

Zastosowanie inżynierii tkankowej w terapii regeneracyjnej mięśnia sercowego *Tissue engineering in regeneration therapy for the heart*

Łukasz A. Małek, Lidia Chojnowska, Witold Rużyłto

I Klinika Choroby Wieńcowej, Samodzielna Pracownia Hemodynamiki, Instytut Kardiologii, Warszawa

Post Kardiol Interw 2007; 3, 3 (9): 149-152

Słowa kluczowe: niewydolność serca, inżynieria tkankowa, komórki macierzyste, regeneracja, transplantacja

Key words: heart failure, tissue engineering, stem cells, regeneration, transplantation

Wstęp

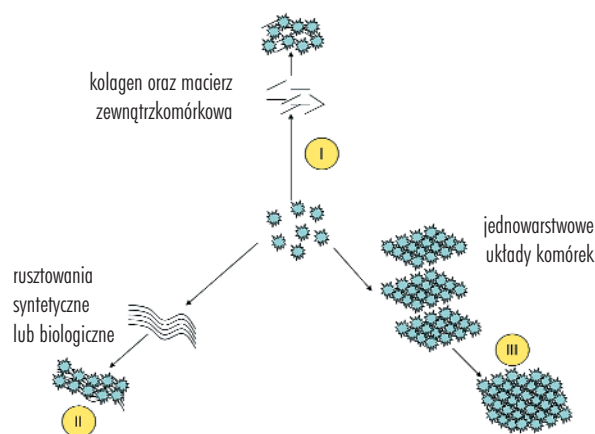
Wprowadzenie nowoczesnego leczenia choroby wieńcowej za pomocą farmakoterapii i zabiegów inwazyjnych na tętnicach wieńcowych doprowadziło z jednej strony do wzrostu przeżywalności osób cierpiących na tę chorobę, z drugiej – zwiększyło populację chorych z niewydolnością serca spowodowaną kardiomiopatią niedokrwinną (ICM). Są to chorzy po licznych incydentach wieńcowych lub niepomysłnym przebiegu ostrego zespołu wieńcowego (duży rozmiar zawału, brak reperfuzji lub niepełna reperfuzja). U tych osób endogenne mechanizmy regeneracyjne w niewystarczający sposób kompensują utratę mięśnia związaną z przebyłym zawałem. W zaawansowanej ICM lekarze często stają wobec problemu braku adekwatnej strategii terapeutycznej (tzw. *no-option*). Chorzy ci, mimo optymalnego leczenia farmakologicznego, najczęściej nie kwalifikują się do zabiegów inwazyjnych na naczyniach wieńcowych oraz do operacji kardiochirurgicznych. Jeśli uwzględnić też pacjentów ze schyłkową niewydolnością serca wynikającą z innych przyczyn (np. kardiomiopatii rozstrzeniowej), zrozumiałe jest, że liczba transplantacji serca zawsze będzie zbyt mała w stosunku do potrzeb. Wynika to przede wszystkim z niedoboru dawców. Koszt samego przeszczepu oraz związanych z nim hospitalizacji i konieczności przewlekłego przyjmowania leków immunosupresyjnych sprawia, że coraz więcej badaczy zastanawia się nad alternatywnymi rozwiązaniami terapeutycznymi. W ostatnich latach dokonano ogromny postęp w dziedzinie zastosowania komórek macierzystych podawanych dowieńcowo lub domięśniowo w terapii pozawałowej niewydolności serca [1]. Pojawiły się już pierwsze badania kliniczne, które po-

kazują, że zastosowanie takiej strategii wiąże się z poprawą rokowania pacjentów [2].

Poniższy artykuł stanowi próbę przedstawienia nowej metody terapeutycznej wykorzystującej dokonania inżynierii tkankowej. Zgodnie z definicją zaproponowaną przed laty przez *US National Science Foundation* (NSF) inżynieria tkankowa opiera się na zastosowaniu metod biotechnologii w celu poznania zależności między strukturą i funkcją zdrowych i objętych chorobą tkanek organizmu ludzkiego oraz na stworzeniu biologicznych substytutów, które przywrócą, utrzymają lub poprawią funkcję danego narządu [3]. W przeciwieństwie do terapii przy użyciu komórek macierzystych, która ma za zadanie doprowadzenie do powstania *in vivo* nowej tkanki i co za tym idzie – do poprawy czynności narządu, inżynieria tkankowa skupia się na stworzeniu w warunkach *in vitro* trójwymiarowych fragmentów tkanki lub całych narządów, które następnie zostają uformowane według potrzeb i implantowane do organizmu człowieka.

Pod koniec ubiegłego stulecia, w atmosferze kończących się badań nad pełnym poznaniem sekwencji genomu ludzkiego postulowano, że w ciągu 10 lat uda się wyhodować biologiczne sztuczne serce. Kolejne badania wykazały jednak, że proces ten może się okazać bardziej skomplikowany, niż przypuszczano. O ile w wypadku sztucznej skóry, chrząstek i pomostów naczyniowych opublikowano już pierwsze wyniki badań klinicznych, o tyle inżynieria tkanki mięśniowej serca (ang. *engineered heart tissue* – EHT) znajduje się nadal w fazie badań podstawowych i prób na zwierzętach. Mimo to kilka zespołów klinicznych ogłosiło, że w najbliższych latach rozpoczną się pierwsze badania kliniczne.

Adres do korespondencji/Corresponding author: lek. Łukasz A. Małek, I Klinika Choroby Wieńcowej, Samodzielna Pracownia Hemodynamiki, Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42, 04-628 Warszawa, tel. +48 22 343 42 67, faks +48 22 613 39 18, e-mail: lmalek@ikard.pl
Praca wpłynęła 31.07.2007, przyjęta do druku 21.08.2007.



Ryc. 1. Różne metody przygotowywania tkanki mięśnia sercowego. Niebieskie gwiazdki – kardiomiocyty. Szczegóły w tekście. Zmodyfikowano na podstawie Zimmermann WH i wsp. [5]

Fig. 1. Different methods of heart tissue engineering. Blue stars – cardiomyocytes. See text for details. Modified after Zimmermann WH et al. [5]

Historia inżynierii tkanki sercowej

Pierwsze doniesienia na temat inżynierii tkanki mięśniowej serca pochodzą z lat 50. poprzedniego stulecia, kiedy to Moscona i wsp. zauważyli, że komórki embrionalne serca kurczą w trakcie wirowania w probówkach Erlenmeyera tworząc skupiska złożone nawet z 200 komórek [4]. Podstawowym problemem było wówczas uzyskanie trwałości otrzymanych fragmentów tkanki, które, odrywając się od podłoża, traciły swoje właściwości mechaniczne. Stąd też kolejnym krokiem w procesie tworzenia EHT stało się wzmocnienie jednowarstwowych grup komórek przez dodanie kolagenu typu I [3, 5, 6]. Z czasem zauważono, że do prawidłowego wzrostu tkanki oraz nabywania przez nią funkcji tkanki mięśnia sercowego zdolnej do samoczynnego kurczenia się i przewodzenia impulsów elektrycznych potrzebna jest stała stymulacja oraz właściwy skład podłoża wzrostowego [7]. Do stymulacji komórek zaczęto stosować cyklicznie zmieniające się naprężenie mechaniczne, pole magnetyczne lub pole elektryczne. Tkanki hodowane w ten sposób cechowała większa zdolność proliferacyjna, bardziej zorganizowana struktura, a co za tym idzie – znacznie większa siła skurczowa w stosunku do tkanek hodowanych bez zastosowania stymulacji [8]. Kolejnym usprawnieniem procesu tworzenia EHT było wprowadzenie kolistych form, wokół których powstawała nowa tkanka, co znacznie podniosło wydajność procesu. Przez wiele lat dominującym podłożem wzrostowym była macierz zewnątrzkomórkowa pochodząca z guzów myszy (tzw. *matrigel*) zawierająca w swym składzie proteoglikany, lamininę, kolagen oraz czynniki wzrostu, które zapewniają wydajną proliferację komórek. Ze względu na jej potencjalną immunogenność w ostatnich latach zaczęto poszukiwać innych substancji (patrz dalej).

Z czasem rozpoczęto eksperymenty z nowymi metodami otrzymywania stabilnych fragmentów tkanki. Obok

opisanej uprzednio techniki mieszania komórek z kolagenem i macierzą zewnątrzkomórkową (I) pojawiły się dwie nowe: (II) osadzanie kardiomiocytów na przygotowanych w tym celu rusztowaniach biologicznych lub syntetycznych oraz (III) łączenie jednowarstwowych układów komórek w wielowarstwowe struktury [9, 10] (ryc. 1.).

Metody te zaczęły zyskiwać przewagę nad techniką klasyczną. Zastosowanie rusztowań wydawało się korzystne pod względem możliwości komputerowego projektowania pożądanego kształtu materiału i tym samym idealnego dopasowania fragmentów EHT do serca biorcy. Podanie komórek do rusztowania oraz stworzenie optymalnych warunków wzrostowych prowadziło do ich mnożenia i wypełnienia szkieletu. Niestety, niekorzystną stroną powyższego podejścia okazały się: ograniczona zdolność dyfuzji komórek i medium wzrostowego przez rusztowanie, niska wartość mechaniczna konstruktów, ryzyko uwalniania toksycznych substancji w trakcie rozkładu materiału rusztowania oraz brak kompatybilności tkanki z fizjologicznie wzrastającym narządem. Nieznaczny poprawę wydajności procesu uzyskano przy zastosowaniu mechanicznej perfuzji rusztowań za pomocą medium wzrostowego. W opublikowanych w ostatnich latach pracach wykazano, że trzecia metoda – mianowicie łączenie jednowarstwowych układów komórek w układy wielowarstwowe bez użycia rusztowań – prowadzi do powstania EHT o największej sile skurczowej, co może mieć kluczowe znaczenie przy próbach klinicznych. Jej niewątpliwą zaletą jest ponadto niezależenie od czynników immunogennych. Dotychczas dzięki tej technice stworzono trójwymiarowe fragmenty tkanki o grubości 50–75 μm .

Część badaczy próbuje wykorzystać samą macierz zewnątrzkomórkową wstrzykiwaną w postaci płynnej do mięśnia sercowego z nadzieją, że generowane przez nią sygnały doprowadzą do zasiedlenia miejsca iniekcji przez autologiczne komórki macierzyste i tym samym do powstania nowej tkanki. Przykładem tego typu postępowania jest użycie łąty z macierzy zewnątrzkomórkowej pęcherza moczowego wołu, mającej postać błony. Okazuje się, że wszycie takiej łąty psom z pełnościennym uszkodzeniem prawej komory prowadzi do poprawy regionalnej funkcji skurczowej i rozkurczowej w 8 tygodni po zabiegu. Łąta zostaje w tym okresie pokryta przez wysepki kardiomiocytów, powstałe z krążących komórek macierzystych szpiku lub w wyniku fuzji komórek macierzystych z komórkami obecnymi w łącie [11].

Problemy inżynierii tkanki mięśniowej serca

Zanim powstanie pierwsze biologiczne sztuczne serce, konieczne jest pokonanie kilku krytycznych przeszkód w samym procesie technologicznym, które warunkują przyszłość tego rodzaju terapii.

Źródło komórek. Głównym problemem w procesie tworzenia EHT jest uzyskanie odpowiedniej liczby komórek. Ocenia się bowiem, że lewa komora dorosłego człowieka zawiera około 40 milionów kardiomiocytów w 1 g tkanki.

Z drugiej strony wiadomo, że dojrzałe kardiomiocyty mają bardzo niewielką zdolność do mnożenia się. Dwa potencjalne źródła komórek to zatem komórki embrionalne (ES) oraz komórki macierzyste dorosłego człowieka obecne w szpiku, krwi obwodowej, tkance tłuszczowej lub też w sercu [3, 5, 6, 12]. Komórki embrionalne, aby mogły znaleźć zastosowanie w tworzeniu EHT, muszą spełniać kilka podstawowych warunków, do których należą pochodzenie allogeniczne, a nie ksenogeniczne, oraz zdolność do tworzenia kultur o dużej wielkości. Ponadto czynność skurczowa komórek powinna zachodzić w sposób umożliwiający przejęcie rytmu implantu przez ośrodki bodźcotwórcze serca biorcy. Należy także wykluczyć ryzyko niekontrolowanego wzrostu i nowotworzenia oraz uzyskać środowisko hodowlane wolne od surowicy. Istnieje co najmniej kilka źródeł pozyskiwania komórek embrionalnych. Podejście polegające na pobraniu komórek z wnętrza blastocyst wiąże się z koniecznością zniszczenia embrionu i wydaje się nie do zaakceptowania z powodów etycznie-prawnych [12]. Inne technologie umożliwiające zachowanie embrionu i obejmujące: biopsję pojedynczych blastomerów, transfer genetyczny genomu oocyta do komórek somatycznych, np. fibroblastów, pozyskiwanie ES ze spermatogoniów lub na drodze zabiegów partenogenezy. Ze względów etycznych i prawnych duże nadzieje wiąże się w ostatnim okresie nie z komórkami embrionalnymi, ale z uzyskiwanymi od osób dorosłych komórkami macierzystymi, które mogą zostać poddane odpowiednim modyfikacjom genetycznym.

Wielkość EHT. Kolejnym nierozwiązanym problemem dotyczącym EHT jest zagadnienie unaczynienia wyhodowanej tkanki [3, 5, 6]. Głównie z tego powodu nie udało się do tej pory otrzymać fragmentów mięśnia większych niż 50–75 μm . Dla EHT małej wielkości udowodniono, że odżywianie tkanki może zachodzić za pomocą dyfuzji. Przy większych EHT konieczne jest wbudowywanie w konstrukty natywnych naczyń lub stymulacja angiogenezy. Istnieją także dane, według których z czasem dochodzi do inwazji tkanek gospodarza do implantowanej tkanki. Pewne nadzieje wiąże się zatem z genetyczną modyfikacją kardiomiocytów tworzących EHT w celu zabezpieczenia ich przed niedotlenieniem i ochrony przed apoptozą do momentu przejścia odżywiania implantu przez naczynia biorcy [3].

W opublikowanym niedawno doniesieniu grupy izraelskiej uzyskano tkankę mięśnia sercowego z własnym unaczynieniem przez zastosowanie w procesie hodowli wszystkich trzech linii komórkowych: śródłonkowej, fibroblastów i kardiomiocytów [13]. Ciekawe podejście zaprezentowali naukowcy amerykańscy, którzy stworzyli warstwę tkanki z fibroblastów skóry, nadali im odpowiedni kształt przez zastosowanie cylindrów ze stali nierdzewnej i pozwolili rosnąć przez kilka tygodni. Po usunięciu cylindrów do środkowej powierzchni przyszłych naczyń podawano komórki śródłonka psów lub szczurów, z których powstawała błona wewnętrzna. Tak skonstruowane naczynia poddawane były następnie wzmocnieniu za pomocą perfuzji płynami pod ciśnieniem, które przygotowują je do implantacji.

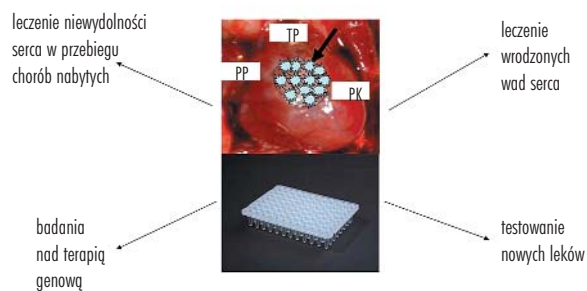
Siła skurczowa. Izolowane fragmenty mięśnia sercowego dorosłego człowieka osiągają siłę około 56 mN/mm². Wyników tych nie udało się powtórzyć w wypadku EHT, której siła oceniana jest na około 4–13 mN/mm² [3, 5]. Wy tłumaczeniem tej rozbieżności jest mniej zbita struktura EHT w stosunku do natywnego miokardium. Dzieje się tak, ponieważ spora część konstruktury zajęta jest przez elementy pozakomórkowe, które stanowią aż 70% całości. Przy omawianiu zagadnienia siły skurczowej należy pamiętać, że innym ważnym elementem jest odpowiednia podatność rozkurczowa tkanki. Tkanka EHT nie może być zatem ani zbyt plastyczna, ani zbyt sztywna. Optymalne parametry próbuje się uzyskać dzięki wykorzystaniu różnego rodzaju materiałów pełniących funkcję rusztowań, których struktura może przyjmować postać zarówno delikatnej siatki, jak i elastycznej formy. W tym celu stosuje się różnego rodzaju cząsteczki tworzące połączenia między proteoglikanami pełniącymi rolę szkieletu dla powstającej tkanki.

Implantacja. Nie do końca wiadomo także, jak przedstawia się przeżycia implantowanych kardiomiocytów, czy między EHT a natywnym miokardium dochodzi do parowania elektrycznego i mechanicznego oraz czy implantowane fragmenty tkanki wpływają w sposób istotny na funkcję serca [3, 5, 6]. Wykazano, że w samej EHT powstają połączenia międzykomórkowe, podczas gdy dane dotyczące podobnych zależności między tkanką implantowaną a miokardium są bardzo skąpe. W jednej z opublikowanych niedawno prac udowodniono, że łąta z EHT wszczepiona szczurom, u których wcześniej wywołano zawał, integruje się z tkanką gospodarza [14]. Co więcej, nie wykazuje ona właściwości proarytmogennych, charakterystycznych dla tkanki cechującej się spontaniczną czynnością elektryczną. U szczurów dochodzi zapewne do narzucenia implantowi rytmu zgodnego z szybkim u tych zwierząt rytmem serca przyjmującego implant. Czynność proarytmiczna może ujawnić się jednak u organizmów, których czynność serca jest wolniejsza, czyli między innymi u ludzi.

Reakcje immunogenne. Ważnym problemem pozostaje odpowiedź immunologiczna organizmu na EHT [3, 5, 12]. Stosowanie allogenicznych komórek stwarza konieczność przewlekłego leczenia immunosupresyjnego, które wiąże się z powikłaniami. Między innymi z tego względu korzystne wydaje się wykorzystanie komórek autologicznych w postaci komórek macierzystych czy też z komórek embrionalnych. Kolejnym czynnikiem o potencjalnie immunogennym działaniu są powszechnie używane media wzrostowe pochodzenia odzwierzęcego. W związku z tym rozpoczęto poszukiwania nowego środowiska wzrostowego dla EHT. Wśród czynników wzrostowych wymienia się między innymi czynniki wzrostu naskórka, hydrokortyzon, L-tyroksynę, albuminy, selen czy też transferynę [15].

Potencjalne zastosowania kliniczne EHT w najbliższych latach

O ile stworzenie pełnego biologicznego serca będzie nieosiągalne w najbliższej przyszłości, o tyle kliniczne za-



Ryc. 2. Potencjalne możliwości zastosowania inżynierii tkankowej w leczeniu niewydolności serca

PP – prawy przedsionek, TP – tętnica płucna, PK – prawa komora. Szczegóły w tekście

Fig. 2. Potential application of tissue engineering in the treatment of heart failure

PP – right atrium, TP – pulmonary artery, PK – right ventricle. See text for details

stosowanie łąt z EHT wydaje się realne [16]. Są one tworzone przez połączenie mniejszych, pierścieniowatych fragmentów EHT w konstrukcję, który może zostać przyszyty do nasierdza. Szczególnym przykładem takiego rozwiązania jest możliwość użycia EHT w formie systemów wspomagających pracę komory serca (ang. *biological ventricular assist device* – BioVAD), które nazywane są dookoła serca jak worek [17]. W skład BioVAD może wchodzić nawet 15 milionów komórek. Doświadczenia z łątami z EHT u szczurów po sztucznie wywołanym zawale dowodzą, że zapobiegają one pozawałowej rozstrzeni komory, zmniejszają objętość końcoworozkurczową lewej komory, a także poprawiają parametry rozkurczowe serca, co potwierdzono w badaniu echokardiograficznym i rezonansu magnetycznego [14] (ryc. 2.).

Kolejną korzyścią wynikającą z wyhodowania EHT naśladującej natywne miokardium jest możliwość wykorzystania jej do testowania nowych leków kardiologicznych, takich jak preparaty antyarytmiczne czy leki inotropowo dodatnie [3]. Trwają badania prowadzące do skonstruowania 96-studzienkowych płytek zawierających fragmenty serca powstałego z komórek macierzystych, które staną się modelem eksperymentalnym dla badań nad lekami. Co więcej, tkanki uzyskane metodami inżynierii mogą się stać w przyszłości polem do testowania nowych wektorów w terapii genowej czy też modelem do analizy zmian ekspresji poszczególnych genów kardiomiocytów.

Duże nadzieje wiąże się z zastosowaniem EHT w leczeniu niektórych wrodzonych wad serca, takich jak tetralogia Fallota oraz hipoplazja prawej lub lewej komory serca. Pierwsze próby kliniczne będą dotyczyć najprawdopodobniej wad obejmujących przede wszystkim niskociśnieniową komorę prawą. Idea tkanki rosnącej wraz z rozwijającym się sercem można także zmniejszyć obciążenie dzieci kolejnymi operacjami oraz ułatwić decyzje o wyborze strategii leczenia w najmłodszej grupie pacjentów [3].

Odrębną dyskusję wymagać będą zagadnienia związane z etyką i regulacjami prawnymi, dotyczącymi

ingerencji w materiał genetyczny człowieka oraz pochodzenia komórek, z których hodowana będzie EHT.

Podsumowanie

Obecnie badania nad biologicznym sztucznym sercem znajdują się na etapie tworzenia w pełni funkcjonalnej, unaczynionej tkanki mięśnia sercowego z materiału autologicznego zgodnie z zasadami dobrej praktyki klinicznej i dobrej praktyki laboratoryjnej oraz testowania przydatności i wartości terapeutycznej EHT na modelach zwierzęcych. Jednymi z większych trwających obecnie badań są projekt *BioEngineered Autologous Tissue* (BEAT) oraz *Living Implants from Engineering* (LIFE) [9]. Niektóre firmy koncentrują się na tworzeniu poszczególnych elementów przyszłego serca – zastawek, naczyń, ale uzyskanie skoordynowanego wzrostu poszczególnych części sztucznego biologicznego serca może być niezwykle trudne. Koncepcja wydaje się jednak bardzo ciekawa i warta zaangażowania dużych funduszy, gdyż sukcesy w tej dziedzinie będą kolejnym krokiem w kierunku przejścia od kardiologii z użyciem struktur mechanicznych (stentów metalowych, stymulatorów, sztucznych komór i zastawek) do kardiologii opartej na materiałach biologicznych (biodegradowalnych stentach, komórkach bodźcotwórczych, biologicznym sztucznym sercu).

Piśmiennictwo

1. Beeres SL, Bengel FM, Bartunek J i wsp. Role of imaging in cardiac stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 1137-1148.
2. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A i wsp. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1210-1221.
3. Eschenhagen T, Zimmermann WH. Engineering myocardial tissue. *Circ Res* 2005; 97: 1220-1231.
4. Mascona AA. Tissues from dissociated cells. *Sci Am* 1959; 200: 132-134.
5. Zimmermann WH, Didié M, Döker S i wsp. Heart muscle engineering: an update on cardiac muscle replacement therapy. *Cardiovasc Res* 2006; 71: 419-429.
6. Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P i wsp. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 2002; 90: 223-230.
7. Radšić M, Park H, Shing H i wsp. Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 18129-18134.
8. Akhryari P, Fedak PW, Weisel RD i wsp. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation* 2002; 106 (12 Suppl 1): 1137-1142.
9. Zandonella C. Tissue engineering: The beat goes on. *Nature* 2003; 421: 884-886.
10. Zimmermann WH, Melnychenko I, Echenhagen T. Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts. *Biomaterials* 2004; 25: 1639-1647.
11. Kochupura PV, Azeloglu EU, Kelly DJ i wsp. Tissue-engineered myocardial patch derived from extracellular matrix provides regional mechanical function. *Circulation* 2005; 112 (9 suppl): 1144-1149.
12. Zimmermann WH, Eschenhagen T. Embryonic stem cells for cardiac muscle engineering. *Trends Cardiovasc Med* 2007; 17: 134-140.
13. Caspi O, Lesman A, Basevitch Y i wsp. Tissue engineering of vascularized cardiac muscle from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2007; 100: 263-272.
14. Zimmermann WH, Melnychenko I, Wasmeier G i wsp. Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nat Med* 2006; 12: 452-458.
15. Naito H, Melnychenko I, Didié M i wsp. Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 2006; 114 (1 Suppl): 172-78.
16. Zimmermann WH, Didié M, Wasmeier GH i wsp. Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 2002; 106 (12 Suppl 1): 1151-1157.
17. Yıldırım Y, Naito H, Didié M i wsp. Development of a Biological Ventricular Assist Device (BioVAD): Preliminary Data from a Small Animal Model. *Circulation* 2007 (in press).