

Rozwój serca i jego implikacje dla chorób serca

Jonathan A. Epstein, MD

Department of Cell and Developmental Biology
and the Cardiovascular Institute, University of
Pennsylvania School of Medicine, Filadelfia, Pensylwania,
Stany Zjednoczone

Adres do korespondencji

Dr Jonathan A. Epstein
Department of Cell and Developmental Biology
University of Pennsylvania School of Medicine, 421 Curie Blvd.
1154 BRB II, Philadelphia, PA 19104, USA
e-mail: epsteinj@mail.med.upenn.edu

N Engl J Med 2010; 363: 1638-1647

Kardiologia po Dyplomie 2011; 10 (1): 14-27

Wykład imienia Franklina H. Epsteina

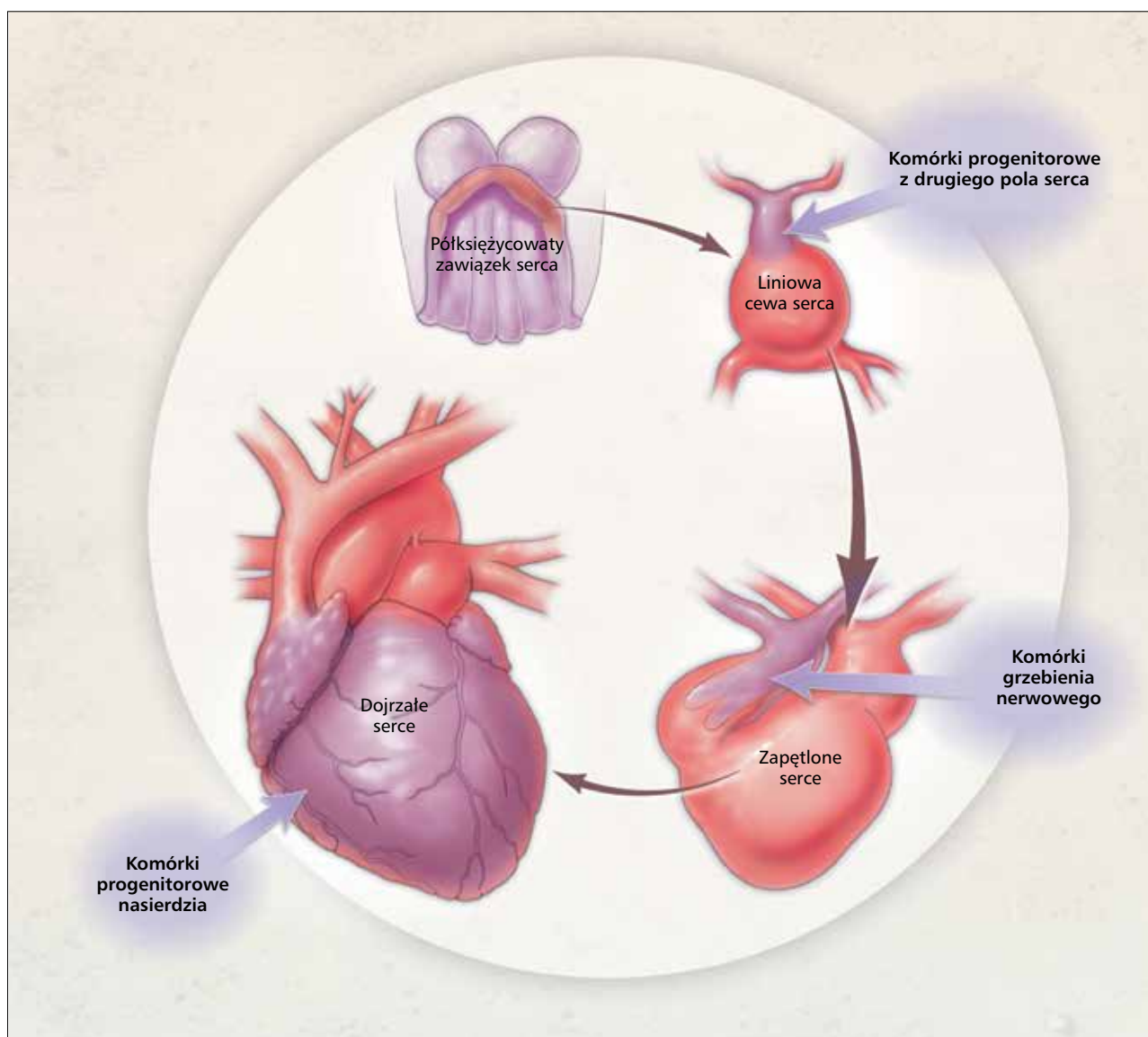
Franklin H. Epstein, MD, był współpracownikiem czasopisma New England Journal of Medicine przez ponad 20 lat. Ten zapalony klinicysta, spełniony badacz i wybitny naukowiec był profesorem i kierownikiem Katedry Chorób Wewnętrznych w Beth Israel Deaconess Medical Center w Bostonie (Massachusetts, Stany Zjednoczone), gdzie dla jego upamiętnienia zorganizowano cykliczne wykłady na temat mechanizmów chorób imienia Franklina H. Epsteina.

W ciągu ostatniej dekady dzięki różnym odkryciom poznaliśmy lepiej rozwój zarodka serca. Te nowe wyniki wymagają zmian standardowego sposobu nauczania, w jaki sposób powstaje czterojamowe serce, a także mają implikacje dla leczenia wrodzonych i nabytych chorób serca. W nadchodzących latach dalszy postęp wiedzy na temat rozwoju serca wywrze najprawdopodobniej jeszcze większy wpływ na klasyfikację i leczenie wrodzonych wad serca, dostarczy klinicytom informacji na temat optymalnego wykorzystania leczenia regeneracyjnego (np. terapii komórkami macierzystymi), a także zmodyfikuje nasze rozumienie niektórych chorób układu krążenia u dorosłych. W tym przeglądzie przedstawiono przykłady najnowszych danych w dziedzinie rozwoju serca, ze szczególnym uwzględnieniem tych wyników, które będą najprawdopodobniej miały największy wpływ na praktykę kliniczną.

Przegląd

Klasycznie naucza się, że rozwój układu krążenia rozpoczyna się od wczesnego wyodrębnienia obustronnych skupisk komórek progenitorowych, które zlewają się, tworząc półksiężycowaty zawiązek serca, a następnie liniową cewę serca w linii pośrodkowej ciała. Cewa ta, składająca się z wewnętrznej warstwy komórek śródbłonna otoczonej komórkami prekursorowymi mięśnia sercowego [1], podlega następnie serii zapętleń i zagięć, a następnie balonowatemu powiększaniu się obszarów, z których mają powstać jamy serca. Później dochodzi do powstawania przegród w sercu, co powoduje ukształtowanie się czterojamowego narządu z odrębnym, równoległym krążeniem systemowym i płucnym.

Dodatkowe rodzaje komórek znajdujących się poza cewą serca odgrywają ważną rolę w rozwoju serca i wpływają na jego morfogenezę (ryc. 1). Na przykład komórki



RYCINA 1 Przegląd rozwoju serca.

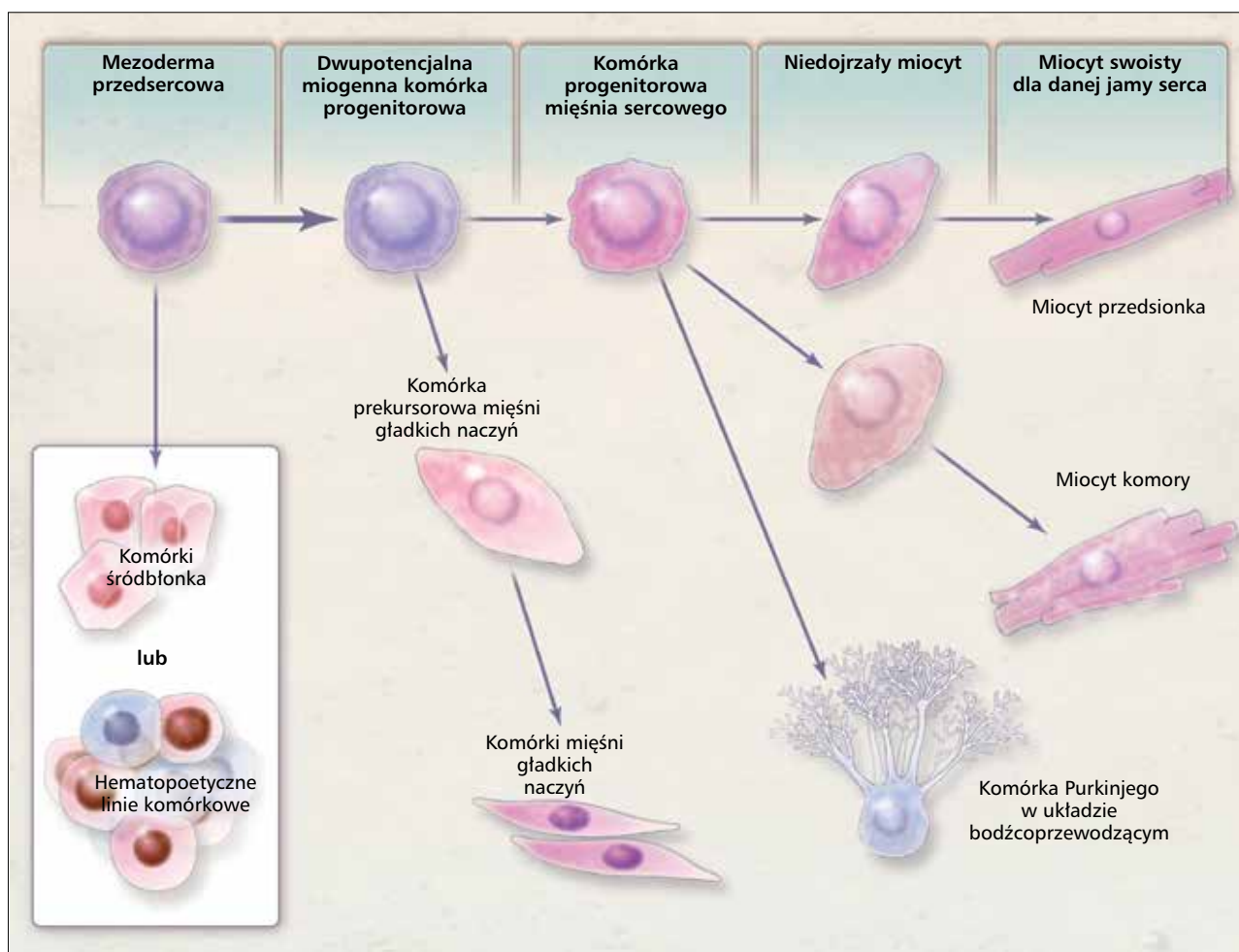
Tradycyjny opis rozwoju serca obejmuje progresję od półksiężycowatego zawiązka serca do liniowej cewy serca, która w fazie przekształcania się w dojrzałe serce zapętlą się i dzieli przegrodami na poszczególne jamy. W morfogenezie serca uczestniczą liczne typy komórek pochodzących spoza początkowego półksiężycowatego zawiązka serca, w tym komórki grzebienia nerwowego, komórki wywodzące się z drugiego pola serca oraz komórki progenitorowe nasierdzia.

grzebienia nerwowego, które tworzą elementy składowe obwodowego układu nerwowego i obszarów twarzoczaszki, migrują do serca, gdzie są niezbędne w powstawaniu przegrody w obrębie drogi odpływu [2]. Zależność między komórkami grzebienia nerwowego [3] a powstawaniem przegród w sercu wyjaśnia związek defektów twarzoczaszki z niektórymi wrodzonymi wadami serca.

Ograniczenie różnicowania się w różne linie komórkowe

Dojrzałe serce jest zbudowane z wielu rodzajów komórek, w tym komórek mięśnia sercowego, śródbłonna,

mięśni gładkich, fibroblastów oraz wyspecjalizowanych komórek bódźoprzewodzących. Do niedawna pochodzenie i rozwój tych różnych typów komórek były niejasne. Ostatnio jednak technika identyfikacji wybranych genów (gene targeting) umożliwiła rygorystyczne „śledzenie losów komórek” (metoda umożliwiająca określanie komórkowych pochodnych danej komórki lub populacji komórek) oraz analizę linii komórkowych w zarodkach i dorosłych organizmach ssaków [4-7]. Wyniki tych badań, a także klonalnych analiz różnicowania zarodkowych komórek macierzystych *in vitro* [7-10], przekonująco dokumentują postępujące ograniczenia różnicowania się komórek uczestniczących w rozwoju serca (ryc. 2). Obecnie jest jasne, że komórki prekursorowe zarodka mogą różni-



RYCINA 2 Postępujące ograniczenie różnicowania się komórek progenitorowych.

W układzie hematopoetycznym podczas różnicowania następuje stopniowe ograniczenie różnicowania się komórek macierzystych. Również komórki progenitorowe serca, które mogą mieć wspólną komórkę prekursorową z hematopoetycznymi komórkami macierzystymi, stają się coraz bardziej ograniczone pod względem potencjalnych typów dojrzałych komórek, które mogą z nich ostatecznie powstać. Zaadaptowane z: Wu i wsp. [11].

ować się w różne rodzaje komórek serca. Kiedy jednak powstaje określona linia komórkowa, zdolność komórek tej linii do zmiany kierunku różnicowania i powstania z nich innych komórek zostaje ograniczona.

Zarodkowe komórki macierzyste są pluripotencjalne, czyli wykazują zdolność różnicowania w niemal każdy typ komórek. Takie komórki macierzyste mogą różnicować się w komórki mięśnia sercowego wykazujące samistną rytmiczną czynność skurczową, kiedy hoduje się je w hodowli tkankowej w obecności swoistych czynników wzrostowych i w określonych warunkach [12-14]. Komórki prekursorowe serca, które powstają *in vitro* z zarodkowych komórek macierzystych, charakteryzują się ekspresją receptora związanego z domeną o aktywności kinazy (kinase-domain-related receptor [KDR], receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego) oraz czynnika transkrypcyjnego NKX2-5 (odgrywającego rolę w rozwoju serca) [8,10]. Z tych wczesnych komórek prekursorowych serca może powstawać śródbłonek, mięśnie gładkie lub mięsień sercowy. Wyniki badań genetycznych *in vivo* wskazują na to, że podobne komórki prekursoro-

we uczestniczą w powstawaniu wielu linii komórkowych w rozwijającym się sercu.

Zjawisko postępującego ograniczenia różnicowania komórek podczas rozwoju serca ma ważne implikacje dla wykorzystywania terapii komórkami macierzystymi w leczeniu chorób serca. W przypadku leczenia, którego celem jest zwiększenie endogennej naprawy mięśnia sercowego lub wytworzenie nowego mięśnia sercowego poprzez dostarczenie odpowiednich komórek progenitorowych serca, bądź też wzrost bioprotezy w postaci łątkurczącego się mięśnia sercowego [8], badacze i praktycy muszą rozważyć, które komórki mogą najlepiej pozwolić na osiągnięcie tych celów [8,15,16]. Na przykład, zregenerowana tkanka powstała w wyniku leczenia komórkami progenitorowymi, z których mogą powstawać tylko miocyty serca, nie będzie podobna do prawidłowej tkanki serca, która zawiera różne elementy komórkowe. Jeżeli celem jest regeneracja tkanki zawierającej komórki wielu linii, składającej się ze śródbłonna, mięśni gładkich (tworzących regenerujące się naczynia) oraz kurczącego się mięśnia sercowego, to konieczne może być zastąpienie

komórek progenitorowych o ograniczonej zdolności różnicowania multipotencjalnymi komórkami progenitorowymi. Obecnie najważniejszy rodzaj komórek progenitorowych, który powinien być wykorzystywany w przypadku terapii komórkami macierzystymi w leczeniu kardiomiopatii niedokrwiennej i innych postaci niewydolności serca, jest nieznan, a markery i sygnatury ekspresji genów, które charakteryzują różne rodzaje komórek progenitorowych, są dopiero poznawane.

Postępujące ograniczenie możliwości różnicowania jest również właściwością różnicowania się multipotencjalnych hematopoetycznych komórek macierzystych w różne linie komórek krwi [17]. Określenie każdego stadium ograniczenia możliwości różnicowania się komórek macierzystych krwi umożliwiło identyfikację klinicznie przydatnych czynników wzrostu, takich jak czynnik wzrostu kolonii granulocytów, czynnik wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów oraz erytropoetyna, z których każdy wpływa na inny rodzaj komórek progenitorowych. Podobnie jak w przypadku hematopoetycznych komórek macierzystych, identyfikacja i scharakteryzowanie określonych komórek progenitorowych serca oraz sercowych czynników wzrostu mogą doprowadzić do opracowania użytecznych metod leczenia zawału mięśnia sercowego lub niewydolności serca.

Drugie pole serca

Nie wszystkie komórki prekursorowe mięśnia sercowego znajdują się w półksiężycowatym zawiązku serca oraz we wczesnej liniowej cewie serca. Wiele miocytów prawej komory oraz w zmiennym stopniu miocytów przedsionków, lewej komory oraz dróg napływu i odpływu wnika do rozwijającego się serca dopiero po zakończeniu wczesnych stadiów zapętlania się serca [18-20]. Te dodatkowe komórki pochodzą z drugiego pola serca, które znajduje przysródkowo i brzusznie od pierwotnego półksiężycowatego zawiązka serca. (W zarodku mianem pola określa się grupę pokrewnych komórek znajdujących się w obrębie zdefiniowanych granic.) Komórki z drugiego pola serca migrują najpierw w okolice gardła, gdzie można je zidentyfikować w zarodkach mysich w początkowym lub środkowym okresie ciąży na podstawie obecności produktów swoistych genów wskaźnikowych, w tym czynnika transkrypcyjnego ISL1 (czynnik transkrypcyjny wysp trzustkowych typu 1, transcription factor islet 1) [20]. Te komórki prekursorowe pochodzące z drugiego pola serca, znajdujące się w okolicy gardła, wnikają do rozwijającego się serca i migrują wzdłuż dróg napływu i odpływu. Komórki progenitorowe charakteryzujące się ekspresją czynnika transkrypcyjnego ISL1 są komórkami multipotencjalnymi, z których mogą powstawać mięśnie gładkie u podstawy aorty i tętnic płucnych, komórki śródbłonna, a także mięsień sercowy [7].

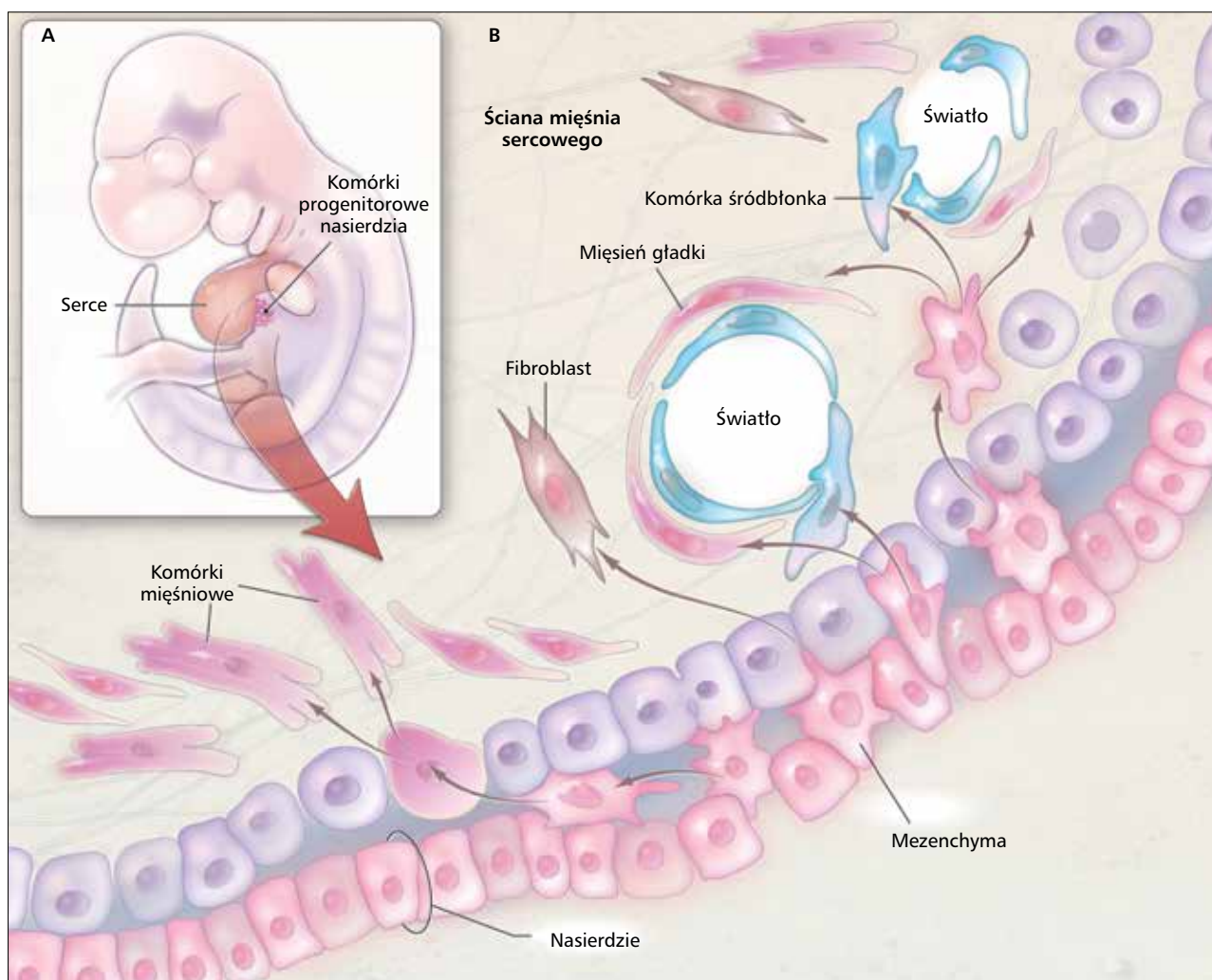
Istnienie drugiego pola serca ma ważne implikacje dla zrozumienia wad wrodzonych serca. Na przykład, nieprawidłowości odrębnych szlaków genetycznych, od których zależy powstawanie miocytów w prawej lub lewej komo-

rze, mogłyby tłumaczyć wady wrodzone dotyczące głównie prawej lub lewej komory. Wyniki indukowania zaburzeń genetycznych dotyczących tylko komórek drugiego pola serca w zarodkach myszy wskazują na to, że nieprawidłowości w tej populacji komórek mogą być przyczyną dwuodpływowej lewej komory, hipoplazji prawej komory, stenozy płucnej oraz tetralogii Fallota [21,22]. Ponadto w badaniach genetycznych u ludzi wykazano, że haplotypy locus genu *ISL1* wykazują silny związek z tymi postaciami wrodzonych wad serca [23]. Być może inne wady dotyczące prawej połowy serca, takie jak hipoplazja prawej komory, anomalia Ebsteina oraz niektóre postaci arytmogennej dysplazji prawej komory [24], również wynikają z nieprawidłowości dotyczących komórek drugiego pola serca.

Zwykle stosowana klasyfikacja wrodzonych wad serca jest oparta na anatomicznej charakterystyce nieprawidłowości. Te tradycyjne systemy klasyfikacji mogą wymagać zmian w świetle nowych dowodów wskazujących na to, że ta sama nieprawidłowość rozwojowa lub podobne nieprawidłowości mogą leżeć u podłoża anatomicznie różnych wrodzonych wad serca. Przykładem jest grupa klinicznie różniących się wad wrodzonych (np. dwuodpływowa prawa komora i hipoplazja prawej komory), które są powiązane poprzez związek z nieprawidłowościami dotyczącymi komórek progenitorowych z drugiego pola serca [25]. Zaburzenia dotyczące tych komórek prekursorowych mogą również być przyczyną nieprawidłowości anatomicznych dotyczących lewej lub prawej połowy serca (np. wady powstawania przegrody międzyprzedsionkowej lub międzykomorowej, położenia stożka tętniczego lub ułożenia wielkich naczyń), ponieważ te komórki uczestniczą w powstawaniu dróg napływu i odpływu w sercu [26]. Co więcej, najnowsze badania dotyczące tych wrodzonych wad serca, które zaczęto określać mianem wad zależnych od drugiego pola serca, wskazują na częste współistnienie wad napływu i odpływu [26]. Klasyfikacja anatomiczna jest bez wątpienia użyteczna klinicznie, ale można sądzić, że systemy klasyfikacyjne oparte na zależnościach rozwojowych i przyczynach genetycznych dostarczą dodatkowych informacji diagnostycznych i prognostycznych. Uzgodnienia ekspertów, które umożliwią jednoznaczne zdefiniowanie rozwojowych klasyfikacji wad wrodzonych serca, będą również sprzyjać lepszej komunikacji między badaczami zajmującymi się naukami podstawowymi i klinicznymi.

Rola nasierdzia w procesach rozwoju i naprawy serca

Nasierdzie, warstwa tkanki łącznej znajdująca między mięśniem sercowym a osierdziem [27], powstaje z przejściowej struktury zarodkowej zwanej narządem pronasierdziowym (ryc. 3). Komórki tego narządu pochodzą z przegrody poprzecznej, która oddziela klatkę piersiową od jamy brzusznej zarodka i uczestniczy w rozwoju przepony i wątroby. Niektóre komórki pronasierdziowe mi-



RYCINA 3 Rozwój i pochodne nasierdzia.

Nasierdzie rozwija się z narządu pronasierdziowego (A), skupisko multipotencjalnych komórek, które powstaje grzbietowo od zapętlonego serca. Komórki progenitorowe nasierdzia migrują do rozwijającego się serca, otaczają je i tworzą dojrzałe nasierdzie (B). Niektóre komórki progenitorowe nasierdzia ulegają przekształceniu w nabłonka w mezenchymę, wnikają do mięśnia sercowego i różnicują się w różne typy dojrzałych komórek serca, do których mogą należeć komórki mięśni gładkich naczyń, fibroblasty, komórki śródbłonna oraz miocyty serca. Zaadaptowane z: Schlueter [28].

grują do rozwijającego się serca i przyczyniają się do powstania warstwy nasierdziowej. Komórki potomne komórek pronasierdziowych wnikają do mięśnia sercowego, gdzie przekształcają się w fibroblasty serca oraz komórki mięśni gładkich tętnic wieńcowych [29-32]. Sygnały z nasierdzia są konieczne do właściwego dojrzewania mięśnia sercowego i prawidłowego rozwoju tętnic wieńcowych [33-35].

Najnowsze badania wskazują na to, że komórki progenitorowe nasierdzia są multipotencjalne, ponieważ mogą różnicować się w komórki mięśni gładkich, fibroblasty, a być może również miocyty mięśnia sercowego i komórki śródbłonna [36,37] (choć koncepcja, że te komórki tworzą śródbłonek naczyń wieńcowych, została zakwestionowana [38]). W tych badaniach wykorzystywano wskaźniki genetyczne ulegające ekspresji w narządzie pronasierdziowym – gen guza Wilmsa typu 1 (*wil1*) [37] oraz gen czynnika transkrypcyjnego T-box 18 (*tbx18*)

[36] – do mapowania losów komórek progenitorowych nasierdzia w czasie ich różnicowania. Uzyskano wyniki przemawiające za tym, że niektóre komórki prekursorowe nasierdzia przyczyniają się do powstawania mięśnia sercowego, co wskazuje na dodatkową drogę rozwojową w powstawaniu tkanki mięśniowej serca. U dorosłych osobników danio przegowanego (*Danio rerio*, ryba z rodziny karpowatych), które mogą regenerować mięsień sercowy po uszkodzeniu [39], nasierdzie jest aktywowane poprzez chirurgiczną resekcję mięśnia sercowego i dochodzi w nim wtedy do ekspresji genów płodowych, w tym genów *wil1* i *tbx18*. Nie wiadomo, czy te pobudzone komórki nasierdzia uczestniczą bezpośrednio w regeneracji mięśnia sercowego, czy też wytwarzają sygnały, które powodują, że miocyty serca wchodzi w cykl podziałów komórkowych [41]. Ponieważ to właśnie z nasierdzia powstają fibroblasty serca, będące głównym składnikiem blizny, jest możliwe, że u ssaków zdolność powstawania

nowego mięśnia sercowego została utracona ewolucyjnie w zamian za zdolność szybkiego tworzenia się blizny po uszkodzeniu.

Komórki progenitorowe pochodzące z nasierdzia (epicardium-derived progenitor cells, EPDC) wyizolowano z serca człowieka, szczura i myszy, a także uzyskano ich wzrost w hodowli tkankowej [42]. U gryzoni (podobnie jak u danio przegowanego) po zawale mięśnia sercowego w tych komórkach następuje ponowna aktywacja genów płodowych i ulegają one proliferacji. EPDC uzyskane *ex vivo* mogą różnicować się w wiele typów komórek i wykazywać ekspresję białek kurczliwych miocytów. Stwierdzono, że różne czynniki wzrostowe, w tym tymozyna β_4 , sprzyjają proliferacji EPDC i zwiększają poprawę czynności mięśnia sercowego po jego uszkodzeniu u zwierząt [45-47]. Na razie nie wiadomo, czy te zmiany wynikają z regeneracji mięśnia sercowego, czy z działania czynników wydzielanych przez EPDC i wywierających działania parakrynnne, które wpływają na przeżywalność lub czynność mięśnia sercowego. Na podstawie tych badań można sądzić, że interwencje obejmujące manipulowanie aktywacją nasierdzia i czynnością EPDC po uszkodzeniu – czy to poprzez leczenie systemowe, metody stosowane miejscowo w obrębie jamy osierdza, czy też wprowadzanie łań uwalniających lek na osierdziową powierzchnię uszkodzonego serca – mogą być godnymi uwagi kierunkami przyszłych badań.

Układ bódzoprzewodzący serca

Wyspecjalizowane komórki układu bódzoprzewodzącego serca powstają z komórek prekursorowych mięśnia sercowego. Dojrzałe komórki tego układu charakteryzują się stosunkowo słabą kurczliwością, natomiast następuje w nich ekspresja wyspecjalizowanych kanałów jonowych i białek połączeń szczelinowych (gap junction), w tym koneksyn, które umożliwiają elektryczną łączność z sąsiednimi komórkami [48,49]. We wczesnej fazie rozwoju, w okresie tworzenia się jam serca, mięsień sercowy między powstającymi przedsionkami i komorami charakteryzuje się wolnym przewodzeniem oraz innymi właściwościami przypominającymi węzeł przedsionkowo-komorowy. Również mięsień sercowy w obrębie drogi napływu uzyskuje autonomiczną aktywność i zaczyna wykazywać czynność rozrusznika. Z tej tkanki powstaje węzeł zatokowy. W komórkach, z których powstaje węzeł zatokowy, następuje ekspresja płodowego genu *TBX18*, natomiast w komórkach, z których powstanie węzeł przedsionkowo-komorowy i układ włókien Purkiniego, stwierdza się ekspresję czynnika transkrypcyjnego *NKX2-5* [48]. Możliwość, że prekursorzy komórek rozrusznikowych węzła zatokowego są spokrewnione z mięśniem sercowym otaczającym żyły płucne, może być ważna (i jest obecnie przedmiotem badań), ponieważ migotanie przedsionków jest często spowodowane arytmia występującą w obrębie żył płucnych. Mięsień sercowy tylnej ściany lewego przedsionka sięga do proksymalnych odcinków żył płucnych i tworzy pochewki dookoła nich,

zapewniając w ten sposób ciągłość elektryczną, a migotanie przedsionków można skutecznie leczyć poprzez elektryczną izolację żył płucnych [50]. Rozwój mięśnia sercowego w obrębie ujść żył płucnych wymaga udziału czynnika transkrypcyjnego *PITX2* [51], a w niedawnych badaniach asocjacji w całym genomie zidentyfikowano haplotypy w obszarze 4q25, w pobliżu locus genu *PITX2*, które wykazują związek z migotaniem przedsionków [52,53]. U podłoża skłonności do występowania migotania przedsionków może więc leżeć odpowiedź komórek mięśnia sercowego w obrębie ujść żył płucnych na zmienioną czynność czynnika transkrypcyjnego *PITX2*. Pewną rolę w migotaniu przedsionków mogą również odgrywać komórki melanocytopodobne w sercu [54], które znajdują się w pierścieniu przedsionkowo-komorowym, przedsionkach oraz żyłach płucnych rozwijającego się zarodka. W modelach zwierzęcych nieprawidłowości genetyczne wywołane w tych komórkach zwiększają podatność na występowanie arytmii przedsionkowych.

Obszar wolno przewodzącego mięśnia sercowego, który rozdziela przedsionki od komór w zarodku i zapewnia opóźnienie przewodzenia przedsionkowo-komorowego, początkowo zajmuje cały pierścień przedsionkowo-komorowy [48,49,55]. W miarę dalszego rozwoju serca fibroblasty pochodzące z nasierdzia wnikają do bruzdy przedsionkowo-komorowej i tworzą pierścień włóknisty [56,57], który powoduje elektryczne odizolowanie przedsionków od komór. Mięsień kanału przedsionkowo-komorowego ulega regresji, a właściwość wolnego przewodzenia ulega ograniczeniu do wyspecjalizowanych komórek węzła przedsionkowo-komorowego. W modelach zwierzęcych niedostateczny rozwój pierścienia włóknistego jest przyczyną nieprawidłowych połączeń elektrycznych między przedsionkami a komorami, preekscytacji oraz charakterystyki zespołu Wolffa-Parkinsona-White'a [56,58]. U osób z tym zespołem częstszy niż nieciągłość pierścienia włóknistego jest jednak ektopowy mięsień sercowy, który tworzy mostki między tkanką przedsionków a tkanką komór. Niektóre postaci tego zespołu mogą więc wynikać z braku prawidłowej regresji mięśnia sercowego kanału przedsionkowo-komorowego w okresie rozwoju serca.

Prawidłowe tworzenie się węzła przedsionkowo-komorowego zależy od czynników transkrypcyjnych, które odgrywają wiele ról podczas rozwoju serca. Do tej grupy należą czynniki *NKX2-5*, *TBX5* i *GATA4* [48]. U myszy czynniki transkrypcyjne *Tbx5* i *Gata4* regulują ekspresję koneksyny 30.2, która jest wymagana do wolnego przewodzenia w węzle przedsionkowo-komorowym [59]. Haploinsuficjencja (tj. obecność tylko jednego prawidłowego allelu genu – przyp. tłum.) genu *Gata4* u myszy jest przyczyną krótkiego odstępu PQ [59]. Mutacje genów *NKX2-5*, *TBX5* i *GATA4* powiązane z ubytkiem w przegrodzie międzyprzedsionkowej zarówno u ludzi, jak i w modelach zwierzęcych [60-63]. Strukturalna interferencja ubytku z włóknami przewodzącymi może więc nie tłumaczyć całkowicie związku między ubytkiem w przegrodzie międzyprzedsionkowej a zaburzeniami przewodzenia. Możliwe jest raczej, że pojedynczy defekt

genetyczny wywiera niezależny wpływ zarówno na zamknięcie się przegrody międzyprzedsionkowej, jak i na wyspecjalizowane komórki bódźoprzewodzące [64]. Stwierdzono, że u pacjentów z mutacjami genu *NKX2-5* rzeczywiście mogą występować izolowane zaburzenia przewodzenia. Te czynniki, a także regulowane przez nie procesy komórkowe, mogą dalej odgrywać ważną rolę w tkance bódźoprzewodzącej przez całe dorosłe życie. Na przykład, inaktywacja genu *Nkx2-5* u dorosłych myszy prowadzi do postępującego zwyrodnienia węzła przedsionkowo-komorowego oraz bloku przedsionkowo-komorowego [65]. Wydaje się prawdopodobne, że u pacjentów w podeszłym wieku z blokiem przedsionkowo-komorowym stwierdzony zostanie związek z pewnymi allelami ryzyka tego genu lub pokrewnych genów, które być może pozwolą też na przewidywanie wystąpienia bloku przedsionkowo-komorowego.

Dojrzewanie układu krążenia

W momencie narodzin w układzie krążenia następuje seria nagłych, krytycznych zmian. Krew musi zostać skierowana do płuc w celu utlenowania, a krążenie wrotne musi perfundować wątrobę, kiedy zacznie się żywienie dojelitowe. Zwiększenie ciśnienia parcjalnego tlenu, do którego dochodzi po pierwszych kilku wdechach, w połączeniu z ustaniem działania matczynych prostaglandyn, stymuluje zamknięcie przewodu tętniczego, co powoduje, że krew z prawej komory zaczyna płynąć wyłącznie do płuc i w ten sposób dochodzi do wytworzenia się równoległych układów krążenia płucnego i systemowego. Następuje zamknięcie otworu owalnego w przegrodzie międzyprzedsionkowej. Przewód żylny zamyka się, kierując krew z żyły wrotnej do wątroby.

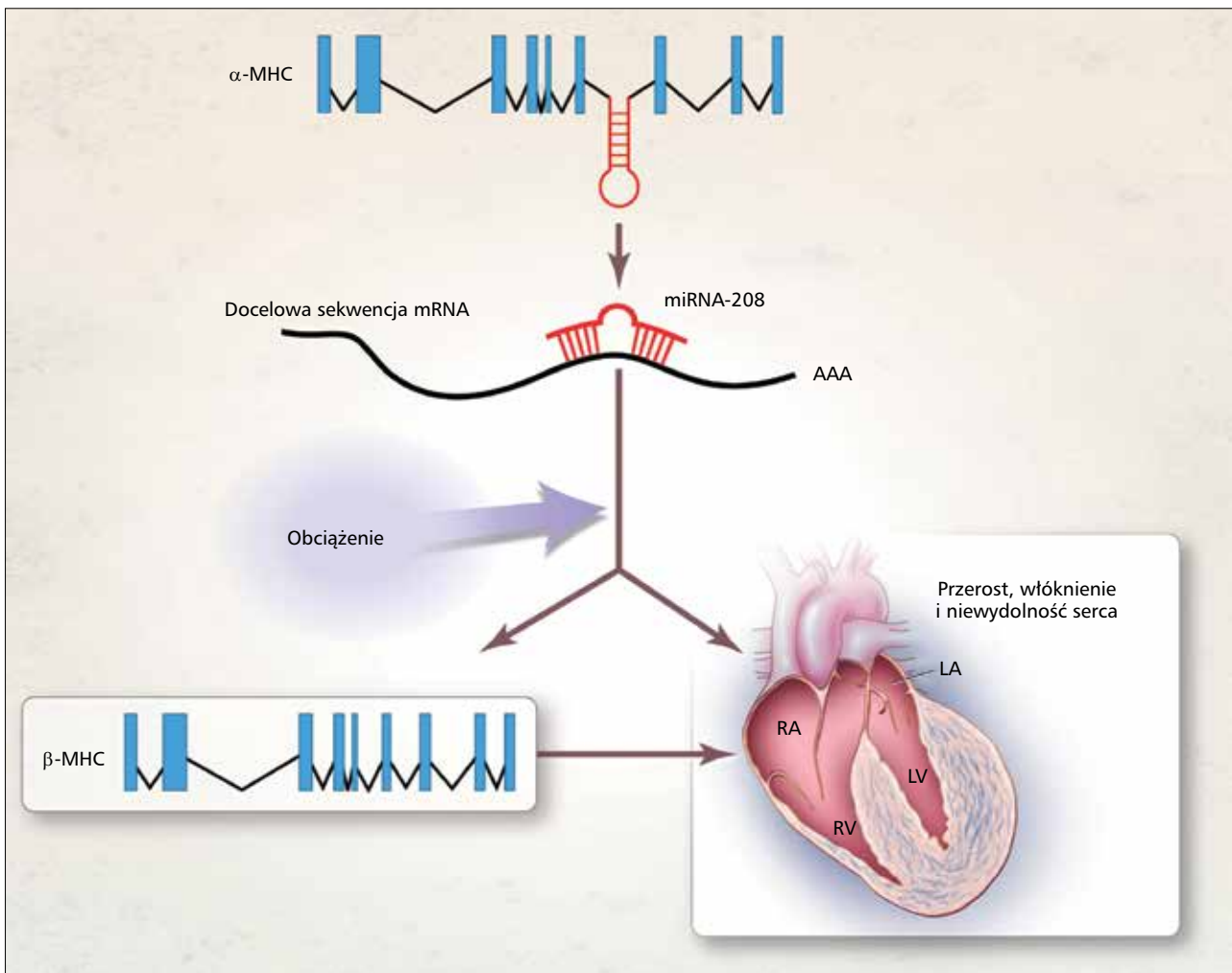
Mniej oczywiste, ale równie ważne zmiany następują w okresie noworodkowym w komórkach mięśnia sercowego. W sercu dochodzi do zmiany profilu ekspresji genów: ekspresja wielu izoform płodowych zmniejsza się lub zostaje zastąpiona przez ekspresję ich dorosłych odpowiedników. Do przykładów należą geny kodujące elementy kurczliwe sarkomerów, aparat gospodarki wapniowej, enzymy utylizujące energię oraz czynniki natriuretyczne [66–68]. Do ponownej ekspresji genów płodowych dochodzi w niemal każdej postaci niewydolności serca u dorosłych i uważa się, że to zjawisko przyczynia się do progresji niewydolności serca. Wyjaśnienie mechanizmów, które regulują ponowną ekspresję genów płodowych w stanach chorobowych, może ujawnić nowe cele w leczeniu niewydolności serca. Z kolei lepsze poznanie programów genetycznych rządzących dojrzewaniem miocytów powinno przyczynić się do rozwoju leczenia regeneracyjnego: wykorzystanie takich metod w leczeniu chorób serca jest obecnie utrudnione przez ograniczoną zdolność wytwarzania w pełni dojrzałych miocytów dorosłego serca z komórek progenitorowych.

Wiedza na temat mechanizmów regulujących ekspresję genów zwiększyła się znacznie w ostatnich latach.

Ekspresja genów wymaga swoistych czynników transkrypcyjnych – białek, które aktywują lub hamują transkrypcję z genomowego DNA na przekąźnikowy RNA (mRNA) poprzez wiązanie z obszarami promotorów lub sekwencji wzmacniających. Zmiany sposobu upakowania DNA, zależne od chromatyny oraz enzymatycznych modyfikacji histonów, które są głównym składnikiem białkowym chromatyny, również wpływają na ekspresję genów w mechanizmie zwanym modyfikacją epigenetyczną. Mechanizm ten reguluje ekspresję genów poprzez wpływ na enzymatyczną acetylację histonów (i inne modyfikacje chemiczne tych białek) oraz inicjowanie rozluźnienia chromatyny (co powoduje odsłonięcie loci ulegających aktywnej transkrypcji). Powoduje on również represję transkrypcji genów poprzez enzymatyczną deacetylację histonów i wzrost gęstości chromatyny. Epigenetyczna kontrola struktury chromatyny, będąca mechanizmem, od którego zależą globalne zmiany programów ekspresji genów, ma zasadnicze znaczenie dla przeprogramowywania komórek (ukierunkowanych zmian, podczas których komórka określonego typu przekształca się w komórkę innego typu – na przykład fibroblast staje się pluripotencjalną komórką macierzystą) oraz określania ich losów.

Pewne dane wskazują na to, że aktywność swoistych deacetylaz histonów jest niezbędna do regulacji programu ekspresji genów płodowych w sercu w okresie rozwoju, a te same enzymy odgrywają rolę w niewydolności serca u dorosłych. Na przykład, genetyczna inaktywacja deacetylazy histonów typu 2 u myszy zmniejsza ekspresję płodowych genów sercowych oraz hamuje reaktywację programu ekspresji genów płodowych w sytuacjach związanych z obciążeniem serca u dorosłych [69]. Chemiczne inhibitory tego enzymu, których stosowanie ocenia się obecnie w próbach klinicznych III fazy dotyczących leczenia pewnych nowotworów, mogą zapobiegać reaktywacji programu ekspresji genów płodowych, przerostowi serca oraz niewydolności serca w modelach zwierzęcych (np. badania numer NCT00773747 i NCT01023308 w rejestrze prób klinicznych ClinicalTrials.gov) [70–75]. Te wyniki pozwalają sądzić, że mechanizmy epigenetyczne regulują przejście od programów ekspresji płodowych genów sercowych do programów ekspresji charakteryzujących osoby dorosłe, a te mechanizmy mogłyby być celami nowych metod leczenia niewydolności serca.

Mikrocząsteczki RNA (mikroRNA, miRNA) są krótkimi, jednoniciowymi fragmentami RNA, które modulują ekspresję genów poprzez wiązanie się z komplementarnymi obszarami transkryptów mRNA. Geny mikroRNA w chromosomalnym DNA mogą ulegać ekspresji jako niezależne geny pozostające pod kontrolą swoich własnych promotorów, lub też ich ekspresja następuje razem z ekspresją innych genów, w których obrębie się znajdują. U myszy w sercu płodowym następuje ekspresja łańcucha ciężkiego miozyny typu β (β -MHC), natomiast w dorosłym sercu ekspresji ulega łańcuch ciężki miozyny typu α (α -MHC). U dorosłych myszy czynniki zwiększające obciążenie serca, takie jak



RYCINA 4 Regulacja ekspresji genu izoformy łańcucha ciężkiego miozyny zależna od mikrocząsteczki RNA.

Mikrocząsteczka RNA-208 (miRNA-208), której gen znajduje się w obrębie intronu genu kodującego łańcuch ciężki miozyny typu α (α -MHC), pośrednio reguluje ekspresję genu łańcucha ciężkiego miozyny typu β (β -MHC) w odpowiedzi na sygnały indukowane przez obciążenie serca. AAA – poliadenylowy ogon przekaźnikowego RNA (mRNA), LA – lewy przedsionek, LV – lewa komora, RA – prawy przedsionek, RV – prawa komora. Zaadaptowane z ryciny udostępnionej przez dr. E. Olsona.

przeciążenie ciśnieniowe lub przewlekła stymulacja adrenergiczna, wywołują ponowną ekspresję β -MHC i zmniejszają ekspresję α -MHC [66]. Podstawą tej przeciwstawnej regulacji jest obecność regulatorowego genu mikroRNA w obrębie intronów genów kodujących obie izoformy łańcucha ciężkiego miozyny [76]. Ekspresja α -MHC powoduje jednoczesną ekspresję *miR-208* (genu mikroRNA swoistego dla serca), który w obecności sygnałów indukowanych przez obciążenie pośrednio aktywuje transkrypcję β -MHC (ryc. 4). W przypadku nieobecności *miR-208* sygnały indukowane przez obciążenie nie aktywują β -MHC i innych genów płodowych, co powoduje, że zarówno odpowiedź przerostowa, jak i towarzyszące jej włóknienie ulegają osłabieniu. Możliwość oddziaływania środków terapeutycznych na geny mikroRNA jest nowym obszarem badań naukowych [77-79].

Podsumowanie

Najnowsze badania ujawniły zaskakująco wiele uprzednio niedocenianych aspektów morfogenezy serca, które mają znaczenie zarówno w wadach wrodzonych serca, jak i w chorobach układu krążenia u dorosłych. Obecnie jest jasne, że populacje komórek spoza pierwotnego pola serca oraz liniowej cewy serca zarodka przyczyniają się do rozwoju dojrzałego serca i modulują morfogenezę serca. Do tych populacji komórek należą komórki grzebienia nerwowego, komórki wywodzące się z drugiego pola serca oraz komórki nasierdziowe. Pełny potencjał rozwojowy i unikatowa charakterystyka definiująca różne komórki progenitorowe serca zostały tylko częściowo poznane, a poszczególne stadia ograniczania się możliwości różnicowania się tych komórek progenitorowych wymagają dalszego scharakteryzowania. Zdolność namnażania po-

pulacji komórek progenitorowych serca *in situ* bądź *ex vivo*, a także sterowania losami tych komórek będzie miała ważne implikacje dla zastosowania terapii regeneracyjnych w leczeniu chorób układu krążenia. Biologia komórkowa dojrzewania miocytów oraz następstwa przekształcenia się serca płodu w dorosłe serce pozostają dziedzinami badań, które w przyszłości prawdopodobnie pogłębią wiedzę na temat niewydolności serca. Można również oczekiwać, że badanie dotyczące regulacji programów ekspresji genów pozwolą na zaproponowanie nowych celów terapeutycznych w leczeniu chorób układu krążenia.

Praca sfinansowana z grantu National Institutes of Health (nr U01 HL100405), nagrody DeHaan Cardiac Myogenesis Award przyznanej przez American Heart Association, a także funduszy W.W. Smith Endowed Chair for Cardiovascular Research.

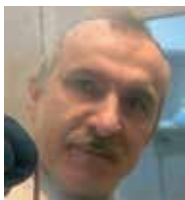
Wypełnione przez autora formularze dotyczące potencjalnych konfliktów interesów są dostępne razem z pełnym tekstem niniejszego artykułu na stronie internetowej NEJM.org.

From The New England Journal of Medicine 2010; 363: 1638-47. Translated and reprinted in its entirety with permission of the Massachusetts Medical Society. Copyright © 2010, 2011 Massachusetts Medical Society. All Rights Reserved.

Piśmiennictwo

- Harvey RP, Rosenthal N, eds. Heart development. San Diego, CA: Academic Press, 1999.
- Kirby ML, Gale TF, Stewart DE. Neural crest cells contribute to normal aorticopulmonary septation. *Science* 1983; 220: 1059-1061
- Stoller JZ, Epstein JA. Cardiac neural crest. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 704-715
- Cui C, Chevront T, Lansford RD, et al. Dynamic positional fate map of the primary heart-forming region. *Dev Biol* 2009; 332: 212-222
- Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med* 2007; 13: 970-974
- Ma Q, Zhou B, Pu WT. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. *Dev Biol* 2008; 323: 98-104
- Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 2006; 127: 1151-1165
- Kattman SJ, Huber TL, Keller GM. Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev Cell* 2006; 11: 723-732
- Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 2006; 127: 1137-1150
- Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 2008; 453: 524-528
- Wu SM, Fujiwara Y, Cibulsky SM, et al. Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 2006; 127: 1137-1150
- Chen VC, Stull R, Joo D, et al. Notch signaling respecifies the hemangioblast to a cardiac fate. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1169-1178
- Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1015-1024
- Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008; 132: 661-680
- Sui R, Liao X, Zhou X, et al. The current status of engineering myocardial tissue. *Stem Cell Rev* 2010 March 3 (Epub ahead of print).
- Chien KR, Domian IJ, Parker KK. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. *Science* 2008; 322: 1494-1497
- Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 35-71
- Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell* 2001; 1: 435-440
- Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, et al. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development* 2001; 128: 3179-3188
- Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell* 2003; 5: 877-889
- High FA, Jain R, Stoller JZ, et al. Murine Jagged1/Notch signaling in the second heart field orchestrates Fgf8 expression and tissue-tissue interactions during outflow tract development. *J Clin Invest* 2009; 119: 1986-1996
- Ward C, Stadt H, Hutson M, et al. Ablation of the secondary heart field leads to tetralogy of Fallot and pulmonary atresia. *Dev Biol* 2005; 284: 72-83
- Stevens KN, Hakonarson H, Kim CE, et al. Common variation in ISL1 confers genetic susceptibility for human congenital heart disease. *PLoS One* 2010; 5 (5) e10855.
- Lombardi R, Dong J, Rodriguez G, et al. Genetic fate mapping identifies second heart field progenitor cells as a source of adipocytes in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Circ Res* 2009; 104: 1076-1084
- Dyer LA, Kirby ML. The role of secondary heart field in cardiac development. *Dev Biol* 2009; 336: 137-144
- Bajolle F, Zaffran S, Losay J, et al. Conotruncal defects associated with anomalous pulmonary venous connections. *Arch Cardiovasc Dis* 2009; 102: 105-110
- Manner J, Perez-Pomares JM, Macias D, et al. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs* 2001; 169: 89-103
- Schlueter J. The origin and therapeutic potential of the coronary blood vessel system. Presented at the European Society of Cardiology, Barcelona, August 29–September 2, 2009.
- Guadix JA, Carmona R, Munoz-Chapuli R, et al. In vivo and in vitro analysis of the vasculogenic potential of avian proepicardial and epicardial cells. *Dev Dyn* 2006; 235: 1014-1026
- Vrancken Peeters MP, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, et al. Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat Embryol (Berl)* 1999; 199: 367-378
- Mikawa T, Gourdie RG. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol* 1996; 174: 221-232
- Mikawa T, Fischman DA. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 9504-9508
- Stuckmann I, Evans S, Lassar AB. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol* 2003; 255: 334-349
- Chen TH, Chang TC, Kang JO, et al. Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. *Dev Biol* 2002; 250: 198-207
- Perez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, et al. Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol* 2002; 247: 307-326
- Cai CL, Martin JC, Sun Y, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature* 2008; 454: 104-108

37. Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature* 2008; 454: 109-113
38. Red-Horse K, Ueno H, Weissman IL, et al. Coronary arteries form by developmental reprogramming of venous cells. *Nature* 2010; 464: 549-553
39. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002; 298: 2188-2190
40. Lepilina A, Coon AN, Kikuchi K, et al. A dynamic epicardial injury response supports progenitor cell activity during zebrafish heart regeneration. *Cell* 2006; 127: 607-619
41. Jopling C, Sleep E, Raya M, et al. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 2010; 464: 606-609
42. Smart N, Riley PR. Derivation of epicardium-derived progenitor cells (EPDCs) from adult epicardium. In: *Current protocols in stem cell biology*. New York: John Wiley, 2009: Unit2C.2.
43. Limana F, Bertolami C, Mangoni A, et al. Myocardial infarction induces embryonic reprogramming of epicardial c-kit (+) cells: role of the pericardial fluid. *J Mol Cell Cardiol* 2010; 48: 609-618
44. Limana F, Zacheo A, Mocini D, et al. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res* 2007; 101: 1255-1265
45. Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al. Thymosin beta-4 is essential for coronary vessel development and promotes neovascularization via adult epicardium. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1112: 171-188
46. Bock-Marquette I, Shrivastava S, Pipes GC, et al. Thymosin beta4 mediated PKC activation is essential to initiate the embryonic coronary developmental program and epicardial progenitor cell activation in adult mice in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 728-738
47. Smart N, Risebro CA, Melville AA, et al. Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature* 2007; 445: 177-182
48. Christoffels VM, Smits GJ, Kispert A, et al. Development of the pacemaker tissues of the heart. *Circ Res* 2010; 106: 240-254
49. Moorman AF, Christoffels VM. Development of the cardiac conduction system: a matter of chamber development. *Novartis Found Symp* 2003; 250: 25-34
50. Peters NS, Schilling RJ, Kanagaratnam P, et al. Atrial fibrillation: strategies to control, combat, and cure. *Lancet* 2002; 359: 593-603
51. Mommersteeg MT, Brown NA, Prall OW, et al. Pitx2c and Nkx2-5 are required for the formation and identity of the pulmonary myocardium. *Circ Res* 2007; 101: 902-909
52. Damani SB, Topol EJ. Molecular genetics of atrial fibrillation. *Genome Med* 2009; 1: 54-54
53. Gudbjartsson DF, Arnar DO, Helgadóttir A, et al. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. *Nature* 2007; 448: 353-357
54. Levin MD, Lu MM, Petrenko NB, et al. Melanocyte-like cells in the heart and pulmonary veins contribute to atrial arrhythmia triggers. *J Clin Invest* 2009; 119: 3420-3436
55. Rutenberg JB, Fischer A, Jia H, et al. Developmental patterning of the cardiac atrioventricular canal by Notch and Hairy-related transcription factors. *Development* 2006; 133: 4381-4390
56. Kolditz DP, Wijffels MC, Blom NA, et al. Epicardium-derived cells in development of annulus fibrosis and persistence of accessory pathways. *Circulation* 2008; 117: 1508-1517
57. Zhou B, von Gise A, Ma Q, et al. Genetic fate mapping demonstrates contribution of epicardium-derived cells to the annulus fibrosis of the mammalian heart. *Dev Biol* 2010; 338: 251-261
58. Arad M, Moskowitz IP, Patel VV, et al. Transgenic mice overexpressing mutant PRKAG2 define the cause of Wolff-Parkinson-White syndrome in glycogen storage cardiomyopathy. *Circulation* 2003; 107: 2850-2856
59. Munshi NV, McAnally J, Bezprozvannaya S, et al. Cx30.2 enhancer analysis identifies Gata4 as a novel regulator of atrioventricular delay. *Development* 2009; 136: 2665-2674
60. Maslen CL. Molecular genetics of atrioventricular septal defects. *Curr Opin Cardiol* 2004; 19: 205-210
61. Basson CT, Cowley GS, Solomon SD, et al. The clinical and genetic spectrum of the Holt-Oram syndrome (heart-hand syndrome). *N Engl J Med* 1994; 330: 885-891 [Erratum, *N Engl J Med* 1994; 330: 1627.]
62. Schott JJ, Benson DW, Basson CT, et al. Congenital heart disease caused by mutations in the transcription factor NKX2-5. *Science* 1998; 281: 108-111
63. Garg V, Kathiriyai IS, Barnes R, et al. GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 2003; 424: 443-447
64. Benson DW, Silberbach GM, Kavanaugh-McHugh A, et al. Mutations in the cardiac transcription factor NKX2.5 affect diverse cardiac developmental pathways. *J Clin Invest* 1999; 104: 1567-1573
65. Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, et al. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease: loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell* 2004; 117: 373-386
66. Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, et al. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* 1993; 73: 184-192
67. Parker TG, Packer SE, Schneider MD. Peptide growth factors can provoke „fetal” contractile protein gene expression in rat cardiac myocytes. *J Clin Invest* 1990; 85: 507-514
68. Taegtmeier H, Sen S, Vela D. Return to the fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1188: 191-198
69. Trivedi CM, Luo Y, Yin Z, et al. Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity. *Nat Med* 2007; 13: 324-331
70. Antos CL, McKinsey TA, Dreitz M, et al. Dose-dependent blockade to cardiomyocyte hypertrophy by histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 2003; 278: 28930-28937
71. Bush EW, McKinsey TA. Targeting histone deacetylases for heart failure. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13: 767-784
72. Gallo P, Latronico MV, Grimaldi S, et al. Inhibition of class I histone deacetylase with an apicidin derivative prevents cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 2008; 80: 416-424
73. Kong Y, Tannous P, Lu G, et al. Suppression of class I and II histone deacetylases blunts pressure-overload cardiac hypertrophy. *Circulation* 2006; 113: 2579-2588
74. Kee HJ, Sohn IS, Nam KI, et al. Inhibition of histone deacetylation blocks cardiac hypertrophy induced by angiotensin II infusion and aortic banding. *Circulation* 2006; 113: 51-59
75. Kook H, Lepore JJ, Gitler AD, et al. Cardiac hypertrophy and histone deacetylase-dependent transcriptional repression mediated by the atypical homeodomain protein Hop. *J Clin Invest* 2003; 112: 863-871
76. van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, et al. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 2007; 316: 575-579
77. Brown BD, Naldini L. Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 578-585
78. Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. *Nat Rev Cardiol* 2009; 6: 419-429
79. van Rooij E, Marshall WS, Olson EN. Toward microRNA-based therapeutics for heart disease: the sense in antisense. *Circ Res* 2008; 103: 919-928



Komentarz

prof. dr hab. n. med. Maciej Kurpisz
Kierownik Zakładu Biologii Rozrodu i Komórek Macierzystych
Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

KOMÓRKI MACIERZYTE W REGENERACJI MIĘŚNIA SERCOWEGO

Przedstawiony artykuł jest bardzo przydatny w rozróżnieniu diagnostycznym chorób (wad) serca, do powstania których dochodzi na etapie wczesnego rozwoju (płodowego) cewy serca. Klasyfikacja elementów tworzących pierwsze i drugie pola serca pozwala znaleźć wspólne podłoże chorób serca, których objawy i charakterystyka wydawały się dotąd niezwykle odległe. Implikacje te mogą także wskazywać na optymalny dobór terapii komórkami macierzystymi dla regeneracji układu krążenia.

W rozdziale dotyczącym komórek macierzystych ukierunkowanych na rozwój kardiomiogeny autor zwraca uwagę na dwa podstawowe markery, tj. KDR (receptor zawierający domenę kinazową), który odpowiada na powszechnie rozpoznawany ligand angiogeny, VEGF (vascular endothelial growth factor) oraz czynniki transkrypcyjne (NKX2-5). Wczesne komórki prekursorowe wobec mięśnia sercowego zawierające te markery mogą różnicować się w kierunku śródbłonna, mięśniówki gładkiej i miokardium. Trwa intensywna dyskusja, ponieważ u dorosłych wykazano obecność tzw. progenitorowych komórek serca (cardiac progenitor cells, CPC), które stanowią pewien (ograniczony) potencjał samoodnawialności mięśnia sercowego (ulożone w dwóch niszach miokardialnych). Paradoksalnie, jak wynika z przedstawionego przeglądu danych, znacznie większym potencjałem samoodnawialności (więcej wytwarzanych typów komórkowych) charakteryzują się komórki macierzyste wywodzące się z drugiego pola sercowego (ektopowego wobec komórek pierwotnej cewy serca), charakteryzujące się markerem Isl-1 (czynnik transkrypcyjny islet 1). Pozwolę nie zgodzić się z fragmentem artykułu, w którym autor wysuwa rolę multipotencjalnych komórek macierzystych w regeneracji mięśnia sercowego, ponieważ na tym etapie poddawać się będą one silnie patogennemu środowisku blizny pozawałowej (mogą być natomiast przydatne w kardiomiopatii, w której rezydują natywne kardiomiocyty). Uważam, że obecnie droga do regeneracji mięśnia sercowego wiedzie przez równoległe zastosowanie kilku linii komórek progenitorowych, nie jednej multipotencjalnej. Słusznie natomiast autor wskazuje, że w funkcji bioregeneracyjnej serca mogą także brać udział linie komórek macierzystych o potencjale hematopoetycznym, wydzielające różne pomocne czynniki wzrostu, np.

stymulujące kolonie granulocytów (G-CSF) lub mieszane kolonie granulocytowo-makrofagowe (GM-CSF), a nawet erytropoetyny. Te właściwości parakrynowe są obecnie wykorzystywane w przeżywającej boom implantacji komórek pochodzenia szpikowego w ostrej fazie zawału mięśnia sercowego.

Wspomniałem na początku komentarza, że komórki progenitorowe drugiego pola sercowego pochodzą spoza cewy serca i różnicują się w obrębie gardzieli (zawierają marker isl-1, charakterystyczny dla przetrwałej u dorosłych linii CPC, również obdarzonej tym markerem). Przez region gardzieli komórki te migrują do rozwijającego się serca, są multipotencjalne i dają odgałęzienia dla komórek mięśniówki gładkiej (aorty i tętnic płucnych), śródbłonna i miokardium. Migracja komórek drugiego pola serca lub ewentualne jej zaburzenia mogą prowokować liczne wrodzone defekty, takie jak dwuodpływowa komora serca, hipoplazja prawej komory, stenoza płucna czy tetralogia Fallota. Zwykła akademicka klasyfikacja wrodzonych chorób serca zależy od charakterystyki anatomicznej stwierdzanej anomalii i musi zostać zmieniona na podstawie danych wynikających z procesu rozwojowego narządu, co sprawia, że często odległe kojarzone schorzenia mają wspólną wadę rozwojową (jak wymieniono powyżej). Aberracje w tych komórkach mogą także zaburzać podział przedsionków i komór, położenie stożka tętniczego i ułożenie wielkich naczyń.

Nasierdzie leży między wsierdziem a miokardium i zbudowane jest z tkanki łącznej, powstaje z przejściowej struktury embrionalnej, zwanej proepikardium. Komórki wywodzące się z tego organu tworzą przegrodę poprzeczną oddzielającą klatkę piersiową od jamy brzusznej oraz przeponę i wątrobę. Komórki potomne epikardium rozwijają się w fibroblasty i komórki mięśniówki gładkiej naczyń wieńcowych, jednak nie tworzą ich śródbłonna. Interesujące jest to, że genetyczne markery proepikardium to markery zidentyfikowane w guzie Wilmsa (Wt1). U dorosłych osobników danio przegowanego (zebrafish) komórki epikardium aktywowane są przez chirurgiczną resekcję serca, co daje sygnał do regeneracji serca. Moim zastrzeżeniem do tej części artykułu jest to, że danio przegowane regeneruje część serca po odcięciu koniuszka, co wskazuje na bliskość niszy komórek macierzystych (co na pewno jest adekwatną lokalizacją dla niszy CPC u ludzi), jednak mylnie przypisuje autor porzucenie (ewolucyjne)

możliwości regeneracji mięśnia sercowego na rzecz wytwórczych procesów blizny pozawałowej (produkowanej przez sercowe fibroblasty). Proces wytwórczy nie jest wymienny, jest tylko objawem skrajnej specjalizacji postmitotycznych kardiomiocytów, zróżnicowanych (rozdzielnie) w obrębie komór i przedsionków. Specjalizacja zawsze skutkuje zanikiem multipotencjalności. Jednak proces aktywacji epikardialnych komórek progenitorowych (epicardium-derived cells, EPDC) w odniesieniu do klinicznego zastosowania u ludzi nie został jeszcze opracowany.

W rozdziale dotyczącym układu bódźoprzewodzącego serca pojawia się wspomniany poprzednio marker NKX2, czynnik transkrypcyjny wczesnych, zarodkowych komórek prekursorowych serca, który jest znakiem węzła przedsionkowo-komorowego i włókien Purkiniego, odróżniającym je od innych elementów układu bódźoprzewodzącego. W węźle zatokowym króluje marker genowy TBX18, a jego komórki prekursorowe mogą powodować migotanie przedsionków przez falę wnikającą z ujęść żył płucnych. Zatem elektryczne odizolowanie tego potencjału (z żył płucnych) może skutecznie wyleczyć migotanie przedsionków. Odpowiedź ze strony komórek miokardium na aktywację wychodzącą z ujęść żył płucnych może być spowodowana nieprawidłową funkcją genu *PITX2*, co zidentyfikowano w badaniach całego genomu. Inne sensacyjne odkrycie to wykazanie wpływu komórek melanocytopodobnych zlokalizowanych w sercu na rozwój migotania przedsionków.

Prawidłowe formowanie się węzła przedsionkowo-komorowego uwarunkowane jest ekspresją kilku czynników transkrypcyjnych, tj. NKX2, TBX5 i GATA4. U myszy geny dla *Tbx5* oraz *Gata4* regulują ekspresję koneksyny 30.2, która z kolei reguluje przewodnictwo elektrofizjologiczne w obrębie tego węzła. Warto wspo-

mnąć, że mutacja tylko jednego genu może spowodować zamknięcie przegrody międzyprzedsionkowej lub wpłynąć na upośledzenie funkcji komórek układu bódźoprzewodzącego. Stąd płynnie niesłuchanie ważny wniosek – zidentyfikowanie jednego tylko allelu genowego może pozwolić zidentyfikować czynnik ryzyka dla bloku przedsionkowo-komorowego.

Jednak najbardziej pasjonujący jest rozdział dotyczący tzw. dojrzewania układu krążenia. Autor wyraźnie wskazuje, że geny pochodzenia płodowego, które ulegają reekspresji w dorosłym sercu są przyczyną poważnych zaburzeń. Takie odwrócenie kolei rzeczy (prawidłowego zróżnicowania komórek) wiedzie w odwrotnym procesie do acetytacji histonów, tj. deacetytacji. Deacetylacja może odwracać kierunek różnicowania (pojawienie się antygenów płodowych w sercu może prowadzić do rozwoju patologii). Autor doniesienia podaje, że chemiczne inhibitory deacetytacji stosowane są obecnie w trzech próbach klinicznych, co może zaowocować skuteczną prewencją antynowotworową, ale również zapobiegać przerostowi mięśnia sercowego czy niewydolności serca. Na przykład pojawienie się płodowej izoformy ciężkiego łańcucha miozynowego (MHC- β) zamiast występującej u dorosłych formy α może nasilać zaburzenia prowadzące do niewydolności serca. Do takiej konwersji izoform może dochodzić pod wpływem przewlekłej stymulacji adrenergicznej lub przeciążenia mięśnia. Moim zdaniem autor jednak mylnie przypisuje przeprogramowaniu genetycznemu (reakspresji) wpływ na terapię komórkami macierzystymi, a jest odwrotnie – to komórki macierzyste należy uczynić obojętnymi na presję otoczenia patogenicznego. I to jest najtrudniejsza kwestia obecnej terapii komórkowej. Polecam lekturę w oryginale. To świetny artykuł z głębokimi konsekwencjami klinicznymi.



Komentarz

dr hab. n. med. Wojciech Wojakowski
III Klinika Kardiologii
Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach

CZEGO KARDIOLOGIOMOGĄ SIĘ NAUCZYĆ OD EMBRIOLOGÓW?

Przez ostatnie 8 lat, które upłynęły od pierwszego badania klinicznego z zastosowaniem dowieńcowej terapii zawiesiną komórek sziku kostnego, zagadnienia terapii regeneracyjnej w chorobach układu krążenia były jednym z najgorliwiej dyskutowanych i najczęściej cytowa-

nych tematów w kardiologii. Co prawda odległa skuteczność kliniczna terapii komórkami macierzystymi musi zostać potwierdzona, niemniej zainteresowanie regeneracją serca spowodowało dynamiczny rozwój badań z zakresu nauk podstawowych, w tym dotyczących embriogenezy serca. Można założyć, że optymalna metoda terapeutycznej regeneracji serca będzie polegała na

„odblokowaniu” w sercu dorosłych endogennych mechanizmów naprawczych pochodzących z okresu płodowego. Niedawno opublikowany w *New England Journal of Medicine* artykuł poglądowy napisany przez wybitnego naukowca i znawcę embriogenezy serca Jonathana A. Epsteina jest podsumowaniem obecnego stanu wiedzy na ten temat. Artykuł systematycznie i przejrzysto przedstawia skomplikowane mechanizmy molekularne i komórkowe regulujące rozwój serca w życiu płodowym.

Zdolność narządów do regeneracji jest cechą szczególnie istotną u organizmów długo żyjących. Jego podstawą jest istnienie mechanizmów naprawczych, polegających na zdolności kardiomiocytów do podziałów komórkowych, obecności puli komórek o dużym potencjale różnicowania w szpiku kostnym bądź w mięśniu sercowym, a także mechanizmów sygnałowych zapewniających mobilność komórek szpiku kostnego i ich ukierunkowaną chemotaksję do miejsca uszkodzenia mięśnia sercowego. Do niedawna uważano, że kardiomiocyty są komórkami postmitotycznymi, terminalnie zróżnicowanymi, i nie jest możliwe tworzenie nowych kardiomiocytów w życiu osobniczym. Zwiększenie masy mięśnia sercowego w czasie rozwoju osobniczego oraz w odpowiedzi na bodźce patologiczne tłumaczono więc wyłącznie jako przerost kardiomiocytów i zwiększoną syntezę substancji pozakomórkowej tkanki łącznej. Dane o zachowanej zdolności kardiomiocytów do podziałów mitotycznych nie tylko w życiu płodowym i bezpośrednio po urodzeniu, ale także u dorosłych ludzi całkowicie zmieniły poglądy na biologię serca. Nastąpiła zmiana paradygmatu – zarzucono pogląd o braku zdolności serca do regeneracji i zaakceptowano model serca jako narządu o powolnym, ale zachowanym przez całe życie potencjale regeneracyjnym. Zwiększenie masy mięśnia sercowego po urodzeniu u myszy przebiega w dwóch etapach – w rozwoju płodowym i w pierwszych 4-7 dniach życia dominuje proliferacja kardiomiocytów, a następnie liczba podziałów komórkowych zmniejsza się i przeważa ich przerost. U ludzi zdolność kardiomiocytów do proliferacji jest zachowana przez pierwsze 3-6 miesięcy życia [1, 2].

Badania zespołu Piero Anversy dostarczyły dowodów na obecność dzielących się kardiomiocytów w sercach pacjentów z kardiomiopatią niedokrwienną i idiopatyczną, a także, co istotne, u zdrowych osób. Oceniono, że indeks mitotyczny dla kardiomiocytów uzyskanych od grupy kontrolnej – osób bez kardiomiopatii – wynosi $14/10^6$ komórek i zwiększa się ok. 10-krotnie u pacjentów z kardiomiopatią [3, 4]. Niedawno opublikowane przez Kajsturę i wsp. wyniki badań nad obrotem komórkowym w sercach dorosłych ludzi wykazały, że wymiana kardiomiocytów zachodzi sprawniej u kobiet niż u mężczyzn i zależy od wieku. Można wyliczyć, że wraz z wiekiem wymiana kardiomiocytów staje się coraz intensywniejsza, co odzwierciedla szybsze starzenie i apoptozę tych komórek.

Szacuje się, że między 20 a 80 rokiem życia całkowita liczba kardiomiocytów ulega 15-krotnej wymianie u kobiety oraz 11-krotnej u mężczyzny [5]. Kluczową rolę w obrocie komórkowym kardiomiocytów odgrywają rezydentne komórki macierzyste serca (cardiac stem cells, CSC), które są zdolne do podziałów mitotycznych. Dotychczas wykazano obecność CSC u człowieka, myszy, świni, kota, psa i szczura. W CSC wykryto ekspresję istotnych czynników transkrypcyjnych aktywnych w różnicowaniu kardiomiocytów, nie stwierdzono natomiast ekspresji pojawiających się na późniejszych etapach rozwoju białek strukturalnych kardiomiocytów. W sercu CSC znajdują się w niszach, które zapewniają mikrośrodowisko pozwalające na zachowanie równowagi między apoptozą, różnicowaniem, proliferacją a samoodnową, która zachodzi w mechanizmie symetrycznych i asymetrycznych podziałów komórkowych. Rozmieszczenie skupisk CSC wydaje się zależeć od obciążenia mechanicznego danego segmentu mięśnia sercowego i jest odwrotnie proporcjonalne do obciążenia hemodynamicznego. Liczba CSC różni się w zależności od przyjętej metodyki i definicji i w większości badań została określona na 1 komórkę na 8000-20 000 kardiomiocytów lub 32 000-80 000 wszystkich komórek serca [6]. Wydaje się, że najwłaściwszym sposobem opisu CSC jest uwzględnienie ich interakcji z innymi komórkami tworzącymi niszę. Wykazano obecność białek tworzących połączenia międzykomórkowe (koneksyny, kadheryny, integryny, β -kateniny) między CSC a kardiomiocytami i fibroblastami. Izolowane z serca CSC wykazują ekspresję koneksyny 43 i 45 oraz N-kadheryny i E-kadheryny. Ważną rolę spełniają również białka substancji pozakomórkowej tkanki łącznej (fibronektyna) i ich receptory obecne w błonie komórkowej CSC. Interakcje CSC oraz innych komórek tworzących niszę modulują los rezydentnych komórek macierzystych w różnych tkankach, czyli wybór pomiędzy różnicowaniem a samoodnową, np. na drodze zależnej od receptora Notch, białek nadrodziny BMP/TGF, kinaz JAK/STAT, białek sekrecyjnych Wnt i β -kateniny.

Nie ma zgodności co do markerów powierzchniowych pozwalających na identyfikację CSC. Większość badaczy identyfikuje je na podstawie ekspresji Sca-1, CD117, MDR1 lub czynnika transkrypcyjnego islet-1 w różnych kombinacjach oraz braku markerów liniowych (lin^{-}), CD45 oraz CD34. Wykazano, że CSC są małymi komórkami o dużym współczynniku wielkości jądra komórkowego do cytoplazmy, które są obecne w przedsionkach i komorach, z tym że ich liczba jest największa w przedsionkach i mięśniu lewej komory w okolicy koniuszka serca. CSC znajdują się w skupiskach pomiędzy zróżnicowanymi kardiomiocytami. CSC proliferują w hodowli przez ponad rok od izolacji utrzymując stabilny fenotyp. W modelu zawału serca podanie CSC w strefę okołozawałową prowadzi do poprawy funkcji skurczowej, zmniejszenia obszaru zawa-

łu i powstawania nowych kardiomiocytów oraz zwiększenia gęstości tętniczek i naczyń włosowatych [7].

Za prawidłową homeostazę kardiomiocytów w sercu młodych osobników odpowiadają wzajemnie równoważące się procesy apoptozy i proliferacji CSC. Chen i wsp. wykazali, że u młodych kotów w wieku 11-22 tygodni zwiększenie masy serca jest zarówno związane ze zwiększeniem wielkości, jak i liczby kardiomiocytów. W badanych sercach stwierdzono obecność populacji małych jednojądrzastych kardiomiocytów wykazujących zdolność do inkorporacji BrdU, obecność Ki-67, małą ekspresję genu p16INK4A oraz zwiększoną aktywność telomerazy, czyli cechy komórek młodych i proliferujących. Miocyty te wykazują ekspresję kanałów wapniowych typu T charakterystycznych dla proliferujących i różnicujących się komórek oraz cechy elektrofizjologiczne płodowych i noworodkowych kardiomiocytów. Źródłem kardiomiocytów powstających w sercu młodych osobników w fazie szybkiego wzrostu są prawdopodobnie obecne w nim CSC. Populacja kardiomiocytów jest, podobnie jak u myszy, heterogenna i składa się z współwystępujących małych komórek wykazujących zdolność do proliferacji, obecność długich telomerów i brak p16INK4A oraz dużych p16INK4A+, nieproliferujących kardiomiocytów z istotnie skróconymi telomerami. Wskazuje to na ciągłą proliferację kardiomiocytów, które zastępują stare, ulegające apoptozie komórki.

Cechą charakterystyczną dojrzewających i starzejących się ludzkich i zwierzęcych kardiomiocytów jest utrata potencjału proliferacyjnego, skrócenie telomerów oraz ekspresja białka p16INK4A, a także progresywne zwiększanie objętości komórek i osłabienie ich funkcji skurczowej i właściwości elektromechanicznych. Oczywistym problemem badawczym jest ustalenie czynników wpływających na liczbę i zdolność proliferacyjną kardiomiocytów w dorosłym sercu, co może mieć implikacje praktyczne. CSC syntetyzują czynniki wzrostu i wykazują ekspresję odpowiednich receptorów, co może tłumaczyć ich aktywację w uszkodzeniu mięśnia sercowego. Stwierdzono ekspresję insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1) i czynnika wzrostu hepatocytów (HGF), a także ich receptorów,

odpowiednio IGF-1R i c-Met w ludzkich sercach. Oba czynniki stymulują proliferację, migrację i hamują apoptozę CPC [8].

Przekonujące dane z badań doświadczalnych wskazują, że serce dorosłych osobników, w tym człowieka, jest narządem zdolnym do samoodnowy, podobnie jak skóra, nabłonek jelitowy i szpik kostny. Wykazano obecność replikacji, kariokinezy, cytokinezy oraz ognisk generacji nowych kardiomiocytów. Kluczowym zagadnieniem jest wyjaśnienie, dlaczego ten mechanizm naprawczy nie wystarcza do przywrócenia homeostazy kardiomiocytów po urazie niedokrwinnym w zawale serca. Być może mediatory stanu zapalnego uwalniane w obszarze uszkodzenia hamują procesy różnicowania CPC lub też regeneracja jest niewystarczająca w sytuacji martwicy dużej liczby komórek mięśniowych serca. CSC w zawale ulegają martwicy podobnie jak kardiomiocyty, co także może tłumaczyć brak odpowiedniej skuteczności endogennych mechanizmów naprawczych.

Piśmiennictwo

1. Anversa P, Kajstura J, Leri A, et al. Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 2006; 113: 1451-63.
2. Grajek S, Lesiak M, Pyda M, et al. Hypertrophy or hyperplasia in cardiac muscle. Post-mortem human morphometric study. *Eur Heart J* 1993; 14: 40-7.
3. Kajstura J, Leri A, Finato N, et al. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8801-5.
4. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750-7.
5. Kajstura J, Gurusamy N, Ogórek B, et al. Myocyte Turnover in the Aging Human Heart. *Circulation Research* 2010; 107: 1374-1386.
6. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005; 85: 1373-416.
7. Linke A, Muller P, Nurzynska D, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 8966-71.
8. Torella D, Rota M, Nurzynska D, et al. Cardiac stem cell and myocyte aging, heart failure, and insulin-like growth factor-1 overexpression. *Circ Res* 2004; 94: 514-24.