenog tkiva, mogli bi da izazovu *adheziju* stem ćelija i da pokrenu *kaskadu diferencijacije*. Kao alternativna mogućnost, navodi se da su stem ćelije kontinuirano prisutne u cirkulaciji, a samo u periodu ishemije infiltruju srčano tkivo.

Faktori koji imaju značajnu ulogu u mobilizaciji stem ćelija iz koštane srži u područje infarkta su: Stem Cell Factor (SCF), c-kit (tirozin kinaza receptor), i matrix- metaloproteinaza 9 (3).

Pored embrionalnih matičnih ćelija u literaturi se navodi postojanje dve grupe adultnih stem ćelija koje su kandidati za korišćenje u terapiji AIM. To su: skeletni mioblasti i ćelije koštane srži.

*Skeletni mioblasti* su predstavljali prvi izbor, pre svega zbog velike mitotske aktivnosti, koja omogućava da lako rastu u kulturi i da se dobiju u velikom broju. To su ćelije koje dobro podnose ishemiju, što je od velikog značaja u terapiji, jer se plasiraju u područje gde ishemija postoji. Upotreba autolognih mioblasta bi bila skoro idealna, jer se do njih lako dolazi (biopsijom pacijenta) i mogu biti vraćene pacijentu nakon in vitro ekspanzije (5). Međutim, problem koji se javljao kod primene mioblasta, jeste nepostojanje veze između ćelija tipa *gap junctions*, koje postoje između ćelija srca i omogućavaju lako širenje akcionih potencijala, odnosno funkcionisanje srca kao sincicijuma. Ovakve strukturne razlike, kao i razlika u mehanizmu generisanja akcionog potencijala, refraktornom periodu i aritmogeni potencijal skeletnih mioblasta, rezultovali su na animalnim modelima elektromehaničkom disocijacijom i pojavom fatalnih ventrikularnih aritmija (Slika 2) (6,7).

Progenitorne ćelije koštane srži uključuju hematopoezne (HSCs) i mezenhimne stem ćelije (MSCs) (Slika 3). Diferencijacija mezenhimnih stem ćelija može ići u pravcu hondrocita, osteocita ili adipocita, ali u okviru brojnih ispitivanja pokazano je da se mogu diferencirati u sve tri vrste ćelija u srčanom tkivu, u glatke mišićne ćelije, endotelne ćelije i kardiomiocite(8).

Postoje četiri puta aplikacije stem ćelija u terapiji akutnog infarkta miokarda:

- intramiokardni
- transendokardijalni
- intrakoronarni
- intravenski.

*Intramiokardnom injekcijom*, stem ćelije se ubrizgavaju direktno u miokard, u predeo granične zone infarkta, odakle migriraju u centralnu zonu. Ovakav način aplikacije predstavlja invazivnu proceduru, tokom koje se pacijenti podvrgavaju hirurškoj intervenciji. Prednost ove metode je što se izvodi pod direktnom vizualizacijom i omogućava inspekciju target zone.

Medjutim, stem ćelije aplikovane na ovaj naćin mogu stvoriti ostrvca ćelija u predelu zone infarkta, koja postaju substrat elektrićne nestabilnosti i ventrikularne tahiaritmije (6,9).

Za *transendokardni metod* aplikacije potrebno je elektromehanićko mapiranje, kojim se putem inkorporiranog tkivnog katetera, precizno odredjuje target zona i zona oko infarkta u koju se plasiraju stem ćelije (9).

Perkutani transluminalni koronarni kateter se koristi za *intrakoronarnu administraciju* stem ćelija. Prednost ove tehnike ogleđa se u postizanju maksimalne koncentracije stem ćelija u podrućju infarkta, već pri prvoj pasaži. Medjutim, prisustvo stem ćelija u koronarnoj cirkulaciji, mođe stvoriti okluziju malih krvnih sudova, dajući mikroinfarkte, što je glavni nedostatak (10).

Tehnika *intravenskim putem* je najjednostavnija i najmanje invazivna , koja bi mogla da predstavlja i idealan naćin administracije stem ćelija. Problem koji se javlja je zadrđavanje stem ćelija u drugim organima pri cirkulisanju u organizmu (jetri, slezini, plućima i limfoidnom tkivu), tako da samo mali broj dolazi do ciljanog tkiva (9).

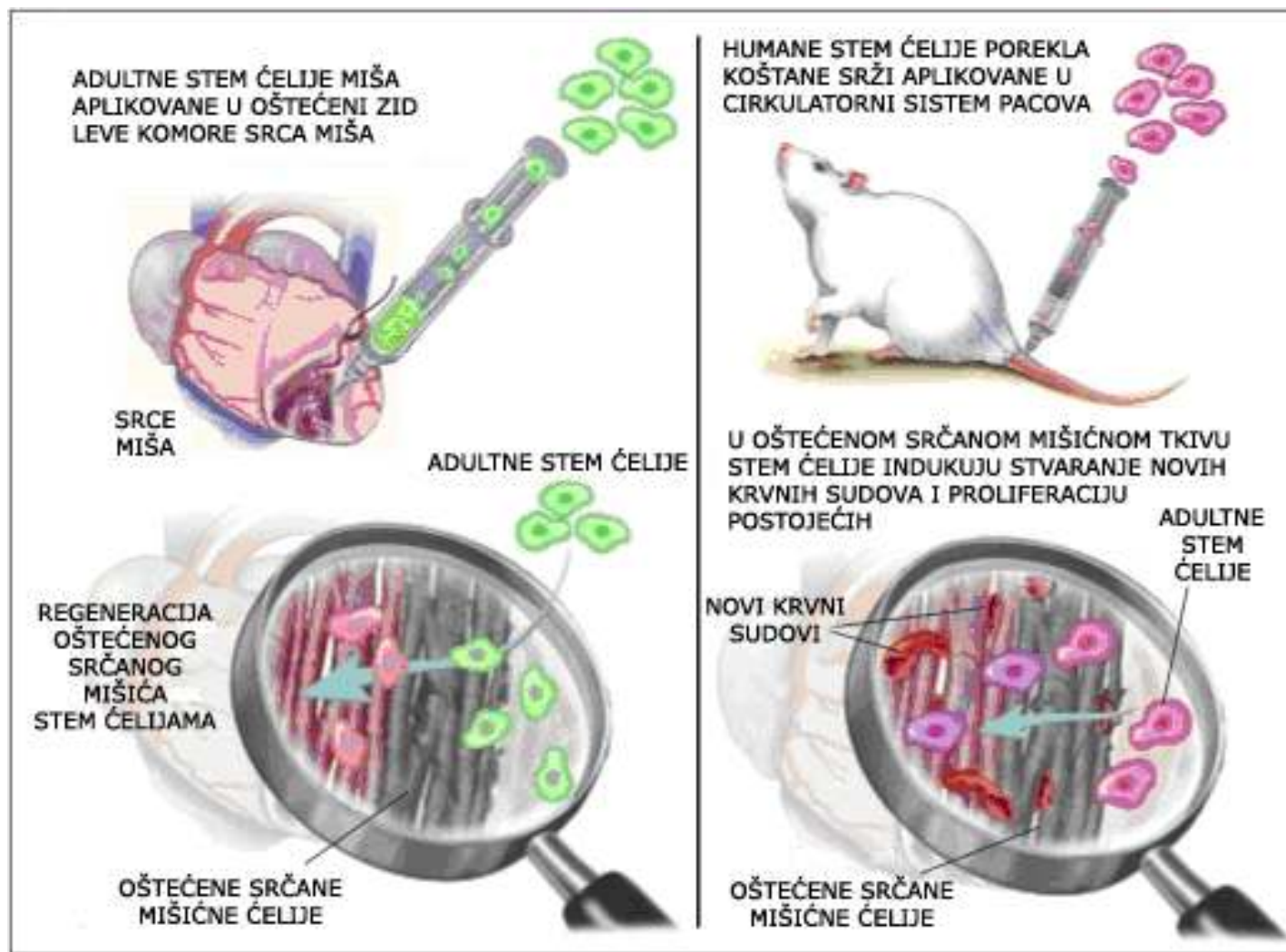
Primena stem ćelija oznaćava budućnost terapije akutnog infarkta miokarda, jer će omogućiti regeneraciju oštećenog miokardnog tkiva, za razliku od dosadašnjih terapijskih protokola, koji se uglavnom baziraju na lećenju simptoma i uzroka samog incidenta.

## Literatura

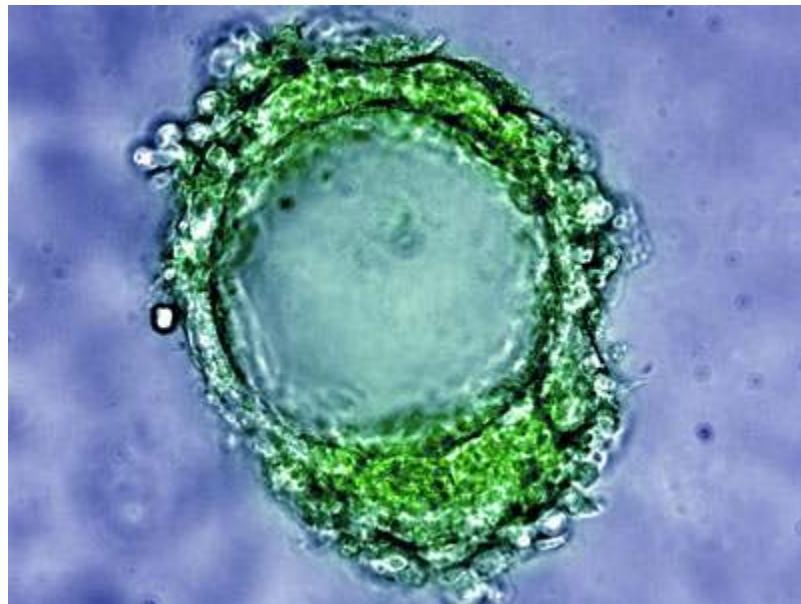
1. Lee MS, Makkar RR. Stem-Cell Transplantation in Myocardial Infarction: A Status Report. *Annals of Internal Medicine* 2004; 140: 729-737.
2. Saha M, Zbinden R, Redwood SR, Marber MS. Stem cells to repair the broken heart: much ado about nothing. *Heart* 2006; 92: 1717-1719.
3. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circulation Research* 2002; 91: 1092-1102.
4. Winslow T, Kibiuk L. Heart Muscle repair with Adult Stem Cells. 2001.
5. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279–280.
6. Herreros J, Prósper F, Perez A et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *European Heart Journal* 2003; 24(22): 2012-202.
7. Zhang YM, Hartzell C, Narlow M, et al. Stem cell-derived cardiomyocytes demonstrate arrhythmic potential. *Circulation* 2002; 106: 1294–1299.
8. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circulation Research* 2004; 95: 9-20.
9. Perin EC, Geng YJ, Willerson JT. Adult Stem Cell Therapy in Perspective. *Circulation* 2003; 107: 935-938.
10. Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of Infarcted Myocardium by Autologous Intracoronary Mononuclear Bone Marrow Cell Transplantation in Humans. *Circulation* 2002;106: 1913-1918.

PRILOG

Slika 1.



Slika2. Skeletni mioblast ( mikroskopski prikaz )



Slika 3.

## STEM ĆELIJE KOŠTANE SRŽI

