



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana ZUPANČIČ

**CELIČNA TERAPIJA ZA REGENERACIJO SRCA  
PO SRČNI KAPI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Ana ZUPANČIČ

**CELIČNA TERAPIJA ZA REGENERACIJO SRCA PO SRČNI KAPI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

**CELL THERAPY FOR HEART REGENERATION AFTER HEART  
INFARCTION**

B. SC. THESIS

Academic Study Programmes

Ljubljana, 2020

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala doc. dr. Jerneja Ogorevca.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Polona JAMNIK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za biotehnologijo,  
mikrobiologijo in varnost živil

Član: doc. dr. Jernej OGOREVC  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum predstavitve: 26.8.2020

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 602.9:611.018:606:616.127-005.8(043.2)
KG	srčni infarkt, regeneracija srca, celična terapija, matične celice
AV	ZUPANČIČ, Ana
SA	OGOREVC, Jernej (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2020
IN	CELIČNA TERAPIJA ZA REGENERACIJO SRCA PO SRČNI KAPI
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VI, 22 str., 1 pregl., 1 sl., 83 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Srčno–žilne bolezni so v razvitem delu sveta in tudi v Sloveniji že desetletja najpogostejši vzrok obolevnosti in umrljivosti odraslih. Če je ob srčnem infarktu pretok krvi prekinjen dlje kot 20-30 minut, so posledice ireverzibilne, saj srčne celice odmrejo. Naravno prisotna regenerativna sposobnost človekovega srčnega mišičnega tkiva je bistveno preslaba, da bi lahko kompenzirala obsežne izgube celic. S celično terapijo se prvič, če izvzamemo presaditve srca, lotevamo reševanja dejanskega vzroka in odpravljanja težav ne le lajšanja simptomov. Glavni namen te diplomske naloge je opis različnih celičnih tipov in njihova ustreznost za regeneracijo srca, nekaj pozornosti pa namenim nadaljnjim izzivom, ki jih bo potrebno rešiti preden bo celična terapija postala učinkovita in razširjena terapija za regeneracijo srca po srčni kapi. Za regeneracijo srca s celično terapijo so primerni različni donorski celični tipi – od somatskih matičnih (predniških) celic pa vse do induciranih pluripotentnih matičnih celic in transdiferenciranih celic. Idealnega celičnega tipa, ki bi bil primeren za vse paciente verjetno ni. Nadaljnje študije se bodo verjetno vse bolj usmerjale v uporabo programiranih celic ter čedalje manj v uporabo alogenih (matičnih) celic. Poleg ustreznega izbora donorskih celic je za višjo učinkovitost celične terapije potrebno izboljšati metode vnosa celic, njihovo preživetje in vraščanje v tkivo.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 602.9:611.018:606:616.127-005.8(043.2)

CX heart infarction, heart regeneration, cell therapy, stem cells

AU ZUPANČIČ, Ana

AA OGOREVC, Jernej (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2020

TI CELL THERAPY FOR HEART REGENERATION AFTER HEART INFARCTION

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VI, 22 p., 1 tab., 1 fig., 83 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Cardiovascular diseases have been the most common cause of morbidity and mortality in adults in the developed part of the world and in Slovenia for decades. If the blood flow is interrupted for more than 20-30 minutes during a heart attack, the consequences are irreversible, as the heart cells die. The naturally present regenerative capacity of human cardiac muscle tissue is too weak to be able to compensate for extensive tissue loss. Cell therapy enables for the first time, with the exception of heart transplants, we to tackle and resolve the actual cause instead of just relieving symptoms. The main purpose of this thesis is to describe the different cell types and their suitability for heart regeneration, and further challenges that will need to be addressed before heart regeneration cell therapy becomes effective and widespread therapy for heart regeneration after heart attack. Various donor cell types are suitable for heart regeneration with cell therapy - from somatic stem (progenitor) cells, to induced pluripotent stem cells and transdifferentiated cells. There is probably no ideal cell type that would be suitable for all patients. Further studies are likely to focus more on the use of programmed cells. In addition to the suitable selection of donor cells, the methods of cell delivery, cell survival, and tissue growth need to be improved to increase the effectiveness of heart regeneration cell therapy.

## KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VI
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN IN POVOD DELA	1
<b>2 SRČNO-ŽILNE BOLEZNI</b>	<b>1</b>
2.1 KORONARNA BOLEZEN SRCA	1
<b>3 ZDRAVLJENJE SRČNEGA INFARKTA</b>	<b>2</b>
<b>4 NARAVNA REGENERACIJA ČLOVEŠKEGA SRCA</b>	<b>2</b>
<b>5 CELIČNA TERAPIJA</b>	<b>2</b>
5.1 TIPI DONORSKIH CELIC ZA CELIČNO TERAPIJO	3
<b>5.1.1 Skeletni mioblasti</b>	<b>3</b>
<b>5.1.2 Celice kostnega mozga</b>	<b>4</b>
5.1.2.1 Neselekcionirane enojedrne celice kostnega mozga	4
5.1.2.2 Mezenhimske matične celice	5
<b>5.1.3 CD 34+ in CD 133+ celice</b>	<b>5</b>
<b>5.1.4 Srčne matične celice</b>	<b>6</b>
<b>5.1.5 Embrionalne matične celice</b>	<b>6</b>
<b>5.1.6 Inducirane pluripotentne matične celice</b>	<b>7</b>
<b>5.1.7 Transdiferencirane celice (programirani kardiomiciti)</b>	<b>8</b>
5.2 IZBOR USTREZNEGA CELIČNEGA TIPA	9
5.3 LEKCIJE PRVIH KLINIČNIH ŠTUDIJ	12
5.4 MEHANIZEM DELOVANJA CELIČNIH TERAPIJ	12
<b>5.4.1 Nadomeščanje izgubljenega miokarda</b>	<b>12</b>
<b>5.4.2 Aktivacija endogenih popravljalnih mehanizmov s parakrinimi učinki</b>	<b>14</b>
5.5 METODE VNOSA CELIC, NJHOVO PREŽIVETJE, ZADRŽEVANJE IN VRAŠČANJE	14
<b>6 ZAKLJUČEK</b>	<b>15</b>
<b>7 VIRI</b>	<b>16</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Možni tipi donorskih celic	11

## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Možni tipi donorskih celic, način vnosa in mehanizem delovanja	13

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

CABG angl. coronary artery bypass graft

LV levi ventrikel

MMC mezenhimske matične celice

HMC hematopoetske matične celice

EPC endotelne predniške celice

SMC srčne matične celice

EMC embrionalne matične celice

iPMC inducirane pluripotentne matične celice

SF srčni fibroblasti

iKPC inducirane kardiomiocitom podobne celice

SeV-GMT sendai virusni vektor s katerim vstavimo Gata4, Mef2c, in Tbx5

## 1 UVOD

### 1.1 NAMEN IN POVOD DELA

Bolezni srca in ožilja povzročijo približno tretjino smrti po vsem svetu. V primeru srčno-žilnih bolezni je najpogostejši vzrok smrti ishemična bolezen srca, ki lahko privede do srčnega infarkta. Ker ima človeško srce naravno nizko regenerativno sposobnost, ne zmore nadomestiti med infarkt izgubljenega miokarda. Na odmrlem predelu se tkivo zabrazgotini in izgubi svojo kontraktilno sposobnost. To oslabi delovanje srca, kar lahko vodi v smrt. Konvencionalni načini zdravljenja ne omogočajo regeneracije izgubljenega srčnega tkiva ampak zgolj lajšajo simptome. S celično terapijo se prvič lotevamo reševanja dejanskega vzroka težave – regeneracije tkiva, ki je bila v preteklosti nedosegljiva.

Osrednja točka preučevanja te diplomske naloge je opis različnih celičnih tipov in njihova ustreznost za regeneracijo srca, nekaj pozornosti pa namenim nadaljnjim izzivom, ki jih bo potrebno rešiti preden bo celična terapija lahko postala učinkovita in razširjena terapija za regeneracijo srca po srčni kapi.

## 2 SRČNO-ŽILNE BOLEZNI

Srčno-žilne bolezni so v razvitem delu sveta in tudi v Sloveniji že desetletja najpogostejši vzrok obolevnosti in umrljivosti odraslih. Med srčno-žilne bolezni sodijo zvišan krvni tlak, koronarna bolezen srca, bolezen možganskega žilja, periferna arterijska bolezen, kronična ledvična bolezen in druge redkejšje bolezni (Willerson, 2015).

### 2.1 KORONARNA BOLEZEN SRCA

Prizadetost ene ali več koronarnih arterij imenujemo koronarna bolezen srca. Koronarne žile srčnim celicam oziroma kardiomiocitom dovajajo kisik, ter odvajajo za celice strupene metabolne presnovke. Koronarna ateroskleroza je stanje nalaganja lipidnih oblog, celic in fibroznega tkiva v koronarnih arterijah. Ko obloge žile tako zožijo, da delom srca primanjkuje krvi, hranil in kisika, govorimo o ishemiji (zmanjšana prekrvavitev). Ta se lahko izrazi kot angina pektoris, akutni srčni infarkt ali nenadna srčna smrt. Angina pektoris se pokaže ob naporu, saj takrat vsi organi potrebujejo več kisika. Ker so prizadete srčne arterije, se pojavi bolečina v prsih, ki v mirovanju popusti. V nasprotju z angino pektoris, ki nastaja postopoma, pride do srčnega infarkta nenadoma. Aterosklerozna obloga, ki je sprva prekrita s plastjo žilnih celic počí, kri pride v stik z vsebino aterosklerotične obloge, kar vodi v nastanek krvnega strdka. V predelu srca, v katerem krvni strdek prekine pretok arterijske krvi (običajno območje levega ventrikla), celicam primanjkuje kisika in hranilnih snovi, metabolni presnovki pa se kopičijo. Če je pretok krvi prekinjen dlje kot 20-30 minut, so posledice ireverzibilne, saj srčne celice odmrejo. Na prizadetem mestu pride do fibroze- formiranja vezivnega tkiva in kasneje do



tvorbe brazgotine. Temu procesu celjenja pravimo remodeliranje. Pri obsežnem infarktu lahko pride do srčnega popuščanja. To je stanje v katerem srčna mišica ne zmore več učinkovito potiskati krvi po telesu, kar se kaže predvsem kot zmanjšana telesna zmogljivost, težko dihanje ob naporu, otekanje nog, kopičenje tekočine v pljučih. Srčno popuščanje se pogosto izraža v obliki ishemične kardiomiopatije, kjer gre za poslabšano delovanje levega ventrikla. Ali bo prišlo do srčnega popuščanja, je odvisno predvsem od velikosti prizadetega dela srčne mišice in od časa, ki je pretekel od zaprtja srčne arterije do medicinske pomoči. Zaradi spremenjenega stanja zgradbe srca lahko pride tudi do nepravilne električne prevodnosti, kar lahko vodi v nenadno srčno smrt (Willerson, 2015).

### **3 ZDRAVLJENJE SRČNEGA INFARKTA**

Pacient ob prihodu v bolnišnico prejme perkutano koronarno intervencijo (PCI), kjer s pomočjo majhnega balona strdek zdrobijo in zožan del arterije razširijo. Mnogo pacientov prejme tudi žilno opornico (koronarni stent). Poleg opisanega posega je po odhodu iz bolnišnice pomembno zdravljenje z zdravili, ki preprečujejo strjevanje krvi, ustrezna prehrana, telesna teža in gibanje. V primeru obsežne izgube kardiomiocitov in posledično poslabšanja funkcionalnosti srca je pacient potencialni kandidat za presaditev srca (Willerson, 2015).

### **4 NARAVNA REGENERACIJA ČLOVEŠKEGA SRCA**

Do nedavno sprejeta paradigma je človeško srce obravnavala kot postmitotični organ, ki ima vse od rojstva dalje tekom celotnega življenja relativno konstantno število mišičnih celic (miocitov). Novejša odkritja so pokazala, da čeprav je večina odraslih miocitov res terminalno diferenciranih, obstaja v srcu majhna in nenehno obnavljajoča se pod-populacija srčnih matičnih celic (SMC) (Velagaleti in sod., 2008). Ta naravno prisotna regenerativna sposobnost srčnega mišičnega tkiva (miokarda) pa je bistveno premajhna, da bi lahko kompenzirala obsežne izgube celic, ki prizadenejo srce v primeru srčnega infarkta (Shi in Garry, 2006). Bolj učinkovito regeneracijo z naravnimi mehanizmi običajno ovira tudi ishemija, lokalno vnetje in fibroza. Okolje, ki ga povzročata ishemija in lokalno vnetje verjetno preprečuje diferenciacijo SMC, fibroza in brazgotinjenje pa za njih predstavljata fizično bariero in onemogočata dostop do obolelega mesta (Naseem in sod., 2007).

### **5 CELIČNA TERAPIJA**

Medicinski napredek uspešno lajša posledice srčnega infarkta, a na račun višje stopnje pojavnosti srčnega popuščanja. Trenutno najbolj učinkovito zdravljenje srčnega popuščanja je presaditev srca, ki pa je omejena s pomanjkanjem darovalcev, majhnim izborom primernih pacientov in tvegano operacijo. Celična terapija bi lahko dramatično spremenila do sedaj uveljavljeni potek zdravljenja ter izboljšala prognozo bolnikov s srčnim popuščanjem. S celično

terapijo se prvič, če izvzamemo presaditve srca, lotevamo reševanja dejanskega vzroka težav in njenega odpravljanja. Regeneracija kardiomiocitov je bila namreč do sedaj nedosegljiva (Sanganalmath in Bolli, 2013).

## 5.1 TIPI DONORSKIH CELIC ZA CELIČNO TERAPIJO

Za vse matične celice v telesu so značilne tri skupne lastnosti: imajo sposobnost deljenja in obnavljanja, s čimer se ohranja njihova zaloga, so nespecializirane in imajo zmožnost specializacije (diferenciacije) v različne celične tipe. Pluripotentne matične celice se lahko diferencirajo v vse tri zarodne plasti, medtem ko imajo odrasle matične celice s svojim multipotentnim potencialom vlogo obnavljanja organov v katerih se nahajajo. Predniška (somatska matična) celica je usmerjena matična celica, ki se lahko diferencira v različne potomke, značilne za določeno tkivo oziroma organ (Wollert in Drexler, 2010).

V spodnjem poglavju so našteje in opisane različne vrste matičnih celic, uporabljene v kliničnih študijah za regeneracijo srca po srčnem infarktu.

### 5.1.1 Skeletni mioblasti

Skeletni mioblasti izvirajo iz miosatelitskih celic. To so skeletne mišične predniške celice, ki so prisotne pod bazalno membrano miofibril. V primeru mišične poškodbe se te regenerirajo tako, da satelitske celice proliferirajo v mioblaste, ki se nato zlijejo v miotubule, ti pa tvorijo nova mišična vlakna (ne pa tudi kardiomiocit) (Buckingham in Montarras, 2008). Zaradi enostavne dostopnosti celic z mišično biopsijo, hitre rasti *in vitro*, odpornosti na hipoksične in ishemične pogoje (Chachques in sod., 2004) ter robustnosti kar se tiče vgnezditev na mestu vnosa po transplantaciji (Menasche, 2018a), so bili skeletni mioblasti prvi celični tip, ki so ga preizkusili tako v predkliničnih kot tudi v kliničnih študijah (Chachques in sod., 2004).

V predkliničnih študijah se je izkazalo, da so se injicirani avtologni skeletni mioblasti diferencirali v miotubule. Ti so na površini zabrazgotinjenega miokarda tvorili sloj živih skeletnih mišičnih celic, kar je vodilo do zmanjšanja fibroze in remodeliranja ventrikla ter pripomoglo k izboljššanemu delovanju ventrikularne funkcije srca (Bonaros in sod., 2006). Prav s tem tipom celic je potekla tudi prva transplantacija celic v človeški miokard. Junija leta 2000 so sočasno s CABG operacijo (angl. coronary artery bypass graft) pri kateri se z obodom vzpostavi žilna povezava med aorto in koronarno arterijo distalno od zožitve, v miokard injicirali avtologne skeletne mioblaste (Bergmann in sod., 2009). Izide te študije je bilo težko interpretirati zaradi prekrivajočih se učinkov operacije in transplantacije, a je potrebno poudariti, da so štirje od desetih pacientov zaradi nepravilne električne prevodnosti srca doživljali hitro, nepravilno bitje srca (Reinecke in sod., 2000). To je vzbudilo kar nekaj skrbi v zvezi z uporabo tega celičnega tipa za celično terapijo srca. Miotubuli se namreč električno ne integrirajo in ne bijejo sinhrono s kardiomiociti v svoji okolici (Laflamme in Murry, 2005). Nekoliko večja študija je zajemala 97 pacientov, ki so jim naključno injicirali nizko ali visoko

koncentracijo avtolognih skeletnih mioblastov ali pa placebo raztopino. Po šestih mesecih med pacienti, ki so prejeli celično terapijo in med tistimi, ki so prejeli placebo raztopino ni bilo statistično značilnih razlik v delovanju srca in v pojavnosti aritmije (Menasche in sod., 2008). V nadaljnjih študijah leta 2017 so pojasnili, da je do aritmij najverjetneje prišlo zaradi metode transplantacije celic. Večkratno intramiokardno injiciranje je namreč povzročilo območje nakopičenih neprevodnih celic, kar je zaradi prekinjenega akcijskega potenciala vodilo do aritmije (Miyagawa in sod., 2017). Kljub pojasnjenemu vzroku aritmij je zaradi ne vzpodbudnih rezultatov študije in dostopnosti drugih celičnih tipov zanimanje za skeletne mioblaste počasi zamrlo (Sanganalmath in Bolli, 2013).

### **5.1.2 Celice kostnega mozga**

Interes za ta celični tip je izhajal iz praktičnih razlogov in ne iz podkrepljenih podatkov o njihovem mehanizmu delovanja, saj je njihovo pridobivanje enostavno, gojenje pa zelo nezahtevno. Začetni val zanimanja za to celično skupino so sprožili izsledki eksperimenta, ki so pokazali, da lahko različne haematopoetične celice (podskupina celic kostnega mozga) regenerirajo infarktiran mišje srce, a je potrebno poudariti, da eksperiment ni bil nikoli več ponovljen (Orlic in sod., 2001). Kljub temu je v znanstvenem svetu raziskava sprožila začetek številnih študij uporabe teh celic za regeneracijo srca, medtem ko so osnovne raziskave na področju mehanizma delovanja teh celic zaostajale. To je najverjetneje razlog za težavno interpretacijo rezultatov študij in negotovosti kar se tiče resničnega učinka teh celic pri regeneraciji poškodovanega srca (Menasche, 2018a).

#### **5.1.2.1 Neselekcionirane enojedrne celice kostnega mozga**

Gre za izjemno heterogeno populacijo celic z zelo raznolikim delovanjem in fenotipom. V njej najdemo mešanico predniških, stromalnih in hematopoetičnih celic (Menasche, 2018a).

Leta 2006 so Hendriks in sod. poročali, da je intramiokardno injiciranje avtolognih celic kostnega mozga med CABG operacijo izboljšalo sposobnost krčenja v prej neviabilnem zabrazgotinjenem predelu, ni pa izboljšalo delovanja levega ventrikla (LV)- povečalo volumna prečrpane krvi (Hendriks in sod., 2006). O podobnih rezultatih so poročali Perin in sod. (2012). Pacienti s srčnim popuščanjem so prejeli avtologne celice kostnega mozga ali pa placebo raztopino. Po šestih mesecih se skupini med seboj nista značilno razlikovali (Perin in sod., 2012). Možni vzrok za različne izide je lahko variabilnost deležev podskupin celic kostnega mozga med pacienti. V tej heterogeni skupini celic je namreč več podskupin celic z različnim delovanjem in regenerativno sposobnostjo (Taylor in sod., 2016). To težavo naslavlja študija CardiAMP, v kateri avtologno celično terapijo prejmejo samo tisti kandidati, pri katerih uspejo iz kostnega mozga izolirati celice določenih skupin v ustreznih razmerjih (US National Library Of Medicine, 2020). Rezultati študije še niso znani, saj le-ta še vedno poteka, bodo pa verjetno vplivali na usodo uporabe neselekcioniranih celic kostnega mozga za regeneracijo srca, saj bo

v primeru neučinkovitosti tovrstne terapije zanimanje za uporabo tega celičnega tipa verjetno manjše.

#### 5.1.2.2 Mezenhimske matične celice

So multipotentne celice, ki se lahko diferencirajo v osteoblaste, hondrocite in adipocite. Ob specifičnih pogojih naj bi imele celo sposobnost *in vitro* (Caplan in Denis, 2006) in *in vivo* diferenciacije v kardiomiocite (Miyahara in sod., 2006). Izmed vseh celic kostnega mozga so mezenhimske matične celice (MMC) tiste, ki na področju regeneracije srca obljublajo največ. Poleg že naštetih lastnosti je uporabo podkrepila dostopnost, dobra sposobnost rasti, ustrezno ohranjanje biološke aktivnosti tudi po krioprezervaciji in močni parakrini učinki (Spees in sod., 2016), s katerimi verjetno spodbujajo lokalno rast celic na poškodovanem območju miokarda (Caplan in Denis, 2006). Zaradi njihove majhne imunogenosti so dobre kandidatke tudi za alogene terapije (Amado, 2005).

Do letošnjega leta je bilo izvedenih 1077 kliničnih študij z MMC za zdravljenje najrazličnejših bolezni, od tega 26 za zdravljenje srčnega popuščanja in 16 za zdravljenje ishemične kardiomiopatije. Pri večini študij so MMC pridobili iz kostnega mozga, nekaj pa iz popkovine in adipoznega tkiva. Prav zaradi uporabe različnih odmerkov MMC iz različnih virov pa so študije med seboj težko primerljive (Menasche, 2018a). Klinična študija, ki je potekala na pacientih s srčnim popuščanjem je med seboj primerjala tri različne odmerke avtogenih in alogeni MMC. Izsledki so pokazali, da so vsi trije odmerki, tako avtogenih kot alogeni MMC, prispevali k zmanjšanju ventrikularnega remodeliranja (Hare in sod., 2012). Terapija z MMC je bila izvedena tudi na pacientih z vstavljeno mehansko cirkulacijsko podporo levega ventrikla. Izsledki so pokazali le minimalno izboljšanje stanja- tisti pacienti, ki so prejeli MMC terapijo so imeli zgolj začasno zmanjšano potrebo po uporabi naprave v primerjavi s kontrolnimi pacienti (Ascheim in sod., 2014). Poročanja o formiranju osteoblastov in kostnega tkiva po transplantaciji MMC v mišje srce (Breitbach, 2007) so poudarila izjemno pomembnost v preprečevanju diferenciacije takšnih celic v druge celične tipe.

#### 5.1.3 CD 34+ in CD 133+ celice

CD34 in CD133 sta površinska označevalca, značilna za hematopoetske matične celice (HMC) in endotelne predniške celice (EPC). HMC se nahajajo v kostnem mozgu in se diferencirajo v različne tipe celic, med drugimi v EPC (Young, 2007). EPC se ne morejo diferencirati v kardiomiocite, a imajo zaradi svoje sposobnosti vaskularizacije pozitivne učinke na delovanje srca. Krožijo v perifernem krvnem obtoku in se v primeru ishemične poškodbe diferencirajo v endotelne celice ter tako omogočijo ponovno tvorbo žilnega endotelija (Kalka in sod., 2000) in angiogenezo (Young, 2007). Poleg tega naj bi endotelne celice, ki se formirajo iz EPC, izločale molekule, ki naj bi spodbujale parakrine učinke (Narmoneva, 2004).

Transplantacija avtolognih CD34+ celic pri pacientih z ishemično kardiomiopatijo, združena s CABG operacijo, je pokazala izboljšano kontraktilno sposobnost srca (Patel in sod., 2005). Rezultati študije Vrtovec in sod. (2011) so poročali o izboljšanjem delovanju levega ventrikla tudi pet let po injiciranju CD34+ celic.

Začetno navdušenje so z rezultati študije sprožili Stamm in sod. (2007), ki so pokazali, da je intramiokardno injiciranje CD133+ celic združeno s CABG operacijo izboljšalo iztis levega srčnega prekata (Stamm in sod., 2007). Na žalost rezultati nadaljnje študije iste ekipe niso pokazali pozitivnih učinkov CD133+ celic (Nasseri in sod., 2014). Enake izsledke je naknadno leta 2016 pokazala tudi študija, ki prav tako ni zasledila nobenih razlik v delovanju srca po terapiji s temi celicami v primerjavi s placebo skupino (Noiseux in sod., 2016).

#### **5.1.4 Srčne matične celice**

Spoznanje, da se odraslo človeško srce ves čas obnavlja, je ne samo ovrglo dolgo priznано doktrino o srcu kot postmitotičnem organu, ampak tudi odprlo vrata za nove terapevtske pristope (Sanganalmath in Bolli, 2013). Ta proces omogočajo v srcu prisotne matične celice, ki posedujejo sposobnost diferenciacije v kardiomiocite, gladke mišične celice in endotelne celice (Leri in sod., 2011). Srčne matične celice (SMC) se lahko iz srca izolirajo z dokaj ne-invazivno biopsijo ter se nato namnožijo *in vitro* (Smith in sod., 2007).

Na podlagi specifičnih površinskih označevalcev je bilo do sedaj izoliranih in identificiranih kar nekaj populacij SMC (Bianconi in sod., 2018), zaenkrat pa so klinične študije izvedli le na dveh populacijah celic : KIT+ SMC (Bolli in sod., 2011) in kardiosfernih SMC (Malliaras in sod., 2014). Čeprav so KIT+ celice bolj podvržene diferenciaciji v celice vaskularnega tkiva ter postanejo v kulturi hitro senescentne (Koninckx, 2011), so leta 2011 v študiji na bolnikih z ishemično kardiomiopatijo rezultati pokazali izboljšanje delovanja levega ventrikla ter zmanjšanje infarktne območja (Bolli in sod., 2011). Študija sicer za primerjavo podatkov ni uporabila nobene placebo skupine, zato so bile prisotne skrbi o integriteti pridobljenih rezultatov (Oransky, 2014). S kardiosfernimi SMC je leta 2014 potekala klinična študija, kjer so pri bolnikih, ki so doživeli srčni zastoj in popuščanje levega ventrikla, opazili izboljšano delovanje nekaterih predelov srca, zmanjšanje infarktne območja, a nobenega izboljšanja v iztisu levega srčnega prekata (Malliaras in sod., 2014).

#### **5.1.5 Embrionalne matične celice**

V nasprotju z že naštetimi celičnimi tipi, ki so izolirani iz tkiv, so embrionalne matične celice (EMC) izolirane iz znotraj celične mase blastociste (Thomson in sod., 1998). EMC so zaradi pluripotentnosti, sposobnosti samoobnavljanja in formiranja klonov »idealne« za diferenciacijo v različne celične tipe (Garry in Olson, 2006) z velikim potencialom za regeneracijo srca (Laflamme in Murry, 2005). Poleg že naštetih lastnosti uporabo še dodatno podkrepijo njihova

dobra sposobnost rasti in možnost strogega nadzora poteka diferenciacije (Menasche in sod., 2018b). Iz EMC diferencirane kardiomiocite, pridobljene iz embrionalnih telesc spontano bijejo in prenašajo akcijski potencial (He in sod., 2003).

Tri glavne ovire, ki otežujejo uporabo EMC, so zavračanje pri transplantacijah, saj gre za alogeno terapijo, zmožnost tvorbe teratomov *in vivo* ter etični zadržki zaradi njihovega izvora (Nussbaum, 2007). Zavračanju celic bi se lahko vsaj delno izognili z vzpostavitvijo celične banke z različnimi HLA tipi (Pucéat in Ballis, 2007) ali z uporabo induciranih pluripotentnih matičnih celic (Sanganalmath in Bolli, 2013). Tvorbi teratomov bi se potencialno lahko izognili z *in vitro* diferenciacijo EMC v kardiomiocite še pred injiciranjem (Laflamme in sod., 2007), čeprav je potrebno poudariti, da ima terapevtska uporaba za kakršno-koli možnost tvorbe teratomov ničelno toleranco.

Za klinično uporabo EMC se izkorišča njihovo lastnost pluripotentnosti in sposobnost tvorbe populacij zgodnjih predniških kardiovaskularnih celic (Bellamy in sod., 2015). Predniške kardiovaskularne celice prepoznamo po izražanju označevalca ISL1, ki se izraža na površini kardiovaskularnih celic ter označevalca SSEA1, ki pa z izražanjem kaže na izgubo pluripotentnosti. Prva študija, ki je potekala na človeku se je osredotočala na varno uporabo teh celic. Vključevala je šest pacientov s hudim ishemičnim disfunkcionalnim levim ventrikulumom, ki so jim med CABG operacijo vstavili celice ISL1<sup>+</sup>SSEA1<sup>+</sup> celice. Po 12 in 18 mesecih pri nobenem od pacientov niso opazili škodljivih učinkov (Menasche in sod., 2018b). Žal je zaradi majhnega števila pacientov ter prekrivajočih se učinkov CABG operacije težko sklepati o učinkovitosti teh celic. Res pa je, da so izid te študije podprli še Wang in sod. (2017), ki so z uporabo podobnih predniških celic poročali o izboljšani funkcionalnosti infarktiranega srca.

### 5.1.6 Inducirane pluripotentne matične celice

Leta 2006 sta Takahashi in Yamanaka (2006) s transdukcijo mišjih fibroblastov proizvedla populacijo induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPMC), ki izražajo enake površinske označevalce, imajo enako morfologijo in podobno sposobnost diferenciacije kot embrionalne matične celice (EMC). S pridobivanjem iPMC pridobimo celice s podobnimi lastnostmi kot jih imajo EMC, a se izognemo etičnim dilemam, ki so povezane s tem celičnim tipom. iPMC predstavljajo dobro izhodišče za *in vitro* pridobivanje avtolognih kardiomiocitov z za njih tipičnimi lastnostmi: spontano bitje, kontraktilna sposobnost in prisotnost ionskih kanalčkov (Pfannkuche in sod., 2009). Pridobivanje iPMC je težavno ne samo zaradi zaenkrat še ne-účinkovitega postopka, ampak tudi zaradi uporabe transkripcijskih faktorjev s potencialnim onkogenim delovanjem, ki lahko vplivajo na sposobnost formiranja teratomov. Poleg tega je tvorjenju teratomov podvržena tudi njihova pluripotentna narava (Kaji, 2009), zato je pomembno, da so celice pred transplantacijo v pacienta dokončno diferencirane. Prav tako je pridobivanje (predvsem avtolognih) iPMC v skladu z dobro proizvodno prakso delovno zahtevno in izjemno drago (Kadota in sod., 2020).

Shiba in sod. (2016) so v predkliničnih študijah poročali, da so transplantirane avtologne kardiomiocite, diferencirane iz iPMC izboljšale kontraktilno sposobnost srca in se na mestu vnosa obdržale kar 12 tednov. Poleg izboljšanega stanja so opazili tudi tahikardijo (srčni utrip hitrejši od normalnega), ki jo morda lahko povzročajo nezreli kardiomiociti. Kardiomiociti, diferencirani iz iPMC so namreč precej heterogeni, kar predstavlja oviro pri uporabi v kliničnih študijah. Mnoge študije so poročale o izboljšanemu postopku pridobivanja homogenih zrelih kardiomiocitov, kar naj bi izboljšalo vgnezdenje celic, odpravilo aritmije in zmanjšalo tumorski potencial (Tohyama in sod., 2013).

Letos so na Japonskem pričeli s prvo klinično študijo, kjer bodo uporabili iz iPMC diferencirane kardiomiocite na pacientih z izjemno težko obliko ishemične kardiomiopatije (Kadota in sod., 2020).

### **5.1.7 Transdiferencirane celice (programirani kardiomiociti)**

Srčni fibroblasti so precej zastopana celična skupina, ki jo najdemo v človeškem srcu. V primeru srčnega infarkta se ravno ta celična skupina transformira v miofibroblaste, ki prispevajo k fibrozi. Sposobnost transdiferenciacije teh celic bi ne samo zmanjšala fibrozo srca, temveč omogočila ponovno regeneracijo med infarktoma izgubljenih kardiomiocitov. Neposredna transdiferenciacija srčnih fibroblastov (SF) v inducirane kardiomiocitov podobne celice (iKPC) bi bistveno spremenila potek terapije. V primeru *in vivo* transdiferenciacije bi se izognili vmesnemu koraku (re)programiranja celic *in vitro*, transplantaciji, težavam z vgnezdenjem in preživetjem celic ob injiciranju. Že več študij poroča o uspešni *in vivo* transdiferenciaciji SF v iKPC s pomočjo dejavnikov za reprogramiranje v ishemičnem mišjem srcu (Qian in sod., 2012, Song in sod., 2012, Jayawardena in sod., 2014). Izsledki teh študij so pokazali, da so mišji iKPC pridobljeni *in vivo* bolj podobni endogenim kardiomiocitom kakor pa tisti, pridobljeni *in vitro*. Razlog za to so verjetno različni dejavniki, prisotni v naravnem mikrookolju. Zmožnost reprogramiranja človeških somatskih fibroblastov bi potencialno predstavljala dober vir celic za regenerativno terapijo. Nedavno so Cao in sod. (2016) *in vitro* transdiferencirali človeške fibroblaste v iKPC s pomočjo devetih različnih kemičnih induktorjev. iKPC so bile podobne človeškim kardiomiocitom po njihovem transkriptomu, epigenetiki in elektrofizioloških lastnostih. Čeprav lahko *in vivo* programiranje omogoči izboljšanje srčne funkcije in zmanjša fibrozo po srčnem infarktu, pa uporaba retrovirusnih in lentivirusnih vektorjev vodi do insercijske mutogeneze. Nedavno je bila odkrita neintegrativna metoda, kjer so s pomočjo policitronskega Sendai virusnega vektorja vstavili transkripcijske dejavnike Gata4, Mef2c in Tbx5 (SeV-GMT) in tako *in vitro* kot *in vivo* uspešno reprogramirali mišje fibroblaste (Miyamoto in sod., 2018). *In vivo* reprogramiranje je vodilo k izboljšanemu delovanju srca ter zmanjšani fibrozi. Čeprav se postopek reprogramiranja in transdiferenciacije mišjih fibroblastov nekoliko razlikuje od človeških, so dosedanji izsledki pomemben korak, ki vodi proti kliničnim študijam. Zaenkrat je učinkovitost transdiferenciacije človeških fibroblastov še nizka in je bila izvedena le *in vitro* ter z uporabo integrativnih metod, iKPC pa

izražajo heterogeno zrelost (Isomi in sod., 2019). Kljub temu, da je potrebnih še precej izboljšav in rešitev, je reprogramiranje fibroblastov s pomočjo SeV-GMT potencialni terapevtski pristop za regeneracijo srca v prihodnosti.

## 5.2 IZBOR USTREZNEGA CELIČNEGA TIPA

Eden izmed izzivov, s katerim se sooča regenerativna medicina je izbor celičnega tipa.

V primeru regeneracije srca je prednost skeletnih mioblastov njihova dobra odpornost na pogoje v ishemičnem ali infarktiranem srcu in njihova dobra obstojnost na mestu integracije, a se električno ne integrirajo z zdravimi kardiomiociti v srcu ter lahko ob nepravilno izvedeni transplantaciji oziroma neustreznem razrastu povzročijo aritmijo. Prav tako se skeletni mioblasti ne morejo diferencirati v kardiomiocite. Kljub pojasnjenemu vzroku za aritmije je zaradi ne vzpodbudnih rezultatov in dostopnosti drugih celičnih tipov zanimanje za skeletne mioblaste počasi zamrlo (Sanganalmath in Bolli, 2013).

Možen vzrok za nejasne in nasprotujoče si izide študij, izvedenih z neselekcioniranimi enojedrnimi celicami kostnega mozga, je heterogena zastopanost različnih podskupin celic kostnega mozga med pacienti, ki pa imajo različne lastnosti in različno regenerativno sposobnost. Trenutno je študija, ki to problematiko preučuje, še v teku. Zaradi nevzpodbudnih rezultatov do sedaj izvedenih študij pa ta celični tip verjetno ni optimalna izbira za celično terapijo za regeneracijo srca.

Izjemno veliko število študij, izvedenih z mezenhimskimi matičnimi celicami, navkljub poročanju nekaterih študij (npr. Breitbach in sod., 2007) o formiranju osteoblastov v srčnem tkivu, kaže na možnost varne uporabe tega multipotentnega celičnega tipa. Zaradi majhne imunogenosti so MMC primerne tudi za alogeno terapijo. Mehanizem delovanja njihovih močnih parakrinih signalov še ni popolnoma znan, zato je težko govoriti o tem ali celice tkivo dejansko regenerirajo z diferenciacijo v kardiomiocite ali s parakrinimi signali le spodbudijo naravno prisotne popravilne mehanizme. Da bi lahko dosegli visoko učinkovito celično terapijo z mezenhimskimi matičnimi celicami, bi bilo potrebno izboljšati razumevanje mehanizma delovanja tega celičnega tipa ter njegovega vpliva na kardiomiocite.

DC34+/ CD133+ celice so zaradi svoje sposobnosti vaskularizacije dobre kandidatke za celično terapijo za regeneracijo srca. Izboljšani pretok krvi v koronarnih žilah bi namreč lahko ublažil posledice ter preprečil nastanek novega srčnega infarkta. Te celice se ne zmorejo diferencirati v kardiomiocite, a morda na njihovo regeneracijo pozitivno vplivajo z izločanjem parakrinih signalov. Izsledki dosedanjih študij so nejasni in nasprotujoči si, zato bi za boljše razumevanje tega celičnega tipa ter njegovega mehanizma delovanja potrebovali nadaljnje študije.

KIT+ srčne matične celice posedujejo sposobnost diferenciacije, ne samo v kardiomiocite,



ampak tudi v celice vaskularnega tkiva. Njihova slaba stran je, da v kulturi hitro dosežejo senescenco, zato je njihovo gojenje bolj zahtevno. Do sedaj izvedene študije so poročale tako o pozitivnih kot ničelnih vplivih tega celičnega tipa, za boljše razumevanje pa so potrebne nadaljnje študije.

Kardiosferne srčne matične celice se diferencirajo v kardiomiocyte, vendar so si izsledki študij nasprotujoči in nejasni. Za boljše razumevanje vpliva tega celičnega tipa na regeneracijo srca so potrebne nadaljnje študije.

EMC s svojimi lastnostmi predstavljajo potencial za regeneracijo srca, a je pred tem potrebno premostiti problem zavračanja donorskih celic in tvorbe teratomov. Etične dileme, ki so povezane s pridobivanjem in karakterizacijo EMC pa še dodatno otežujejo situacijo. Navkljub nekaterim že obstoječim rešitvam je potrebno poudariti, da za terapevtsko uporabo obstaja ničelna toleranca za kakršno-koli možnost tvorbe teratomov. Prav tako je za celično terapijo primernejša avtologna terapija, v primeru uporabe EMC pa smo omejeni zgolj na alogeno terapijo. Vzpodbudni rezultati do sedaj izvedenih študij so dobra popotnica za nadaljevanje, a etična spornost pridobivanja EMC ter omejenost na alogeno terapijo predstavljata težavo.

Tako kot EMC, so tudi inducirane pluripotentne matične celice (iPMC) z zmožnostjo diferenciacije v kardiomiocyte potencialne kandidatke za učinkovito regeneracijo srca. Prednosti iPMC so, da njihovo pridobivanje ni etično sporno ter da so primerne za avtologno terapijo, s čimer se izognemo zavračanju transplantiranih celic. Njihovo pridobivanje je zaenkrat še dokaj neučinkovito in drago, v samem postopku pa se uporabljajo transkripcijski faktorji, ki imajo potencialno onkogeno delovanje. Težavo predstavlja tudi nepopolno reprogramiranje in karakterizacija pridobljenih celic. Prav tako so zaradi pluripotentne narave nagnjene k tvorbi teratomov. Trenutno je prva klinična študija s kardiomiocitom-podobnimi celicami, diferenciranimi iz iPMC še v teku, njihovi izsledki pa bodo dober pokazatelj učinkovitosti iPMC za uporabo pri regeneraciji srca.

Sposobnost transdiferenciacije srčnih fibroblastov bi ne samo zmanjšala fibrozo srca, temveč omogočila ponovno regeneracijo med infarktom izgubljenih kardiomiocitov. Izgnili bi se vmesnemu koraku *in vitro* formiranja induciranih pluripotentnih matičnih celic (iPMC), transplantaciji ter težavam povezanih z njo. Zaenkrat je učinkovitost programiranja celic dokaj nizka, izvedena samo *in vitro*, iKPC pa so po diferenciaciji heterogene. Kljub temu, da je potrebnih še precej izboljšav, je reprogramiranje somatskih celic s pomočjo neintegrativnih metod obetaven terapevtski pristop za regeneracijo srca in druge celične terapije v prihodnosti.

Do izbire optimalnega celičnega tipa za regeneracijo srca nam manjka še precej znanja. Vseeno pa je iz dosedanjih izsledkov moč sklepati, da idealnega celičnega tipa ni ter da verjetno tudi z dodatnimi študijami ne bomo našli univerzalnega celičnega tipa, ki bi bil primeren za vse paciente. Vseeno menim, da se bodo nadaljnje študije vse bolj usmerjale v uporabo induciranih

pluripotentnih matičnih celic in transdiferenciranih celic, saj jih je mogoče *in vitro* ali *in vivo* (trans)diferencirati v avtologne kardiomiocitom podobne celice. Zaradi težavne diferenciacije v kardiomiocite se bo verjetno čedalje bolj opuščalo idejo o uporabi somatskih matičnih celic za regeneracijo srca in pa tudi za aktivacijo parakrinih učinkov, saj bo z izboljšanim razumevanjem delovanja parakrinih dejavnikov morda mogoč celo brezcelični terapevtski pristop, osnovan na injiciranju proteinov s parakrinim delovanjem. V preglednici 1 so predstavljeni različni celični tipi, ki so potencialno uporabni za regeneracijo srca.

Preglednica 1: Možni tipi donorskih celic za regeneracijo srca in njihove lastnosti

Celični tip	Prednosti	Slabosti	Diferenc. v kardiomiocit
Skeletni mioblasti	Dostopnost, odpornost na hipoksijo in ishemične pogoje, robustnost, obstojnost na mestu trasplantacije	Se električno ne integrirajo z miokardiocitami, možnost nastanka aritmije	Ne
Neselecionirane enojedrne celice kostnega mozga	Nezahtevno gojenje, enostavno pridobivanje	Nejasni, nasprotujoči se izidi študij – vprašljiva učinkovitost	Ne
Mezenhimske matične celice	<i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> diferenc. v kardiomiocite, dobra sposobnost rasti, močni parakrini efekti, primerne za alogeno terapijo	Diferencirajo tudi v druge celične tipe, variabilnost deležev podskupin celic kostnega mozga	Da
DC34+/CD133+ celice	Enostavno pridobivanje, inducirajo angiogenezo, izločajo molekule, ki stimulirajo parakrino delovanje	Nejasni, nasprotujoči se izidi študij – vprašljiva učinkovitost	Ne
KIT+ srčne matične celice	Dokaj enostavno pridobivanje, možnost kultivacije, diferenciacija v celice vaskularnega tkiva	V kulturi hitro dosežejo senescenco	Da
Kardiosferne SMC	Dokaj enostavno pridobivanje, možnost kultivacije	Vprašljiva učinkovitost	Da
EMC	Dostopnost, pluripotentnost, sposobnost samoobnavljanja, formiranje klonov, dobra sposobnost rasti, nadzor diferenciacije	Zavračanje, alogena terapija, možna tvorba teratomov, etični zadržki	Da
iPMC	Dobra sposobnost rasti, nadzor diferenciacije, avtologna terapija	Neučinkovito, drago pridobivanje, potencialno onkogeno delovanje, možna tvorba teratomov	Da
Transdiferencirane celice	Zmanjšanje fibroze, izboljšano delovanje srca, z <i>in vivo</i> transdiferenciacijo se izognemo iPMC in transplantaciji	Slaba učinkovitost, kliničnih študij še ni, heterogenost zrelih iKPC	Da

### 5.3 LEKCIJE PRVIH KLINIČNIH ŠTUDIJ

Za nejasne in nasprotujoče si izide študij je v veliki meri odgovorno pomanjkanje predznanja o mehanizmu delovanja, ki eventuelno vodi v napačno izbiro celičnega tipa ter nadaljnje težave z njihovim preživetjem, vgnezditevijo v tkiva in regeneracijo srca. Dober primer je že omenjena študija na miši (Orlic in sod., 2001) katere rezultati so bili objavljeni aprila 2001, avgusta pa so že poročali o prvih aplikacijah teh celic na pacientih (Strauer in sod., 2001). Sprožen je bil val kliničnih študij, njihovi rezultati so bili mnogokrat nejasni, učinkovitost terapije pa vprašljiva.

Veliko do sedaj izvedenih študij je bilo slabo načrtovanih. Protokoli izolacije celic so bili nestandardizirani (Wollert in Drexler, 2010), zato medsebojne primerjave študij niso bile mogoče. Mnogokrat je bila terapija izvedena v kombinaciji z drugimi terapevtskimi pristopi npr. CABG operacija, izidi terapije in operacije pa so se posledično prikrivali (Reinecke in sod., 2000). Placebo skupine v nekaterih študijah sploh ni bilo (Oransky, 2014), prav tako pa so bile uporabljene kontrolne skupine pogosto neustrezne, zato rezultati niso zanesljivi. Ker so študije zajemale majhno število pacientov (Sanganalmath in Bolli, 2013), bi bilo potrebno temu primerno prilagoditi tudi statistična orodja uporabljena za interpretacijo izidov (Menasche, 2018a).

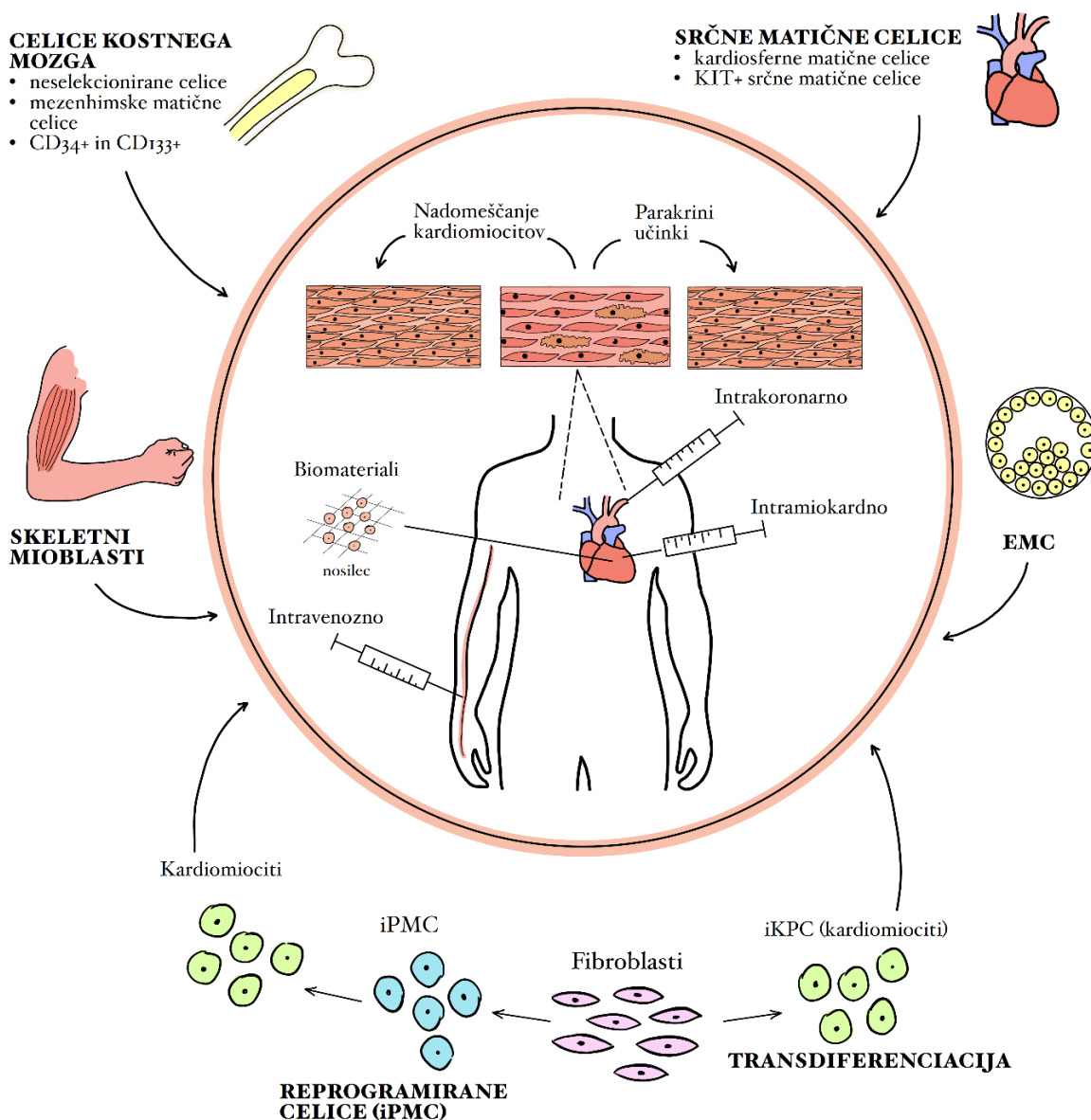
### 5.4 MEHANIZEM DELOVANJA CELIČNIH TERAPIJ

Do sedaj so bile klinične študije mnogokrat izvedene brez pravega predznanja in razumevanja mehanizma delovanja posameznih celičnih tipov. To je najverjetneje razlog za težavno interpretacijo rezultatov in negotovost glede ocene resničnega učinka transplantiranih celic pri regeneraciji poškodovanega srca (Menasche, 2018a). Da bi v prihodnosti lahko izboljšali izide terapij, je pomembno, da se zavedamo mehanizma delovanja celic in lahko na podlagi tega znanja, glede na naš cilj, izberemo ustrezen celični tip. Izoblikovali sta se dve glavni hipotezi o mehanizmu delovanja celic pri regeneraciji srca (Slika 1). Prva temelji na tem, da transplantirane celice nadomestijo izgubljene kardiomiocite in tako tvorijo novo miokardno tkivo. Druga pa pravi, da transplantirane celice z izločanjem specifičnih molekul parakrino aktivirajo naravno prisotne celične popraviljalne mehanizme in tako posredno vplivajo na regeneracijo tkiva (Menasche, 2018a).

#### 5.4.1 Nadomeščanje izgubljenega miokarda

Ta mehanizem delovanja zahteva vnos zadostne količine celic, ki so sposobne diferenciacije v kardiomiocite in tvorjenja novega miokardnega tkiva. Poleg tega se morajo celice na mestu vnosa vgraditi za daljši čas in se z endogenimi kardiomiociti elektromehanično pariti (Menasche, 2018a). Zaradi spoznanja, da skeletni mioblasti (Reinecke in sod., 2002), celice kostnega mozga (Murry in sod., 2004) in CD34+/CD133+ (Kalka in sod., 2000) celice niso sposobne transdiferenciacije v kardiomiocite, so te celične skupine neprimerne za uporabo v kontekstu nadomeščanja izgubljenega tkiva. Zaradi velikega števila odmrlih celic, ki jih je

potrebno nadomestiti, so KIT+ SMC zaradi slabe zmožnosti kultivacije prav tako neprimerne. Dominantno parakrino delovanje mezenhimskih matičnih celic (Chimenti in sod., 2010) ter odsotnost dolgoročnega vgrajevanja preostalih celični tipov (Emmert in sod., 2017) kaže, da so pluripotentne matične celice ali reprogramirane/transdiferencirane celice verjetno najboljša izbira za nadomeščanje izgubljenega miokarda. EMC so zaradi etičnih dilem in alogene terapije v primerjavi z induciranimi pluripotentnimi matičnimi celicami (iPMC) ali transdiferenciranimi celicami manj primerne. Potrebno je poudariti, da je prva klinična študija z iPMC še vedno v teku ter da bodo njeni izsledki dober pokazatelj delovanja tega celičnega tipa za regeneracijo srca.



Slika 1: Možni tipi donorskih celic, način vnosa in mehanizem delovanja

Programirane celice bodo v prihodnosti zaradi dejstva, da bi s takšnim pristopom zaobšli pridobivanje EMC ter se izognili mnogim do sedaj prisotnim omejitvam celične terapije, povezanimi z njihovo transplantacijo, verjetno postale eden glavnih terapevtski pristopov za regeneracijo srca v prihodnosti.

#### **5.4.2 Aktivacija endogenih popravljalnih mehanizmov s parakrinimi učinki**

Ta mehanizem delovanja izkorišča parakrine učinke eksogenih celic na naravno prisotne celične popravljalne mehanizme (Garbern in Lee, 2013). Potencialni učinki parakrinih dejavnikov so zaščita miokarda, neovaskularizacija, zmanjšanje vnetja na infarktne območju, aktivacija rezidenčnih predniških in matičnih celic ter povečana proliferacija kardiomiocitov (Landmesser in sod., 2004). Prednost tega mehanizma delovanja je, da ni potrebno zagotoviti dolgoročnega vgrajevanja celic na obolelo mesto, ampak je dovolj da se celice na obolelem mestu zadržijo samo toliko časa, da izločijo biološko aktivne molekule (Menasche, 2018a).

Če je cilj študije aktivacija endogenih popravljalnih mehanizmov, potrebujemo celice z visoko sekretorno sposobnostjo. Mezenhimske matične celice ter CD34+/CD133+ celice imajo močno parakrino delovanje, zato se zdijo primerne kandidatke. V primerjalni študiji (v primerjavi s celicami kostnega mozga in adipocitnimi celicami) pa so celice diferencirane iz srčnih matičnih celic pokazale najvišjo sekretorno sposobnost različnih rastnih dejavnikov (Li in sod., 2012).

### **5.5 METODE VNOSA CELIC, NJIHOVO PREŽIVETJE, ZADRŽEVANJE IN VRAŠČANJE**

Glavna omejitev celične terapije za regeneracijo srca je njena nizka učinkovitost. Poleg nepoznavanja mehanizma delovanja in posledično neustreznega izbora celičnega tipa je za nizko učinkovitost odgovorno tudi slabo preživetje celic po intramiokardnem injiciranju (v do sedaj izvedenih študijah najpogostejši mehanizem vnašanja celic) ter izjemno hitro izplakovanje celic iz srca (van den Akker in sod., 2017) kot posledica slabega vraščanje celic na mestu vnosa (Robey in sod., 2008).

Do sedaj uporabljene tehnike vnosa celic na obolelo mesto so se izkazale za slabo učinkovite, saj velik del celic ob injiciranju odmre ali pa jih tok krvi odplakne iz mesta vnosa. Navkljub poročanju o višji učinkovitosti direktnega intramiokardnega injiciranja v primerjavi z intrakoronarno in retrogradno vensko koronarno potjo (Hou in sod., 2005), so celice dostavljene na tak način vseeno izjemno hitro odplaknjene iz srca - običajno s samo nekaj utripi (van den Akker in sod., 2017). Za boljšo učinkovitost te tehnike in boljše preživetje celic bi bilo potrebno izboljšati zasnovo katetra (Behfar in sod., 2013) ter prilagoditi pretok celic iz katetra na mesto vnosa (Amer in sod., 2016).

Endovenozni vnos celic je v primerjavi z direktnim intramiokardnim in intrakoronarnim injiciranjem bistveno manj invaziven. Neinvazivnost postopka je več kot zaželjena, saj je vsaj zaenkrat zaradi nizke učinkovitosti potrebno za dolgotrajni učinek celice na obolelo mesto vnašati

večkrat (Guo in sod., 2017). Slaba stran te metode je predvsem ta, da se velik delež celic ujame v drugih organih, z intravenoznim vnosom je namreč po enem tednu v srcu prisotnih samo še en odstotek transplantiiranih celic (Parekkadan, 2010).

Poškodbam zaradi injiciranja in pa hitremu odplakovanju iz mesta vnosa se lahko izognemo z vgrajevanjem celic v biomateriale, ki poleg 3D oblike celicam nudi tudi zaščito pred poškodbami (O'Neill in sod., 2016). Na voljo so različni biomateriali v tekoči obliki, ki na mestu vnosa polimerizira ali v obliki nosilca, ki se na obolelo mesto vstavi z operacijo (Menasche, 2018a).

Na preživetje celic v primeru alogene terapije močno vpliva imunski sistem. Tega je moč utišati z imunosupresivi, a se zaradi negativnega učinka, ki ga povzroči doživljenjsko jemanje teh zdravil (Schwartz in sod., 2015) razvijajo tudi drugi načini, ki preprečujejo imunske reakcije na transplantiirane celice. Ustanovitev celične banke z različnimi HLA haplotipi bi lahko omogočila izbor takšne celične linije, ki ima pacientu enak HLA haplotip (Menasche, 2018a), s tem pa bi vsaj deloma rešili težavo zavračanja.

Do sedaj je bilo identificiranih nekaj glavnih dejavnikov, ki omogočijo naravno zadrževanje in kopičenje predniških celic na poškodovanem mestu. Po srčnem infarktu se namreč iz nekroznih celic izločajo kemokini, ki sprožijo izstopanje srčnih predniških celic iz krvnega obtoka in njihovo zadrževanje na poškodovanem mestu (Kohno in sod., 2009). Znanje o delovanju tega naravno prisotnega mehanizma omogoča razvoj strategij za izboljšanje zadrževanja celic na obolelem mestu (Chavakis in sod., 2008). S povečano lokalno koncentracijo teh molekul ali z genetskim modificiranjem celic, da bi izražale večje število receptorjev za te molekule, bi lahko povečali delež naravno prisotnih predniških celic in tudi transplantiiranih celic ter podaljšali njihov čas zadrževanja ter tako izboljšali učinkovitost terapije (Penn, 2009).

Predpriprava ishemičnega oziroma infarktiranega tkiva je eden izmed pristopov, ki bi prav tako lahko omogočil boljše zadrževanje celic na mestu vnosa. Predhodna obdelava tkiva z nizko energijskimi električnimi pulzi, ki aktivirajo izločanje kemoatraktantov, namreč izboljša zadrževanje celic na mestu vnosa (Aicher in sod., 2006).

## **6 ZAKLJUČEK**

Dosedanji izidi kliničnih študij so pokazali majhen učinek celične terapije, kar pa glede na pomanjkanje znanja o mehanizmih delovanja in kompleksnosti regeneracije srca ni presenetljivo. Izidi kliničnih študij prve generacije so kljub nizki učinkovitosti pokazali, da imajo tako endogene kot transplantiirane odrasle matične in predniške celice učinek na poškodovano srce in obenem izpostavile težave, ki jih je potrebno rešiti preden bo učinkovitost celičnih terapij ustrezna. Omogočile so spoznanje, da je izbor ustreznega celičnega tipa odvisen od strategije zdravljenja, ki se je želimo poslužiti ter da univerzalni celični tip za regeneracijo srca verjetno ne obstaja. Na žalost so zaradi slabega razumevanja mehanizma delovanja, slabo zastavljenih študij in neenotnih protokolov študije prve generacije s kontroverznimi izidi očrnilo celično terapijo za regeneracijo

srca. Kljub temu menim, da bodo študije druge generacije, podkrepljene s teoretičnim razumevanjem mehanizma delovanja celic ter s standardiziranimi protokoli, omogočile medsebojne primerjave in pokazale vzpodbudne rezultate. Izboljšano razumevanje regeneracije srca in poznavanje vpliva posameznega celičnega tipa na regeneracijo srca bosta omogočila razvoj visoko-účinkovite celične terapije. Z izboljšanim razumevanjem delovanja parakrinih dejavnikov bo morda mogoč celo brezcelični terapevtski pristop, ki bo osnovan na parakrinem delovanju.

## 7 VIRI

- Aicher A., Heeschen C., Sasaki K.I., Urbich C., Zeiher A.M., Dimmeler S. 2006. Low-energy shock wave for enhancing recruitment of endothelial progenitor cells: A new modality to increase efficacy of cell therapy in chronic hind limb ischemia. *Circulation*, 114, 25: 2823–2830
- Amado L.C., Saliaris A.P., Schuleri K.H., St. John M., Xie J.S., Cattaneo S., Durand D.J., Fitton T., Kuang J.Q., Stewart G., Lehrke S., Baumgartner W.W., Martin B.J., Heldman A.W., Hare J.M. 2005. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 32: 11474–11479
- Amer M.H., Rose F.R.A.J., White L.J., Shakesheff K.M. 2016. A detailed assessment of varying ejection rate on delivery efficiency of mesenchymal stem cells using narrow-bore needles. *Stem cells translational medicine*, 5, 3: 366–378
- Ascheim D.D., Gelijns A.C., Goldstein D., Moye L.A., Smedira N., Lee S., ... Woo J. 2014. Mesenchymal precursor cells as adjunctive therapy in recipients of contemporary left ventricular assist devices. *Circulation*, 129, 22: 2287–2296
- Behfar A., Latere J.P., Bartunek J., Homasy C., Daro D., Crespo-Diaz R.J., Stalboerger P.G., Steenwinckel V., Seron A., Redfield M.M., Terzic A. 2013. Optimized delivery system achieves enhanced endomyocardial stem cell retention. *Circulation: Cardiovascular Interventions*, 6, 6: 710–718
- Bellamy V., Vanneau V., Bel A., Nemetalla H., Emmanuelle Boitard S., Farouz Y., Joanne P., Perier M.C., Robidel E., Mandet C., Hagege A., Bruneval P., Larghero J., Agbulut O., Menasché P. 2015. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 34, 9: 1198–1207
- Bergmann O., Bhardwaj R.D., Bernard S., Zdunek S., Barnabé-Heide F., Walsh S., Zupicich J., Alkass K., Buchholz B.A., Druid H., Jovinge S., Frisén J. 2009. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*, 324, 5923: 98–102
- Bianconi V., Sahebkar A., Kovanen P., Bagaglia F., Ricciuti B., Calabrò P., Patti G., Pirro M. 2018. Endothelial and cardiac progenitor cells for cardiovascular repair: A controversial paradigm in cell therapy. *Pharmacology and Therapeutics Elsevier*, 181: 136-168
- Bolli R., Chugh A.R., D'Amario D., Loughran J.H., Stoddard M.F., Ikram S., et al. 2011. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): Initial results of a randomised phase 1 trial. *The Lancet Lancet Publishing Group*, 378: 1847-1857

- Bonaros N., Rauf R., Wolf D., Margreiter E., Tzankov A., Schlechta B., Kocher A., Ott H., Schachner T., Hering S., Bonatti J., Laufer G. 2006. Combined transplantation of skeletal myoblasts and angiopoietic progenitor cells reduces infarct size and apoptosis and improves cardiac function in chronic ischemic heart failure. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 132, 6: 1321-1328
- Breitbach M., Bostani T., Roell W., Xia Y., Dewald O., Nygren J.M., Fries J.W.U., Tiemann K., Bohlen H., Hescheler J., Welz A., Bloch W., Jacobsen S.E.W., Fleischmann B.K. 2007. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*, 110, 4: 1362–1369
- Buckingham M, Montarras D. 2008. Skeletal muscle stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development*, 18:330–336.
- Cao N., Huang Y., Zheng J., Spencer C.I., Zhang Y., Fu J.D., Nie B., Xie M., Zhang M., Wang H., Ma T., Xu T., Shi G., Srivastava D., Ding S. 2016. Conversion of human fibroblasts into functional cardiomyocytes by small molecules. *Science*, 352, 6290: 1216–1220
- Chachques J.C., Acar C., Herreros J., Trainini J.C., Prosper F., D’attellis N., Fabiani J.-N., Carpentier A.F. 2004. Cellular Cardiomyoplasty: Clinical Application. *The annals of thoracic surgery*, 77: 1121–1151
- Chavakis E., Urbich C., Dimmeler S. 2008. Homing and engraftment of progenitor cells: A prerequisite for cell therapy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45: 514-522
- Chimenti I., Smith R.R., Li T.S., Gerstenblith G., Messina E., Giacomello A., Marbán E. 2010. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circulation Research*, 106, 5: 971–980
- Caplan A.I., Dennis J.E. 2006. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98: 1076-1084
- Emmert M.Y., Wolint P., Jakab A., Sheehy S.P., Pasqualini F.S., Nguyen T.D.L., et al. 2017. Safety and efficacy of cardiopoietic stem cells in the treatment of post-infarction left-ventricular dysfunction – From cardioprotection to functional repair in a translational pig infarction model. *Biomaterials*, 122: 48–62
- Garbern J.C., Lee R.T. 2013. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell Cell Press*, 12: 689-698
- Garry D.J., Olson E.N. 2006. A Common Progenitor at the Heart of Development. *Cell*, 127: 1101-1104
- Noiseux N., Mansour S., Weisel R., Stevens L.M., Der Sarkissian S., Tsang K., Crean A.M., Larose E., Li S.H., Wintersperger B., Vu M.Q., Prieto I., Li R.K., Roy D.C., Yau T.M. 2016. The IMPACT-CABG trial: A multicenter, randomized clinical trial of CD133+ stem cell therapy during coronary artery bypass grafting for ischemic cardiomyopathy. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 152, 6: 1582-1588
- Nussbaum J., Minami E., Laflamme M.A., Virag J.A.I., Ware C.B., Masino A., Muskheli V., Pabon L., Reinecke H., Murry C.E. 2007. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *The FASEB Journal*, 21, 7: 1345–1357



- Guo Y., Wysoczynski M., Nong Y., Tomlin A., Zhu X., Gumpert A.M., Nasr M., Muthusamy S., Li H., Book M., Khan A., Hong K.U., Li Q., Bolli R. 2017. Repeated doses of cardiac mesenchymal cells are therapeutically superior to a single dose in mice with old myocardial infarction. *Basic Research in Cardiology*, 112, 2: 18
- Hare J.M., Fishman J.E., Gerstenblith G., DiFede Velazquez D.L., Zambrano J.P., Suncion V.Y., et al. 2012. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: The POSEIDON randomized trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 308, 22: 2369–2379
- He J.Q., Ma Y., Lee Y., Thomson J.A., Kamp T.J. 2003. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: Action potential characterization. *Circulation Research*, 93, 1: 32–39
- Hendrikx M., Hensen K., Clijsters C., Jongen H., Koninckx R., Bijnens E., Ingels M., Jacobs A., Geukens R., Dendale P., Vijgen J., Dilling D., Steels P., Mees U., Rummens J.L. 2006. Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: Results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation*, 114, SUPPL. 1: 101-107
- Hou D., Youssef E.A.S., Brinton T.J., Zhang P., Rogers P., Price E.T., Yeung A.C., Johnstone B.H., Yock P.G., March K.L. 2005. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: Implications for current clinical trials. *Circulation*, 112, 9: 150-156
- Isomi M., Sadahiro T., Ieda M. 2019. Progress and Challenge of Cardiac Regeneration to Treat Heart Failure. *Journal of Cardiology Japanese College of Cardiology*, 73, 2: 97-101
- Jayawardena T.M., Finch E.A., Zhang L., Zhang H., Hodgkinson C.P., Pratt R.E., Rosenberg P.B., Mirosou M., Dzau V.J. 2014. MicroRNA induced cardiac reprogramming in vivo evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circulation Research*, 116, 3: 418–424
- Kadota S., Tanaka Y., Shiba Y. 2020. Heart regeneration using pluripotent stem cells. *Journal of Cardiology Japanese College of Cardiology*, 5, 1: 74–81
- Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. 2009. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458, 7239: 771–775
- Kalka C., Masuda h., Takahashi T., Kalka-Moll M., Silver M., Kearney M., Li T., Isner M., Asahara T. 2000. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 7: 3422–3427
- Kohno T., Anzai T., Naito K., Miyasho T., Okamoto M., Yokota H., Yamada S., Maekawa Y., Takahashi T., Yoshikawa T., Ishizaka A., Ogawa S. 2009. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodelling. *Cardiovascular research*, 81: 565-573
- Koninckx R., Daniëls A., Windmolders S., Carlotti F., Mees U., Steels P., Rummens J.L., Hendrikx M., Hensen K. 2011. Mesenchymal stem cells or cardiac progenitors for cardiac repair? A comparative study. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68, 12: 2141–2156

- Laflamme M.A., Murry C.E. 2005. Regenerating the heart. *Nature Biotechnology*, 23, 7: 845–856
- Laflamme M.A., Chen K.Y., Naumova A. V., Muskheli V., Fugate J.A., Dupras S.K., ... Murry C. 2007. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotechnology*, 25, 9: 1015–1024
- Landmesser U., Engberding N., Bahlmann F.H., Schaefer A., Wiencke A., Heineke A., Spiekermann S., Hilfiker-Kleiner D., Templin C., Kotlarz D., Mueller M., Fuchs M., Hornig B., Haller H., Drexler H. 2004. Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 110, 14: 1933–1939
- Leri A., Kajstura J., Anversa P. 2011. Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: A paradigm shift in human myocardial biology. *Circulation Research*, 109: 941–961
- Li T.S., Cheng K., Malliaras K., Smith R.R., Zhang Y., Sun B., Matsushita N., Blusztajn A., Terrovitis J., Kusuoka H., Marbán L., Marbán E. 2012. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *Journal of the American College of Cardiology*, 59, 10: 942–953
- Menasché P., Alfieri O., Janssens S., McKenna W., Reichenspurner H., Trinquart L., Vilquin J.T., Marolleau J.P., Seymour B., Larghero J., Lake S., Chatellier G., Solomon S., Desnos M., Hagege A.A. 2008. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*, 117, 9: 1189–1200
- Menasché P. 2018a. Cell therapy trials for heart regeneration — lessons learned and future directions. *Nature Reviews Cardiology* Nature Publishing Group, 15: 659–671
- Menasché P., Vanneaux V., Hagege A., Bel A., Cholley B., Parouchev A., et al. 2018b. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell–Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 71, 4: 429–438
- Malliaras K., Makkar R.R., Smith R.R., Cheng K., Wu E., Bonow R.O., Marbán L., Mendizabal A., Cingolani E., Johnston P. V., Gerstenblith G., Schuleri K.H., Lardo A.C., Marbán E. 2014. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: Evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-derived aUtologous stem CElls to reverse ventricular dysfunction). *Journal of the American College of Cardiology*, 63, 2: 110–122
- Miyagawa S., Domae K., Yoshikawa Y., Fukushima S., Nakamura T., Saito A., Sakata Y., Hamada S., Toda K., Pak K., Takeuchi M., Sawa Y. 2017. Phase I Clinical Trial of Autologous Stem Cell-Sheet Transplantation Therapy for Treating Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association*, 6, 4: 1–12
- Miyahara Y., Nagaya N., Kataoka M., Yanagawa B., Tanaka K., Hao H., Ishino K., Ishida H., Shimizu T., Kangawa K., Sano S., Okano T., Kitamura S., Mori H. 2006. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Medicine*, 12, 4: 459–465

- Miyamoto K., Akiyama M., Tamura F., Isomi M., Yamakawa H., Sadahiro T., et al. 2018. Direct In Vivo Reprogramming with Sendai Virus Vectors Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Cell Stem Cell*, 22, 1: 91-103
- Murry C.E., Soonpaa M.H., Reinecke H., Nakajima H., Nakajima H.O., Rubart M., Pasumarthi K.B.S., Virag J.I., Bartelmez S.H., Poppa V., Bradford G., Dowell J.D., Williams D.A., Field L.J. 2004. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 428, 6983: 664–668
- Narmoneva D.A., Vukmirovic R., Davis M.E., Kamm R.D., Lee R.T. 2004. Endothelial cells promote cardiac myocyte survival and spatial reorganization: Implications for cardiac regeneration. *Circulation*, 110, 8: 962–968
- Nasseri B.A., Ebell W., Dandel M., Kukucka M., Gebker R., Doltra A., Knosalla C., Choi Y.-H., Hetzer R., Stamm C. 2014. Autologous CD133<sup>+</sup> bone marrow cells and bypass grafting for regeneration of ischaemic myocardium: the Cardio133 trial. *European Heart Journal*, 35: 1263–1274
- O'Neill H.S., Gallagher L.B., O'Sullivan J., Whyte W., Curley C., Dolan E., Hameed A., O'Dwyer J., Payne C., O'Reilly D., Ruiz-Hernandez E., Roche E.T., O'Brien F.J., Cryan S.A., Kelly H., Murphy B., Duffy G.P. 2016. Biomaterial-Enhanced Cell and Drug Delivery: Lessons Learned in the Cardiac Field and Future Perspectives. *Advanced Materials*, 28: 5648-5661
- Oransky I. 2014. Harvard- Brigham heart researcher under investigation earns Lancet Expression of Concern. *Retraction Watch*.  
<https://retractionwatch.com/2014/04/11/harvard-brigham-heartresearcher-under-investigation-earns-lancet-expression-of-concern/>. (6.8.2020)
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S.M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D.M., Leri A., Anversa P. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410, 6829: 701–705
- Parekkadan B., Milwid J.M. 2010. Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 12: 87-117
- Patel A.N., Geffner L., Vina R.F., Saslavsky J., Urschel H.C., Kormos R., Benetti F. 2005. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: A prospective randomized study. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 130, 6: 1631-1638
- Penn M.S. 2009. Importance of the SDF-1: CXCR4 axis in myocardial repair. *Circulation Research*, 104: 1133-1135
- Perin E.C., Willerson J.T., Pepine C.J., Henry T.D., Ellis S.G., Zhao D.X.M., et al. 2012. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: The FOCUS-CCTRN trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 307, 16: 1717–1726
- Pfannkuche K., Liang H., Hannes T., Xi J., Fatima A., Nguemo F., Matzkies M., Wernig M., Jaenisch R., Pillekamp F., Halbach M., Schunkert H., Šaric T., Hescheler J., Reppel M. 2009. Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: Intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24, 1–2: 73–86

- Pucéat M., Ballis A. 2007. Embryonic stem cells: From bench to bedside. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 82, 3: 337-339
- Qian L., Huang Y., Spencer C.I., Foley A., Vedantham V., Liu L., Conway S.J., Fu J.D., Srivastava D. 2012. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 485, 7400: 593–598
- Reinecke H., MacDonald G.H., Hauschka S.D., Murry C.E. 2000. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle: Implications for infarct repair. *Journal of Cell Biology*, 149, 3: 731–740
- Reinecke H., Poppa V., Murry C.E. 2002. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 34, 2: 241–249
- Robey T.E., Saiget M.K., Reinecke H., Murry C.E. 2008. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 45: 567-581
- Sanganalmath S.K., Bolli R. 2013. Cell therapy for heart failure: A comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circulation Research*, 113, 6: 810–834
- Schwartz S.D., Regillo C.D., Lam B.L., Elliott D., Rosenfeld P.J., Gregori N.Z., et al. 2015. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet*, 385, 9967: 509–516
- Shi X., Garry D.J. 2006. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Genes and Development*, 352, 6290, 1216-1220
- Shiba Y., Gomibuchi T., Seto T., Wada Y., Ichimura H., Tanaka Y., et al. 2016. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*, 538, 7625: 388–391
- Smith R.R., Barile L., Cho H.C., Leppo M.K., Hare J.M., Messina E., Giacomello A., Abraham M.R., Marbán E. 2007. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*, 115, 7: 896–908
- Song K., Nam Y.J., Luo X., Qi X., Tan W., Huang G.N., Acharya A., Smith C.L., Tallquist M.D., Neilson E.G., Hill J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. 2012. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 485, 7400: 599–604
- Spees J.L., Lee R.H., Gregory C.A. 2016. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research and Therapy*, 7, 1: 125
- Stamm C., Kleine H.D., Choi Y.H., Dunkelmann S., Lauffs J.A., Lorenzen B., David A., Liebold A., Nienaber C., Zurakowski D., Freund M., Steinhoff G. 2007. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: Safety and efficacy studies. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 133, 3: 717-725
- Strauer, B. E., Brehm M., Zeus T., Gattermann N., Hernandez A., Sorg R.V., Kögler G., Wernet P. 2001. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for

- myocardial regeneration following myocardial infarction. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 126: 932-938
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126, 4: 663–676
- Taylor D.A., Perin E.C., Willerson J.T., Zierold C., Resende M., Carlson M., et al. 2016. Identification of bone marrow cell subpopulations associated with improved functional outcomes in patients with chronic left ventricular dysfunction: An embedded cohort evaluation of the FOCUS-CCTR trial. *Cell Transplantation*, 25, 9: 1675–1687
- Thomson A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S., Michelle A., Swiergiel J., Marshall V., Jones J. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 5391: 1145–1147
- Tohyama S., Hattori F., Sano M., Hishiki T., Nagahata Y., Matsuura T., et al. 2013. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Cell Stem Cell*, 12, 1: 127–137
- Us National Library of Medicine. 2020. *ClinicalTrials.gov*.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02438306> (2020)
- Van der Akker F., Feyen D., van den Hoogen P., van Laake L., van Eeuwijk E., Hoefler I., Pasterkamp G., Chamuleau S., Grundeman P., Doevendans P., Sluijter J. 2016. Intramyocardial stem cell injection: go(ne) with the flow. *European Heart Journal*, 7, 120: 1-3
- Velagaleti R.S., Pencina M.J., Murabito J.M., Wang T.J., Parikh N.I., D’Agostino R.B., Levy D., Kannel W.B., Vasan R.S. 2008. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*, 118, 20: 2057–2062
- Vrtovec B., Poglajen G., Sever M., Lezaic L., Domanovic D., Cernele P., Haddad F., Torre-Amione G. 2011. Effects of intracoronary stem cell transplantation in patients with dilated cardiomyopathy. *Journal of Cardiac Failure*, 17, 4: 272–281
- Wang L., Meier E.M., Tian S., Lei I., Liu L., Xian S., Lam M.T., Wang Z. 2017. Transplantation of Isl1+ cardiac progenitor cells in small intestinal submucosa improves infarcted heart function. *Stem Cell Research and Therapy*, 8, 1: 230
- Willerson J. 2015. *Coronary artery disease*. London, Springer-Verlag: 786 str.
- Wollert K.C., Drexler H. 2010. Cell therapy for the treatment of coronary heart disease: A critical appraisal. *Nature Reviews Cardiology*, 7: 204-215
- Young P.P., Vaughan D.E., Hatzopoulos A.K. 2007. Biologic Properties of Endothelial Progenitor Cells and Their Potential for Cell Therapy. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 49, 6: 421–429