

Gensko obilježavanje i praćenje diferencijacije ljudskih kardiomiocita

Doc. dr. Filip Sedlić, dr. med.,
Dr. sc. Ana Šepac, dr. med.,

Katedra za patofiziologiju
Zavod za patologiju
Medicinski fakultet Zagreb

Srčano zatajivanje i regeneracija srca

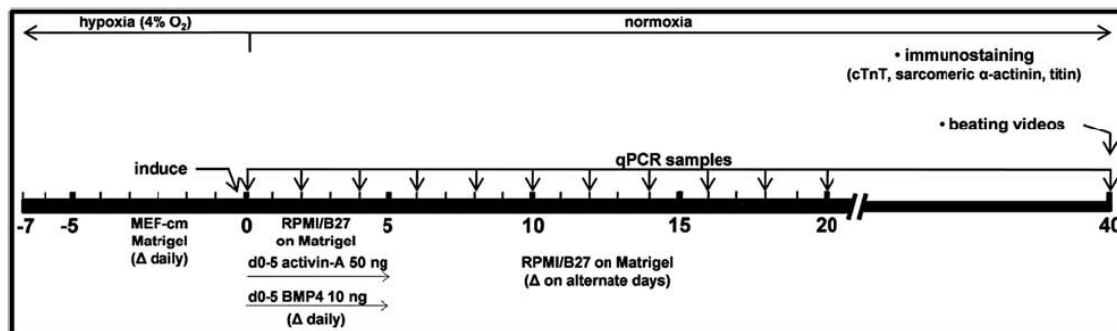
- Prema SZO-u 30% svih smrti u svijetu je uzrokovano kardiovaskularnim bolestima
- Prema *European Heart Network*-u godišnje umire 1.8 milijuna stanovnika EU od srčanih bolesti
- Unatoč impresivnim rezultatima prekliničkih studija (*Anversina grupa*), regeneracija srca matičnim stanicama u kliničkim studijama nije pokazala značajnije uspjehe

Srčano zatajivanje i regeneracija srca

- *1% kardiomiocita odraslih ljudi se obnovi godišnje proliferacijom samih kardiomiocita*
- *Regeneracija srca poticanjem diobe postojećih kardiomiocita je obećavajući pristup liječenja srčanog zatajivanja*
- *Značajna regeneracija srca u odraslih zebrica i neonatalnih miševa se odvija proliferacijom kardiomiocita*

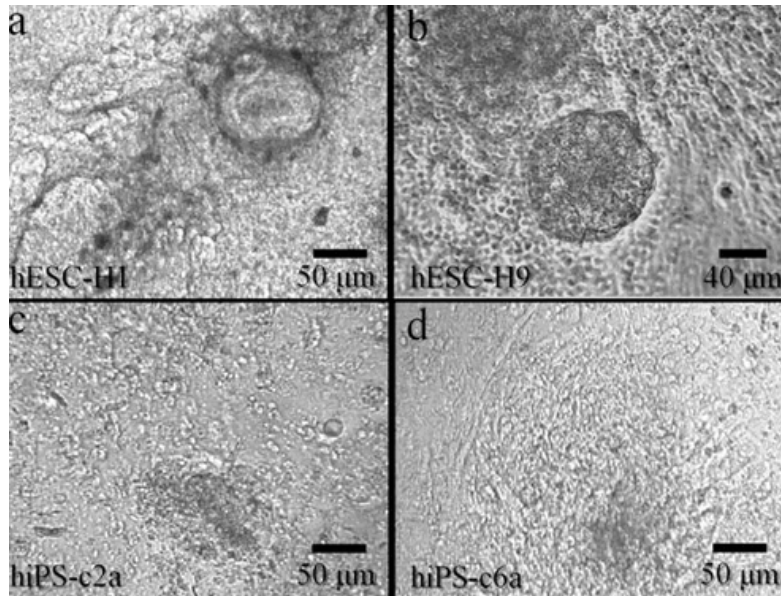
Diferencijacija kardiomiocita - *in vitro*

Usmjerena kardiomiogena diferencijacija se temelji na oponašanju signalizacije iz endoderma



Diferencijacija kardiomiocita - *in vitro*

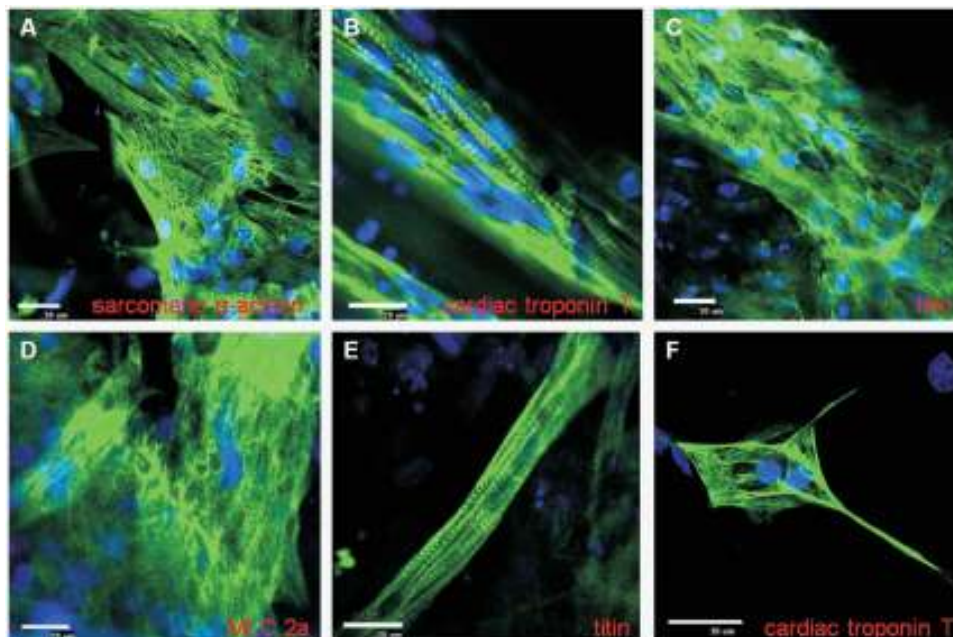
Spontano kucajuće strukture označavaju nazočnost kardiomiocita



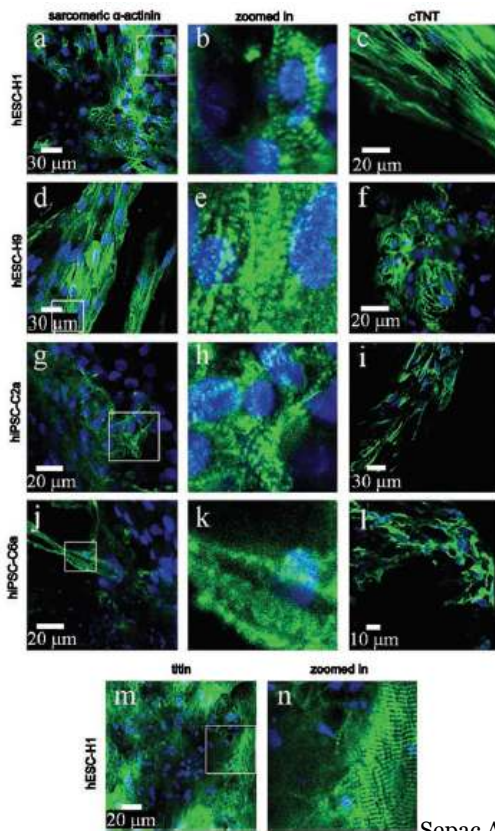
Video isječci prikazuju područja sa spontano kucajućim diferenciranim kardiomiocitima.

Sepac A, Si-Tayeb K, Sedlic F, et al. Cell Transplant. 2012;21(11):2523-30

Prikaz sarkomera u diferenciranim kardiomiocitima



Sepac A, Sedlic F, Anesthesiology. 2010 Oct;113(4):906-16.

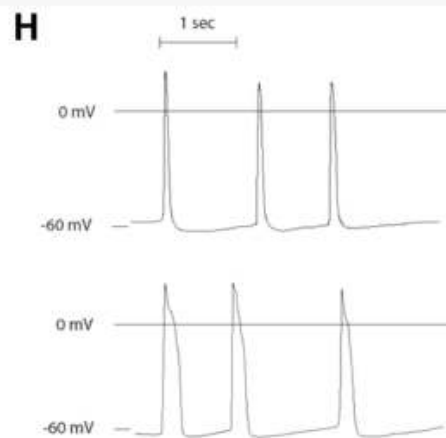
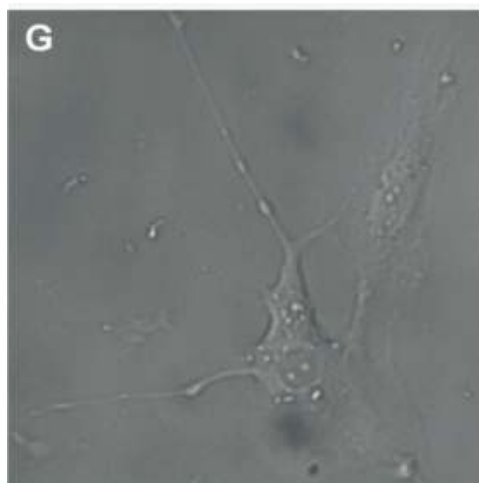


Prikaz sarkomera u diferenciranim kardiomiocitima

Sepac A, Si-Tayeb K, Sedlic F, et al. Cell Transplant. 2012;21(11):2523-30

Elektrofiziološka karakterizacija diferenciranih kardiomiocita

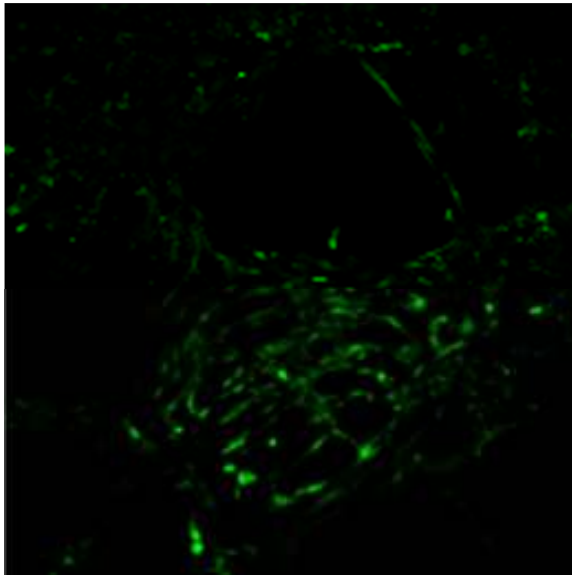
Kardiomiociti s kraćim akcijskim potencijalom-atrijski kardiomiociti s duljim akcijskim potencijalom-ventrikularni



Sepac A, Sedlic F, Anesthesiology. 2010 Oct;113(4):906-16.

Kucajući kardiomiociti pokazuju pravilne unutarstanične mijene kalcija

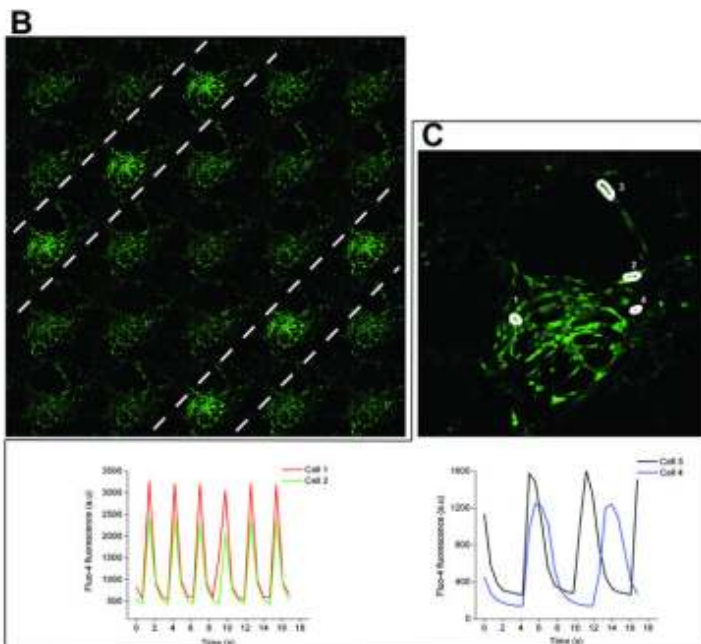
Sprega ekscitacije i kontrakcije



Video prikazuje nakupinu stanica kod kojih se pojavljuju ritmične mijene unutarstaničnog kalcija koje bi u srcu odgovarale sistoličkom utoku i dijasoličkom izlasku kalcija iz kardiomiocita. Sinkrone kalcijeve mijene upućuju na funkcionalni stanični sincicij.

Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, et al. BMC Dev Biol. 2010 Aug 3;10:81

Pravilne mijene kalcija odgovaraju prikazanim duljinama akcijskih potencijala 2 tipa kardiomiocita

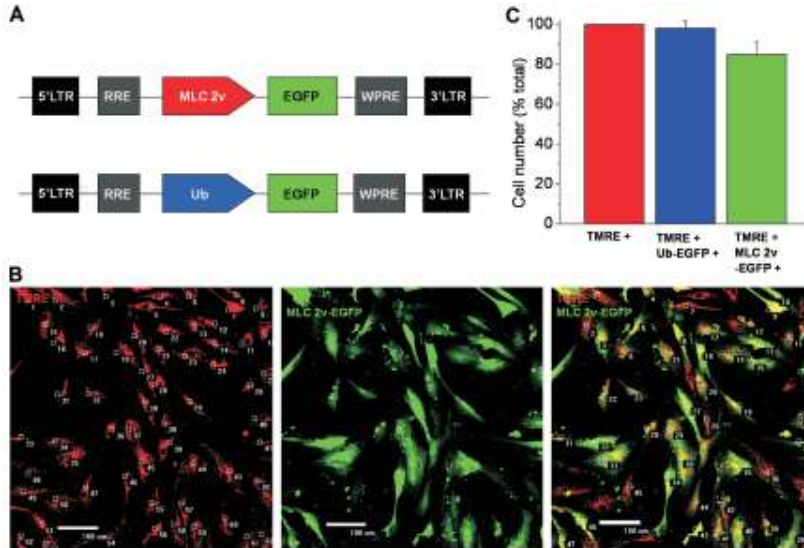


Kalcijeve mijene se javljaju u pravilnim vremenskim razmacima. Analiza pojedinih mijena pokazuje kraće i dulje trajanje porasta unutarstaničnog kalcija, što bi moglo odgovarati kraćim i duljim akcijskim potencijalima prikazanim ranije (faza 2 akcijskog potencijala).

Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, et al. BMC Dev Biol. 2010 Aug 3;10:81

Gensko obilježavanje živih kardiomiocita

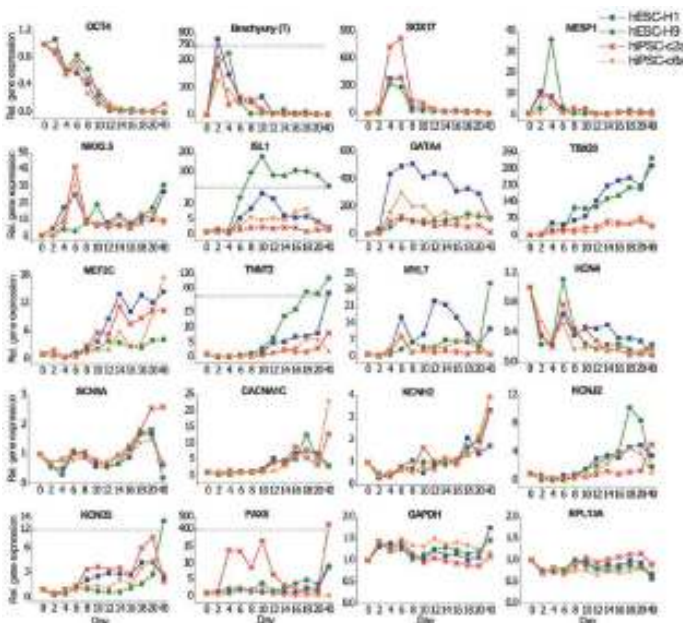
transdukcija lentivirusnog vektora s MLC2v-EGFP konstruktom



Lentivirusnim vektorom se prenosi MLC2v-EGFP genski konstrukt koji služi za obilježavanje živih kardiomiocita. Uspješnost transdukcije je 98% (UB-EGFP konstrukt), dok kardiomigeneza iznosi 85%.

Sepac A, Sedlic F, Anesthesiology. 2010 Oct;113(4):906-16.

Praćenje diferencijacije kardiomiocita genski markeri



Vremenski tijek diferencijacije se prati analizom izražaja gena kvantitativnim PCR-om. Indukcija kardiomiogene diferencijacije je praćena padom biljega pluripotentnosti (Oct4), prolaznim porastom mezodermalnog biljega (Brachyury), te naknadnim porastom ranih i kasnih biljega kardijalne diferencijacije (npr. MESP1 ili TBX20) kao i različitih podjedinica ionskih kanala u srcu.

Sepac A, Si-Tayeb K, Sedlic F, et al. Cell Transplant. 2012;21(11):2523-30

Zaključci

- Obilježavanje MLC2v-EGFP genskim konstruktom omogućava praćenje živih kardiomiocita
- Analiza izražaja panela gena omogućava određivanje stupnja diferencijacije srčanih stanica
- Ovi pristupi pružaju platformu za razvoj znanstvenih i dijagnostičkih pomagala koji će pratiti razvoj metoda za terapijsku regeneraciju srca u budućnosti

Zahvale

Prof. Zeljko J. Bosnjak
Prof. Martin Bienengraeber
Bosnjak's lab
Dr. Karim Si-Tayeb
Prof. John Lough
Prof. Steven Duncan
Medical College of Wisconsin

Prof. Zdenko Kovač
Prof. Sven Seiwert
Medicinski fakultet Zagreb

