

# In vitro diferencijacija matičnih stanica u kardiomiocite

---

**Zabini, Adam**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2017**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:712176>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-28**



*Repository / Repozitorij:*

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Adam Zabini**

***In vitro* diferencijacija matičnih stanica u  
kardiomiocyte**

**DIPLOMSKI RAD**



ZAGREB, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Adam Zabini**

***In vitro* diferencijacija matičnih stanica u  
kardiomiocyte**

**DIPLOMSKI RAD**

**ZAGREB, 2017.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Katedri za patofiziologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Filipa Sedlića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

Mentor: doc. dr. sc. Filip Sedlić, dr. med.

## **Popis i značenje kratica korištenih u radu:**

**BMP** – koštani morfogogenetski protein (engl. bone morphogenetic protein)

**DKK1** – Dickkopf vezani protein 1

**EMS** – embrionalne matične stanice

**END-2** – visceralne stanice slične endodermu

**ET** – embrioidna tjelešca

**FACS** – fluorescencijom aktivirano sortiranje stanica (engl. fluorescence activated cell sorting)

**FGF** – čimbenik rasta fibroblasta (engl. fibroblast growth factor)

**FGF** – čimbenik rasta fibroblasta (engl. fibroblast growth factor)

**iPMS** – inducirane pluripotentne matične stanice

**MEF** – mišji embrionalni fibroblast

**mRNA** – glasnička ribonukleinska kiselina (engl. messenger ribonucleic acid)

**PMS** – pluripotentne matične stanice

**TGF- $\beta$**  – transformirajući čimbenik rasta  $\beta$  (engl. transforming growth factor  $\beta$ )

**VCAM-1** – adhezijska molekula vaskularnih stanica 1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1)

**VEGF** – vaskularni endotelni čimbenik rasta (engl. vascular endothelial growth factor)

## Sadržaj:

1. Sažetak.....	I
2. Summary.....	III
3. Uvod.....	1
3.1. Srce i kardiomiociti.....	1
3.2. Matične stanice i njihova uloga.....	1
3.3. Vrste matičnih stanica .....	3
3.4. Važnost istraživanja <i>in vitro</i> diferencijacije matičnih u srčane mišićne stanice.....	4
4. Embrionalni razvoj srca.....	5
4.1. Razvoj kardiogenog mezoderma.....	5
4.2. Promjena položaja srčane cijevi.....	7
4.3. Savijanje srčane cijevi.....	7
4.4. Pregrađivanje srca.....	8
4.4.1. Pregrađivanje atrioventrikularnog kanala.....	8
4.4.2. Pregrađivanje primitivnog atrija i ventrikula.....	9
5. Različite metode <i>in vitro</i> diferencijacije srčanih stanica.....	11
5.1. Diferencijacija pomoću embrioidnih tjelešaca.....	12
5.2. Diferencijacija u jednosloju.....	15
5.3. Induktivna su-kultura s visceralnim stanicama sličnim endodermu.....	17

5.4. Utjecaj malih organskih molekula na kardiomiogenezu.....	18
5.5. Metode pročišćavanja i obogaćivanja kardiomiocita.....	19
6. Diferencijacija srčanih stanica iz različitih vrsta pluripotentnih matičnih stanica.....	23
6.1. Inducirane pluripotentne matične stanice .....	23
6.2. Diferencijacija srčanih stanica iz embrionalnih matičnih stanica i induciranih pluripotentnih matičnih stanica.....	24
6.3. Diferencijacija kardiomiocita iz matičnih stanica podrijetlom iz masnog tkiva.....	28
7. Diferencijacija kardiomiocita <i>in vivo</i> .....	31
7.1. Uloga srčanih progenitornih stanica u regeneraciji srca nakon opsežnih ozljeda.....	31
7.2. Transdiferencijacija stanica u regeneraciji srca.....	33
8. Zaključak.....	37
9. Zahvale.....	39
10. Literatura.....	40

# 1. Sažetak

## ***In vitro* diferencijacija matičnih stanica u kardiomiocite**

Zabini Adam

Kardiomiociti – mišićne stanice srca, temeljne su stanice srčanog miokarda i odgovorne su za njegovu kontraktilnu sposobnost. Iako su dugo smatrani terminalno diferenciranim stanicama, danas je poznato da se i u odraslom srcu tijekom života neprestano obnavlja vrlo mali broj kardiomiocita; za sada nije razjašnjeno je li to posljedica proliferacije već postojećih kardiomiocita ili diferencijacije nekih drugih stanica. U svakom slučaju, *in vivo* regeneracija kardiomiocita nedovoljna je za obnovu tkiva i održavanje funkcije srca nakon opsežnih oštećenja, što je jedan od razloga što su kardiovaskularne bolesti glavni uzrok smrtnosti u većini gospodarski razvijenih zemalja. Zbog toga je u posljednje vrijeme veliki napor uložen u razvoj metoda koje bi omogućile *in vitro* diferencijaciju kardiomiocita iz matičnih i srodnih vrsta stanica, koje bi, između ostalog, otvorile vrata primjeni tehnika regenerativne biologije u ljudskoj medicini i znatno poboljšale terapijske opcije za veliki broj bolesnika.

U ovom diplomskom radu bit će opisane neke od trenutno dostupnih metoda *in vitro* diferencijacije kardiomiocita (diferencijacija pomoću embrioidnih tjelešaca, diferencijacija u jednosloju i diferencijacija pomoću induktivne su-kulture), bit će navedene prednosti i nedostaci svake metode te će se raspraviti ograničenja koja bi trebala biti premoštena kako bi se postigao njihov puni potencijal. Osim toga, usporedit će se uspjeh diferencijacije iz različitih vrsta pluripotentnih stanica, kao što su embrionalne matične stanice i inducirane pluripotentne matične stanice.



Konačno, cilj ovog rada je navesti dosadašnje dosege, nabrojati neke od budućih izazova, te naglasiti važnost daljnjih istraživačkih napora koji imaju mogućnost iz temelja promijeniti terapiju kardiovaskularnih i drugih bolesti.

**Ključne riječi:** kardiomiociti, diferencijacija, matične stanice, regeneracija, *in vitro*

## 2. Summary

### *In vitro* differentiation of stem cells into cardiomyocytes

Zabini Adam

Cardiomyocytes — heart muscle cells, are the principal cell type of cardiac muscle layer and are responsible for its contractility. Even though they were considered to be terminally differentiated cells for a very long time, it is now known that even the adult heart is capable of renewing a limited amount of cardiomyocytes; whether this is the result of the proliferation of existing cardiomyocytes or differentiation of some other cells is still incompletely understood. In either case, *in vivo* renewal of cardiomyocytes is thought to be insufficient to allow for tissue regeneration and to sustain adequate cardiac function following substantial damage, such as myocardial infarction. This is one of the primary reasons for cardiovascular diseases being the major cause of mortality in most industrialized countries. Consequently, great efforts have been made recently in developing methods of *in vitro* differentiation of cardiomyocytes from stem cells, which would, among other things, open doors to regenerative biology use in clinical medicine and significantly improve therapeutic outcome for many patients.

This thesis paper shall focus on some of the currently available methods of *in vitro* differentiation of cardiomyocytes, such as embryoid body formation, monolayer *in vitro* cultures and inductive co-cultures with visceral endoderm-like cells, as well as advantages and setbacks of each method, and limitations that still need to be surpassed before its full potential is reached. Additionally, efficiencies of differentiation from various types of pluripotent cells, such as embryonal stem cells and induced pluripotent stem cells shall be compared.

Lastly, the aim of this thesis paper is to list the recent breakthroughs, mention future

challenges and emphasize the importance of further research, seeing as it has the ability to fundamentally change the means of treatment of cardiovascular and other diseases.

**Key words:** cardiomyocytes, differentiation, stem cells, regeneration, *in vitro*

### **3. Uvod**

#### **3.1. Srce i kardiomiociti**

Ljudsko srce šuplji je mišićni organ koji obavlja vitalnu funkciju pumpanja krvi u sistemsku cirkulaciju. Sastoji se od 4 komore i smješteno je u sredoprsju. Srčani zid građen je od nekoliko slojeva – od unutrašnjosti prema van nalaze se endokard, miokard i epikard, a cijelu strukturu još obavija i vreća vezivnog tkiva koju nazivamo perikard.

Miokard je mišićni i za funkciju srca kao crpke ključan sloj srca. Histološki je građen od kardiomiocita, stanica odgovornih za kontraktilnu sposobnost srca. Kardiomiociti su dugačke, cilindrične stanice građene od velikog broja mišićnih vlaknaca – miofibrila. Većina kardiomiocita ima jednu jezgru, a pod mikroskopom imaju karakterističan poprečno-prugasti oblik, sličan skeletnim mišićnim stanicama (Mescher AL, 2013).

Iako se dugo vjerovalo da je srčano mišićno tkivo terminalno diferencirano, tj. da je broj stanica zadan rođenjem i da se zaliha kardiomiocita ne može obnavljati tijekom života, nedavno su objavljeni radovi koji sugeriraju da unutar srčanog tkiva ipak postoji mali broj matičnih stanica koji je sposoban dijeliti se i diferencirati u srčane mišićne i u neke druge vrste stanica. Znanstvena zajednica još uvijek je podijeljena po tom pitanju i za sada nije jasno doprinose li navedene stanice i u kojoj mjeri (ako uopće postoje) obnovi srčanog tkiva nakon opsežnih oštećenja, kao što je infarkt miokarda (Cai i Molketin, 2016).

#### **3.2. Matične stanice i njihova uloga**

Matične stanice su nediferencirane stanice koje imaju dva temeljna obilježja: sposobnost

samoobnavljanja putem neograničene diobe i sposobnost da se pod određenim uvjetima diferenciraju u barem jedan tip specijaliziranih stanica (Watt F. M. i Hogan B.L., 2000).

S obzirom na vrstu i broj različitih specijaliziranih stanica u koje se mogu diferencirati, matične stanice dijelimo u nekoliko skupina. Totipotentne su one matične stanice koje se mogu diferencirati u bilo koji tip stanice organizma, uključujući i ekstraembrionalna tkiva (npr. tkiva koja grade posteljicu). Pluripotentne matične stanice također imaju sposobnost diferencijacije u sve tipove stanica odraslog organizma, ali im nedostaje mogućnost diferencijacije u ekstraembrionalna tkiva. Multipotentne stanice mogu se diferencirati u nekoliko različitih tipova stanica, dok unipotentne stanice, iako imaju znatnu mitotičku sposobnost, mogu dati samo jednu vrstu stanice (najbrojnije unipotentne stanice u ljudskom organizmu su epitelne stanice kože) (<http://stemcells.nih.gov/>).

Glavna je uloga matičnih stanica u odraslom ljudskom organizmu nadomjestiti izgubljenu frakciju stanica. U nekim tkivima, kao što su epidermis kože, epitel lumena crijeva i koštana srž, stanice imaju genetski zadan vrlo kratak životni vijek i nužno ih je neprestano nadomještati novim stanicama, što je omogućeno populacijama matičnih stanica prisutnim u navedenim tkivima – takve stanice nazivamo **labilnima**. Za razliku od toga, u nekim drugim vrstama tkiva (jetra, bubrezi) u bazalnim uvjetima se nadomješta samo mali broj stanica, ali ukoliko dođe do znatnijeg oštećenja, matične stanice se počinju ubrzano dijeliti kako bi obnovile izgubljeno tkivo. Takve stanice nazivamo **stabilnima**. Konačno, postoje i **terminalno diferencirane** stanice (kardiomiociti, neuroni, stanice skeletnih mišića) koje nemaju sposobnost diobe, iako se u novije vrijeme spoznalo da su čak i u navedenim tkivima prisutne skromne populacije stanica koje imaju ograničenu sposobnost regeneracije tkiva (Mescher AL, 2013).

Matične stanice u ljudskom su organizmu prisutne od rođenja pa do smrti, iako se njihov ukupan broj u tijelu tijekom života smanjuje eksponencijalnom brzinom, uzrokujući sve slabiju mogućnost zamjene oštećenih i odumrlih stanica tijekom procesa starenja.

### **3.3. Vrste matičnih stanica**

**Embrionalne matične stanice (EMS)**, tako nazvane zbog činjenice da im je izvor embrio u preimplantacijskom stadiju, imaju sposobnost neograničene diobe i diferencijaciju u tkiva sva 3 zametna listića. Iako je njihova upotreba u istraživanjima otežana zbog činjenice da iziskuju žrtvovanje zametaka, što je i dalje predmet etičkih dilema, njihova izvanredna sposobnost regeneracije ih i danas čini zlatnim standardom na području istraživanja pluripotencije i stanične diferencijacije (Okita K, Yamanaka S, 2010).

**Somatske (adultne) matične stanice** nalazimo u raznim tkivima odraslog organizma, a s obzirom na diferencijacijsku sposobnost svrstavamo ih uglavnom u multipotentne stanice. U tu skupinu ubrajaju se hematopoetske matične stanice, koje osim sposobnosti neograničene diobe tijekom cijelog života, služe kao izvor svih loza krvnih stanica, sve se više specijalizirajući tijekom diferencijacije iz matičnih stanica. Za razliku od toga, somatske matične stanice drugih tkiva (epidermisa kože, epitela lumena crijeva) imaju slabiji diferencijacijski kapacitet koji je uglavnom ograničen na jednu ili nekoliko vrsta stanica (Watt FM, Hogan BL, 2000).

**Progenitorne stanice** nisu u pravom smislu riječi matične stanice, ali ih zbog srodnosti s njima neki autori ipak svrstavaju u tu skupinu. Kao i matične stanice, one imaju sposobnost diferencijacije u nekoliko vrsta stanica, ali razlika je ta što je njihova sposobnost diobe ograničena. Primjeri takvih stanica su satelitne stanice skeletnih mišića i stanice periosta kosti (Watt FM,

Hogan BL, 2000).

### **3.4. Važnost istraživanja in vitro diferencijacije matičnih u srčane mišićne stanice**

Ishemijska bolest srca i njezine komplikacije već su nekoliko desetljeća vodeći uzrok smrti u većini razvijenih zemalja svijeta. Unatoč tome, sadašnje terapijske mogućnosti su ograničene i usmjerene prvenstveno na sprečavanje progresije bolesti i smanjenje rizika akutnih komplikacija. Otkriće da je matične stanice izolirane iz određenih tkiva pacijenata moguće *in vitro* diferencirati u funkcionalne srčane mišićne stanice stoga predstavlja potencijalnu revoluciju u liječenju kardiovaskularnih bolesti. Osim mogućnosti transplantacije in vitro uzgojenih kardiomiocita bolesnika na oštećeno srčano tkivo, metode in vitro diferencijacije nude mogućnost istraživanja embrionalnih poremećaja razvoja srca, kao i modeliranja i boljeg razumijevanja nasljednih srčanih bolesti. Konačno, in vitro diferencirano srčano tkivo omogućilo bi izravno ispitivanje djelovanja postojećih i novih farmakoterapeutika na srčanu strukturu i funkciju i time pomoglo u bržem razvoju novih lijekova.

Imajući na umu sve navedeno, može se zaključiti da ovo dinamično područje ima značajan potencijal i da je daljnje istraživanje metoda *in vitro* diferenciranja matičnih stanica u kardiomiocite u potpunosti opravdano.

## 4. Embrionalni razvoj srca

### 4.1. Razvoj kardiogenog mezoderma

Kardiovaskularni sustav počinje obavljati svoju funkciju vrlo rano tijekom embrionalnog razvitka – prvi otkucaji srca javljaju se već tri tjedna nakon začeća. Tijekom tog dinamičnog procesa, prve srčane stanice, koje potječu iz epiblasta, lateralno od primitivne pruge počinju putovati kroz primitivnu prugu i formirati dvije velike skupine mezodermalnih stanica lateralno od Hensenovog čvora. Te skupine stanica nazivaju se kardiogeni mezoderm i temelj su za razvojatrijskog i ventrikularnog mišićnog tkiva, specijaliziranih stanica srčanog provodnog sustava i endotelnih stanica srčanih komora i zalistaka. Prve migriraju stanice koje će se kasnije razviti u kranijalne dijelove srca, nakon čega slijedi migracija populacija stanica koje će se razviti u kaudalne dijelove srca – lijevi i desni ventrikul te *sinus venosus*. Spomenute stanice putuju prema naprijed i smještaju se u visceralni mezoderm bočne ploče, mjesto na kojem započinje njihova diferencijacija u srčano tkivo (Gilbert SF, 2003).

Indukcija diferencijacije kardiogenog mezoderma započinje iz priležećeg endoderma, kojeg možemo podijeliti na anteriorni i posteriorni dio. Ukoliko se anteriorni endoderm odstrani, srce se neće razviti, ali razvoj će neometano teći ako se ukloni samo posteriorni endoderm. Signalni putovi **BMP** (koštani morfogenetski protein; engl. bone morphogenetic protein) i **FGF** (čimbenik rasta fibroblasta; engl. fibroblast growth factor) za sada se čine kao ključni inicijatori spomenutih događaja. BMP podrijetlom iz endoderma potiču razvoj srčanog tkiva i započinju sintezu FGF8 u endodermu koji se nalazi neposredno ispod kardiogenog mezoderma. Čini se da FGF8 ima temeljnu ulogu u poticanju ekspresije bjelančevina srčanih stanica. S druge strane, bjelančevine skupine **Wnt** (posebice Wnt3a i Wnt8) podrijetlom iz neuralne cvijevi, imaju koćeću ulogu u



razvoju srca. Anteriorni endoderm njihovu kočecu ulogu utišava proizvodnjom inhibitora bjelančevina skupine Wnt, kao što su proteini **Cerebrus**, **Dickkopf** i **Crescent** koji djeluju tako što sprječavaju vezanje bjelančevina skupine Wnt za njihove receptore. Imajući na umu navedeno, može se zaključiti da će do diferencijacije prekursora srčanih stanica doći na mjestima gdje je najveći gradijent koncentracije bjelančevina skupine BMP (lateralni mezoderm i endoderm) i inhibitora bjelančevina skupine Wnt (anteriorni mezoderm) (Gilbert SF, 2003).

Signalni put BMP, u odsutnosti bjelančevina skupine Wnt, ima glavnu ulogu u sintezi transkripcijskog čimbenika **Nkx-2**. Navedeni čimbenik ključan je u poticanju diferencijacije mezodermalnog u srčano tkivo, a djeluje tako što aktivira sintezu nekoliko drugih važnih transkripcijskih čimbenika, prvenstveno pripadnika porodice **GATA** i **MEF2**. Zajedničkim učinkom, ti čimbenici potiču ekspresiju gena koji kodiraju za specifične strukturne i funkcionalne bjelančevine srčanih stanica (npr. srčanog aktina, atrijskog natriuretskog čimbenika i  $\alpha$ -miozina teških lanaca) što s vremenom dovodi do nastanka funkcionalnih srčanih mišićnih stanica, odgovornih za kontrakciju srca koja se kontinuirano nastavlja do čovjekove smrti. Diferencijacija i specijalizacija srčanih stanica odvija se postupno, u anteriorno-posteriornom smjeru duž srčane osi, tako da se buduće stanice srčanih klijetki razviju prije stanica pretklijetki (Gilbert SF, 2003).

U trenutku dok se još uvijek odvija migracija stanica, stanice ventralnog mezoderma započinju ekspresiju N-kadherina na svojoj površini, napuštaju tkivo dorzalnog mezoderma i međusobno se povezuju, tvoreći epitel. Taj proces dovodi do nastanka perikardijalne šupljine, ovojnice u kojoj će srce kasnije biti smješteno. Manja populacija tih stanica istovremeno smanjuje ekspresiju N-kadherina i odvaja se od spomenutog epitela te se povezuje i stvara endoderm, unutrašnju površinu srčanih komora. Osim što vrše strukturnu ulogu oblažući srčane komore i zaliske, endokardijalne stanice također izlučuju bjelančevine koje nadziru i potiču daljnji rast

miokarda te urastanje živčanog tkiva u srčano (Gilbert SF, 2003).

#### **4.2. Promjena položaja srčane cijevi**

Tijekom 3. tjedna razvitka, embrio se počinje savijati u kraniokaudalnom, a potom i u lateralnom smjeru, što rezultira približavanjem dviju endotelnih cjevčica koje se tada nalaze u visceralnom mezodermu i njihovim spajanjem u zajedničku srčanu cijev. Prednji, savijeni kraj osnove srca proširuje se i tvori osnovu za budući izlazni (arterijski) dio srca i srčane klijetke. Time osnova srca postaje jedinstvena proširena cijev, koja ima unutrašnji sloj građen od endotela i vanjski sloj građen od mezoderma. Srčana cijev nastavlja rasti te se sve više izbočuje u perikardijalnu šupljinu, za čiju stražnju stijenku je u početku pričvršćena naborom mezoderma kojeg nazivamo dorzalni mezokard. On kasnije nestaje, a srce ostaje pričvršćeno za perikardijalnu stijenku samo krvnim žilama na svom kranijalnom i kaudalnom kraju (Sadler TW, 2006).

#### **4.3. Savijanje srčane cijevi**

Ljudski embriji u 4. tjednu embrionalnog razvitka imaju srce koje se sastoji od samo dvije komore – jedne pretklijetke i jedne klijetke. Sljedeća važna faza srčanog razvoja jest savijanje srčane cijevi – proces tijekom kojeg srce, koje je do tada imalo anteriorno-posteriorno usmjerenje srčane osi, prelazi u lijevo-desno usmjerenje, koje će trajno zadržati. Nakon što je savijanje srčane cijevi završeno, dio srčane cijevi koje će kasnije postati desna klijetka leži ispred dijela koje će postati lijeva klijetka (Gilbert SF, 2003).

Savijanje srčane cijevi je posljedica ekspresije bjelančevina **Nodal**, **Lefty-2** i njima srodnih

čimbenika. Nkx2-5 iz primitivne srčane cijevi kontrolira proizvodnju transkripcijskih čimbenika Hand1 i Hand2. Iako se bjelančevine iz skupine Hand sintetiziraju duž cijele srčane cijevi, u trenutku kad započne savijanje srčane petlje, Hand1 postaje ograničen na područje buduće lijeve klijetke, a Hand2 na područje desne klijetke. U odsutnosti odgovarajućeg koncentracijskog gradijenta navedenih bjelančevina, doći će do poremećaja savijanja i daljnjeg razvoja srčanih klijetki (Gilbert SF, 2003).

Vrijedno je spomenuti još jedan transkripcijski čimbenik značajan za pravilno savijanje srčane cijevi – Pitx2. Navedeni čimbenik aktivan je samo u lijevoj strani lateralnog mezoderma i odgovoran je za ekspresiju bjelančevina izvanstaničnog matriksa kao što je flectin, koji omogućuje nastanak različite napetosti tkiva lijeve i desne klijetke (Gilbert SF, 2003).

#### **4.4. Pregrađivanje srca**

Razdvajanje pretklijetki od klijetki omogućeno je aktivacijom nekoliko transkripcijskih čimbenika koji su ograničeni ili na anteriornu ili na posteriornu polovicu srčane cijevi. Ta se separacija odvija kad kardiomiociti počnu sintetizirati određeni čimbenik (vjeruje se da je u pitanju transformirajući čimbenik rasta  $\beta 3$ ) koji potiče odvajanje stanica iz priležećeg endokarda i njihov ulazak u hijaluronskom kiselinom bogatu 'srčanu sluz'. U ljudi, te stanice tvore endokardijalne jastučice – strukture koje daju osnovu za razvoj atrioventrikularnih ušća, membranskih dijelova interatrijske i interventrikularne pregrade te ušća aorte i pulmonalne arterije (Gilbert SF, 2003).

##### **4.4.1. Pregrađivanje atrioventrikularnog kanala**

Potkraj 4. tjedna razvoja, na gornjem i donjem rubu atrioventrikularnog kanala iz

mezenhimna se razvijaju gornji i donji atrioventrikularni endokardijalni jastučići. Ti se jastučići povećavaju sve dok ne srastu jedan s drugim te se krajem 5. tjedna razvoja kanal u potpunosti podijeli na lijevo i desno atrioventrikularno ušće. Nakon srastanja jastučića, novonastala struktura okružena je zadebljanjem endokarda koji je nastao proliferacijom mezenhima. Mehaničkim djelovanjem struje krvi, u miokardu nastaju udubine koje se postupno stanjuju, a sa stijenkom ventrikula povezani su mišićnim tračcima, koji se kasnije zamjenjuju vezivnim tkivom – novonastala struktura čini zaliske između pretkljetke i kljetke srca. Oko lijevog atrioventrikularnog ušća razvijaju se dva, a oko desnoga tri zaliska. (Sadler T. W., 2006.)

#### **4.4.2. Pregrađivanje primitivnog atrija i ventrikula**

Istovremeno, s krova primitivne pretkljetke prema naprijed i dolje, u smjeru endokardijalnih jastučića, počinje rasti greben koji nazivamo *septum primum* i koji će primitivnu pretkljetku podijeliti na desni i lijevi atrij. Otvor koji ostane između donjeg ruba grebena i endokardijalnih jastučića je *foramen primum*. Kasnije endokardijalno tkivo nastavi rasti sve do endokardijalnih jastučića pa se *foramen primum* zatvara, ali istovremeno u gornjem dijelu pregrade tkivo propada i stvara pukotine čijim spajanjem nastaje novi otvor – *foramen secundum* (Sadler TW, 2006).

Nešto kasnije, kad se desni atrij proširi, desno od *septuma primuma* počinje rasti novi greben – *septum secundum*. Ta pregrada nikad potpuno ne podijeli šupljinu atrija; u njezinu zidu ostaje otvor kojeg nazivamo ovalni otvor, te čini kosu izduženu pukotinu koja omogućuje protjecanje krvi iz desne strane srca u lijevu. Taj desno-lijevi protok krvi je nužan za razvoj fetusa kako bi krv iz venskog sustava mogla protjecati u arterijski krvotok, pritom zaobilazeći nerazvijena pluća koja prije rođenja ne mogu obavljati svoju respiratornu funkciju. Tek nakon rođenja djeteta

i prvog udaha, porast tlaka u lijevom atriju i složena kaskada molekularnih zbivanja potiču sljubljanje zaliska ovalnog otvora uz *septum secundum* i posljedično zatvaranje otvora u zidu pregrade između dvije pretklijetke. Tako nastaje potpuno odvojena lijeva i desna cirkulacija (Sadler TW, 2006).

S obzirom da su lijeva i desna klijetka još tijekom ranog embrionalnog razvoja bile odvojene interventrikularnom pregradom, srce je sada struktura građena od 4 odvojene komore koje putem plućne arterije crpi vensku krv u pluća kako bi se oksigenirala, a kisikom zasićenu arterijsku krv koja se putem plućih vena vratila u lijevo srce pomoću aorte crpi u sistemsku cirkulaciju (Gilbert SF, 2003).

## 5. Različite metode *in vitro* diferencijacije srčanih stanica

Postupak *in vitro* diferencijacije matičnih stanica u kardiomiocite vrlo je složen proces koji se temelji na poticanju određenih aktivacijskih ili inhibicijskih signalnih putova kojima se nastoji što vjernije imitirati prirodne molekularne kaskade koje se odvijaju tijekom embrionalnog razvoja srca. Veliki broj istraživanja, od kojih su mnoga još u tijeku, nastoje otkriti specifične transkripcijske čimbenike, njihove optimalne koncentracije te kritični trenutak kada se trebaju primijeniti kako bi se postigao najbolji mogući odgovor. Na temelju dosadašnjih spoznaja, ključnima su se pokazali koštani morfogenetski protein 4 (**BMP4**), **aktivin A**, čimbenik rasta fibroblasta 2 (**FGF2**) i vaskularni endotelni čimbenik rasta (**VEGF**) (Yang i sur, 2008). Za sada je poznato da dodatak BMP4 pospješuje diferencijaciju PMS u zrelo mezodermalno tkivo (Kattman i sur, 2011), a dodatak visokih koncentracija aktivina A pospješuje diferencijaciju u endodermalno tkivo. Osim toga, poznato je i da dodatak inzulina u niskim koncentracijama povećava postotak uspješno diferenciranih stanica (Yang i sur, 2008).

Unatoč nedavnim otkrićima, na putu do pronalaska optimalne laboratorijske metode *in vitro* diferencijacije kardiomiocita još uvijek stoje brojne prepreke – do sada nije utvrđeno koji je najbolji trenutak za primjenu transkripcijskih čimbenika u kulturama ljudskih stanica. Osim toga, navedeni transkripcijski čimbenici su skupi, a u kulturi stanica brzo gube biološku aktivnost (Lewandowski i sur, 2016).

Prije opisa različitih dostupnih tehnika *in vitro* diferencijacije kardiomiocita, potrebno je navesti i metode kojima se može ispitati učinkovitost diferencijacije i kvaliteta dobivenih stanica. Najjednostavnija i najmanje pouzdana metoda je mikroskopska analiza tkiva kojom se mogu uočiti

područja spontano kontrahirajućih nakupina stanica, što nedvosmisleno upućuje na prisutnost kardiomiocita, kao i karakteristična histološka obilježja srčanih stanica. Pouzdaniji podatci se mogu dobiti elektronskim mikroskopom koji omogućuje detaljniju analizu staničnih struktura, primjerice veliku gustoću mitohondija i prisutnost sarkomera (Lewandowski i sur, 2016).

Metoda lančane reakcije polimeraze omogućuje detekciju mRNA molekula koje nose upute za sintezu kardiospecifičnih bjelančevina (npr. srčani troponin T), što je dokaz ekspresije njihovih gena, dok se za dokaz prisutnosti samih bjelančevina koriste imunohistokemijske metode koje omogućuju vizualizaciju srčanih bjelančevina uz pomoć specifičnih protutijela koja vežu za njih, a mogu se vizualizirati različitim metodama (Lewandowski i sur, 2016).

Konačno, najpouzdanije dostupne metode za dokazivanje prisutnosti visokofunkcionalnih kardiomiocita uključuju elektrofiziološko mjerenje akcijskih potencijala dobivenih stanica. Ovom metodom se na temelju izmjerenih vrijednosti istih može odrediti ne samo je li uistinu riječ o zreom kardiomiocitu, nego i kojem podtipu srčanih stanica on pripada – atrijskoj, ventrikularnoj ili nodalnoj stanici (Lewandowski i sur, 2016).

Do sada su razvijena 3 različita pristupa u diferencijaciji kardiomiocita u laboratorijskim uvjetima, od kojih će svaki biti opisan u nastavku poglavlja: diferencijacija pomoću embrioidnih tjelešaca, diferencijacija u jednosloju i induktivna su-kultura s visceralnim stanicama sličnim endodermu.

### **5.1. Diferencijacija pomoću embrioidnih tjelešaca**

**Embrioidna tjelešca (ET)** su trodimenzionalni agregati stanica sferoidna oblika koji

nastaju kad se pluripotentne stanice stave u medij koji ne podržava pluripotentnost (Talkhabi i sur, 2015). Sastoje se od untrašnjeg sloja stanice koje imaju svojstva slična ektodermu i vanjskog sloja kojeg čini endoderm, a prvi put su razvijeni iz kultura embrionalnih matičnih stanica miša. Zbog svoje sličnosti sa stanicama rane faze razvoja postimplantacijskog embrija i zbog svoje sposobnosti da se diferenciraju u tkiva sva tri zametna listića, opisani agregati stanica nazvani su embrioidnim tjelešcima (Lewandowski i sur, 2016).

Nedugo nakon njihova otkrića, razvijeni su prvi protokoli za diferencijaciju EMS u kardiomiocite pomoću embrioidnih tjelešaca. Otkriveno je da ljudske EMS, za razliku od mišjih, ne mogu preživjeti međusobno odvajanje do jednostaničnog oblika, jer stanice u tom slučaju ulaze u apoptozu i umiru. Taj problem riješen je tako da je u hranjivi medij dodana kolagenaza 4, koja enzimski kida međustanične veze i razdvaja stanice u male kolonije, koje su se sastojale od 3 do 20 stanica (Lewandowski i sur, 2016). Nakon toga, kolonije su bile stavljene u 20%-tni goveđi fetalni serum te su se iz kolonija razvila embrioidna tjelešca. Tada su preseljene u zdjelice koje su bile obložene 0.1%-tnom želatinom. Prve kontraktilne stanice razvile su se nakon 4 dana. Elektronskim mikroskopom potvrđena je prisutnost sarkomera, imunohistokemijskom analizom nađeni su srčani troponin T i druge bjelančevine specifične za kardiomiocite, a elektrofiziološkom analizom utvrđen je spontani nastanak akcijskih potencijala tipičnih za nodalne stanice srca te stanice atrijske i ventrikularne. Unatoč tome što su zapaženi rezultati dokazali potencijal metode embrioidnih tjelešaca, uspješnost diferencijacije je bila niska; samo 8% svih stanica imalo je sposobnost kontrakcije (Lewandowski i sur, 2016).

Nakon daljnjih istraživanja, razvijeni su poboljšani protokoli za diferencijaciju kardiomiocita iz EMS u tri stadija. Goveđi serum zamijenjen je medijem u koji je prvog dana bila dodana askorbinska kiselina u koncentraciji 50  $\mu\text{g/ml}$  i BMP4 u koncentraciji 0.5  $\text{ng/ml}$ , a tijekom



1. do 4. dana dodani su BMP4, FGF i aktivin A kako bi potaknuli razvoj primitivne pruge. Od 4. do 8. dana u medij je stavljen VEGF i Dickkopf vezani protein 1 (DKK1) kako bi potaknuli razvoj kardiogenog mezoderma. Naposljetku su do 14. dana bili dodani još VEGF, FGF i DKK1, što je rezultiralo diferencijacijom mezodermalnih stanica u kardiomiocyte. Tijekom 16. dana utvrđeno jest da je čak 40% stanica uspješno sintetiziralo srčani troponin T, što je bio veliki pomak u odnosu na prvotni protokol (Yang i sur, 2008).

Opisani protokoli su se nastavili razvijati i poboljšavati te se i danas radi na njihovoj optimizaciji kako bi uspješnost diferencijacije bila što veća uz što manji financijski trošak. Neke od novijih metoda diferencijacije pomoću embrioidnih tjelešaca koje su svakako vrijedne spomena su diferencijacija ET-a u mikrojažicama, metoda centrifugiranja ET-a i metoda mikropatentiranih ET.

Metoda diferencijacije ET u mikrojažicama jedna je od danas najčešće primjenjivanih metoda, a sastoji se od prijenosa kolonija ET u zdjelice koje imaju mikrojažice obložene matrigelom. Zdjelice imaju točno definirani promjer jažica, što omogućuje dobivanje uniformnih kolonija i razvoj ET-a optimalne veličine. Osim toga, izvanstanični matriks matrigela potiče adheziju i proliferaciju stanica (Lewandowski i sur, 2016). Međutim, učinkovitost metode je niska do umjerena – samo 20% kolonija ET-a kasnije se uspjeva diferencirati u kardiomiocyte (Mohr i sur, 2006), a cijena je još uvijek visoka.

Metoda centrifugiranja ET jeftina je i ne zahtjeva visoko specijaliziranu opremu, a omogućuje visoki stupanj reproducibilnosti i barem umjerenu učinkovitost. Centrifugiranje omogućuje dobivanje ET uniformne veličine, što se pokazalo kao jedan od čimbenika koji povećava uspješnost daljnje diferencijacije (Lewandowski i sur, 2016). Uspješnost diferencijacije

u kardiomiocite je do 24%, ali jedan od glavnih nedostataka metode je taj što uspješnost ovisi o tome koje su stanične linije upotrijebljene (Burridge i sur, 2007).

Metoda mikropatentiranih ET počela se razvijati nakon što je uočeno da je uspješnost diferencijacije ET u kardiomiocite ovisna o veličini kolonija EMS i omjeru koncentracija određenih transkripcijskih čimbenika, prvenstveno omjeru GATA4:PAX6 (Lee i sur, 2009). **GATA4** pripadnik je obitelji transkripcijskih čimbenika s motivom cinkovih prstiju i jedan je od ključnih faktora u embriogenezi srca. **PAX6**, poznat i pod nazivom okulorombin, ključan je u poticanju razvoja neuralnog tkiva. Pokazalo se da ljudske ES koje su izložene visokim omjerima koncentracija GATA4:PAX6 potaknule nastanak embrioidnih tjelešaca s većim udjelom mezodermalnog tkiva i većim postotkom diferencijacije u srčano tkivo (Lewandowski i sur, 2016). Također je otkriveno da manja veličina kolonija EMS postiže više omjere koncentracija GATA4:PAX6. Glavna je prednost ove metode što se njome postiže najveća uspješnost diferencijacije od do sada spomenutih tehnika - oko 40% kardiomiocita (Bauwens i sur, 2011), dok je nedostatak vrlo skupa oprema koja se temelji na mikrokontaktnom inženjerstvu (Lewandowski i sur, 2016).

## **5.2. Diferencijacija u jednosloju**

Embrioidna tjelešca su kompleksne trodimenzionalne strukture, što uvjetuje nastanak složenih difuzijskih barijera sa slabom propusnošću za transkripcijske čimbenike i druge molekule koje utječu na diferencijaciju matičnih stanica. Iz tog razloga, istraživanja su usmjerena prema razvijanju kulture pluripotentnih stanica u kojima one prekrivaju dno posudica u samo jednom sloju, što bi teoretski trebalo olakšati difuziju organskih molekula te povećati reproducibilnost i

uniformnost metode (Lewandowski i sur, 2016).

Prvi pokušaj diferencijacije kardiomiocita iz kultura ljudskih embrionalnih matičnih stanica u jednosloju proveden je 2008. godine, kada je istraživačka skupina kultivirala nediferencirane ljudske embrionalne matične stanice u jednosloju (Laflamme i sur, 2007). Upotrijebljene su zdjelice obložene matrigelom, a medij je bio obogaćen mišjim embrionalnim fibroblastima. Kako bi potaknuli diferencijaciju stanica u kardiomiocite, potom je u medij dodan aktivin A u koncentraciji 100 ng/ml tijekom jednog dana, nakon čega je dodan BMP4 u koncentraciji 10 ng/ml tijekom 4 dana. Nakon 12 dana utvrdili su da je uspješnost diferencijacije u kardiomiocite bila veća od 30%, a centrifugiranjem su uspjeli dobiti čistoću kardiomiocita veću od 80% (Laflamme i sur, 2007).

Jedna od novijih i vrlo učinkovitih metoda koja se temelji na diferencijaciji u jednosloju je “metoda slojevite matrice” (engl. “**sandwich matrix**”), tako nazvana zbog činjenice da se pluripotentne matične stanice prvo u jednosloju stavljaju na dno posudica prekrivenih matrigelom, da bi se nakon nekoliko dana kolonije stanica prekrile još jednim slojem matrigela (Zhang i sur, 2012). Takva složena struktura, u kojoj se sloj matrigela nalazi ispod i iznad sloja PMS potiče njihovo sazrijevanje u stanice koje pokazuju obilježja mezenhima s ekspresijom N-kadeherina. U navedenom istraživanju (Zhang i sur, 2012), u kulture su kasnije dodani transkripcijski čimbenici aktivin A, BMP4 i FGF, te je nakon ukupnog razdoblja od 30 dana elektronskomikroskopskim, imunohistokemijskim i metodama protočne citometrije utvrđena prisutnost zrelih kardiomiocita. Elektrofiziološkim metodama utvrđeno je postojanje akcijskih potencijala karakterističnih za nepotpuno zrele nodalne, atrijske i ventrikularne stanice srca. Potrebno je istaknuti podatak da je nakon pročišćavanja dobivena smjesa stanica u kojoj su kardiomiociti činili 98% mase, te da je prosječno iz jedne PMS dobiveno 11 srčanih stanica (Zhang i sur, 2012). Opisani protokol je

ispitan na 3 linije induciranih PMS i 2 linije EMS. Osim već spomenutih – vrlo visoke učinkovitosti i jednostavnog pročišćavanja, prednost su ove metode i visoki stupanj reproducibilnosti i manja koncentracija transkripcijskih čimbenika nužnih za poticanje kardiomiocitne diferencijacije. Kao glavni nedostatak metode navodi se velika raznolikost u stupnju zrelosti kardiomiocita između različitih staničnih linija (Lewandowski i sur, 2016).

### **5.3. Induktivna su-kultura s visceralnim stanicama sličnim endodermu**

Metoda induktivne su-kulture zasniva se na oponašanju signalizacije kojom visceralni endoderm *in vivo* potiče mezoderm na diferencijaciju u kardiomiocite, a sastoji se od kultiviranja PMS u mediju koji sadrži visceralne stanice slične endodermu (Lewandowski i sur, 2016). Navedena metoda poznata je i pod nazivom “Mummeryjeva metoda”, po znanstveniku koji je bio voditelj grupe koja je metodu razvila. Mummery i suradnici su u svojim istraživanjima koristili visceralne stanice slične endodermu (END-2) koje su stavljene u zdjelice s medijem koji je sadržavao mišje embrionalne fibroblaste (MEF), koji su prije toga bili inaktivirani mitomicinom C, nakon čega su u kulturu dodane ljudske embrionalne matične stanice i inducirane pluripotentne stanice. Nakon 12 dana, opaženo jest da je 35% kultura razvilo područja stanične kontrakcije (Lewandowski i sur, 2016).

Međutim, pomnijim ispitivanjima utvrđeno je da su samo 2-3% svih stanica činili kardiomiociti, što je zahtjevalo daljnje napore u poboljšanju metode (Talkhabi i sur, 2015). Nakon što je upotrijebljen pročišćeni medij koji nije sadržavao komponente seruma niti inzulin, područja kontrakcije su se povećala deset puta, a dodatkom organskih molekula kao što su askorbinska kiselina i prostaglandin I<sub>2</sub>, rezultati su bili još bolji (Talkhabi i sur, 2015).

Iako se uspješnost metode induktivne su-kulture čini skromna u odnosu na ranije opisane metode, treba uzeti u obzir i njezine prednosti, a to su jednostavnost i kratko vrijeme trajanja te mali broj potrebnih embrionalnih stanica. Također treba napomenuti da se unatoč opsežnim ispitivanjima još uvijek ne zna točan mehanizam kojim visceralne stanice slične endodermu potiču diferencijaciju u kardiomiocyte (Lewandowski i sur, 2016). Zbog toga se može očekivati da će ova metoda postići puni potencijal tek kada se u potpunosti razjasni ta nedoumica.

#### 5.4. Utjecaj malih organskih molekula na kardiomiogenezu

Do sada je ispitan utjecaj brojnih malih, biološki aktivnih organskih molekula na kardiomiogenezu. Većina transkripcijskih čimbenika koji se koriste u poticanju kardiomiogeneze su relativno skupi, teško dostupni, u kulturi imaju vrlo kratko poluvrijeme života te zbog svoje veličine i fizikalno-kemijskih svojstava, puno teže prolaze biološke barijere. U odnosu na njih, male organske molekule su postojane, jeftine i lako dostupne, te mnogo lakše prolaze stanične i izvanstanične barijere u mediju. Iako se za mnoge molekule još ne zna točan mehanizam djelovanja, većina do sad otkrivenih mehanizama uključuje aktivaciju ili inhibiciju specifičnih enzima uključenih u signalne puteve kardiomiogeneze (Lewandowski i sur, 2016). Neke od tih molekula navedene su u tablici 2.

**Tablica 1:** Pregled izabranih malih organskih molekula koje su biološki aktivne u kardiomiogenezi (preuzeto i prilagođeno iz članka Lewandowski i sur, 2016)

<i>Molekula</i>	<i>Mehanizam djelovanja</i>	<i>Funkcija</i>
<b>Askorbinska kiselina</b>	poticanje sinteze kolagena	• poticanje proliferacije kardiomiocita

<b>Prostaglandin I2</b>	nepoznat	<ul style="list-style-type: none"> <li>• kardioprotektivan učinak</li> <li>• pozitivan utjecaj na diferencijaciju END-2 stanica</li> </ul>
<b>kardiogenoli</b>	aktivacija Wnt signalnog puta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• poticanje kardiomiogenih funkcija progenitornih srčanih stanica</li> </ul>
<b>Dorzomorfin</b>	inhibitor BMP signalnog puta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• pojačavanje diferencijacije nezrelih kardiomiocita</li> </ul>
<b>Wnt-C59</b>	inhibitor Wnt signalnog puta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• poticanje diferencijacije kardiomiocita</li> </ul>
<b>XAV 939</b>	inhibitor Wnt-β-katenin signalnog puta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• poticanje kardiomiogenog razvoja iz mezodermalnih progenitornih stanica</li> </ul>

Kratice: END-2 = visceralne stanice slične endodermu; BMP = koštani morfogenetski protein

### 5.5. Metode pročišćavanja i obogaćivanja kardiomiocita

Kao što je opisano u prethodnim odlomcima, već je razvijeno nekoliko metoda kojima se iz EMS i induciranih PMS može potaknuti diferencijacija u kardiomiocite. Međutim, unatoč visokoj učinkovitosti, u tim se kulturama neizbježno nalazi i određena heterogena frakcija neželjenih stanica, u kojoj su najčešći fibroblasti, glatke mišićne stanice i endotelne stanice (Birket i sur, 2015). Važno je i napomenuti da se kardiomiociti, za razliku od ostalih nabrojanih stanica, u kulturi ne dijele. Zbog toga će s vremenom udio neželjenih stanica u kulturi rasti, a udio

kardiomiocita padati (Schwach i sur, 2016). S obzirom da su za primjenu kardiomiocita u područjima istraživačke razvojne biologije, a posebno pretkliničke i kliničke medicine nužne potpuno pročišćene populacije stanica, za tu su svrhu razvijene brojne metode obogaćivanja.

**Mehaničke metode** sastoje se od manualnog uklanjanja kontraktilnih područja iz kulture u zdjelici, nakon čega se tako dobiveni sadržaj još centrifugira (Lewandowski i sur 2016). Rezultat je populacija stanica među kojima preko 70% njih posjeduje stanične biljege specifične za kardiomiocite. Nedostaci ove metode jesu primjena koja je ograničena na metodu diferencijacije pomoću embrioidnih tjelešaca, zahtjeva dugi vremenski period i ovisna je o uspješnoj lokalizaciji kontraktilnih područja u kulturi, što smanjuje učinkovitost (Xu i sur, 2002).

Jedna od jednostavnijih i jeftinih metoda svakako vrijedna spomena je **metoda metaboličke selekcije**, u kojoj su se kulture kardiomiocita dobivenih iz induciranih pluripotentnih matičnih stanica izložile mediju koji je bio bogat mliječnom kiselinom, a siromašan glukozom (Fuerstenau-Sharp i sur, 2015). Naime, dobro je poznato svojstvo kardiomiocita da kao izvor energije učinkovito mogu koristiti mliječnu i neke druge organske kiseline, dok stanice kao što su fibroblasti puno teže preživljavaju u takvim uvjetima. Nakon tjedan dana takve izloženosti, udio kardiomiocita narastao je s prosječnih 37% na 90%, dok je gubitak kardiomiocita tijekom postupka u odnosu na početni broj bio oko 50%. Elektrofiziološka ispitivanja su potom potvrdila prisutnost atrijskih, ventrikularnih i nodalnih stanica u konačnom izolatu. Imajući na umu da je ovaj pristup tehnički jednostavan i ne zahtjeva skupu opremu, a daje vrlo zadovoljavajuće rezultate, za očekivati je da će se dalje usavršavati i sve više upotrebljavati (Fuerstenau-Sharp i sur, 2015).

Još jedna od korisnih razlika je i značajno veća gustoća mitohondrija prisutna u kardiomiocitima u odnosu na ostale tipove stanica. To omogućuje da se nanošenjem fluorescentnih

boja kao što je tetrametilrodamin, koji ima visoki afinitet za vezanje molekula koje grade mitohondrije, vizualiziraju kardiomiociti u kulturi stanica. Opisani pristup iskorišten je kasnije i na kulturama štakorskih i mišjih srčanih stanica, kao i na kardiomiocitima dobivenim iz PMS čovjeka te je dobiveni udio kardiomiocita bio veći od 99% (Hattori i sur, 2010). Negativne strane metode su kratko poluvrijeme raspada tetrametilrodamina; nakon 24 sata fluorescentna boja značajno izblijedi. Osim toga, za visoki stupanj čistoće potrebno je koristiti vrlo zrele kardiomiocite, koji su u kulturi bili barem 8 tjedana (Lewandowski i sur 2016).

Razvijeno je i niz metoda koje omogućuju odabir stanica željenih svojstava uz pomoć genetičkog inženjerstva. Jedan od često korištenih pristupa je unos gena koji svojom ekspresijom matičnim stanicama donosi otpornost na određeni antibiotik koji se potom dodaje u kulturu. Budući da se uneseni gen umeće na mjesto u genomu čiji je promotor također odgovoran za transkripciju gena koji kodiraju za proteine specifične za kardiomiocite, tom se metodom omogućuje preživljavanje samo onih stanica koje će sintetizirati za kardiomiocite karakteristične bjelančevine (Klug i sur, 1996). Sličan pristup je i unos tzv. glasničkog proteina (engl. “reporter protein”), čiju ekspresiju kontrolira isti promotor koji aktivira transkripciju kardiospecifičnih bjelančevina. Stanice koje su sintetizirale željene glasničke proteine se potom mogu izdvojiti metodama protočne citometrije ili imunofluorescencije (Lewandowski i sur 2016). Složenije inačice nabrojanih metoda koristimo kad želimo dodatno razdvojiti kardiomiocite na nodalne, atrijske ili ventrikularne stanice. Tada se traži prisutnost glasničkog proteina koji je pod kontrolom promotora odgovornog za ekspresiju bjelančevina specifičnih za samo jednu od 3 navedene skupine stanica, npr. gena za miozin lakih lanaca *MLC2v* specifičnog za ventrikularne ili gena *cGATA6* specifičnog za nodalne stanice (Sepac A i sur, 2012).



Dugo vremena tragalo se za bjelančevinama visoko specifičnima za kardiomiocite koji se nalaze na njihovoj površini kako bi se u svrhu razvrstavanja mogla iskoristiti visoko učinkovita metoda fluorescencijom aktiviranog sortiranja stanica (**FACS**, od engl. fluorescence activated cell sorting) koja se već dugo vremena izrazito uspješno koristila u drugim područjima stanične biologije. Radi se o metodi protočne citometrije kojom se u heterogenoj smjesi svaka stanica zasebno obasjava laserskim svjetlom, softverski analizira te se na temelju svojih fluorescencijskih svojstava razvrstava. Ona omogućuje izrazito brzo i efikasno razvrstavanje, uz istovremeno očuvanje strukturnog integriteta i funkcije analiziranih stanica (Pontén A i sur, 2013). Kako idealna bjelančevina specifična za staničnu površinu kardiomiocita nije nađena, u tu svrhu je upotrijebljena adhezijska molekula vaskularnih stanica 1 (VCAM-1, od engl. vascular cell adhesion molecule 1) koja je izražena na endotelnim stanicama krvnih žila, a omogućuje adheziju stanica kao što su limfociti, monociti i eozinofili. Međutim, otkriveno je da je ona prisutna i na staničnim površinama embrionalnih kardiomiocita, što je omogućilo primjenu FACS metode u pročišćavanju kardiomiocita. Za sada je metoda iskorištena na srčanom tkivu mišjih embrija, a udio kardiomiocita nakon pročišćavanja bio je 98%, od čega je 95% stanica zadržalo strukturni integritet i funkciju, što je potvrđeno elektrofiziološkim ispitivanjima (Pontén A i sur, 2013). Daljnja istraživanja na različitim linijama životinjskih i ljudskih stanica su u tijeku te je za očekivati da će se, ako se pokaže uspješnom i na ljudskim stanicama, njezina primjena značajno proširiti i omogućiti daljnji napredak u istraživanju i primjeni *in vitro* diferenciranih kardiomiocita.

## 6. Diferencijacija srčanih stanica iz različitih vrsta pluripotentnih matičnih stanica

### 6.1. Inducirane pluripotentne matične stanice

Kao što je objašnjeno u uvodnom poglavlju, PMS su vrsta matičnih stanica koje imaju sposobnost diferencijacije u sve tipove stanica odraslog organizma, ali im nedostaje mogućnost diferencijacije u ekstraembrionalna tkiva. Tipičan primjer takvih stanica su embrionalne matične stanice, koje su zbog svojih karakteristika izvrstan model u staničnoj biologiji, ali čija je upotreba ograničena mnogim preprekama (dostupnost, cijena, etičke dileme). Osim toga, vjeruje se da su pluripotentne matične stanice prisutne i u različitim tkivima odraslog organizma, ali se njihov broj starenjem značajno smanjuje. Dodatni problem je i njihova izolacija (Talkhabi i sur, 2015). Iz navedenih razloga, otkriće da se somatske stanice uzete iz tkiva odraslih organizama mogu laboratorijski reprogramirati u pluripotentne stanice jedno je od značajnijih biomedicinskih dostignuća posljednjih desetljeća (Takahashi K i Yamanaka S, 2006). Na taj način dobivene stanice nazivaju se **inducirane pluripotentne matične stanice (iPMS)**, a Shinya Yamanaka, znanstvenik koji je prvi uspio u tom pothvatu, za svoje je otkriće 2012. podijelio Nobelovu nagradu za medicinu s Johnom Gurdonom. Yamanaka je u svom istraživanju uspio inducirati mišje fibroblaste u stanice koje se mogu diferencirati u tkiva sva tri zametna listića, te je nakon dugotrajnih ispitivanja došao do saznanja da su za taj postupak reprogramiranja ključna 4 čimbenika (**Oct3/4, Sox 2, c-Myc i Klf4**), koji su danas poznati kao Yamanakini čimbenici (Takahashi K i Yamanaka S, 2006).

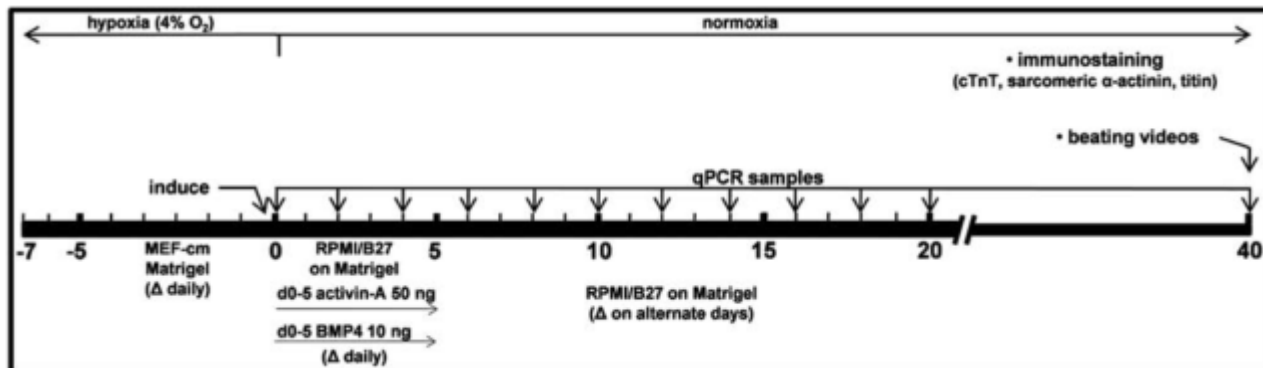
## **6.2. Diferencijacija srčanih stanica iz embrionalnih matičnih stanica i induciranih pluripotentnih matičnih stanica**

Nakon otkrića iPMS, uslijedila su brojna istraživanja koja su ispitala učinkovitost njihove diferencijacije u razne vrste specijaliziranih stanica. Nekoliko je istraživačkih skupina ubrzo objavilo uspjeh u diferencijaciji kardiomiocita iz iPMS, no važno pitanje na koje je trebalo dati odgovor bilo je koliko je ta diferencijacija učinkovita u usporedbi s EMS, koje su dugo smatrane zlatnim standardom.

Kako bi dobili što točnije i objektivnije rezultate, jedna je istraživačka grupa simultano, u istom laboratoriju upotrijebila identični protokol za poticanje diferencijacije u obje populacije stanica (Sepac i sur, 2012). Korištene su EMS linija H1 i H9 kupljene iz Nacionalne banke matičnih stanica (NSCB; WiCell, Madison, WI) i iPMS linija C2a i C6a dobivene iz fibroblasta kože čovjeka koji su bili transducirani transkripcijskim čimbenicima Oct4, Sox2, Nanog i Lin28. Nakon toga, EMS i navedenim postupkom dobivene iPMS uzgajane su pod istovjetnim uvjetima. Sve kulture stavljene su u jednake medije (RPMI/B27) i u sve kulture su u određenom trenutku usporedno dodani isti induktori diferencijacije (aktivin-A i BMP4) tijekom 5 dana, nakon čega su ostavljene u mediju (RPMI/B27) tijekom 40 dana. Kulture su nakon toga bile svakodnevno praćene kako bi se detektirao nastanak spontane kontrakcije. Iako su kontrakcije u obje linije EMS utvrđene već 10. dan, kod iPMS one su uočene tek tijekom 4. tjedna. U sve četiri linije, kontrakcije su bile sponatne i ritmične te su se odvijale u valovima koji su se širili skupinama stanica, što je karakteristično za kardimiocite dobivene iz matičnih stanica (Sepac i sur, 2012).

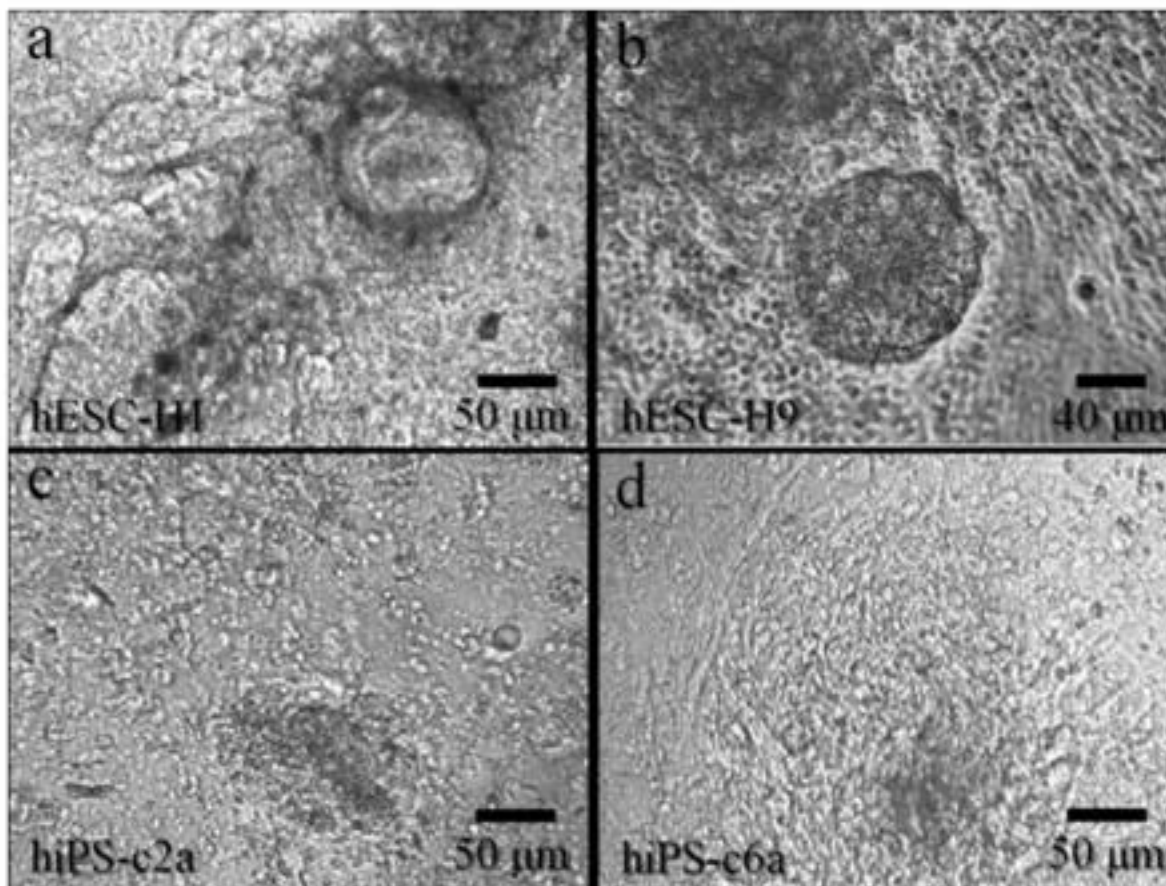
Imunohistokemijsko bojanje je obavljeno 40 dana nakon indukcije diferencijacije u svrhu utvrđivanja prisutnosti za srčane stanice specifičnih bjelančevina. Utvrđeno je da su se srčani troponin T i  $\alpha$ -aktinin organizirali u poprečno-prugaste uzorke duž sarkomera u H1 i H9 linijama

EMS, dok su kod linija iPMS ti uzorci bili oskudniji i slabije vidljivi.



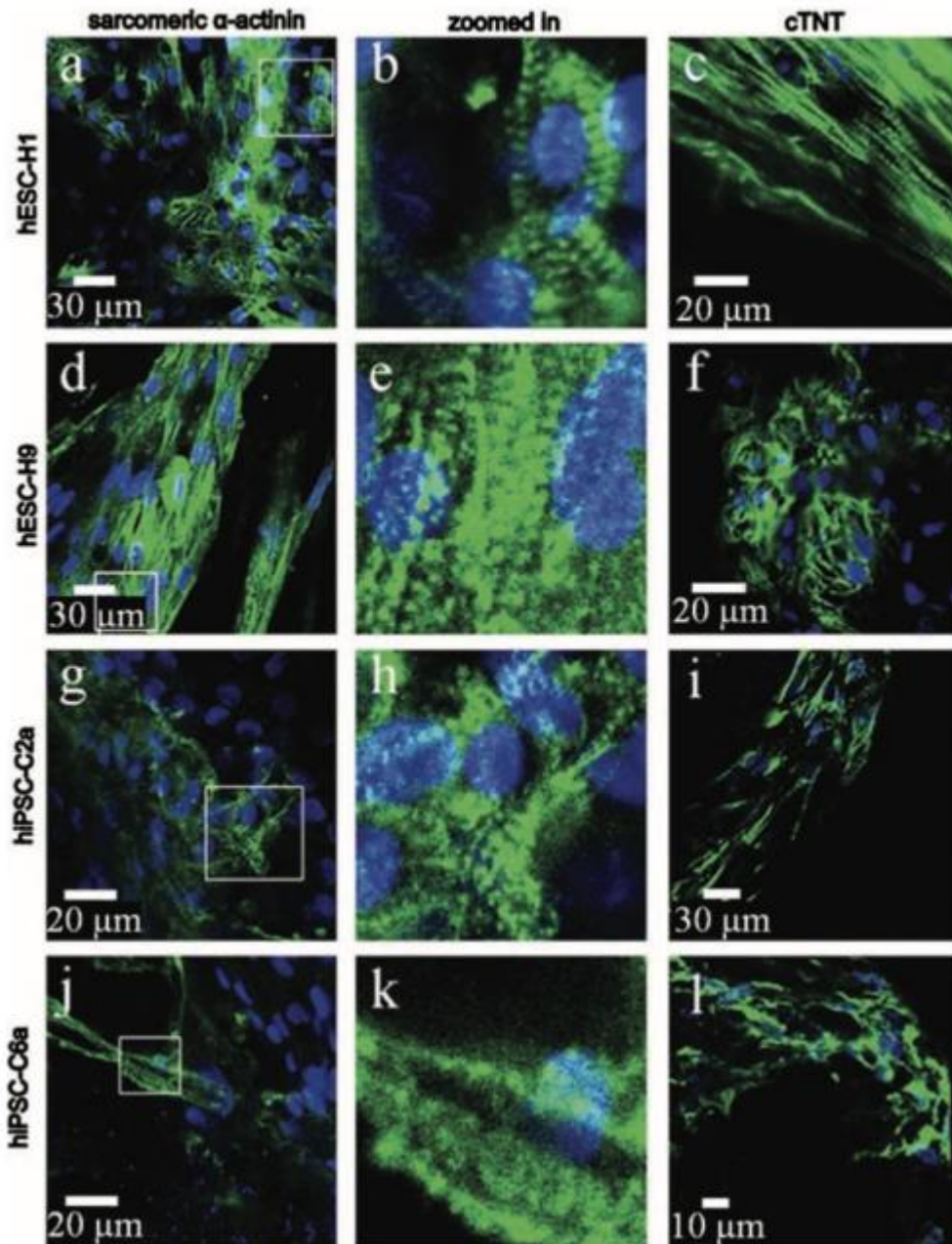
**Slika 3.** Prikaz vremenske linije istraživanja u kojem je uspoređena uspješnost *in vitro* diferencijacije EMS i iPMS u kardiomiocite (Sepac i sur, 2012)

Osim već nabrojanih metoda, korištena je i lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu kako bi se izmjerila ekspresija količine mRNA specifične za kardiomiocite u različitim intervalima. Kako se kardiomiociti počinju diferencirati, ekspresija određenih biljega, kao što su GATA4, MEF2C, TNNT2, TBX20 i MYL7 raste. Iako je ekspresija svih navedenih biljega očekivano narasla u linijama EMS, linije iPMS su pokazale skromniji porast biljega TNNT2, TBX20 i MYL7. Što se tiče ekspresije mRNA koje kodiraju za određene bjelančevine ionskih kanala, kao što su HCN4, SCN5A, CACNA1C, KCNH2 i KCNJ2, nije zamijećena razlika između pojedinih staničnih linija.



**Slika 4.** Fazno-kontrastni prikaz uz povećanje 400X svjetlosnim mikroskopom 40 dana nakon indukcije diferencijacije. Slike *a* i *b* pokazuju EMS, a slike *c* i *d* iPMS (Sepac i sur, 2012)

Iz navedenih podataka može se zaključiti da su i linije EMS i linije iPMS pokazale značajnu sposobnost diferencijacije u kardiomiocite u navedenim uvjetima, što potvrđuje njihova sposobnost spontane ritmičke kontrakcije, karakteristične morfološke preobrazbe i prisutnost ekspresije specifičnih gena kardiomiocita. Unatoč tome, obje linije iPMS pokazale su slabiju terminalnu diferencijaciju u odnosu na EMS što ukazuje da bi trebalo nastaviti tragati za još uspješnijim metodama kako bi iPMS ispunile svoj puni potencijal u regenerativnoj medicini.



**Slika 5.** Kardiomiociti diferencirani iz ljudskih EMS i iPSC, s imunohistokemijski obojenim  $\alpha$ -aktininom i srčanim troponinom T (cTNT) na 40. dan pokusa;  $\alpha$ -aktinin i cTNT jače su izraženi u kardiomiocitima dobivenim iz EMS (slike a - f) (Sepac i sur, 2012)

### **6.3. Diferencijacija kardiomiocita iz matičnih stanica podrijetlom iz masnog tkiva**

Adipociti su zrele stanice mezodermalnog podrijetla koje, osim u čovjeka, nalazimo u većine životinjskih vrsta, a glavna im je funkcija pohrana energije u obliku masti. Glavnina adipocita u tijelu čovjeka nalazi se u sklopu bijelog masnog tkiva koje također sadrži i manje količine stanica endotela i glatkih mišićnih stanica, leukocita i njihovih prekursora, ali i matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva, koji zajedno čine tzv. vaskularnu stromalnu frakciju masnog tkiva (Fraser i sur, 2006). Osim što služi kao spremnik lako dostupne energije, masno tkivo obavlja i druge važne funkcije, poglavito služeći kao termalna izolacija organizma, dok izlučivanjem endokrinih molekula sudjeluje u regulaciji imunskog odgovora, angiogeneze, kontrole krvnog tlaka i koštane mase (Trayhurn P, 2005).

Nakon uzimanja uzorka masnog tkiva iz životinjskih modela i obrade tako da se odvoje zreli adipociti od stanica vaskularne stromalne frakcije (VSF), pokazalo se (Mitchell JB i sur, 2006) kako stanice pokazuju fenotipska obilježja mnogih staničnih linija, kao što su multipotentne matične stanice (biljezi CD44, CD73 i CD90), hematopoetske (biljezi CD11b, CD34 i CD45), endotelne (biljezi CD31 i CD133), te stanice glatkih mišića i mastocita. Nadalje, stanice VSF kultivirane u mediju koji sadrži metilcelulozu pokazale su značajan angiogeni potencijal te su se uspješno diferencirale u kardiomiocite (Mazo i sur, 2011). Populacija stanica dobivena iz VSF koja pokazuje multipotentna obilježja, u literaturi je poznata i pod nazivom matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva, te se pokazalo da s multipotentnim matičnim stanicama koštane srži dijeli mnoga obilježja. Do sada su navedene stanice uspješno diferencirane u kardiomiocite, kondrocite, osteoblaste i adipocite (Mazo i sur, 2011). Ljudske matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva uzete biopsijom u kulturi su se diferencirale u kardiomiocite uz dodatak demetilirajućih kemijskih spojeva ili ekstrakta bjelančevina dobivenih iz srčanih stanica. Pokazalo

se da je jedan od čimbenika koji je stanice usmjerio prema tom razvojnom putu vaskularni endotelni čimbenik rasta izlučen iz stanica VSF (Mazo i sur, 2011).

S obzirom na uspjeh koji su matične stanice podrijetlom iz masnog tkiva pokazale u kulturama, njihov terapijski potencijal već je predmet brojnih istraživanja, a jedan od glavnih kliničkih ciljeva je obnavljanje srčanog tkiva oštećenog infarktom miokarda. Dva moguća cilja djelovanja u svrhu smanjivanja nastale štete u pacijenata koji su pretrpili infarkt jesu izravna diferencijacija presađenih stanica u kardiomiocite koji bi obnovili nekrotizirano područje srca i parakrino djelovanje presađenih stanica za koje se vjeruje da može potaknuti regenerativne sposobnosti lokalnog tkiva (Mazo i sur., 2011.). Isprva se čini kako je transplantacija matičnih stanica koje su prije toga *in vitro* bile potaknute na diferencijaciju u kardiomiocite najbolja opcija. No uzmemo li u obzir da područje infarkta srca može zahvaćati površinu na kojoj se nalazi i preko 1 milijarda kardiomiocita koje bi trebalo nadomjestiti i činjenicu da je do sada primjenjenim metodama frakcija funkcionalnih implantiranih stanica bila od 0.1 - 5%, možemo zaključiti da je ova metoda za sada još uvijek nedovoljno učinkovita da bi ušla u kliničku primjenu (Mazo i sur, 2011.).

S druge strane, neke studije su pokazale da čak i vrlo mali broj presađenih matičnih stanica podrijetlom iz masnog tkiva ima blagotvoran učinak na oštećeno srčano tkivo, prvenstveno potičući preživljenje ishemičnih stanica, lučeći čimbenike kemotaksije koje privlače progenitorske stanice, kao i regulirajući fibrozu tkiva i povećavajući nastanak nove mreže krvnih žila (Fedak PW, 2008).

Konačno, može se reći kako su stanice masnog tkiva pokazale velik potencijal na području regenerativne kardiologije. Osim sposobnosti diferencijacije u srčane stanice, one posjeduju i



značajne parakrine učinke koji imaju izrazito korisna svojstva ako se presade u ishemijom oštećeno srčano tkivo. Sukladno tome, za očekivati je da će se u bliskoj budućnosti postupak razviti dovoljno da omogući primjenu u kliničkoj medicini.

## 7. Diferencijacija kardiomiocita *in vivo*

### 7.1. Uloga srčanih progenitornih stanica u regeneraciji srca nakon opsežnih ozljeda

Upotreba matičnih i progenitornih stanica u svrhu obnavljanja i/ili poboljšanja funkcije ljudskih tkiva i organa široko je istraživana metoda. Razvoj tehnologija koje bi uspješno prenijele tehnike regenerativne biologije iz laboratorija u kliničku praksu značio bi revoluciju u liječenju mnogih kroničnih nezaraznih bolesti koje su vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u gospodarski razvijenim zemljama. Još 2001. Orlic i suradnici su u časopisu *Nature* objavili da su uspješno regenerirali velika područja srca glodavaca koja su bila oštećena infarktomiokarda upotrebom c-Kit<sup>+</sup> mononuklearnih stanica podrijetlom iz koštane srži (Orlic i sur, 2001). U spomenutom istraživanju, izolirane su c-Kit<sup>+</sup> stanice iz koštane srži transgeničnih miševa, te injicirane u rubna područja infarciranog područja. U članku se navodi da je 9 dana nakon unosa stanica iz koštane srži, 68% prvotne površine infarkta bilo zamijenjeno novonastalim miokardom, a većinu tkiva činili su proliferirajući kardiomiociti i vaskularne strukture. Dvije godine kasnije, u članku koji su objavili Beltrami i suradnici, znanstvenici iz istog laboratorija, naveli su da je nakon izolacije c-Kit<sup>+</sup> stanica iz samog srca i njihove *in vitro* proliferacije te injiciranja stanica u područje infarciranog srca uspješno regenerirano 70% oštećenog tkiva (Beltrami i sur, 2003).

Navedena istraživanja privukla su veliko zanimanje znanstvene zajednice, no razočaranje je uslijedilo kad je većina daljnjih ispitivanja pokazala da c-Kit<sup>+</sup> stanice podrijetlom iz koštane srži nemaju sposobnost diferencijacije u kardiomiocite pod do sada ispitanim uvjetima. Najrelevantniji radovi ukazuju na to da su c-Kit<sup>+</sup> stanice zapravo progenitori endotelnih stanica koji pod mnoštvom ispitanih uvjeta nisu sintetizirali bjelančevine specifične za kardiomiocite (Cai i Molkenin, 2016).

Za sada još nema univerzalno prihvaćenog objašnjenja za ove proturječne rezultate. Moguće je da, ako c-Kit<sup>+</sup> stanice nemaju sposobnost diferencijacije u kardiomiocite, one nakon injiciranja u srčano tkivo parakrinim učinkom potiču proliferaciju već diferenciranih kardiomiocita ili nekih drugih lokalno prisutnih matičnih ili adultnih stanica koje se pod tim uvjetima diferenciraju u kardiomiocite (Cai i Molkenin, 2016).

Iako se smatra da su kardiomiociti većine sisavaca terminalno diferencirani, postoje dokazi da se u određenih vrsta oni mogu ponovno početi dijeliti. Primjerice, zapaženo je da su se srca novorođenih miševa u potpunosti regenerirala nakon kirurške resekcije ili inducirano infarkta miokarda, i da su za regeneraciju bili odgovorni kardiomiociti prisutni u rubnim područjima oko oštećenja (Porrello i sur, 2011).

Dokazano je i da ribe zebrice (*Danio rerio*), čija srca također imaju značajne regenerativne sposobnosti nakon oštećenja, obnavljanje srčanog tkiva postižu na račun proliferacije određenih populacija već prisutnih zrelih kardiomiocita, a ne progenitornih stanica (Kikuchi i sur, 2010).

Nakon brojnih ispitivanja i neuspjeha u pronalasku progenitornih ili njima srodnih matičnih stanica koje bi se u srcu mogle diferencirati u kardiomiocite, sve više istraživača vjeruje da su za ograničenu sposobnost obnove srčanog tkiva odgovorni već diferencirani kardiomiociti koji se u njemu nalaze (Cai i Molkenin, 2016). Danas se smatra da srce odraslog čovjeka godišnje obnovi 1 do 2 % svojih kardiomiocita (van Berlo i Molkenin, 2014). Ako se uzme u obzir i apoptoza kardiomiocita koja je prisutna tijekom cijelog života, i koja se starenjem odvija sve većim intenzitetom, dolazimo do zaključka da regeneracija srčanih stanica mora biti mnogo veća od 1% godišnje kako bi se održala bazalna funkcija srca tijekom života (Cai i Molkenin, 2016). Neki znanstvenici (Anversa i sur, 2013) smatraju da se to može objasniti pretpostavkom da je razina

apoptoze prisutna u srcu značajno manja nego što se do sada predviđalo.

Druga mogućnost je da u srcu ipak postoje progenitorne stanice koje sudjeluju u regeneraciji i održavanju stabilne funkcije srca tijekom većine života čovjeka, ali da one nisu u stanju obnoviti srčano tkivo nakon većih oštećenja kao što je akutni infarkt. Međutim, kako za sada nema uvjerljivih dokaza o prisutnosti takvih stanica u ljudskom srcu, velik dio znanstvene zajednice smatra da one niti ne postoje (Cai i Molkenin, 2016). Osim toga, postavlja se i pitanje zašto je, ako su progenitorne stanice zaista prisutne, njihova sposobnost regeneracije srca toliko ograničena.

Zaključno, iako je znanstvena zajednica podijeljena, većina stručnjaka ovog područja smatra kako za niski stupanj regeneracije srca tijekom života čovjeka nisu odgovorne progenitorne stanice, nego određena populacija u srcu prisutnih kardiomiocita koja zadržava sposobnost proliferacije i nakon diferencijacije (Cai i Molkenin, 2016), što je dokazano kod nekih drugih vrsta, kao što su riba zebrića i miš. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se do kraja razjasnili prirodni mehanizmi obnove srčanog tkiva i ispitani načini kako ih terapijski potaknuti, što bi barem djelomično poboljšalo trenutno dostupne opcije u liječenju kardiovaskularnih bolesti.

## **7.2. Transdiferencijacija stanica u regeneraciji srca**

U prethodnim poglavljima su opisani postupci kojima je moguće već zrele, diferencirane somatske stanice laboratorijski reprogramirati, tj. dediferencirati u pluripotentne matične stanice i da se dobivene stanice raznim metodama, uz više ili manje uspjeha, kasnije mogu *in vitro* potaknuti da se diferenciraju u točno određenu vrstu zrelih stanica. Međutim, moguće je zrele diferencirane stanice prevesti u neki drugi tip zrelih stanica i bez da ih se prije toga dediferencira u matične

stanice – taj postupak se naziva "izravno reprogramiranje" ili "**transdiferenciranje**" (Srivastava D i sur, 2016). Iako je već od 1987. bilo poznato da je moguće fibroblaste izravno transdiferencirati u mioblaste uz pomoć samo jednog transkripcijskog čimbenika, daljnja istraživanja s drugim vrstama stanica polučila su vrlo malo uspjeha jer nije bila pronađena odgovarajuća kombinacija poticajnih čimbenika. Tek kad je Yamanaka 2006. godine otkrio da se elegantnim "kombinatornim pristupom", kojim je identificirao koktel od samo nekoliko transkripcijskih čimbenika kojima se uspješno može reprogramirati zrele stanice u iPMS, njegov je uspjeh potaknuo mnoge istraživačke grupe da ispitaju slične pristupe i u transdiferenciranju drugih histoloških tipova zrelih stanica (Srivastava D i sur, 2016).

Ieda i suradnici objavili su 2011. da su nakon ispitivanja 14 transkripcijskih čimbenika i velik broj microRNA molekula uspjeli identificirati 3 čimbenika – **Gata4**, **Mef2c** i **Tbx5**, koji su brzo i učinkovito *in vitro* transdiferencirali fibroblaste kože i srca postnatalnih miševa u funkcionalne kardiomiocite. Dobivene stanice izražavale su kardiospecifične biljege i imale sposobnost kontrakcije. Osim toga, fibroblasti mišjeg srca u koje su postupkom transdukcije unesena navedena 3 čimbenika, i koji su nakon jednog dana transplantirani u srce miševa, također su se diferencirali u stanice srodne kardiomiocitima (Ieda i sur, 2011).

Ubrzo nakon toga, objavljeno je da su neke istraživačke grupe otkrile protokole uz pomoć kojih su uspjeli transdiferencirati mišje fibroblaste u kardiomiocite s još većim uspjehom – dodatak transkripcijskog čimbenika **Hand2** (Song i sur. 2012), te microRNA miR-1 i miR-133 (Heidersbach i sur, 2013) značajno su povećali učinkovitost postupka. Kombinacija 4 microRNA molekule (miR-1, miR-133, miR-208 i miR-499) uspješno je transdiferencirala mišje fibroblaste u kardiomiocite u odsutnosti bilo kakvih drugih transkripcijskih čimbenika, a inhibitor JAK 1 i

inhibitori TGF- $\beta$  signalnog puta povećali su uspješnost diferencijacije (Srivastava D i sur, 2016).

Na žalost, pokušaj transdiferencijacije ljudskih fibroblasta u kardiomiocite pokazao se znatno težim – tri izvorno upotrijebljena čimbenika (Gata4, Mef2c i Tbx5) nisu postigli zadovoljavajuće rezultate, kao ni preostale kombinacije koje su bile uspješne u miševa. Unatoč tome, brojne su istraživačke grupe nastavile ispitivati druge kombinacije čimbenika te su mnoge od njih postigle uspjeh. Jedna od takvih je kombinacija GATA4, Hand2, T-box5, miokardina, te dvije microRNA molekule, (miR-1 i miR-133), koja je postigla rezultate usporedive s onima koji su dobiveni u miševa (Srivastava D i sur, 2016).

Što se tiče transdiferencijacije *in vivo*, i tu su postignuti spomena vrijedni rezultati.

2012. godine objavljeno je da se nakon induciranja infarkta miokarda, izravnim unosom **Gata4**, **Mef2c** i **Tbx5** u oštećeno tkivo uspjelo potaknuti njegovu regeneraciju (Qian i sur, 2012). Novonastale stanice imale su dvije jezgre i bile histološki slične nativnim kardiomiocitima te imale sposobnost generiranja akcijskog potencijala i kontrakcije. Nakon 3 mjeseca, područje infarkta bilo je manje, a izbačajna frakcija srca veća nego u kontrolnim skupinama. Dodatak nekih proangiogenih molekula, kao što su peptid koji aktivira fibroblaste i timozin  $\beta$ 4 dodatno je smanjio područje infarkta i fibroze tkiva. (Qian i sur, 2012).

Ono što je posebno zanimljivo jest da je uspješnost reprogramiranja stanica *in vivo* bila veća nego *in vitro*. Novonastalo tkivo je histološki i elektrofiziološki više nalikovalo nativnim srčanom tkivu, a kapilarna prokrvljenost bila je veća. Pretpostavlja se da je uzrok tome parakrini i imunomodulacijski učinak transdiferenciranih kardiomiocita na okolno tkivo i supresija fibroze koja je odgovorna za nastanak ožiljka (Srivastava D i sur, 2016).

Sve nabrojano svakako predstavlja značajan pomak naprijed i s pravom budi nadu da je trenutak kad će tehnologija biti spremna za kliničku primjenu sve bliže. Procjenjuje se da fibroblasti čine više od 50% ukupnog broja stanica u ljudskom srcu (Baudino i sur, 2006) te su gotovo idealna meta za transdiferencijaciju u kardiomiocite s obzirom da se tim postupkom istovremeno smanjuje broj preostalih fibroblasta koji su odgovorni za neželjeno modeliranje srca i stvaranje ožiljka koji prate svako oštećenje. Osim toga, mogućnost izravne primjene čimbenika *in vivo* smanjuje tehničke poteškoće i cijenu te ubrzava cijeli postupak. Daljnje prepreke koje treba savladati jesu pronalazak čimbenika optimalnih za ljudsko srce i put unosa koji će biti dovoljno učinkovit i siguran za primjenu *in vivo*.

## 8. Zaključak

Za sada nema uvjerljivih dokaza o postojanju matičnih ili srodnih stanica u ljudskom srcu koje bi bile sposobne obnoviti taj organ *in vivo* nakon većih oštećenja kao što je infarkt miokarda te je za većinu kardiovaskularnih bolesnika usporavanje daljnje progresije gubitka srčane funkcije za sada jedina opcija. Zbog toga se u zadnje vrijeme ekstenzivno istražuju mogućnosti *in vitro* diferencijacije matičnih i drugih vrsta stanica u kardiomiocite, koje bi, osim terapijskih mogućnosti, omogućile i znatno lakši pristup srčanom tkivu u svrhu istraživanja razvojne biologije srca i utjecaja postojećih i novih farmakoterapeutika na njegovu funkciju. Veliki korak naprijed postignut je otkrićem da se somatske stanice uzete iz tkiva odraslih organizama mogu laboratorijski reprogramirati u pluripotentne stanice – tzv. iPMS, jer se time smanjuje potreba za embrionalnim matičnim stanicama, čija je upotreba skupa i predmet etičkih dilema. Iako su mnoge istraživačke skupine uspjele potaknuti diferencijaciju kardiomiocita iz iPMS, učinkovitost je još uvijek znatno slabija u odnosu na onu koja se postiže primjenom embrionalnih matičnih stanica te je zbog toga potrebno optimizirati postojeće ili razviti nove metode kako bi se ispunio njihov potencijal.

Postupak *in vitro* diferencijacije matičnih stanica u kardiomiocite vrlo je složen proces koji se temelji na poticanju određenih aktivacijskih ili inhibicijskih signalnih putova kojima se nastoji što vjernije imitirati prirodne molekularne kaskade koje se odvijaju tijekom embrionalnog razvoja srca. Tri najčešće korištene metode kojima se u laboratorijskim uvjetima potiče diferencijacija matičnih stanica u kardiomiocite su diferencijacija pomoću embrioidnih tjelešaca, diferencijacija u jednosloju i induktivna su-kultura s visceralnim stanicama sličnim endodermu. Svaka od navedenih ima svoje prednosti i nedostatke, no **diferencijacija u jednosloju** je zbog svoje



jednostavnosti, relativno visoke učinkovitosti, niže cijene i manje ovisnosti o upotrebi egzogenih transkripcijskih čimbenika metoda izbora većine istraživača, posebno onih koji nastoje primijeniti takav pristup u kliničkoj medicini.

U bliskoj budućnosti možemo očekivati daljnji razvoj navedenih metoda jer se radi o području koje ima potencijal revolucionarizirati liječenje kardiovaskularnih bolesti, glavnog uzročnika morbiditeta i mortaliteta u svijetu. Trenutno dostupne metode nisu dostatno učinkovite i sigurne da bi zadovoljile rigorozne kriterije nužne za kliničku primjenu, no nova otkrića do kojih svakodnevno dolaze brojne istraživačke skupine s pravom ulijevaju nadu i optimizam.

## **9. Zahvale**

Izrazito sam zahvalan mentoru, doc. dr. dc. Filipu Sedliču, koji mi je tijekom pisanja ovog rada puno pomogao konstruktivnim savjetima, odabirom literature te strpljivim pojašnjavanjem nedoumica koje sam imao. Također zahvaljujem članovima komisije, prof. dr. sc. Zdenku Kovaču i prof. dr. sc. Jasenki Markeljević, na trudu i vremenu koje će uložiti čitajući ovaj rad.

Naposlijetku, želim zahvaliti svojim roditeljima, užoj i široj obitelji te prijateljima i kolegama, (među kojima bih izdvojio Antonija Marketina i Ines Kovačić) koji su mi bili potpora tijekom studija i uvijek uz mene kad sam trebao njihovu pomoć.

## 10. Literatura:

1. Anversa P, Kajstura J, Rota M, Leri A (2013) Regenerating new heart with stem cells; *Journal of Clinical Investigation*; 123:62–70. DOI: 10.1172/JCI63068
2. Baudino TA, Carver W, Giles W, Borg TK (2006): Cardiac fibroblasts: friend or foe?; *American Journal of Physiology*; 291:H1015–1026
3. Bauwens CL, Song H, Thavandiran N (2011): Geometric control of cardiomyogenic induction in human pluripotent stem cells; *Tissue Engineering*; 17: 1901–1909
4. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P (2003): Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration; *Cell*; 19;114(6):763-76.
5. Birket MJ, Ribeiro MC, Verkerk AO, Ward D, Leitoguinho AR1, den Hartogh SC, Orlova VV, Devalla HD, Schwach V, Bellin M, Passier R, Mummery CL (2015): Expansion and patterning of cardiovascular progenitors derived from human pluripotent stem cells; *Nature biotechnology*; 33(9):970-9. DOI: 10.1038/nbt.3271
6. Burridge PW, Anderson D, Priddle H (2007): Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability; *Stem Cells*; 25: 929–938
7. Cai C, Molkentin JD (2016): The Elusive Progenitor Cell in Cardiac Regeneration Slip Slidin' Away; *American Heart Association*; DOI: <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309710>

8. Fedak PW (2008): Paracrine effects of cell transplantation: modifying ventricular remodeling in the failing heart; *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery*; 20(2), 87–93
9. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH (2006): Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology; *Trends in Biotechnology*, 24(4), 150–15
10. Fuerstenau-Sharp M, Zimmermann ME i sur (2015): Generation of highly purified human cardiomyocytes from peripheral blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells; DOI: 10.1371/journal.pone.0126596
11. Hattori F, Chen H, Yamashita H (2010): Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes; *Nature Methods*; 7(1):61-6; DOI: 10.1038/nmeth.1403
12. Heidersbach A, Saxby C, Carver-Moore K, Huang Y, Ang YS, de Jong PJ, Ivey KN, Srivastava D (2013): MicroRNA-1 regulates sarcomere formation and suppresses smooth muscle gene expression in the mammalian heart; *eLife* 2, e01323.
13. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, Srivastava D (2010): Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors; *Cell* 142, 375–386
14. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G (2011): Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines; *Cell Stem Cell*; 4;8(2):228-40. DOI: 10.1016/j.stem.2010.12.008
15. Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, Anderson RM, Fang Y, Egnaczyk GF, Evans T, Macrae CA, Stainier DY, Poss KD (2010): Primary contribution to zebrafish heart regeneration by gata4(+) cardiomyocytes, *Nature*; 464:601–605. DOI:

10.1038/nature08804.

16. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996): Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts; *Journal of Clinical Investigation*; 1;98(1):216-24; DOI: 10.1172/JCI118769
17. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV (2007): Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts; *Nature Biotechnology*; 25: 1015–1024
18. Lee LH, Peerani R, Ungrin M (2009): Micropatterning of human embryonic stem cells dissects the mesoderm and endoderm lineages; *Stem Cell Research*; 2: 155–162
19. Lewandowski J, Kolanowski TJ, Kurpisz M (2016): Techniques for the induction of human pluripotent stem cell differentiation towards cardiomyocytes; *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*; DOI: 10.1002/term.2117
20. Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B (2011): Adipose-derived Stem Cells for Myocardial Infarction; *Journal of Cardiovascular Translational Research*; DOI 10.1007/s12265-010-9246-y
21. Mescher AL: Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas; 13th edition; ISBN-13: 978-0071780339; str. 212 – 216
22. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A (2006): Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24(2), 376–385
23. Mohr JC, de Pablo JJ, Palecek SP (2006): 3D microwell culture of human embryonic stem cells; *Biomaterials* 27: 6032–6042; *Nature*; 410:701–705; DOI: 10.1038/35070587
24. Okita K, Yamanaka S (2010): Induction of pluripotency by defined factors; *Experimental*

*Cell Research.*; DOI: 10.1016/j.yexcr.2010.04.023

25. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium; *Nature*; DOI: 10.1038/35070587
26. Pontén A, Walsh S, Malan D, Xian X, Schéele S, Tarnawski L, Fleischmann BK, Jovinge S (2013): FACS-Based Isolation, Propagation and Characterization of Mouse Embryonic Cardiomyocytes Based on VCAM-1 Surface Marker Expression; DOI: 10.1371/journal.pone.0082403
27. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, Sadek HA (2011): Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart; *Science*; 331:1078–1080. DOI: 10.1126/science.1200708.
28. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu JD, Srivastava D (2012): In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes; *Nature*; 485, 593–598
29. Sadler TW (2008): Langmanova medicinska embriologija; *Školska knjiga*, deseto izdanje; ISBN: 978-0-7817-9485-5; str.161. – 197.
30. Schwach V, Passier R (2016): Generation and purification of human stem cell-derived cardiomyocyte; *Differentiation*; DOI: 10.1016/j.diff.2016.01.001
31. Sepac A, Si-Tayeb K, Sedlic F, Barrett S, Canfield S, Duncan SA, Bosnjak ZJ, Lough JW (2012): Comparison of Cardiomyogenic Potential Among Human ESC and iPSC Lines; *Cell Transplantation*; DOI: <http://dx.doi.org/10.3727/096368912X653165>
32. Song K, Nam YJ, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, Acharya A, Smith CL, Tallquist MD, Neilson EG (2012): Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac

- transcription factors; *Nature*; 485, 599–604
33. Srivastava D, DeWitt N (2016): In Vivo Cellular Reprogramming: The Next Generation; *Cell*; 166(6):1386-96. DOI: 10.1016/j.cell.2016.08.055.
  34. Takahashi K, Yamanaka S (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors; *Cell*; 126: 663-676
  35. Talkhabi M, Aghdami N, Baharvand H (2015); Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: A state-of-art; *Life sciences*; DOI: 10.1016/j.lfs.2015.12.023
  36. Trayhurn P (2005): Endocrine and signalling role of adipose tissue: new perspectives on fat. *Acta Physiologica Scandinavica*; 184(4), 285–293. DOI:10.1111/j.1365-201X.2005.01468.x
  37. van Berlo JH, Molkenin JD (2014): An emerging consensus on cardiac regeneration; *Nature Medicine*; 20:1386–1393; DOI: 10.1038/nm.3764.
  38. Watt FM, Hogan BL (2000): Out of Eden: stem cells and their niches; *Science*; DOI: 10.1126/science.287.5457.1427
  39. Xu C, Police S, Rao N (2002): Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells; *Circulation Research*; 91: 501–508
  40. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al. (2008): Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR<sup>+</sup> embryonic stem cell-derived population; *Nature*; 453: 524–528
  41. Zhang J, Klos M, Wilson GF (2012): Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method; *Circulation Research*; 111: 1125–1136