

# Možnosti využití kardiomyocytů vytvořených z indukovaných pluripotentních kmenových buněk konkrétního pacienta v medicíně

Doc. MUDr. Markéta Bébarová, Ph.D.

*Fyziologický ústav*

*Lékařská fakulta*

*Masarykova univerzita*



# Úvod

## Lidské odvozené kardiomyocyty – Co je to?

- kardiomyocyty vytvořené z lidských pluripotentních kmenových buněk indukovaných z jiných diferencovaných buněk, obvykle z fibroblastů (kůže, moč)

# Úvod

## Lidské odvozené kardiomyocyty – Co je to?

- kardiomyocyty vytvořené z lidských pluripotentních kmenových buněk indukovaných z jiných diferencovaných buněk, obvykle z fibroblastů (kůže, moč)

## Nejvhodnější buněčný model ke studiu lidských chorob!

- **výhody**
  - neomezený zdroj jakýchkoliv specializovaných buněk
  - modelování srdečních (i jiných) geneticky podmíněných chorob v kultivační misce
  - umožňují charakterizovat biologické mechanismy, které jsou podkladem lidských chorob
  - výkonný model pro personalizovaný skrínig léčiv

# Úvod

## Lidské odvozené kardiomyocyty – Co je to?

- kardiomyocyty vytvořené z lidských pluripotentních kmenových buněk indukovaných z jiných diferencovaných buněk, obvykle z fibroblastů (kůže, moč)

## Nejvhodnější buněčný model ke studiu lidských chorob!

- **výhody**
  - neomezený zdroj jakýchkoliv specializovaných buněk
- **nevýhody**
  - nezralé buňky, odlišný fenotyp od adultních buněk
  - lišící se buněčné charakteristiky díky různým diferenciačním protokolům užívaným v jednotlivých studiích
  - náklady

# Úvod

## Lidské odvozené kardiomyocyty – Historie

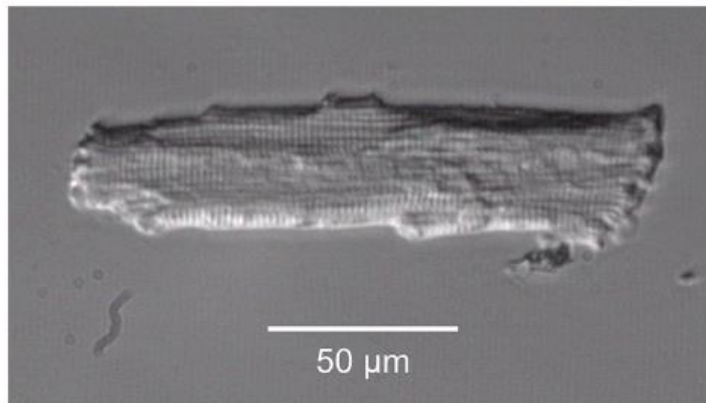
- **2006** – Takahashi a Yamanaka odhalili, jak reprogramovat diferencovanou buňku na pluripotentní (podobnou embryonálním kmenovým buňkám)
- **2009** – první popis kardiomyocytů odvozených z hiPSC (Zhang *et al.*)
- pokračovalo úsilí vyvinout protokol, který dá vzniknout velkému počtu kardiomyocytů odvozených z hiPSC (definované kultivační médium, specifické matrice, komerčně dostupná diferenciační média, ...)
- **v současnosti** k dispozici poměrně jednoduchý a chemicky definovaný **3-krokový protokol**, který dává vzniknout populaci buněk tvořené až z **80-90% kardiomyocyty**

# Úvod

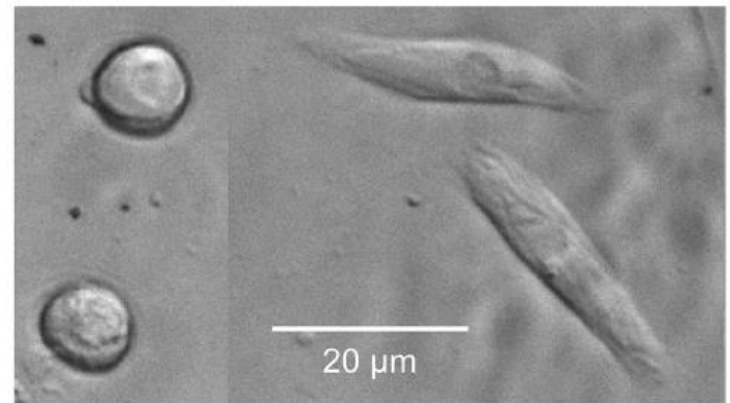
## Lidské odvozené kardiomyocyty – Zralost

- velmi důležitá pro následné využití buněk
- **obecně vykazují nezralé znaky** v:
  - morfologii
  - cytoskeletálních proteinech
  - organizaci  
(chybějící t-tubuly, dezorganizované sarkomery, nezralé hospodaření s  $\text{Ca}^{2+}$ )

dospělý lidský komorový KM



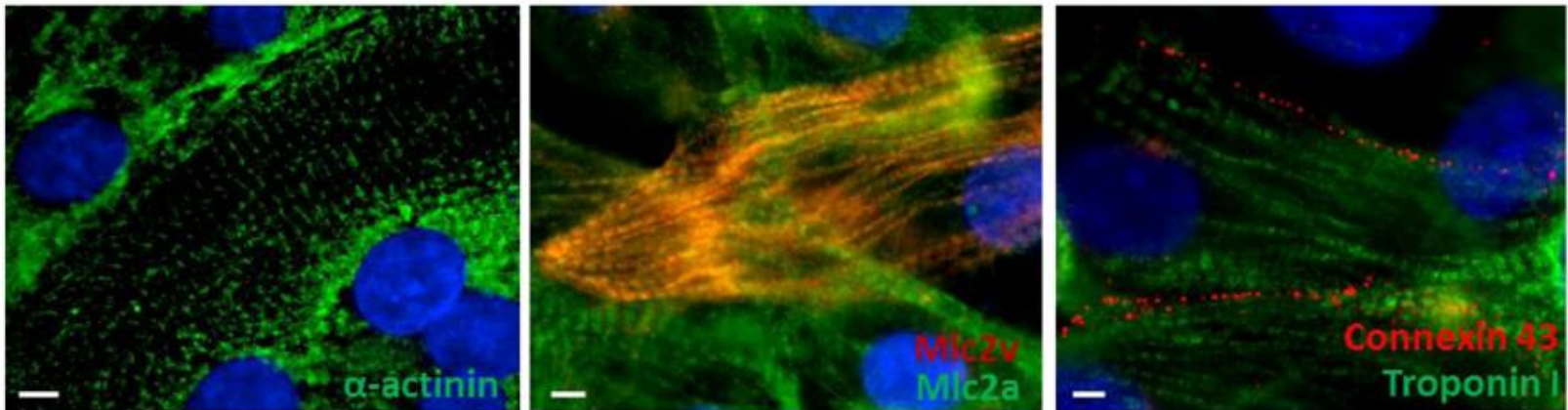
KM odvozený z hiPSC



Meijer van Putten *et al.*, *Front Physiol* 2015; 6: 7

# Úvod

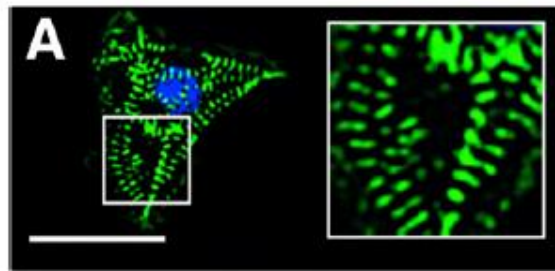
## Lidské odvozené kardiomyocyty – Struktura



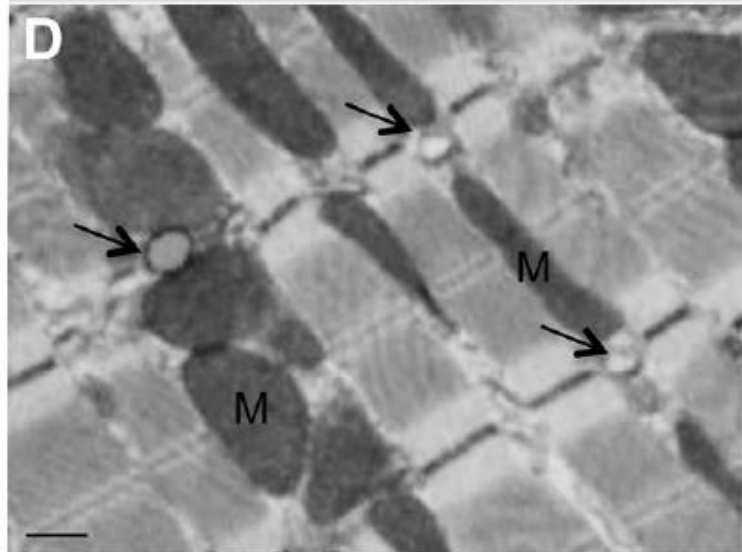
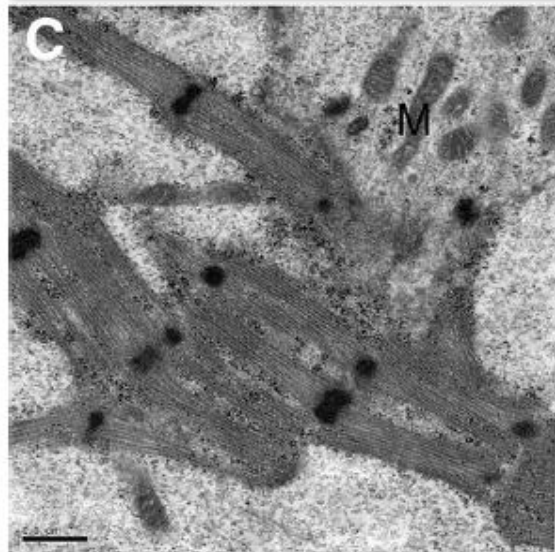
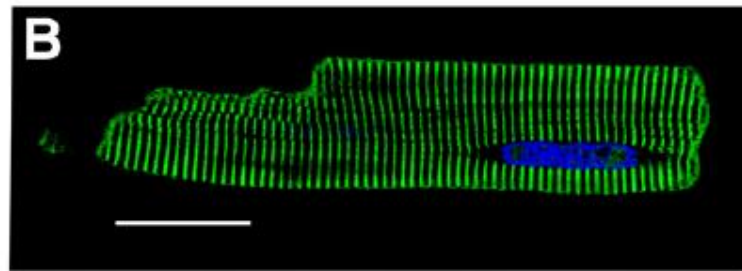
# Úvod

## Lidské odvozené kardiomyocyty – Struktura

KM odvozený z hiPSC



adultní KM potkana



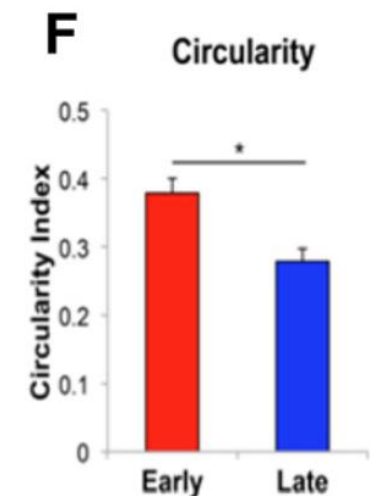
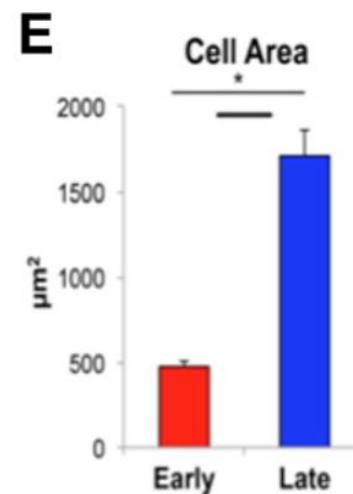
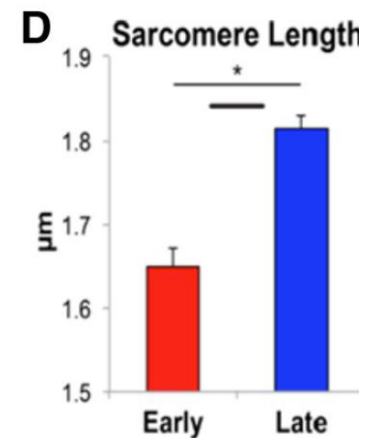
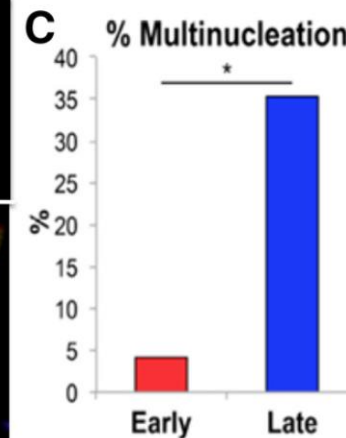
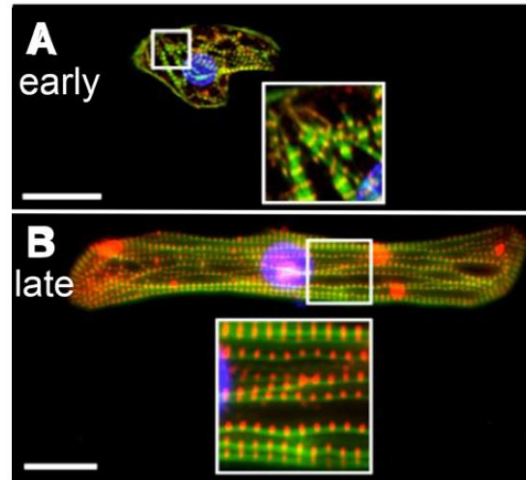


# Úvod

## Lidské odvozené kardiomyocyty – Struktura

časný KM  
odvozený  
z hiPSC

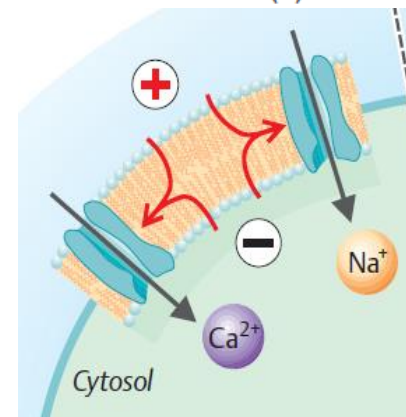
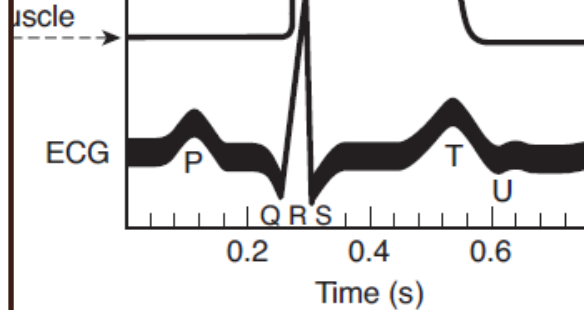
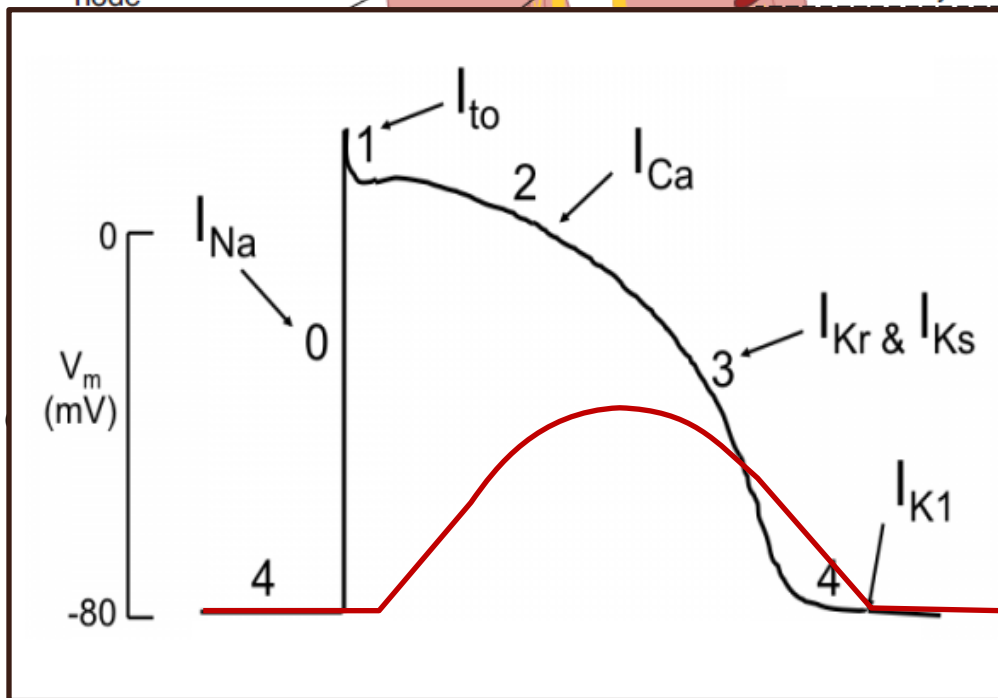
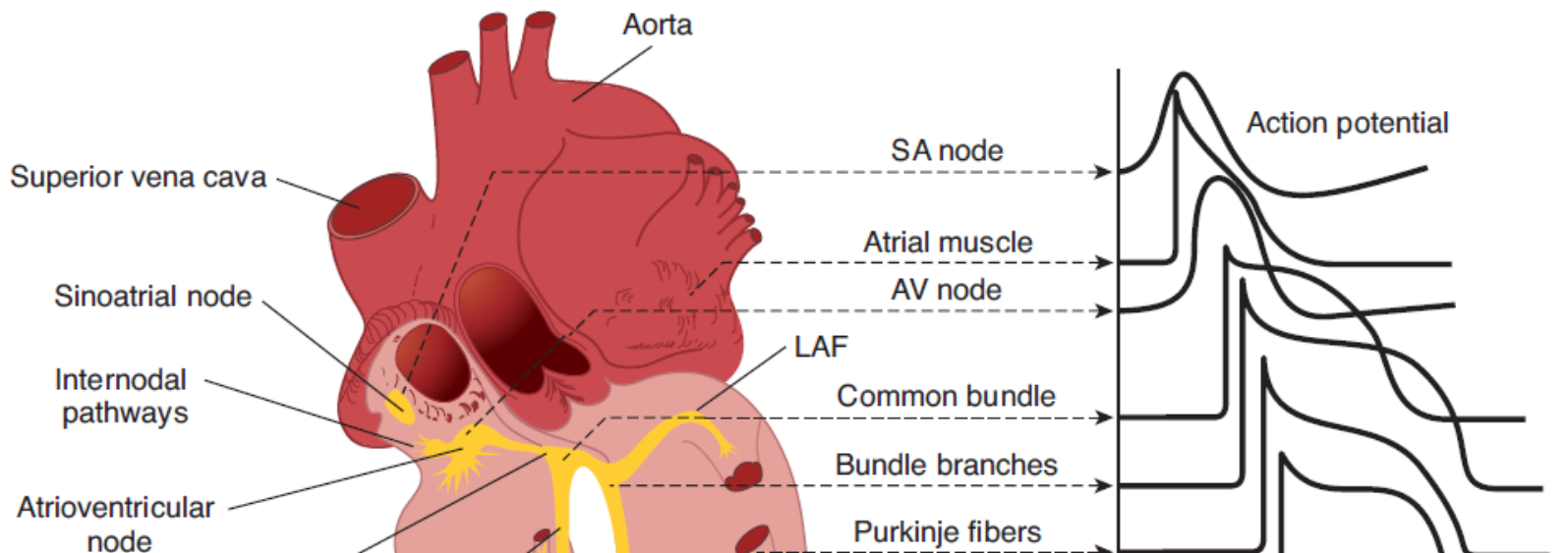
pozdní KM  
odvozený  
z hiPSC



# Úvod

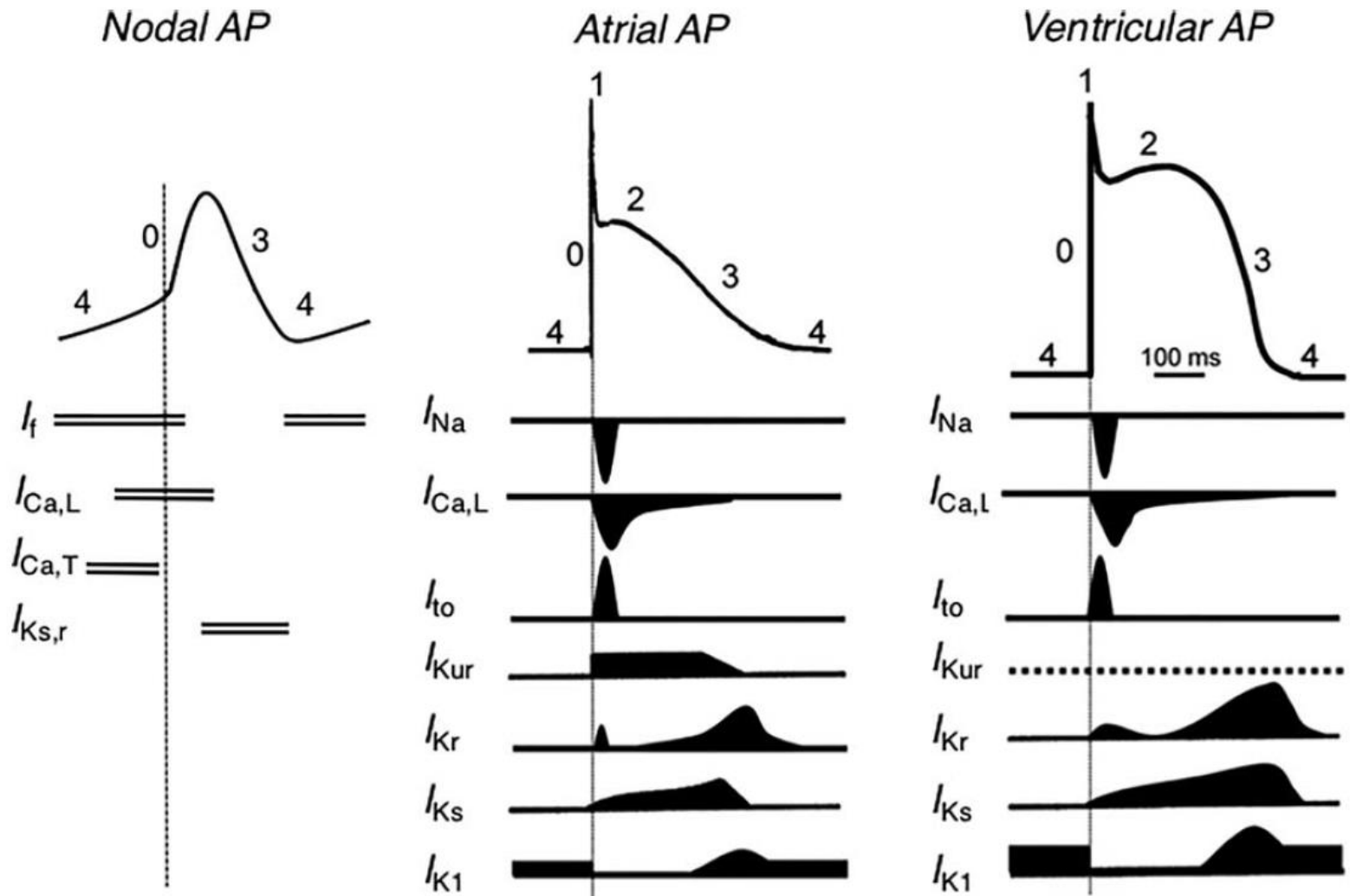
## Lidské odvozené kardiomyocyty – Zralost

- velmi důležitá pro následné využití buněk
- **obecně vykazují nezralé znaky** v:
  - morfologii
  - cytoskeletálních proteinech
  - organizaci  
(chybějící t-tubuly, dezorganizované sarkomery, nezralé hospodaření s  $\text{Ca}^{2+}$ )
  - exprese iontových kanálů



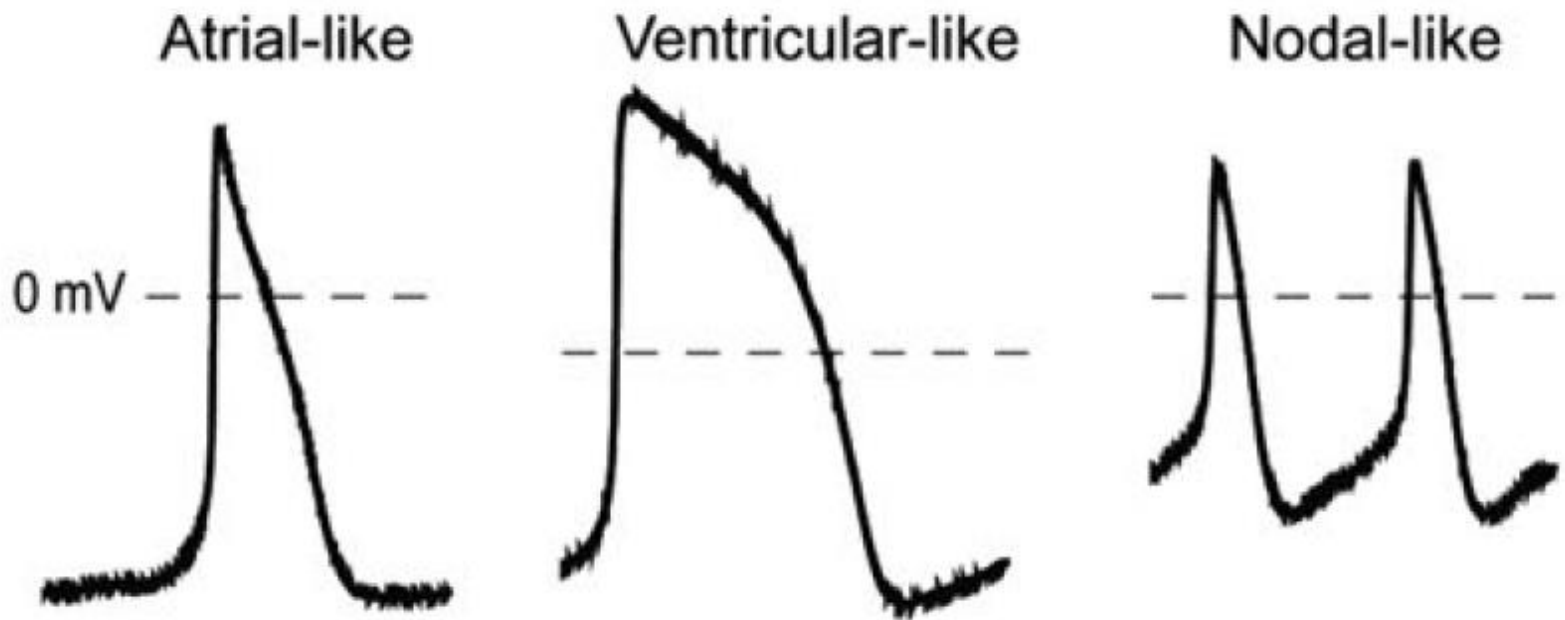
[http://tmedweb.tulane.edu/tmedwiki/doku.php/intro\\_to\\_the\\_heart\\_cardiac\\_electrophysiology](http://tmedweb.tulane.edu/tmedwiki/doku.php/intro_to_the_heart_cardiac_electrophysiology)

# Elektrofyzilogické charakteristiky srdečních buněk



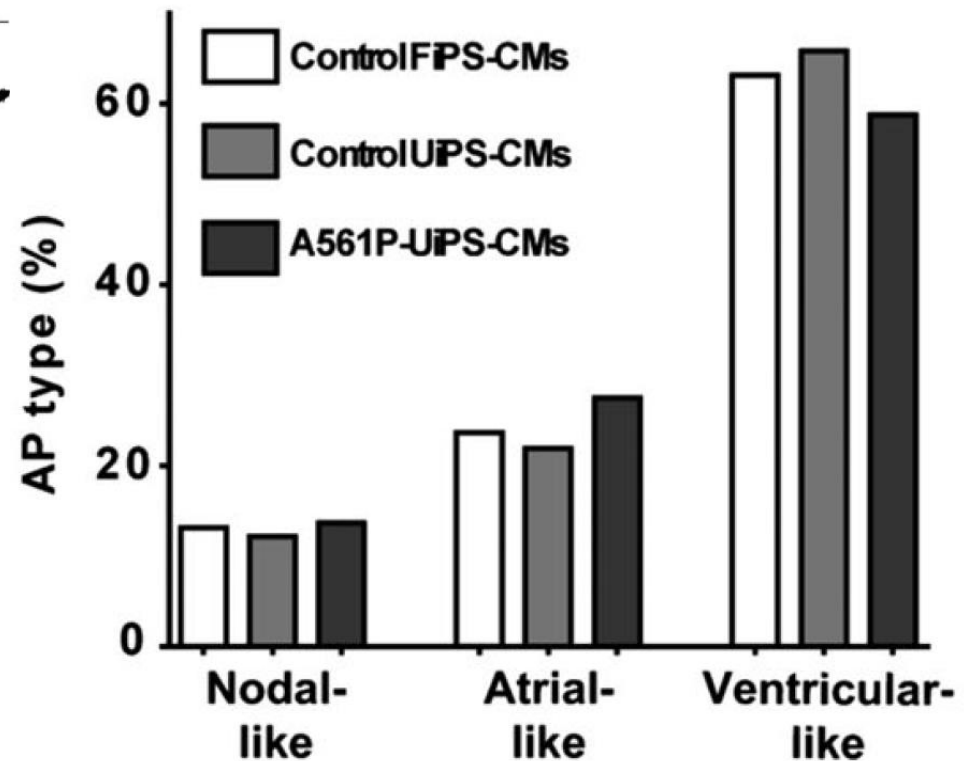
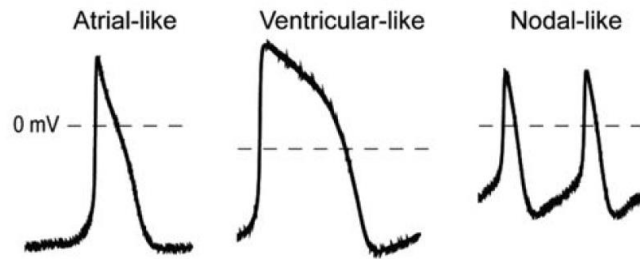
# Úvod

## Lidské odvozené kardiomyocyty – Funkce

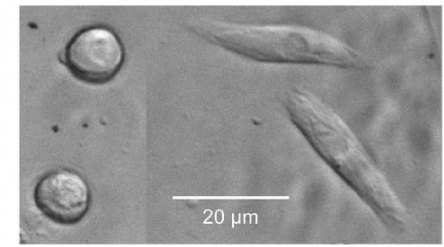
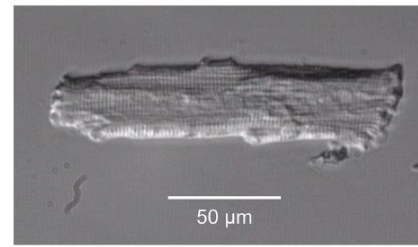


# Úvod

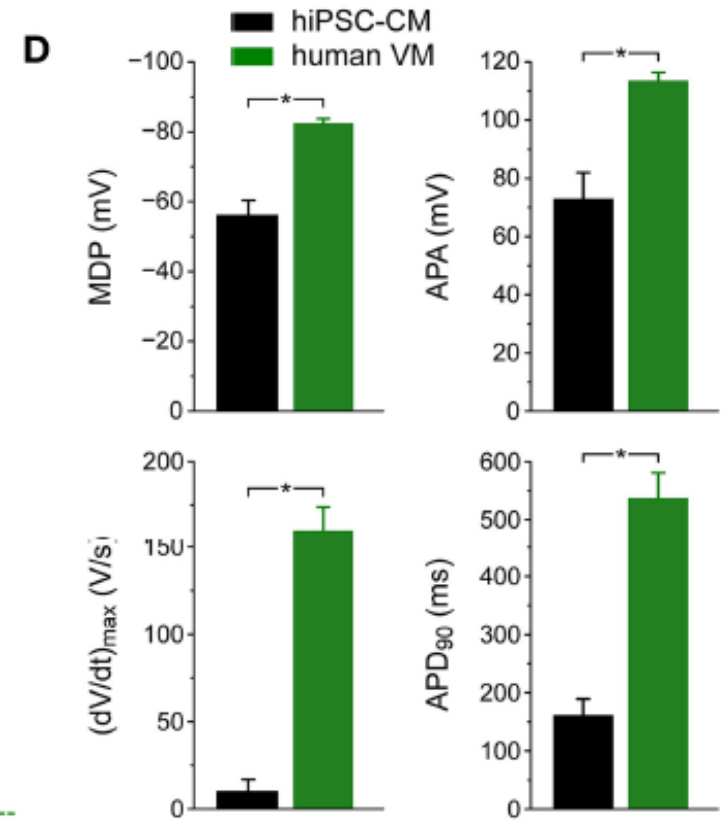
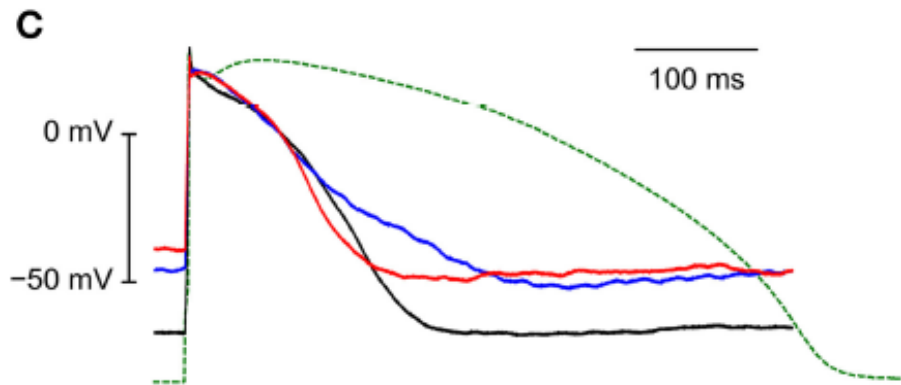
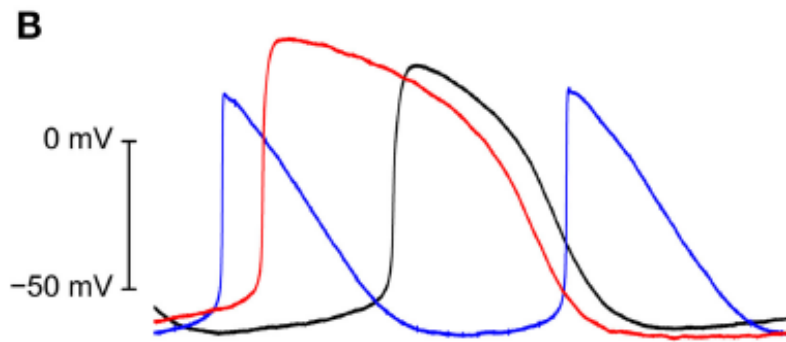
## Lidské odvozené kardiomyocyty – Funkce



# Úvod



## Lidské odvozené kardiomyocyty – Funkce

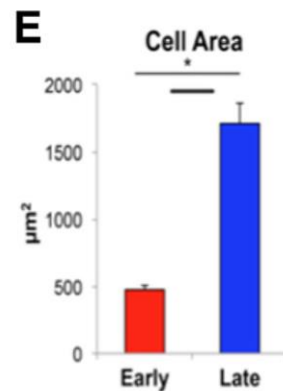
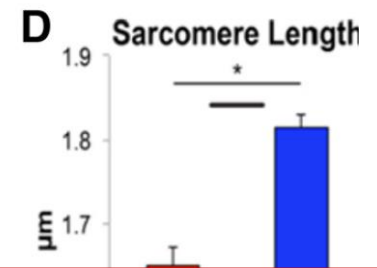
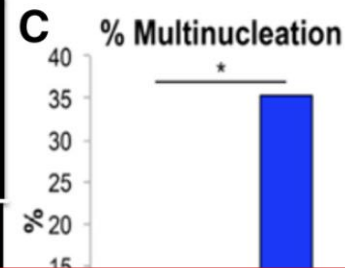
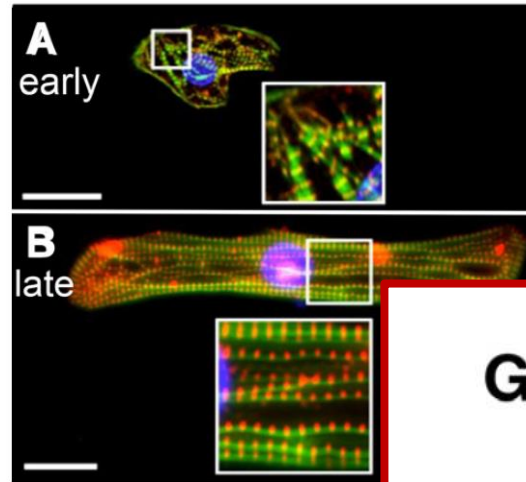


# Úvod

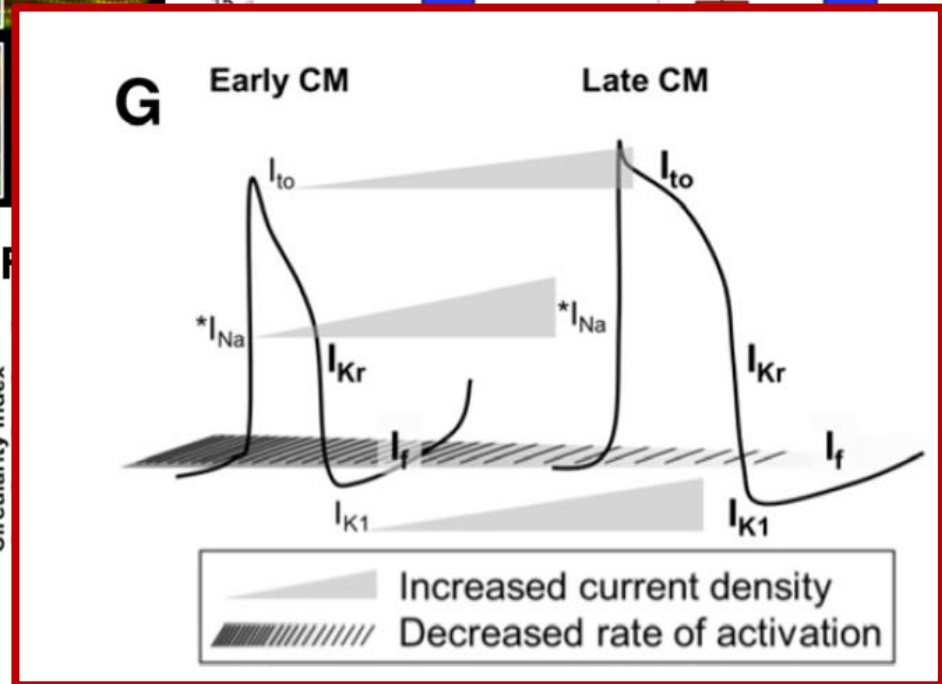
## Lidské odvozené kardiomyocyty – Funkce

časný KM  
odvozený  
z hiPSC

pozdní KM  
odvozený  
z hiPSC



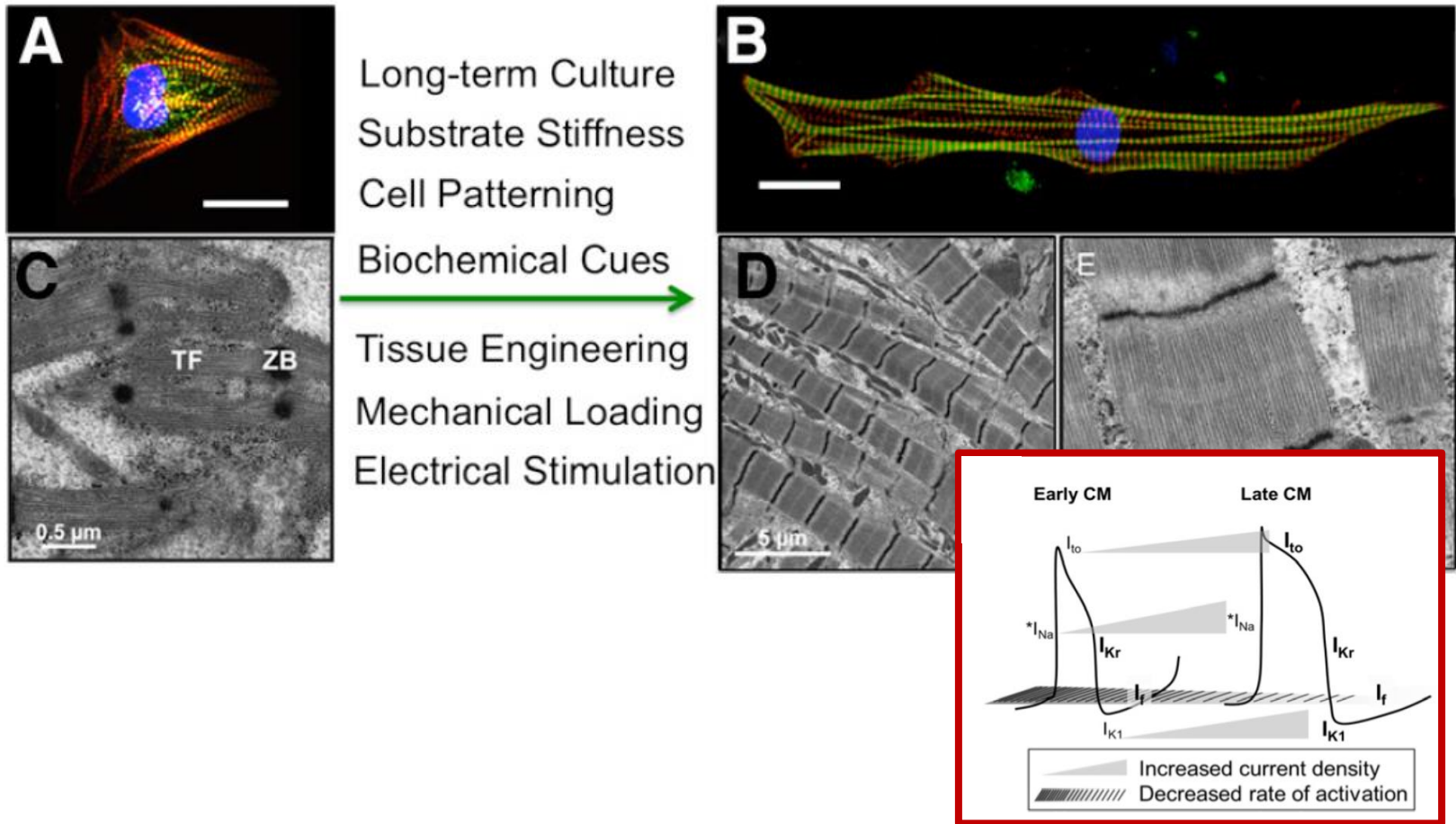
Circularity Index





# Úvod

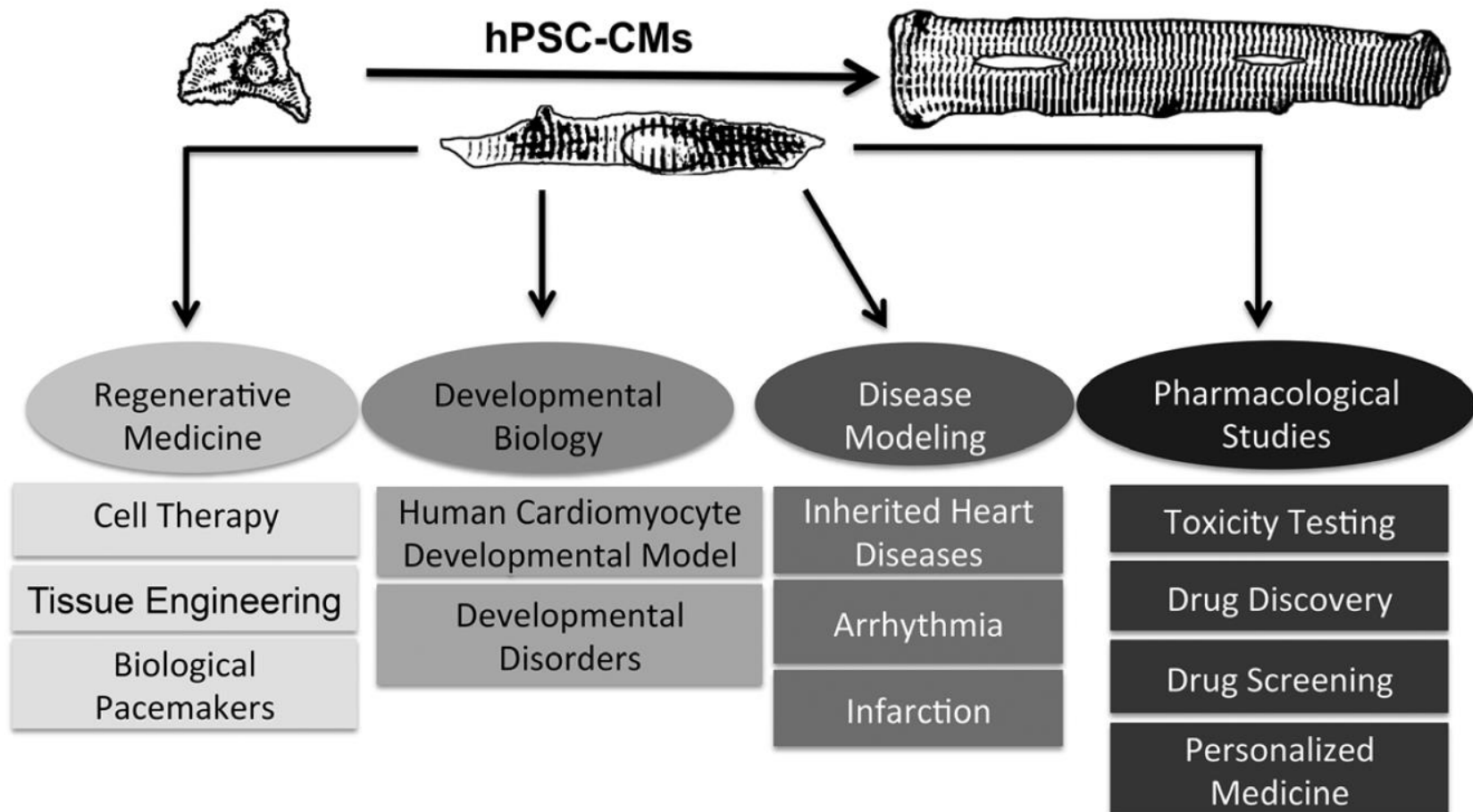
## Lidské odvozené kardiomyocyty – Zralost



Yang *et al.*, *Circ Res* 2014; 114: 511-23

# Úvod

## Lidské odvozené kardiomyocyty – Využití



Yang *et al.*, *Circ Res* 2014; 114: 511-23

# Vybrané studie používající lidské odvozené kardiomyocyty

Modelování dědičných arytmií

# Syndrom dlouhého QT (LQTS)

**Jervell A, Lange-Nielsen F.** Congenital deaf-mutism, functional heart disease with prolongation of the Q-T interval and sudden death. *Am Heart J* **1957**;54:59-68.

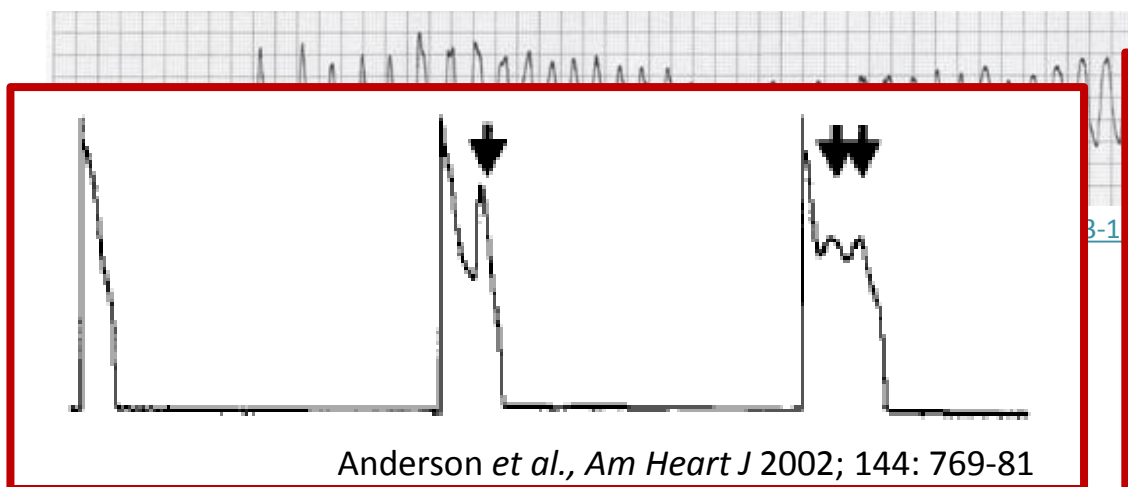
**Romano C, Gemme G, Pongiglione R.** Aritmie cardiache rare dell'età pediatrica. *Clin Pediatr* **1963**;45:656-83.

**Ward OC.** A new familial cardiac syndrome in children. *J Ir Med Assoc* **1964**;54:103-6.

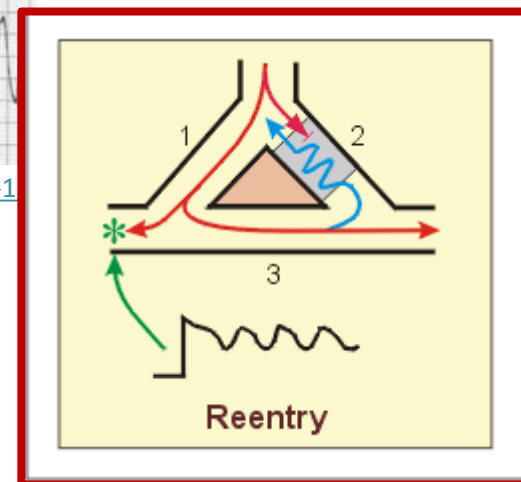


QTc (Bazett) = 530 ms

(<http://bestpractice.bmj.com/best-practice/monograph/829/diagnosis/step-by-step.html>; z osobní sbírky Dr. J.P. Dauberta)

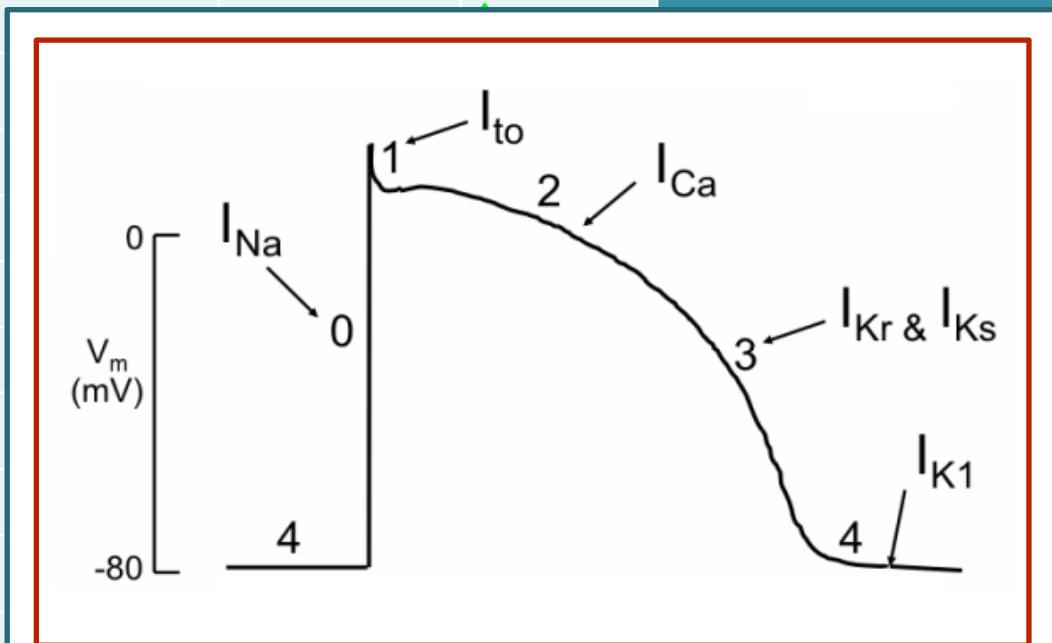


Anderson et al., *Am Heart J* 2002; 144: 769-81



# Dědičný LQTS

podtyp	gen	bílkovina	iontový proud	dysfunkce	poprvé popsáno
LQTS 1	KCNQ1	Kv7.1	$I_{Ks}$	↓	Keating et al. (1991)
LQTS 2	KCNH2	Kv11.1 (hERG)	$I_{Kr}$	↓	Curran et al. (1995)
LQTS 3	SCN5A				
LQTS 4	ANK2				
LQTS 5	KCNE1				
LQTS 6	KCNE2				
LQTS 7	KCNJ2				
LQTS 8	CACNA1C				
LQTS 9	CAV3				
LQTS 10	SCN4B				
LQTS 11	AKAP9				
LQTS 12	SNTA1				
LQTS 13	KCNJ5				

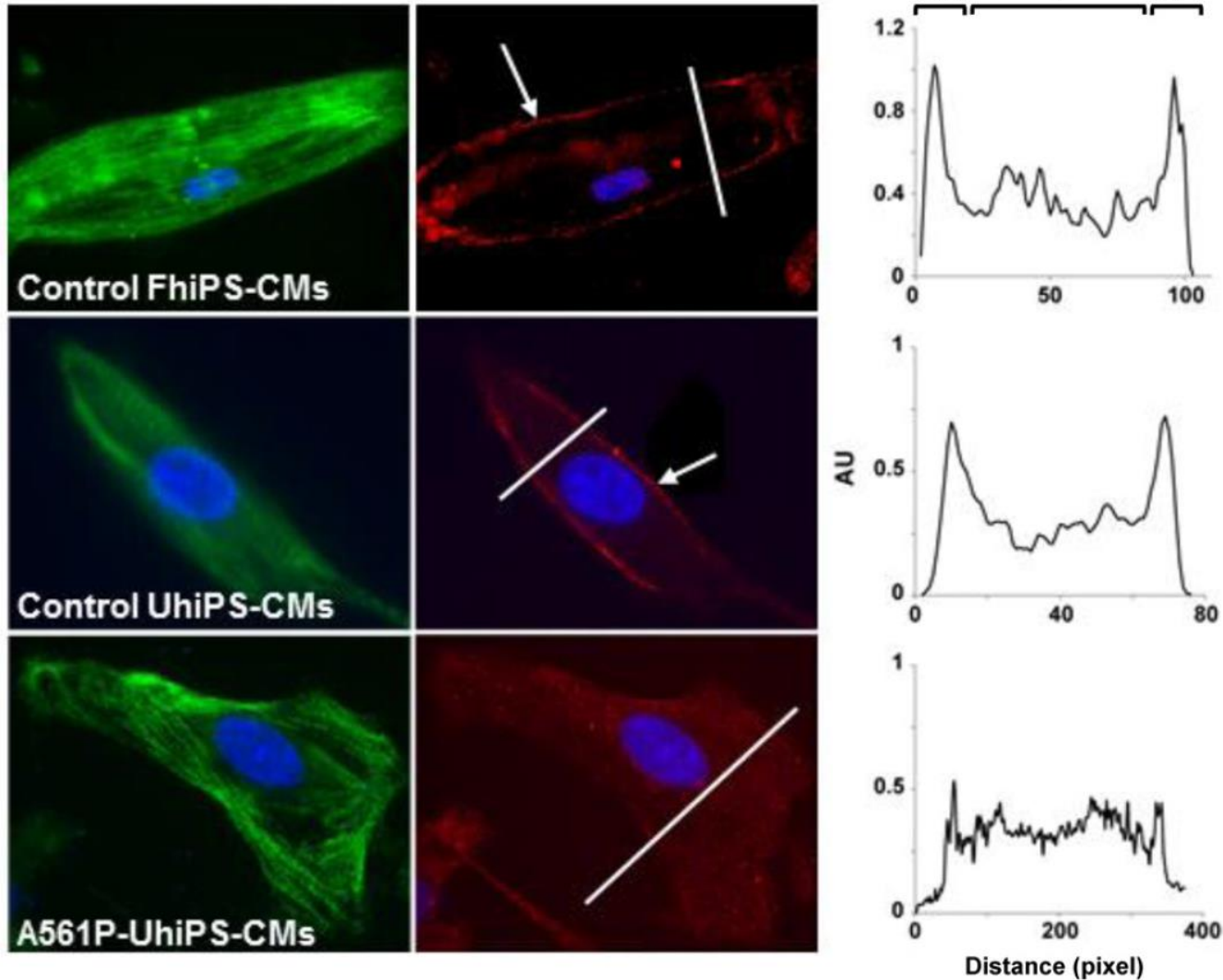


[http://tmedweb.tulane.edu/tmedwiki/doku.php/intro\\_to\\_the\\_heart\\_cardiac\\_electrophysiology](http://tmedweb.tulane.edu/tmedwiki/doku.php/intro_to_the_heart_cardiac_electrophysiology)

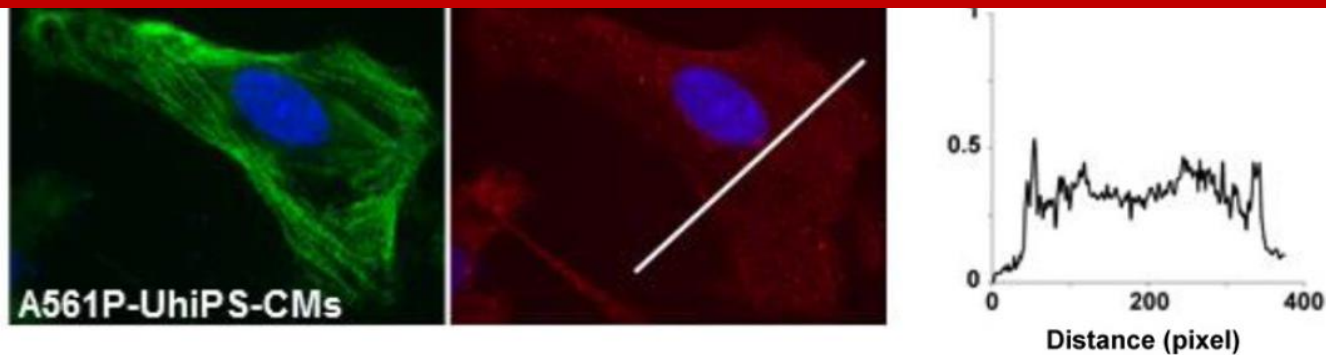
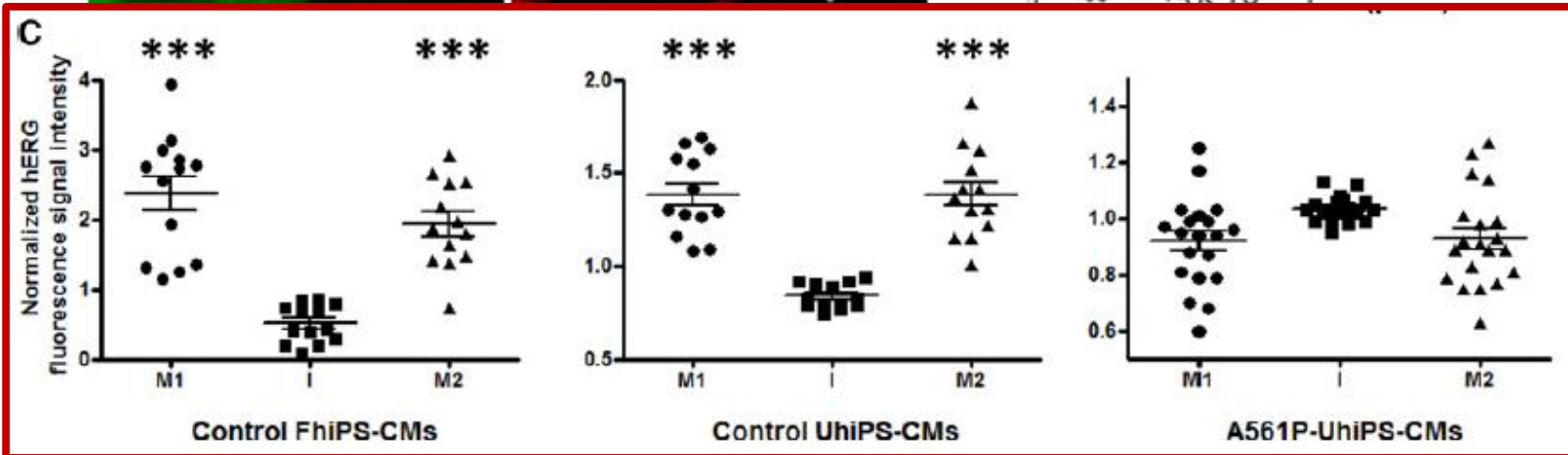
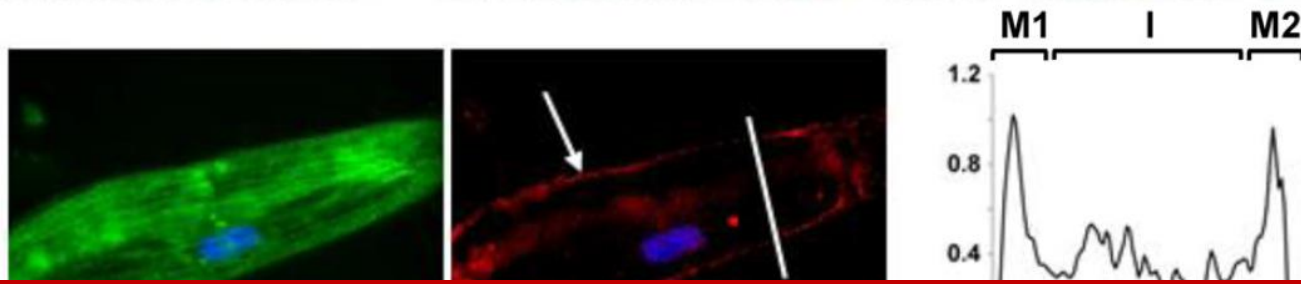
# Dědičný LQTS

podtyp	gen	bílkovina	iontový proud	dysfunkce	poprvé popsáno
LQTS 1	KCNQ1	Kv7.1	$I_{Ks}$	↓	Keating et al. (1991)
LQTS 2	KCNH2	Kv11.1 (hERG)	$I_{Kr}$	↓	Curran et al. (1995)
LQTS 3	SCN5A	Nav1.5	$I_{Na}$	↑	Wang et al. (1995)
LQTS 4	ANK2	Ankyrin B	kotvicí protein ( $I_{NaK}$ , $I_{NaCa}$ , $I_{Na}$ )	↓	Mohler et al. (2003)
LQTS 5	KCNE1	minK	$I_{Ks}$	↓	Schulze-Bahr et al. (1997)
LQTS 6	KCNE2	MiRPI	$I_{Kr}$	↓	Abbott et al. (1999)
LQTS 7	KCNJ2	Kir2.1	$I_{K1}$	↓	Plaster et al. (2001)
LQTS 8	CACNA1C	Cav1.2	$I_{Ca-L}$	↑	Splawski et al. (2004)
LQTS 9	CAV3	M-kaveolin	kotvicí protein ( $I_{Na}$ )	↓	Vatta et al. (2006)
LQTS 10	SCN4B	Navβ.4	$I_{Na}$	↑	Medeiros-Domingo et al. (2007)
LQTS 11	AKAP9	Yotiao	kotvicí protein ( $I_{Ks}$ )	↓	Chen et al. (2007)
LQTS 12	SNTA1	α1-syntrofin	protein cytoskeletu ( $I_{Na}$ )	↓	Ueda et al. (2008)
LQTS 13	KCNJ5	Kir3.4	$I_{K(Ach)}$	↓	Yang et al. (2010)

# Modelování LQT2

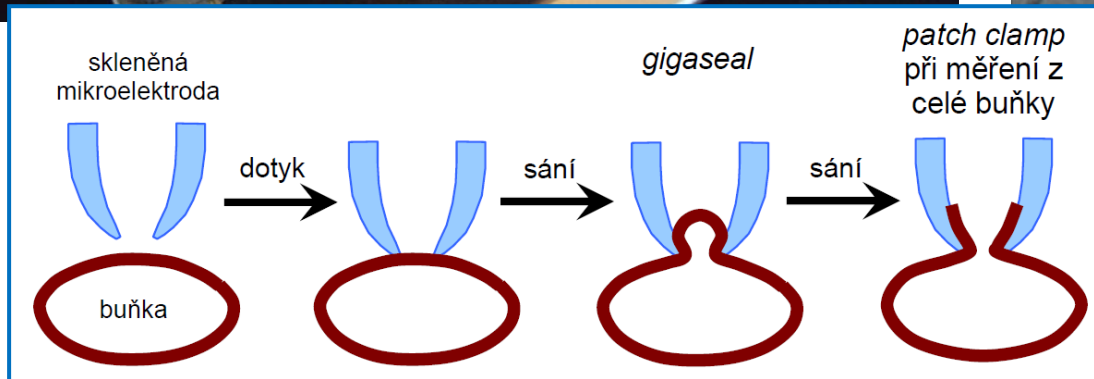
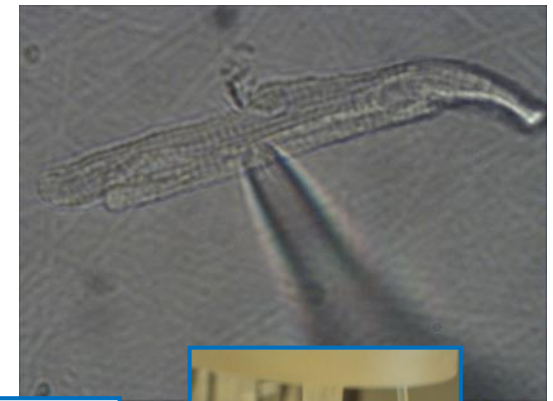
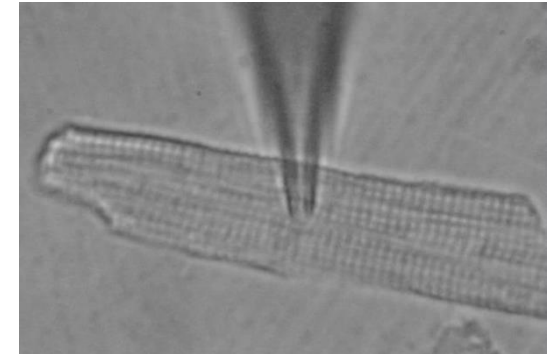
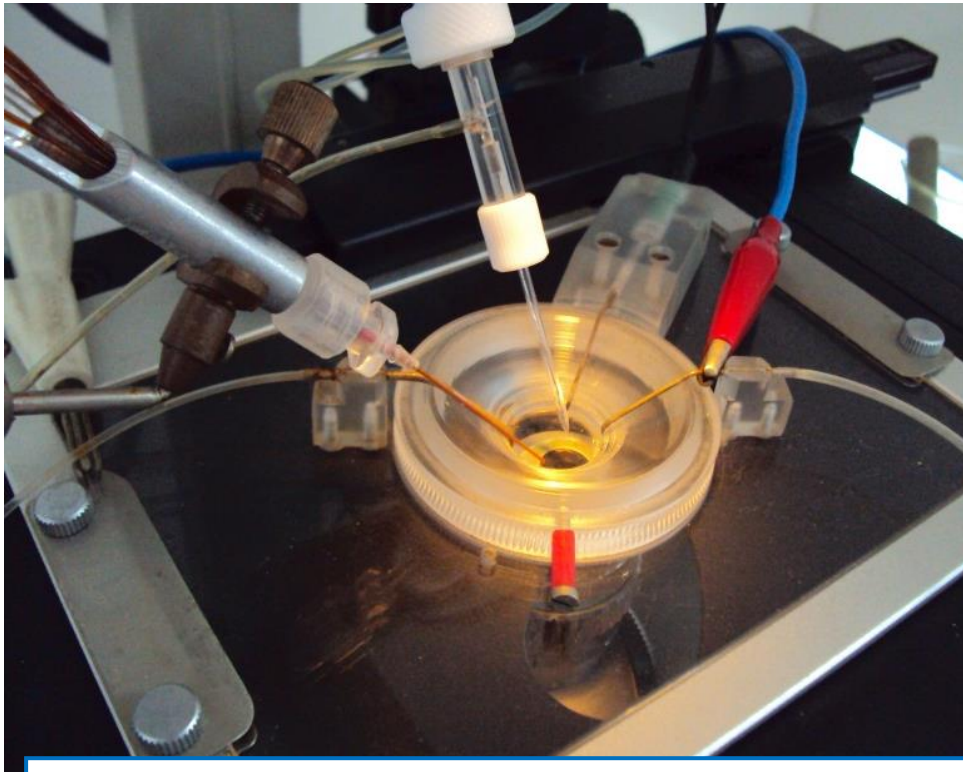


# Modelování LQT2

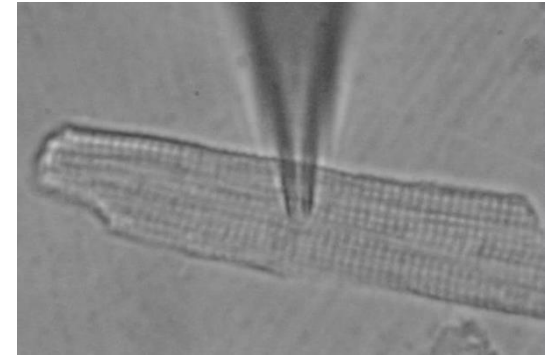




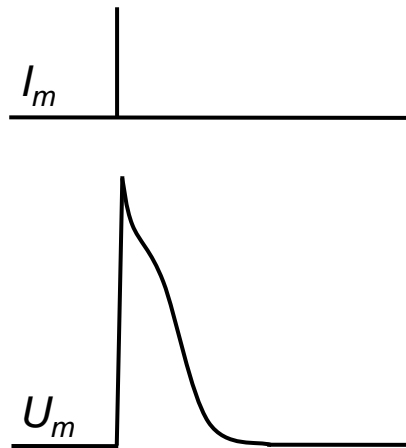
# Whole Cell Patch Clamp



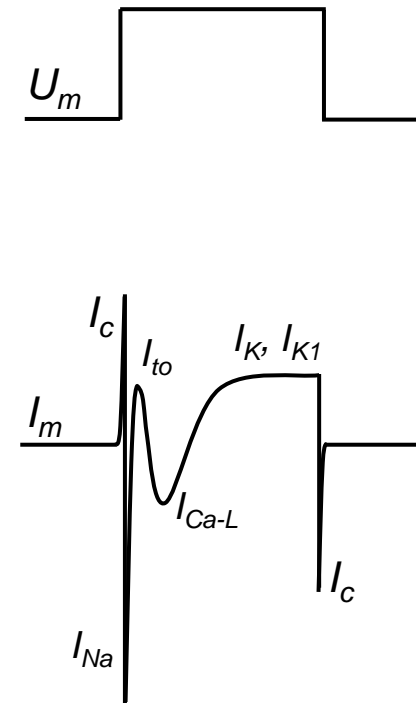
# Whole Cell Patch Clamp



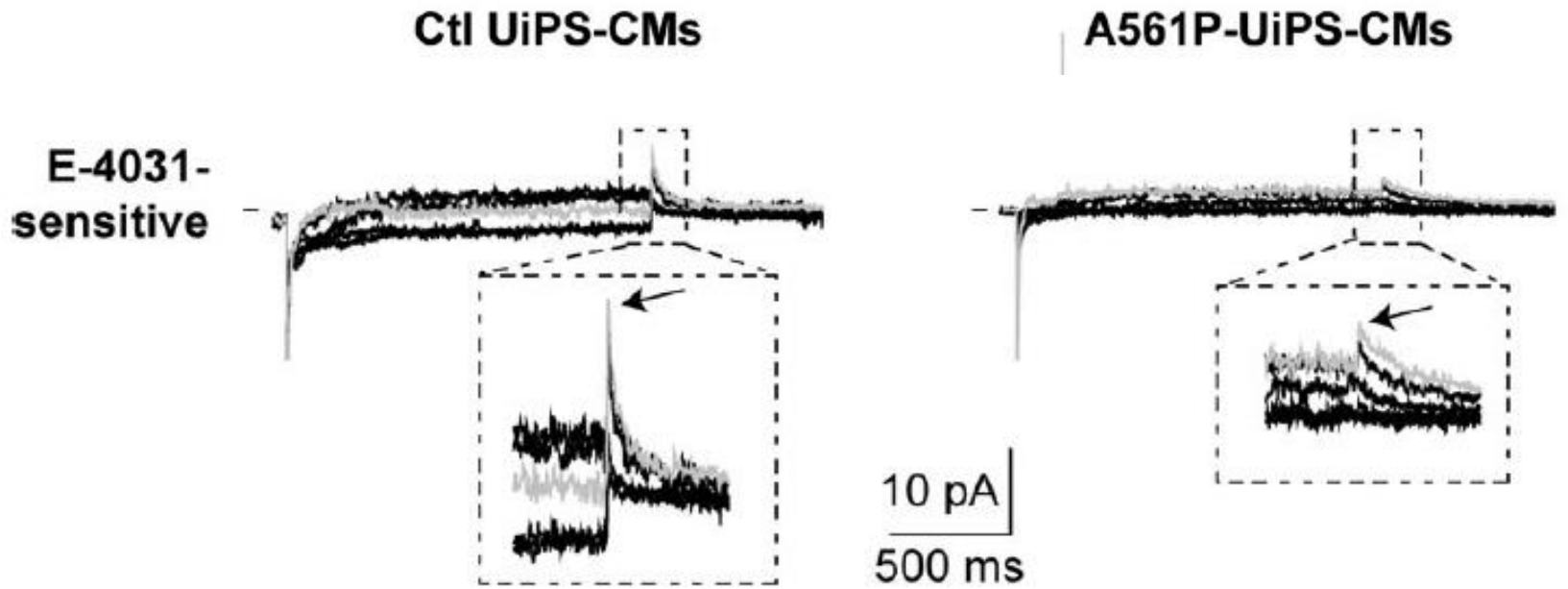
current clamp mode



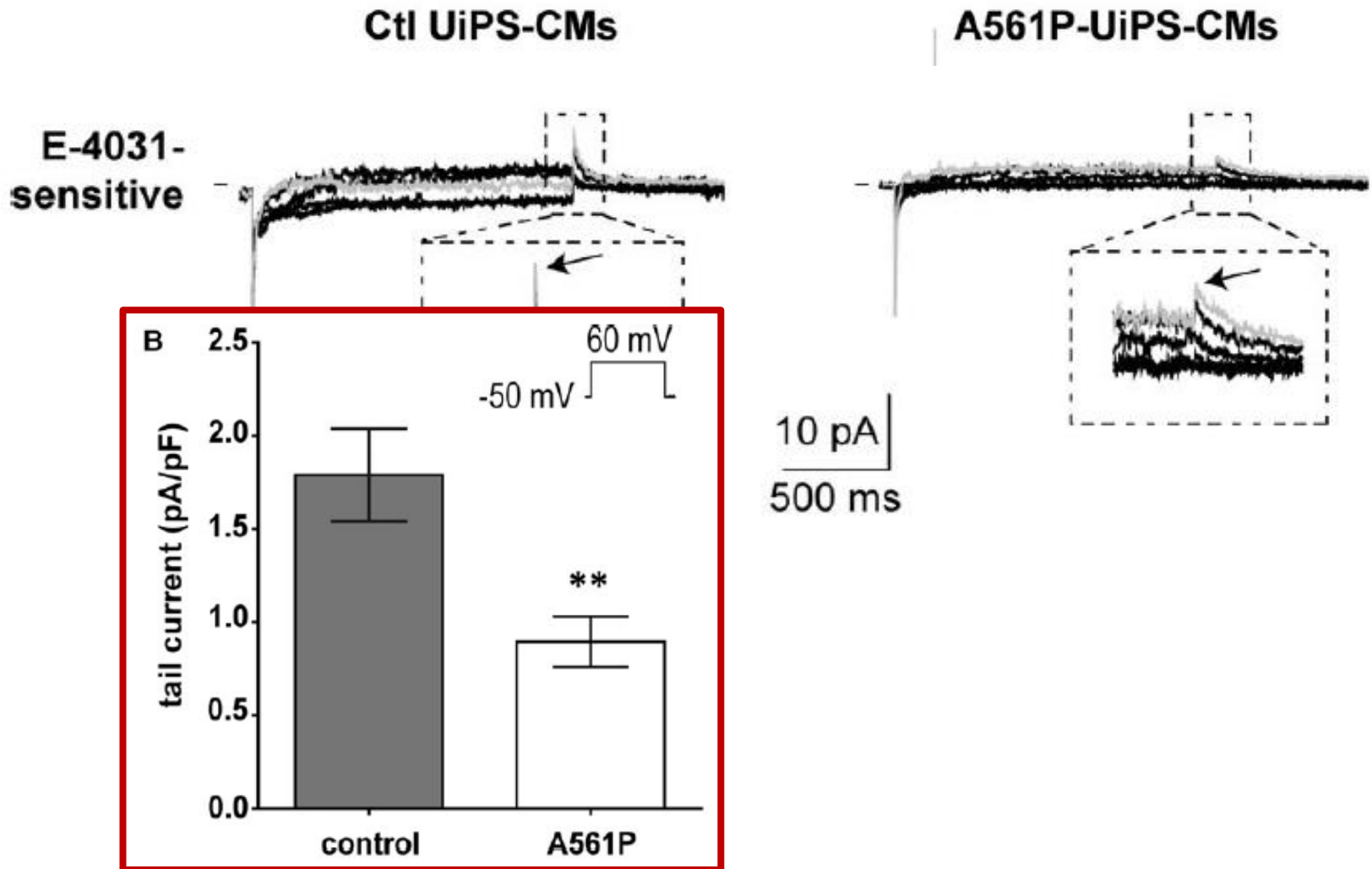
voltage clamp mode



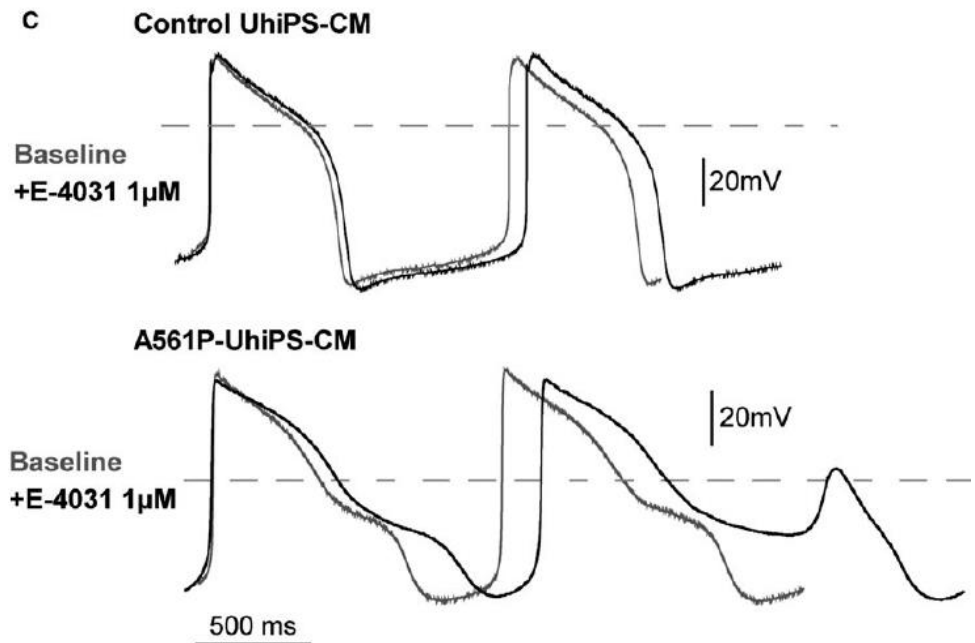
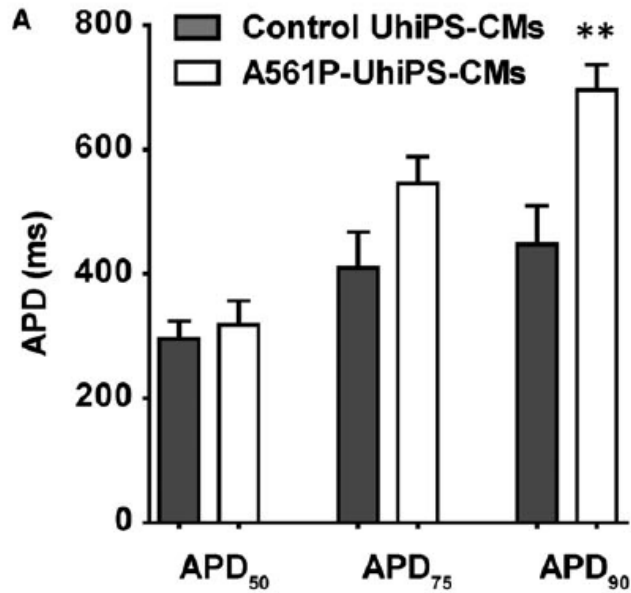
# Modelování LQT2



# Modelování LQT2



# Modelování LQT2

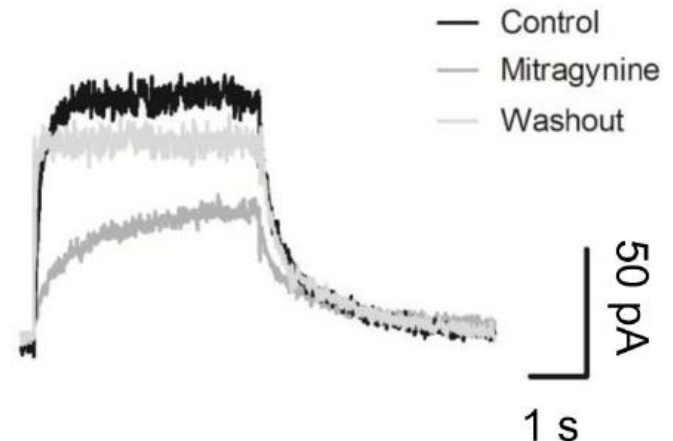
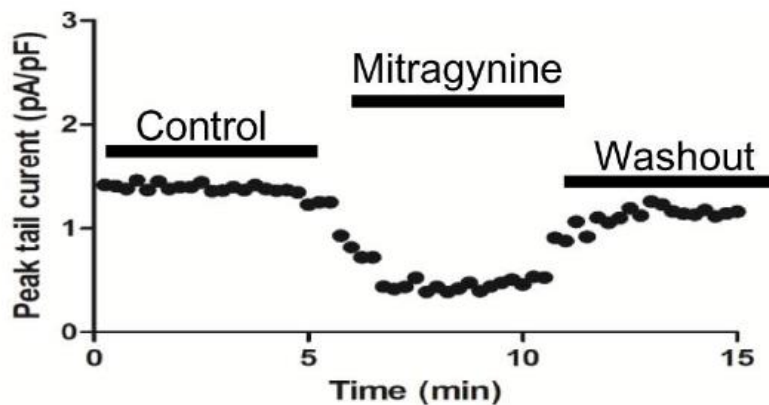


# Vybrané studie používající lidské odvozené kardiomyocyty

## Farmakologické studie

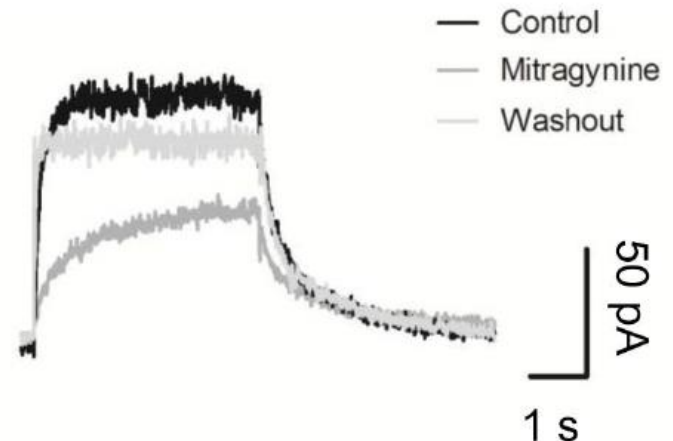
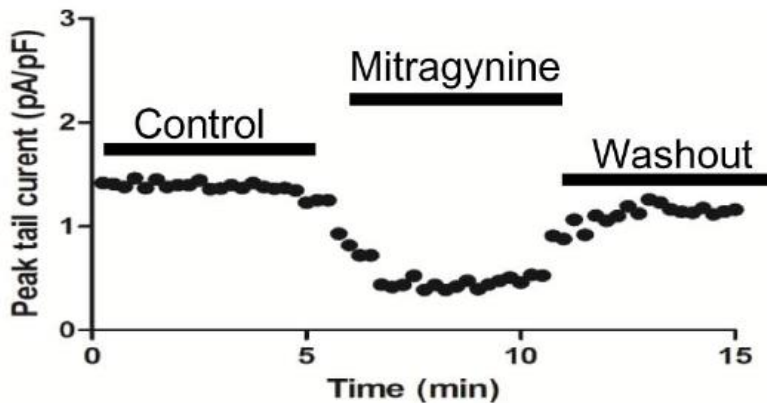
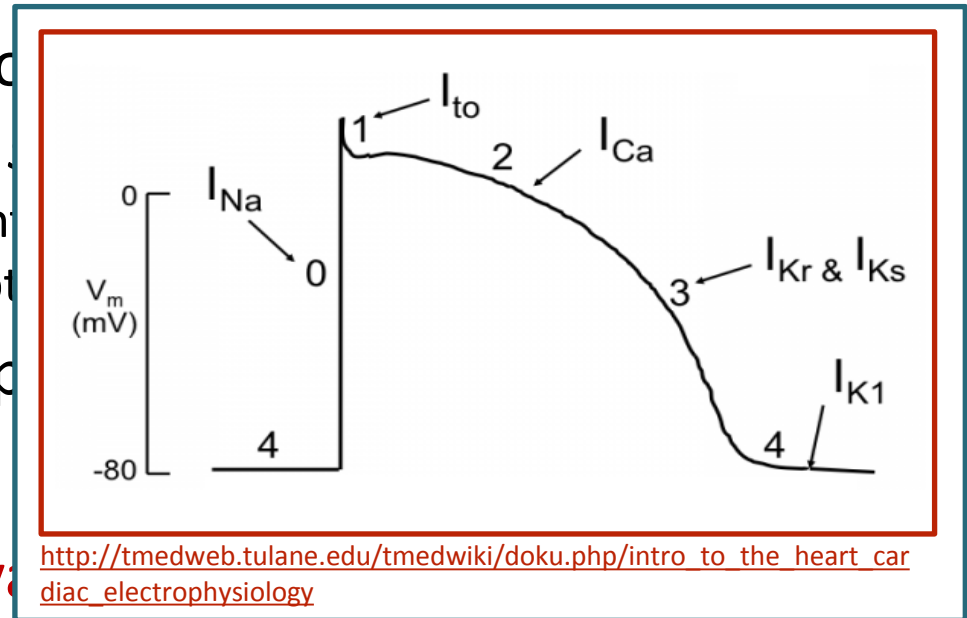
# Mitragynin

- hlavní bioaktivní sloučenina v extraktu z listů rostliny *Mitragyna speciosa* (Kratom)  
(léčivý rostlinný stimulant s efekty podobnými opioidům; léčba chronické bolesti a symptomů z odnětí opioidů)
- popsány smrtelné příhody asociované se zástavou srdce
- inhibice  $I_{Kr}$  pozorována v KM odvozených z hiPSC



# Mitragynin

- hlavní bioaktivní složka rostliny *Mitragyna* (léčivý rostlinný stimulant chronické bolesti a symptomy)
- popsány smrtelné poruchy srdce
- inhibice  $I_{Kr}$  pozorováno



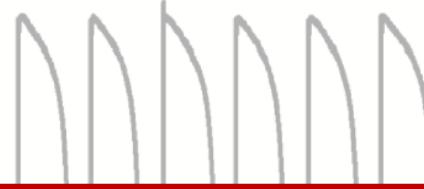


# Mitragynin

Paced APs (1 Hz)  
Control



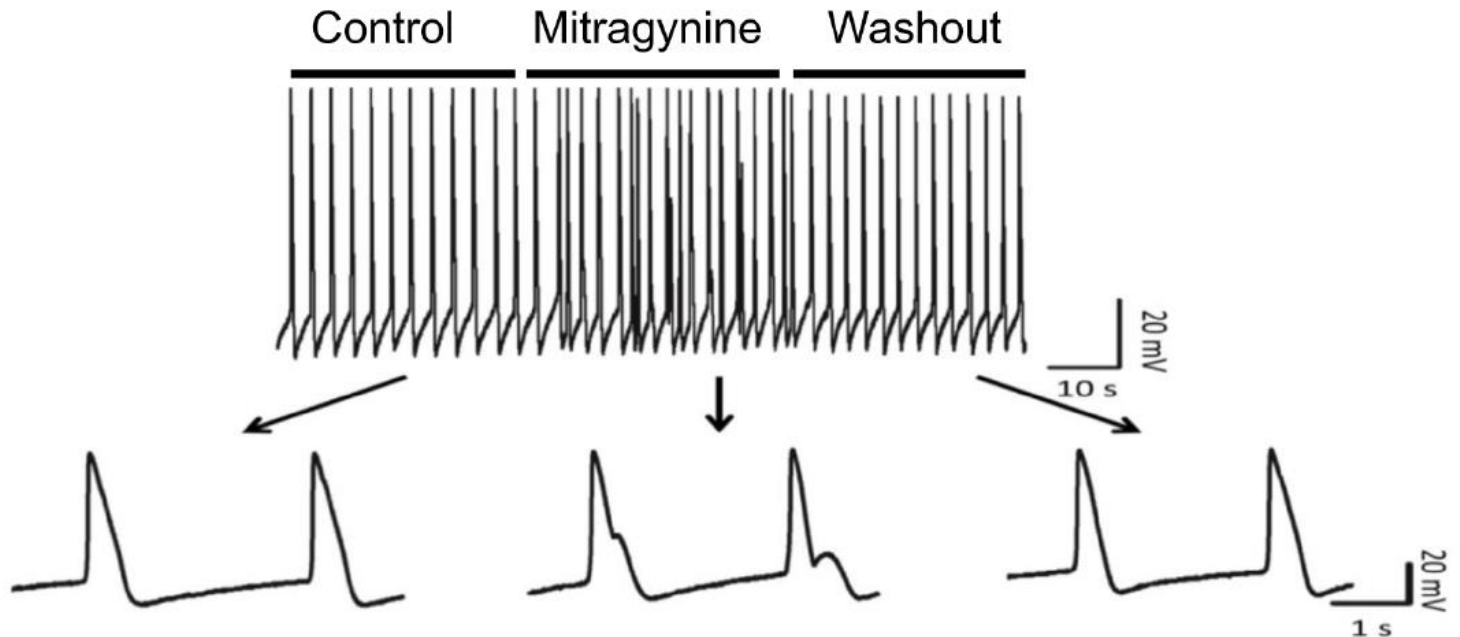
Mitragynine



Overlay



## EADs recorded in spontaneous APs



50 pA  
s

# Nefazodon

- antidepressivum druhé generace
- stoupá počet studií poukazujících na pochybnosti ohledně bezpečnosti použití (arytmie)
- inhibice  $I_{Kr}$  pozorována v KM odvozených z hiPSC

