

**ACADEMIA ROMANA**  
**INSTITUTUL DE BIOLOGIE SI PATOLOGIE CELULARA**  
**“NICOLAE SIMIONESCU”**

# **TEZA DE DOCTORAT**

**TERAPIA CU CELULE STEM IN INFARCTUL DE MIOCARD:  
MECANISME SI SEMNALE MOLECULARE PRIN CARE  
CELULELE TRANSPLANTATE CONFERA  
CARDIOPROTECTIE IN ISCHEMIE**

**CONDUCATOR STIINTIFIC**  
**Acad. MAYA SIMIONESCU**

**DOCTORAND**  
**MIHAI BOGDAN PREDA**

**BUCURESTI**

**2013**

# CUPRINS

<b>CUVANT INAINTE</b> .....	1
<b>LISTA ABREVIERILOR</b> .....	2
<b>I. STADIUL ACTUAL AL CUNOSTINTELOR</b>	
<b>I.1. Mecanismele celulare si moleculare implicate in ischemia-reperfuzia cardiaca</b> .....	3
I.1.1. Infarctul miocardic acut .....	3
I.1.2. Etapele procesului reparator al leziunii de ischemie-reperfuzie cardiaca .....	6
I.1.3. Rolul matricei extracelulare cardiace in procesul reparator .....	6
I.1.4. Moartea celulara in timpul ischemiei-reperfuziei .....	10
<b>I.2. “Conditionarea” cardiaca –strategie terapeutica impotriva leziunii de ischemie-reperfuzie cardiaca</b> .....	12
I.2.1. Conditionarea ischemica .....	13
I.2.2. Postconditionarea ischemica .....	15
I.2.3. Perconditionarea ischemica indepartata .....	17
I.2.4. Preconditionarea ischemica .....	17
<b>I.3. Celulele stem si potentialul lor terapeutic in boala cardiaca ischemica</b> .....	19
I.3.1. Scurt istoric al descoperirii celulelor stem .....	19
I.3.2. Celulele stem embrionare .....	21
I.3.3. Potentialul celulelor stem embrionare de a genera cardiomiocite .....	25
I.3.4. Celulele stem adulte .....	30
I.3.4. Celulele stem mezenchimale (CSM) .....	34
I.3.5. Potentialul celulelor stem mezenchimale de a genera cardiomiocite .....	38
<b>II. CONTRIBUTII ORIGINALE</b>	
<b>II. 1. Stabilirea modelului experimental de ischemie femurala la soarece</b> .....	41
II.1.1 Introducere si obiective .....	41
II.1.2 Materiale si metode .....	42
II.1.3 Rezultate si discutii .....	45
II.1.4 Concluzii .....	47
<b>II.2. Stabilirea modelului experimental de ischemie-reperfuzie miocardica la soarece</b> .....	47

II.2.1. Introducere si obiective .....	47
II.2.2. Materiale si metode .....	49
II.2.3. Rezultate si discutii .....	52
II.2.4. Concluzii .....	56
<b>II.3. Modificari induse de ischemie-reperfuzie in miocardul de soarece .....</b>	<b>58</b>
II.3.1. Introducere si obiective .....	58
II.3.2. Materiale si metode .....	59
II.3.3. Rezultate si discutii .....	63
II.3.4. Concluzii .....	66
<b>II.4. Efectul ischemiei asupra functiei cardiace a inimii perfuzate ex vivo in sistem Langendorff .....</b>	<b>68</b>
II.4.1. Introducere si obiective .....	68
II.4.2. Materiale si metode .....	69
II.4.3. Rezultate si discutii .....	72
II.4.4. Concluzii .....	75
<b>II.5. Derivarea celulelor stem embrionare de soarece .....</b>	<b>75</b>
II.5.1. Introducere si obiective .....	75
II.5.2. Materiale si metode .....	77
II.5.3. Rezultate si discutii .....	81
II.5.4. Concluzii .....	87
<b>II.6. Conditii de agregare ale celulelor stem embrionare influenteaza eficienta acestora de a genera cardiomiocite contractile in vitro .....</b>	<b>88</b>
II.6.1. Introducere si obiective .....	88
II.6.2. Materiale si metode .....	89
II.6.3. Rezultate si discutii .....	91
II.6.4. Concluzii .....	95
<b>II.7. Stimularea regenerarii cardiace prin combinarea factorilor secretati de celulele stem mezenchimale si celulele endoteliale progenitoare .....</b>	<b>97</b>
II.7.1. Introducere si obiective .....	97
II.7.2. Materiale si metode .....	98
II.7.3. Rezultate si discutii .....	103

II.7.4. Concluzii .....	112
<b>II.8. Transplantul subcutan al celulelor stem mezenchimale derivate din tesutul adipos protejeaza inima impotriva leziunii de ischemie-reperfuzie .....</b>	<b>114</b>
II.8.1. Introducere si obiective .....	114
II.8.2. Materiale si metode .....	116
II.8.3. Rezultate si discutii .....	120
II.8.4. Concluzii .....	128
<b>III. CONCLUZII GENERALE .....</b>	<b>131</b>
<b>IV. BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>135</b>
<b>V. LISTA LUCRARILOR PUBLICATE .....</b>	<b>158</b>
<b>VI. FINANTAREA CERCETARILOR .....</b>	<b>161</b>

**CUVINTE CHEIE:** boala cardiovasculara, ischemie-reperfuzie cardiaca, artera coronara stanga, celule stem embrionare, corpi embrioizi, celule stem mezenchimale, terapie la distanta.

## REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Bolile cardiovasculare reprezinta principala cauza a mortalitatii din intreaga lume iar una dintre manifestari clinice cele mai importante ale acestora o reprezinta boala cardiaca ischemica. Aceasta conditie patologica a inimii este caracterizata prin reducerea fluxului coronarian intr-o anumita regiune a inimii, ceea ce are ca rezultat aparitia infarctului miocardic reprezentat de necroza datorata ischemiei cardiace. Dezvoltarea insuficientei cardiace dupa un infarct miocardic este in stransa legatura cu alterarile induse in geometria, functia si structura cardiaca, reunite sub numele de "remodelare ventriculara".

Tratamentul actual al insuficientei cardiace poate doar imbunatati simptomatologia, dar nu poate reversa pierderea tesutului miocardic prin inlocuirea celulelor moarte cu cardiomiocite (CMC) noi, contractile. Singura alternativa actuala pentru cele mai severe manifestari patologice ale insuficientei cardiace ramane transplantul de inima, inasa aceasta interventie terapeutica este limitata, nu doar din cauza costurilor foarte mari pe care le implica, ci si datorita indisponibilitatii donatorilor.

In aceste conditii, terapia cu celule stem a adus o speranta in cardiologie pentru tratamentul infarctului miocardic, dar si al insuficientei cardiace, motivata fiind de rezultatele pre-clinice incurajatoare obtinute in ultimii 10 ani. Aceste rezultate experimentale au determinat initierea primelor trialuri clinice, inasa efectul lor s-a dovedit pana in prezent cel mult modest, aratand o imbunatatire a fractiei de ejectie a ventriculului stang de numai 2-4%. Mai mult, unele trialuri au aratat ca nu exista diferente semnificative pe termen lung intre functia unui miocard infarctizat cu transplant celular si fara. Explicatia a fost data de faptul ca celulele transplantate sunt slab retinute in inima infarctizata si ca majoritatea lor mor dupa transplantare. Astfel, a fost avansata ipoteza ca imbunatatirea cardiaca nu este datorata regenerarii miocardului, ci biomoleculelor secretate de celulele stem, care pot ajuta pentru o perioada de timp procesul de remodelare. Aceste concluzii au dus la reconsiderarea observatiilor anterioare in domeniul celulelor stem si au impus necesitatea dezvoltarii de noi strategii pentru imbunatatirea supravietuirii, grefarii si diferentierii celulelor dupa transplantare.

Principalele tipuri de celule stem considerate ca optiuni in terapia regenerativa a infarctului de miocard sunt celulele stem embrionare (CSE) si celulele stem adulte (CSA). CSE, generate din masa celulara interna a blastocistului inainte de implantare, sunt celule pluripotente,

capabile sa se diferentieze in derivati din toate cele trei straturi germinale: ectoderm, endoderm si mezoderm. Ele pot fi mentinute in stare nediferentiata prin cultivare in conditii specifice. Cand aceste conditii sunt eliminate, CSE se diferentiaza, putand fi manipulate pentru directionarea lor spre CMC. CMC generate din aceste celule au insa un fenotip imatur, ceea ce le face inutilizabile in terapia clinica in acest moment.

CSA sunt definite ca celule stem/progenitoare care raman intr-un organism dupa dezvoltarea embrionara. Printre acestea, celulele stem mezenchimale (CSM) sunt celule multipotente izolate din maduva osoasa si alte tesuturi adulte, care pot da nastere la linii adipocitare, osteoblaste si condrogenice si, cu o eficienta mai scazuta, la neuroni, CMC, celule beta-pancreatice sau hepatice. Un alt tip de CSA il reprezinta celulele progenitoare endoteliale (CPE), celule hematopoietice izolate din maduva osoasa sau circulatia periferica. Desi se pare ca nu se diferentiaza in CMC, CPE ajuta la regenerarea miocardica prin promovarea angiogenezei si furnizarea de semnale paracrine protectoare pentru CMC.

Lucrarea de fata este structurata in doua capitole importante. Astfel, prima parte prezinta succint stadiul actual al cunostintelor, fiind organizata in 3 subcapitole: (i) Mecanisme celulare si moleculare implicate in ischemia-reperfuzia cardiaca; (ii) "Conditionarea" cardiaca – o noua strategie terapeutica impotriva leziunii de ischemie-reperfuzie cardiaca; si (iii) Celulele stem si potentialul lor terapeutic in boala cardiaca ischemica. Partea a doua a tezei ("Contributii originale") prezinta aportul acestei lucrari la imbogatirea cunostintelor din domeniul celulelor stem, fiind organizata pe 8 subcapitole. Aceste subcapitole prezinta standardizarea si imbunatatirea modelelor experimentale utilizate (obtinerea de noi linii de celule stem embrionare si adulte si modelele experimentale de ischemie-reperfuzie miocardica in vivo, ex vivo si in vitro) si rezultatele obtinute pe aceste modele, rezultate publicate (sau in curs de publicare) in reviste internationale in domeniu.

O preocupare constanta de-a lungul intregii perioade de doctorat a constituit-o cresterea eficientei de diferentiere in vitro a celulelor stem in CMC contractile si exploatarea proprietatilor celulelor stem pentru imbunatatirea structurala si functionala a miocardului infarctizat. In acest sens, in prima parte studiile s-au concentrat pe derivarea de linii de CSE si obtinerea unui randament cat mai bun al diferentierii lor in CMC. Rezultatele obtinute au aratat ca diferentierea in vitro a CSE obtinute din linia de soareci RAP (pentru prima data raportate in literatura) in celule cardiace contractile este dependenta de numarul initial de celule stem utilizate si de gradul

de compactare al acestora la nivelul corpurilor embrioizi (EB). Inlocuirea serului fetal (cel mai frecvent utilizat pentru diferentierea in vitro a acestor celule) cu KO-SR (Knock-Out Serum Replacement) in timpul agregarii EB are ca rezultat imbunatatirea diferentierii CSE in CMC, prin cresterea procentului de EB contractili generati. Luand in considerare aceste aspecte, initierea agregarii CSE in prezenta de KO-SR poate fi importanta pentru decizia de diferentiere a CSE in CMC si pentru imbunatatirea gradului de diferentiere cardiogenica a EB.

In ceea ce priveste studiile realizate pe celule stem adulte, acestea s-au axat in principal pe analiza capacitatii CSM de a induce regenerarea miocardica in conditii de ischemie-reperfuzie. Pentru aceste studii, au fost standardizate cateva modele experimentale de ischemie-reperfuzie si anume: modelul experimental de ischemie *in vivo* (soarece cu ischemie-reperfuzie miocardica, obtinut prin ligaturarea tranzienta a arterei coronare stangi), modelul de ischemie-reperfuzie cardiaca *ex vivo* in sistem Langerdorff si modele de ischemie-reperfuzie *in vitro* prin incubarea sectiunilor de miocard (fetal, neonatal si adult) in conditii de ischemie (prezenta unui tampon ischemic, ce mimeaza din punct de vedere chimic ischemia si atmosfera de 1% O<sub>2</sub>). Principalele rezultate originale obtinute prin studiile efectuate pe aceste modele au aratat ca:

1. Atat miocardul fetal, cat si cel adult, este afectat de ischemie, fapt ilustrat atat prin scaderea viabilitatii tisulare dupa o ora de ischemie, cat si prin valorile scazute ale enzimei ERK1/2 fosforilate. Cu toate ca miocardul fetal raspunde la ischemie prin manifestarile generale ale tesuturilor ischemice (cresterea valorilor de SDF si VEGF secretate in mediul de cultura), el este mult mai rezistent la reperfuzia post-ischemica, fapt demonstrat prin revenirea la valorile initiale dupa o zi de reperfuzie. In plus, miocardul fetal nu raspunde la ischemie prin formare de tesut cicatrizant, dimpotriva valorile TGF $\beta$  scad in ischemie-reperfuzie. Spre deosebire de miocardul fetal, miocardul adult raspunde la ischemie prin scaderea nivelelor de CGL si formare de tesut cicatrizant (ilustrat prin cresterea nivelelor de TGF $\beta$ , atat in supernatant, cat si la nivel de mRNA). Reperfuzia induce raspuns inflamator (cresterea de IL-6 dupa 1 ora de reperfuzie post-ischemica), ca si cresteri ale nivelelor de HGF si c-Met, implicate in reparare.

2. Atat in conditii normoxice, cat si hipoxice, CSM si CPE au proprietati cardioprotectoare si de stimulare a angiogenezei, prin care pot contribui la regenerarea miocardului infarctizat. Nici una dintre aceste populatii, singura, nu poate insa sustine o angiogeneza eficienta, tradusa prin aderarea si proliferarea celulelor endoteliale (CE) in vitro. CSM au proprietatea de a promova migrarea si aderarea CE, insa nu pot sustine proliferarea lor

dupa aderare. Spre deosebire de CSM, CPE prezinta efecte complementare asupra angiogenezei, putand stimula proliferarea CE, dar nu si aderarea acestora la substrat. Combinarea factorilor secretati de aceste celule are un puternic efect pozitiv asupra comportamentului CE in vitro, ceea ce indica posibilitatea unei terapii eficiente de regenerare vasculara prin utilizarea simultana a mai multor populatii de celule stem/progenitoare.

3. Transplantul subcutan de CSM protejeaza miocardul de leziunea de ischemie-reperfuzie, reprezentand o posibila strategie terapeutica cu multiple aplicatii clinice. CSM implantate intr-o regiune indepartata de miocard ("remote transplantation"), printr-o metoda neinvaziva, prolifereaza, dar nu migreaza de la locul de injectare. Aceste celule produc si secreta sistemic o varietate de molecule cu rol paracrin, dintre care au fost identificate PTX3 si TSG-6 (proteine cu efecte cardioprotectoare), precum si o serie de citokine pro- (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) si anti-inflamatoare (IL-10, IL-1Rn), implicate in modularea procesului inflamator. Inimile izolate de la soareci astfel transplantati cu CSM prezinta o arie de infarct scazuta si o imbunatatire a functiei cardiace in urma ischemiei-reperfuziei, comparativ cu inimile izolate de la soareci netransplantati.

4. Ca un alt rezultat original, modelul de soarece cu ischemie-reperfuzie cardiaca demonstreaza importanta inregistrarii ECG pe parcursul interventiei chirurgicale de ligatura LCA, atat pentru validarea ligaturii, cat si a reperfuziei vasului. Fara a adauga nici un dezavantaj major in ceea ce priveste procedura, inregistrarea ECG ofera posibilitatea de validare obiectiva a ligaturarii (prin cresterea inaltimii segmentului ST si prelungirea segmentului QTc) si a reperfuziei vasului dupa eliberarea ligaturii (prin revenirea ECG la profilul normal), inlocuind astfel subiectivismul dat de observarea disparitiei culorii rosiiatice in regiunea ischemica a inimii. In plus, utilizarea electrocardiografei ofera informatii importante cu privire la severitatea modificarilor miocardului determinate de ischemie, demonstrandu-se o corelatie intre profilul ECG si modificarile histologice obtinute dupa ischemie-reperfuzie.

Rezultatele prezentate in aceasta lucrare descriu cateva aspecte importante ale mecanismelor si semnalelor moleculare implicate atat in patofiziologia ischemiei-reperfuziei cardiace, cat si in efectul transplantului cu celule stem asupra miocardului ischemic, contribuind astfel la progresul cercetarii fundamentale stiintifice in domeniul celulelor stem si al bolilor cardiovasculare.