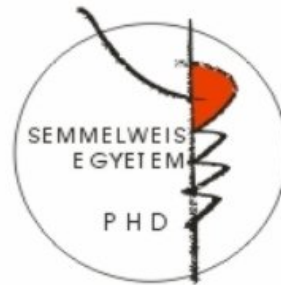


# Sejtalapú terápiák hatékonyságának vizsgálata szívinfarktus modellben

Doktori értekezés

**Benkő Zsolt, M.Sc.**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Kiss Levente, Ph.D., egyetemi adjunktus

Hivatalos bírálók: Dr. Radovits Tamás, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Prof. Papp Zoltán, D.Sc., tanszékvezető  
egyetemi tanár

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Buzás Edit, D.Sc., intézetvezető, egyetemi  
tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Földes Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Katarova Zoja, Ph.D., kutató

Budapest  
2015

## Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	1
Rövidítések jegyzéke .....	4
1 Bevezetés.....	7
1.1 Iszkémiás szívbetegségek - szívinfarktus .....	7
1.1.1 Demográfia .....	7
1.1.2 A miokardiális infarktust követő szívizom-károsodás folyamata .....	9
1.1.2.1 Iszkémiás károsodás .....	9
1.1.2.2 Reperfúziós károsodás .....	11
1.1.2.3 Szöveti helyreállító folyamatok.....	13
1.1.2.4 Komplikációk .....	14
1.1.3 Terápiás lehetőségek.....	15
1.2 Sejtalapú terápiák.....	17
1.2.1 Őssejtek .....	18
1.2.2 Őssejt típusok .....	19
1.2.2.1 Embrionális őssejtek.....	20
1.2.2.2 Felnőtt őssejtek .....	21
1.2.2.2.1 Mesenchymális őssejtek.....	21
1.2.2.2.2 Szív eredetű őssejtek.....	23
1.2.2.3 Indukált pluripotens sejtek .....	24
1.2.3 Az őssejtkezelések hatásmechanizmusa.....	25
1.2.3.1 Parakrin hatások .....	26
1.2.3.1.1 Gyulladás szabályozása .....	26
1.2.3.1.2 Fibrózis szabályozása.....	27
1.2.3.1.3 Angiogenezis szabályozása.....	27
1.2.3.2 Differenciáció .....	27
1.2.3.3 Membrán nanocsövek.....	29
1.2.3.4 Sejtfúzió.....	30
1.2.4 Őssejtterápiák preklinikai és klinikai eredményei.....	30
1.2.4.1 Őssejtterápia miokardiális infarktus után .....	31
1.2.5 Lehetőségek a sejtterápiák hatékonyságának fokozására.....	35

1.2.5.1	Homing befolyásolása .....	35
1.2.5.2	Előkezelések sejterápiákban.....	36
1.2.5.3	A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1 .....	37
2	Célkitűzések .....	40
3	Módszerek .....	41
3.1	Felhasznált eszközök .....	41
3.2	Felhasznált sejttípusok .....	42
3.2.1	H9c2 sejtvonal .....	42
3.2.2	Humán csontvelő eredetű mesenchymális őssejt.....	42
3.2.3	Humán zsírszövet eredetű őssejt .....	43
3.3	Élő/halott jelölés – calcein-ethidium homodimer .....	44
3.4	Iszkémia-reperfúzió modell .....	46
3.5	A terápiásan alkalmazott sejtek jelölése -Vybrant DiD .....	48
3.6	A hozzáadott sejtek PARP inhibitor előkezelése.....	48
3.7	hASC kondicionált médium.....	49
3.8	Konfokális mikroszkóp.....	49
3.9	Áramlási citometria.....	50
3.10	Metabolikus aktivitás mérése .....	52
3.11	Malondialdehid mérés .....	53
3.12	Laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérés .....	54
3.13	Kísérleti protokollok.....	55
3.13.1	Iszkémia-reperfúzió modell jellemzése .....	55
3.13.2	Csontvelő és zsírszövet eredetű őssejtek hatásainak összehasonlítása <i>in vitro</i> iszkémia-reperfúzió modellben .....	55
3.13.3	Terápiás sejtek PJ34 PARP inhibitorral való előkezelésének hatása <i>in vitro</i> iszkémia-reperfúzió modellben .....	57
3.13.3.1	Előkísérletek .....	57
3.13.3.2	Kísérletek.....	58
3.14	Adatelemzés és statisztika .....	59
4	Eredmények.....	60
4.1	Iszkémia-reperfúzió modell jellemzése .....	60

4.2	Csontvelő és zsírszövet eredetű őssejtek hatásainak összehasonlítása in vitro iszkémia-reperfúzió modellben.....	62
4.3	Terápiás sejtek PJ34 PARP inhibitorral való előkezelésének hatása in vitro iszkémia-reperfúzió modellben.....	66
5	Megbeszélés .....	69
6	Következtetések .....	76
7	Összefoglalás.....	77
8	Summary .....	78
9	Irodalomjegyzék.....	79
10	Publikációs lista.....	115
11	Köszönetnyilvánítás.....	117

**Rövidítések jegyzéke**

$\Delta\mu_{H^+}$	hidrogén ion kémiai potenciálkülönbsége a membrán két oldalán
ADP	adenozin-diszfoszfát
AKM	zsírszövet eredetű őssejttel kondicionált médium
AKT/PKB	protein kináz B
ALS	amiotrófiás laterálszklerózis
ASC	zsírszövet eredetű mesenchymális őssejt
ATP	adenozin-triszfoszfát
AU	önkéntes egység
Bcl-2	B-sejt limfóma 2 fehérje
Bcl-xL	B-sejt limfóma extra nagy fehérje
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor
BMC	csontvelő eredetű sejtek
BMSC	csontvelő eredetű mesenchymális őssejt
CD	differenciációs klaszter
CFU-F	kolóniaformáló egység – fibroblaszt
Cyt c	citokróm c
CSP	szív eredetű side populáció
Da	Dalton
DMSO	Dimetilszulfoxid
DNA-PK	DNS-függő protein kináz
DNS	Dezoxiribonukleinsav
EB	embrioid test
EDV	végdiasztolés térfogat
EF	ejekciós frakció
EKG	Elektrokardiográfia
ESC	embrionális őssejt
EthD	ethidium homodimer
FACS	fluoreszcencia aktivált sejtválogatás és analízis
FAD	flavin-adenin-dinukleotid oxidált forma
FADH <sub>2</sub>	flavin-adenin-dinukleotid redukált forma

FGF	fibroblaszt növekedési faktor
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
G-CSF	granulocita kolónia stimuláló faktor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	hidrogén-peroxid
hASC	humán zsírszövet eredetű mesenchymális őssejt
hBMSC	humán csontvelő eredetű mesenchymális őssejt
HGF	hepatocita növekedési faktor
HIF-1 $\alpha$	hipoxia-indukált faktor 1 $\alpha$
HLA	humán leukocita antigén
IGF	inzulinszerű növekedési faktor
IL	Interleukin
iPS	indukált pluripotens őssejt
LDH	laktát-dehidrogenáz
LVEF	balkamrai ejekciós frakció
LVESV	balkamrai végszisztolés volumen
LVF	balkamra funkció
MDA	Malondialdehyd
MEF	miocita specifikus enhancer faktor
MHC	miozin nehéz lánc
MLC	miozin könnyű lánc
MMP	mátrix metalloproteináz
MSC	mesenchymális őssejt
NAD	nikotinamid-adenin-dinukleotid
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid-adenin-dinukleotid oxidált forma
NADH	nikotinamid-adenin-dinukleotid redukált forma
NF- $\kappa$ B	nukleáris faktor- $\kappa$ B
NK sejt	természetes ölő sejt
NO <sup>-</sup>	nitroxil anion
NO <sup>+</sup>	nitrózium kation
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	szuperoxid anion
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrit
PAR	poli(ADP-ribóz)

PARP	poli(ADP-ribóz) polimeráz
PCI	perkután koronária intervenció
PE	Fikoeritrin
P <sub>i</sub>	foszfát anion
Q <sup>•</sup>	koenzim Q, ubikinon
QCP	szétkapcsoló fehérje
QOL	Életminőség
RNS	reaktív nitrogénfajták
ROS	reaktív oxigénfajták
SAE	súlyos kedvezőtlen esemény
SCF	őssejt faktor
SDF-1	stromális sejt eredetű faktor 1
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
TBA	tiobarbitursav
TGF-β	transzformációs növekedési faktor β
TIMP	metalloproteináz szöveti inhibitor
TNF-α	tumor nekrosis faktor α
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
XRCC1	röntgen repair kereszt-komplementáló protein 1

## 1 Bevezetés

### 1.1 *Iszkémiás szívbetegségek - szívinfarktus*

A szív- és érrendszeri betegségek komoly egészségügyi és társadalmi problémát jelentenek. Legjelentősebb ezek közül - részben gyakorisága és hosszú távú életminőséget hátrányosan befolyásoló hatása, valamint nem utolsósorban magas költségei és ennek társadalmi kihatásai miatt - a stroke és a miokardiális infarktus.

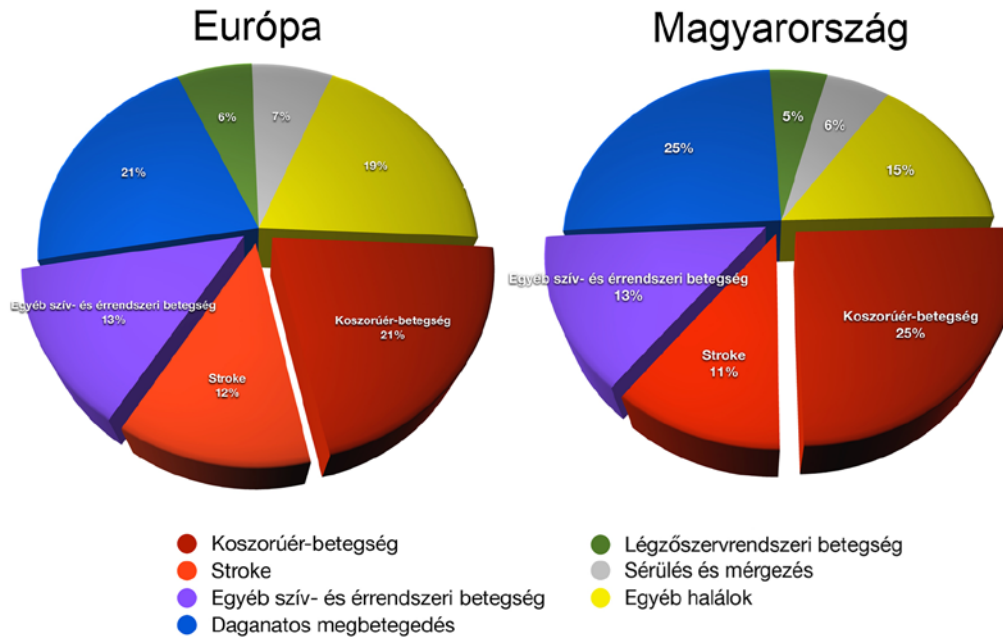
#### 1.1.1 Demográfia

A gyors ipari és technológiai fejlődés következtében a várható élettartam jelentősen növekedett. A fertőzések vakcinákkal, antibiotikumokkal történő kezelése, a transzfúziós lehetőségek, a pontosabb diagnosztikai eljárások, illetve a modern műszerek és gyógyszerek segítségével a betegségek akut szakaszának kezelése sokat fejlődött. Ugyanakkor megfigyelhető a munkakörülmények megváltozása, a mozgásszegény életmód, az egészségtelen étrend elterjedése. Az Eurobarometer adatai szerint a felmérésükbe bevontak 59%-a egyáltalán nem, vagy csak ritkán végez testgyakorlatokat vagy vesz részt sportjátékokban és 30% nem végez egyéb fizikai tevékenységet sem (mint például kerékpározás, tánc vagy kertészkedés) [1]. A fentiek következtében a szív- és érrendszeri, valamint a daganatos betegségek kerültek előtérbe, jelenleg a krónikus betegek ellátása, gondozása a legnagyobb feladat.

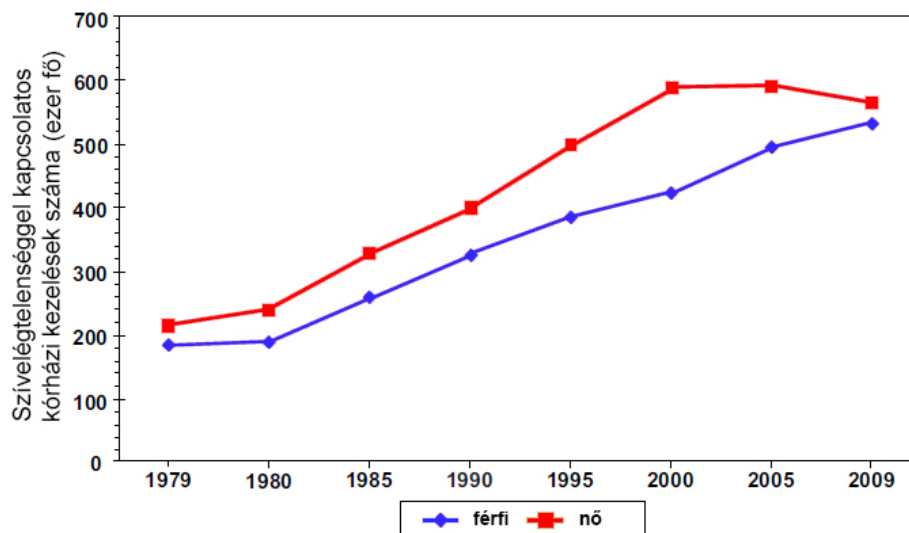
Az European Heart Network 2012-es adatai alapján [2] Európában a mortalitás 46%-a szív- és érrendszeri megbetegedés következménye. Magyarországon még szomorúbb képet mutatnak az adatok: minden második halálozás kardiovaszkuláris betegség következtében történik (1. ábra). Noha a gyógyszeres és műtéti eljárások fejlődése következtében a betegek 90-95%-a túléli az első szívinfarktust [3], azonban a súlyos szívinfarktus utáni kompenzatórikus mechanizmusok szívelégtelenség kialakulásához vezethetnek [4], amelynek morbiditási és mortalitási (2. ábra) adatai emelkednek [5, 6]. A szív- és érrendszeri betegségek komoly gazdasági problémát is jelentenek. Az Európai Unióban a szív- és érrendszeri betegségekkel kapcsolatos teljes ráfordítás évente 196 milliárd euro. Az Európai Unióban a teljes egészségügyi költség 9%-át,



Magyarországon a teljes egészségügyi költség 14%-át ezen betegségek kezelésére fordítják [2]. Mindez aláhúzza új terápiás módszerek kidolgozásának igényét.



**1. ábra:** Európa és Magyarország mortalitási adatai. Nichols és mtsai, European Heart Network 2012, 2012: 14-15, 119 [2]



**2. ábra:** Szívelégtelenségvel kapcsolatos kórházi kezelések száma az Amerikai Egyesült Államokban 1979-2009 között. - Roger és mtsai Circulation 2012, 125: e2-e220 [6]

## 1.1.2 A miokardiális infarktust követő szívizom-károsodás folyamata

### 1.1.2.1 Iszkémiás károsodás

Az iszkémia a szöveti vérellátás hiányát jelenti, az artériás áramlás akadályozottsága vagy a vénás elvezetés csökkenése miatt. Az oxigénhiány mellett magában foglalja a glükóz és egyéb vér által szállított metabolitok hiányát is, valamint a sérült vérellátású területeken a káros metabolikus végtermékek feldúsulását. Az iszkémiás állapot a szövetállományban diszfunkciót, sérülést és sejtpusztulást okoz. Az iszkémiára legérzékenyebb szervek az agy, a szív és a vesék, hiszen fiziológiai körülmények közt energianyerésük aerob metabolizmus útján történik. Az iszkémiás szívbetegségek leggyakoribb oka az ateroszklerózis, de hátterében állhat koronária-vazospasmus, vagy embolizáció is [7].

A vérellátás elégtelensége esetén az aerob szövetek egy biokémiai reakciósorozattal, az iszkémiás kaszáddal reagálnak. Ennek során proteolitikus enzimek, reaktív oxigénfajták és egyéb ártalmas molekulák szabadulnak fel, ami végső soron a szövet pusztulásához vezet.

Az oxigénhiány miatt a sejtek anaerob metabolizmusra állnak át, aminek következtében tejsav halmozódik fel, s kisebb hatékonysága miatt az ATP szintje csökken. Az alacsonyabb ATP-mennyiség miatt a sejtek  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATP-áz működése elégtelenné válik, a sejtbe  $\text{Na}^+$  áramlik be és  $\text{K}^+$  áramlik ki belőle. A magasabb  $\text{Na}^+$  szint a miokardium sejtjeiben a  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Na}^+$ -cseremechanizmus korábbi ionáramlását is megváltoztatja, a  $\text{Ca}^{2+}$  szintje megemelkedik, a sejtekben  $\text{Ca}^{2+}$ -függő enzimek aktiválódnak:

- calpainok:  $\text{Ca}^{2+}$ -függő nem lizoszomális cisztein proteázok, fokozott aktivitásuk szabályozatlan proteolízishez vezet,
- endonukleázok,
- ATP-ázok,
- foszfolipázok.

A foszfolipázok a plazmamembránt és az sejtorganellumok membránját károsítva jelentősen fokozzák azok permeabilitását. A mitokondriális membrán sérülése csökkenti az ATP termelést, a plazmamembrán károsodás az ozmotikus egyensúly további romlásához vezet, míg a lizoszómák sérülése emésztőenzimek felszabadulását okozza.

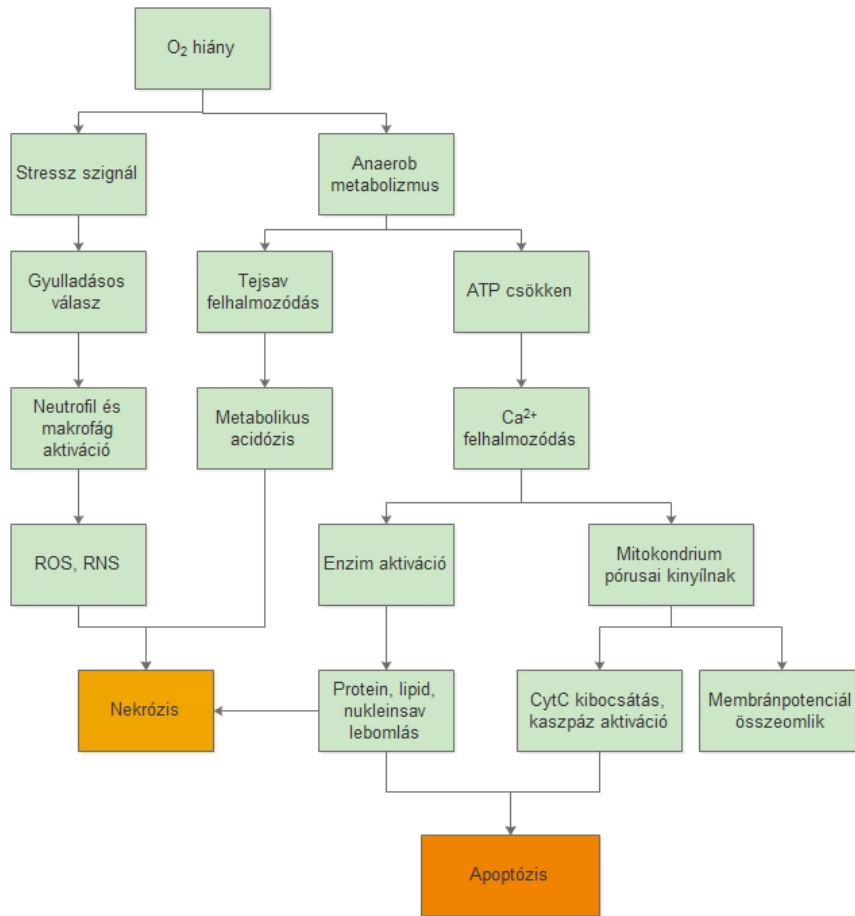
A lizoszomákból felszabadult enzimek a sejt komponenseinek enzimatis emésztését és sejtnekrózist von maga után.

Az aktivált proteolitikus enzimek által a xantin-dehidrogenáz xantin-oxidázzá konvertálódik [8]. Az iszkémia során esetén az ATP metabolizmus lebomlási terméke, a hipoxantin feldúsul, melyet a xantin-oxidáz xantinná, majd húgysavvá alakít, a reakcióban melléktermékként szuperoxid anion képződik, ami a legtöbb reaktív oxigénfajta (ROS) prekuzora. A reaktív oxigénfajta három fő úton fokozza a sejt károsodását. Egyrészt a telítetlen zsírsavakkal reagálva lipidperoxidációt okoznak, amely tovább fokozza a membránkárosodást. Másrészt a fehérjékkel reagálva fragmentációt és szulfhidril-mediált keresztkötéseket hoznak létre, amely az érintett fehérjék degradációjához vagy enzimaktivitásuk elvesztéséhez vezethet [7]. Végül a DNS timin alegységével reagálva egyszál töréseket hoznak létre. Az endonukleázok és reaktív oxigénfajta által kiváltott súlyos DNS károsodás az apoptotikus sejthalál indukálásához vezet.

A növekvő  $Ca^{2+}$  mennyiség hatására a mitokondriumok pórusai kinyílnak. Ezek a pórusok lehetővé teszik az 1500 Da-nál kisebb molekulák átjutását a mitokondrium membránjain, aminek következtében a membránpotenciál összeomlik, a mitokondriális energiatermelés leáll. A pórusokon az elektrontranszport-lánc egyes komponensei is képesek távozni, ilyen például a citokróm c, amely kijutva a citoplazmába, részt vesz a kaspáz-függő apoptotikus út indukálásában.

Ezenkívül a pórusokon átjutó molekulák megbontják az ozmotikus viszonyokat, ami a mitokondrium duzzadásához és líziséhez vezethet. Az oxidatív stressz következtében a légzési lánc komplexeit alkotó fehérjék is károsodnak a ROS és a keletkezett reaktív aldehidek által. A fentiek az elektrontranszportlánc sérült működéséhez vezetnek, melynek következtében elektronok hagyják el a láncot [9] és szabad gyökök, reaktív oxigén- és nitrogénfajta keletkeznek további károkat okozva a sejtben.

A sejt-károsodás mértékétől függően a sejtek kétféle módon válaszolhatnak az őket ért károsító ingerre. Ha az ártalom enyhe, a morfológiai és funkcionális elváltozások reverzibilisek, a membránsérülés sem súlyos és nincs kariolízis sem, bár komoly szerkezeti és funkcionális károsodások jöhetnek létre. Ha az ártalom nagymértékű vagy folyamatosan éri a sejteket, a sérülés irreverzibilissé válik, a sejt elhal apoptózis vagy nekrosis útján (3. ábra).



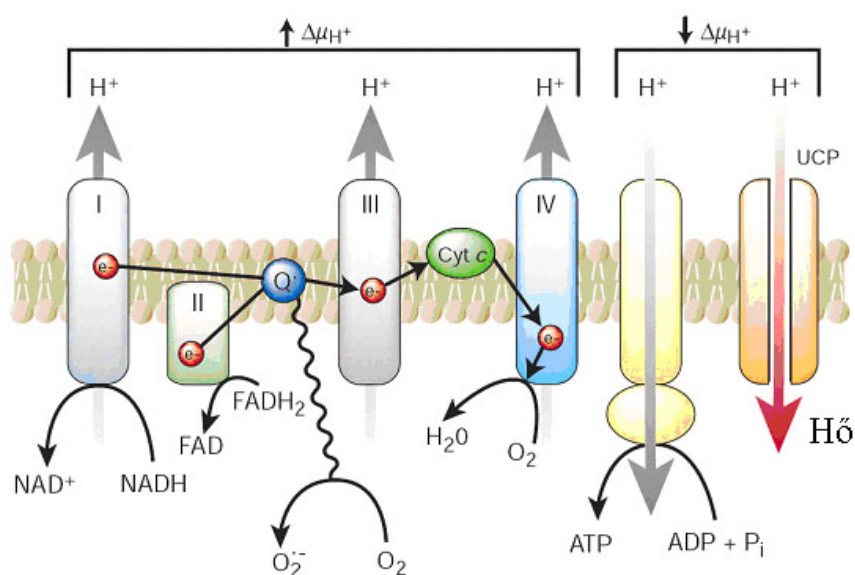
**3. ábra:** Az iszkémiás kaszkád. ATP –adenozin-triszfoszfát, CytC – citokróm c, O<sub>2</sub> – oxigén, RNS - reaktív nitrogénfajták, ROS – reaktív oxigénfajták

Állatkísérletes modellekben a miokardium a teljes okklúziót követően mintegy 20 perccel kezd elhalni [10], a folyamat a szubendokardium felől a szubepikardium irányába halad. Négy órán túli teljes okklúzió esetében a károsodás nagy valószínűséggel irreverzibilis. A rekanalizációs eljárások elvégzésére tehát mindössze négy óra áll rendelkezésre [11]. A gyors reperfúzió csökkenti a lézió nagyságát és javítja a prognózist.

#### 1.1.2.2 Reperfúziós károsodás

Noha a korai reperfúzió kulcsfontosságú a szöveti károsodás minimalizálásában, ismert, hogy a reperfúzió a fokozott ROS képződés miatt káros következményekkel is jár [12]. Az oxigén és a tápanyagok hiányában egy olyan állapot alakul ki, melyben a keringés visszaállítása a normál funkció visszanyerése helyett szöveti gyulladással, oxidatív

károsodással jár. Ennek hátterében egyfelől az áll, hogy az iszkémia miatt a sejtek sérülnek, egy részük nekrotizál, és gyulladáskeltő anyagok szabadulnak fel belőlük. Másrészt a reperfúzió során relatív oxigén-túlkínálat jön létre, amely pedig oxidatív stresszhez vezet. Ez a sejtekben protein-, DNS- és plazmamembrán-károsodásokat okoz. A sejtben a szabad gyökök a redox szignál révén jelet adhatnak az apoptózishoz. A membrán sérülése miatt pedig a szabad gyökök kiszabadulnak az intersticiális térbe, gyulladást okozva. Reperfúzió alatt a mitokondriális légzési lánc komplexei, főleg a komplex I és komplex III a fő forrásai a reaktív oxigénfajtáknak [9], ezért központi szerepük van a posztisztkémiai miokardiális károsodásokban (4. ábra).



**4. ábra:** Szuperoxid anion keletkezése a légzési elektrontranszportlánc komplexeinél.  $\Delta\mu_{H^+}$  - Hidrogén ion kémiai potenciálkülönbsége a membrán két oldalán, ADP – adozin-diszfoszfát, ATP – adozin-triszfoszfát, Cyt c – citokróm komplex, FAD - flavin-adenin-dinukleotid oxidált forma, FADH<sub>2</sub> - flavin-adenin-dinukleotid redukált forma, NAD<sup>+</sup> - nikotinamid-adenin-dinukleotid oxidált forma, NADH - nikotinamid-adenin-dinukleotid redukált forma, O<sub>2</sub><sup>-</sup> - szuperoxid anion, P<sub>i</sub> – foszfát anion, Q<sup>\*</sup> – koenzim Q, QCP - szétkapcsoló fehérje. Brownlee, Nature 2001, 414: 813-820 [13]

A miokardiális infarktus akut fázisában és különösen a reperfúzió során leukociták migrálnak az infarktus által érintett területre és ott számos gyulladáskeltő faktort, többek közt interleukinokat és ROS-t kibocsátva lokális gyulladást okoznak és tovább

súlyosbítják a szöveti sérülést. Emellett az összetapadt leukociták elzárhatják a kisebb kapillárisokat újabb iszkémiát okozva. A makrofágok citokinek hatására fokozzák nitrogén-monoxid szintáz expressziójukat, ami L-arginin szubsztrátból NO-t termel [14]. A keletkezett NO-ból a mikrokörnyezettől függően különböző reaktív nitrogénvegyületek keletkezhetnek, mint például a nitrózium kation ( $\text{NO}^+$ ), nitroxil anion ( $\text{NO}^-$ ), illetve szuperoxiddal reagálva a különösen reaktív peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) [15].

### *1.1.2.3 Szöveti helyreállító folyamatok*

A koronária elzáródását követő súlyos hipoxiás környezetben a kardiomiociták nekrozisa gyulladásos válasz kialakulásához vezet, amely magába foglalja különböző citokinek és kemokinek felszabadulását, amit a neutrofilek és a makrofágok bevándorlása követ [16]. A gyulladásos reakció megtisztítja a miokardiumot a sejt- és extracelluláris mátrix törmeléktől, és aktiválja a reparatív folyamatokat. Azonban az elhúzódó gyulladás a nagy kardiomiocita veszteség, az extracelluláris mátrix változásai és a neovaszkularizáció kedvezőtlen remodellinghez és kamrai diszfunkcióhoz vezet.

A gyulladásos válasz részeként neutrofil granulociták hagyják el a cirkulációt és infiltrálódnak a sérült miokardium területére. Itt proteolitikus enzimeket és reaktív oxigén fajtákat (ROS) szekretálnak és eltakarítják a sejt- és extracelluláris mátrix törmelékét [17, 18]. A sérült miokardium területén a makrofágok egy bifázisos aktiváción mennek keresztül. Ez egy pro-inflammatorikus fázissal (szintén ismert mint M1 vagy klasszikus aktivált) kezdődik, amit egy átfedő anti-inflammatorikus (M2 vagy alternatív aktivált) fázis követ [19, 20]. A makrofágok átváltása M1-ből M2 fázisba a miokardiális infarktus utáni szöveti helyreállító folyamatok kulcsfontosságú eseménye [21, 22].

Noha a gyulladásos válasz kritikus szerepet játszik a sejt-törmelék eltakarításában és a sebgyógyulás beindításában, a túlzott válasz hosszú távon olyan súlyos következményekkel járhat, mint például a ruptúra [23]. A halott sejtek és törmelék eltávolítása után a sérült kamrafal súlyosan meggyengül. Fibroblasztok osztódásba kezdenek és migrálnak a sérült terület felé, ahol miofibroblasztokká differenciálódnak. Az infarktust követő alacsony oxigénszint miatt sok angiogenikus faktort – így például vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF), bázikus fibroblaszt növekedési

faktort (bFGF) - bocsátanak ki, amely új vérerek képződését okozza az infarktus területén [23]. Később, az érés fázisában a miofibroblasztok nagy mennyiségben termelnek extracelluláris mátrix fehérjéket, amik közt a kollagén a fő komponens. Ennek következtében a granulációs szövet helyére lassan egy merev fibrotikus hegszövet képződik. Majd a miofibroblasztok apoptózison mennek keresztül, érett, kollagénben gazdag hegszövetet hagyva hátra.

A miokardiális infarktus az infarktus által közvetlenül érintett terület mellett az egész kamrafalra hatással van. A kamrafal meggyengülése az infarktus expanzióját okozza. A szívizomszövet hegszövettel való pótlása megnöveli a megmaradt életképes szövetre jutó kontrakciós erőket. A megnövekedett kamrafal feszülés késői remodelling-et okoz, amely magában foglalja a túlélő kardiomiociták hipertrófiáját és különböző változásokat a kamrafal szerkezetében. A balkamra megnagyobbodik és a kamrafal elvékonyodik [24]. A balkamra remodelling egy időfüggő folyamat, amely erősen függ az infarktus által érintett terület sérülésének mértékétől. Habár a remodelling nagyrészt megáll, amikor a hegszövet tenzilis ereje ellensúlyozza a feszítő erőket, azonban sohasem lesz képes teljesen kompenzálni az elvesztett kardiomiocitákat.

#### *1.1.2.4 Komplikációk*

Ha a kipumpált vér nem elégséges, hogy ellássa a szervezet szöveteit kardiogén sokk alakul ki, azaz a megfelelő bal kamrai töltőnyomás ellenére lecsökken a vérnyomás és a véráramlás [25]. A szívinfarktus által érintett terület nem feltétlenül nyeri vissza teljesen a munkaképességét. Az elhalt rész szisztolikor nem összehúzódik, hanem épp ellenkezőleg, egy kicsit tágul, ennek következtében aneurizma, ruptúra, életveszélyes szívtamponád alakulhat ki [26]. A sérült szövetek elektromos karakterisztikája is megváltozik, ezért gyakori komplikációk az aritmiák. Ha az iszkémia kihatással volt a szemölcsizmokra, akkor billentyűzavarokat is kiválthat. A gyulladás kiterjedhet a szívhártyára is, perikarditisz alakulhat ki.

Hosszú távon az elhalt szövet gyulladáshoz vezető reakciók során kötőszövevé alakul át. A kötőszövet kevésbé rugalmas, így javítja a kontrakció határfokát, azonban ha túl nagy részre terjed ki, akkor akadályozhatja a feltöltődést a diasztolé során. A kisebb működőképes szívizomtömeg a pumpafunkció gyengülését okozhatja, ezért a szívinfarktus egyik gyakori és rendkívül súlyos következménye a szívelégtelenség [27].

Jelenleg a szívelégtelenség leggyakoribb oka a korábbi miokardiális infarktus [28]. Az Amerikai Egyesült Államokban az első miokardiális infarktus utáni 5 évben a betegek 20%-ánál alakul ki szívelégtelenség. Noha az akut miokardiális infarktus okozta halálozás a revaszkularizációs terápiák következtében folyamatosan csökken, a szívelégtelenség okozta morbiditás és mortalitás emelkedik [5].

### 1.1.3 Terápiás lehetőségek

Kialakult akut iszkémiás betegség esetén az azonnali kezelés célja a vérellátás minél előbbi visszaállításával az érintett szívizom minél nagyobb részét megmenteni és megelőzni a további komplikációkat.

Infarktus gyanúja esetén aszpirin - a gyors felszívódás érdekében lehetőleg elrágva – és glicerín-trinitrát bevétele javasolt a kórházba szállítás közben [29]. A könnyen elérhető automata defibrillátorok és az azonnali segélyhívás nagyban növeli a sikeres kezelés esélyét, ugyanis a szívinfarktus gyakran okoz életveszélyes aritmiákat. Ha a beteget akut miokardiális infarktus gyanúval szállítják be és ST szegmens emelkedése van, vagy új szárblokk észlelhető a tizenkét elvezetéses EKG-n, feltételezik, hogy elzáródásos trombózis van egy epikardiális koronária artériában, ezért azonnali reperfüziós kezelésre szorul: trombolitikus terápia, szívkatéteres értágítás, vagy ezek sikertelensége esetén bypass műtét által [30, 31]. Az elzáródott koronária megnyitásának egyik lehetséges módja az akut perkután transzluminális koronária ballon angioplasztika vagy más néven *perkután koronária intervenció* (PCI). Rendszerint az arteria radialison keresztül vezetik be a katétert az aorta szájadékához, majd az elzáródott területre, ahol túlnyomásos ballonnal tágítják az elzáródott érszakaszt és ma már rutinszerűen végeznek thrombus-aspirációt is. A tágítás után sztentet helyeznek be az újabb szűkület kialakulásának megelőzésére, ugyanis az érszakasz általában gyulladás miatt újra összeszűkül (resztenózis). Gyorsan elvégzett PCI-vel 65%-ról 95%-ra emelhető az elzáródott artériában a véráramlás visszaállításának az esélye [32-34]. A bypass műtét során a páciens egy saját artériáját vagy vénáját implantálják, hogy a szűkült vagy elzáródott érszakaszt kikerüljék. A műtét nem végezhető el közvetlenül az infarktus után, először stabilizálni kell a beteget. Ezt a beavatkozást általában akkor alkalmazzák, ha komplikációk lépnek fel. Két vagy



több érintett ér esetén a bypass műtéttel kezelt betegek túlélési esélye nagyobb, mint PCI kezelés esetén [35]. Mivel az akut koronária elzáródás patomechanizmusában alapvetően az ateroszklerotikus plakk, illetve annak ruptúrája játszik szerepet, a gyógyszeres kezelés ezt a mechanizmust célozza. A trombolitikus gyógyszerek a már meglévő vérrögök feloldását célozzák, a mellettük alkalmazott véralvadásgátlókkal, pedig új vérrögök keletkezését és a meglévők növekedését gátolják. Trombolitikus terápiát a tünetek fellépését követő tizenkét órán belül végzik, ha az akut intervenció lehetősége 90 percen belül nem érhető el, a legjobb eredményeket az első két órán beadott gyógyszerek mutatják. Tizenkét óra után a terápiával járó veszélyek meghaladják a hasznosságát [36]. A trombolízis előnye, hogy nem igényel speciális felszerelést, az intravénás gyógyszer akár már a helyszínen beadható. Hátránya, hogy lényegesen nagyobb a vérzéses szövődmények száma, és a korai reinfarktusok is magasabb arányban fordulnak elő [37-39].

Ha a fenti kezelések ellenére a csökkent pumpafunkció képtelen a keringés fenntartására, szívelégtelenség jön létre. Ebben az esetben invazív keringéstámogató eljárások alkalmazására van lehetőség. Ilyen például az ún. „left ventricular assisting device”, melynek egyik kanüljét a bal kamrába, a másikat az aortába vezetik. A gép mechanikusan áramoltatja a vért egyik kanülből a másikba. Ez az eljárás azonban alapvetően csak átmeneti, „bridge” terápiát képez a szívtültetésre való várakozás során. A kamrafal szerkezeti változásaival járó krónikus szívelégtelenségben egyelőre az egyetlen definitív terápiás lehetőség a szívtültetés [40]. Elérhetőségét a donorok alacsony száma, és az esetleges immunológiai inkompatibilitás korlátozza [41].

A miokardiális infarktus jelenlegi kezelése a szív normál keringésének visszaállítását célozzák az elzáródott érszakasz megnyitásával vagy bypass-ával. Bár ezek az eljárások drasztikusan növelik a várható élettartamot - a gyógyszeres és műtéti eljárások fejlődése miatt a betegek 90-95%-a túléli az első szívinfarktust [3] - egyik sem kezeli a kontraktilisszövet-veszteséget és ennek utólagos merev fibrotikus hegszövettel való pótlását. Mindkét említett esemény a túlélő szövet kompenzatórikus remodellingjét és a szívfunkció csökkenését eredményezi, ami végső esetben szívelégtelenséget okoz [4]. Jelenleg a szívelégtelenség leggyakoribb oka a miokardiális infarktus [28] és nem áll rendelkezésre terápia, amely vissza tudná fordítani a szívfunkció hanyatlását [42], ami felveti új stratégiák kidolgozásának szükségességét.

## 1.2 Sejtalapú terápiák

A regeneratív medicina egy új és gyorsan fejlődő terület. Daar és Greenwood meghatározása szerint a regeneratív medicina „sejtek, szövetek vagy szervek helyreállítása, pótlása vagy regenerációja a sérült funkció helyreállítása céljából” [43]. Az elképzelés szerint a sérült területre lokálisan beadott sejtek új szívizomszövetté differenciálódnak a szívizom regenerációját fokozva. Továbbá lehetséges, hogy ezek a sejtek citokineket és növekedési faktorokat termelnek amelyek serkenthetik az angiogenezist és a vérellátás helyreállítását, illetve befolyásolhatják a remodellinget [40]. A felnőtt szív tartalmaz olyan sejteket, melyek nem teljes mértékben differenciáltak, képesek visszalépni a sejtciklusba és mitotikus osztódáson átesni a miokardiális infarktust követően. Ennek ellenére a miokardium nagyon csekély mértékű megújulásra képes [44]. Mivel miokardiális infarktus után a felnőtt szív sejtjei képtelenek a sérült szövet pótlásához megfelelő mértékű proliferációra előtérbe kerültek a sejtalapú terápiák a sérült szív gyógyítására.

A miokardiális infarktus utáni sejtterápiás kutatások legtöbb esetben őssejteket használnak. A korlátozottabb differenciációs képességű sejtek közt a szkeletális mioblasztok, az endotheliális progenitor sejtek valamint a több különböző sejtpopulációt tartalmazó csontvelő eredetű mononukleáris sejtek és az úgynevezett „processed lipoaspirate” említhetők meg.

A szkeletális mioblasztok egy izombiopsziából könnyen izolálható és sejt kultúrában jelentősen felszaporítható sejt típus. Előnyük, hogy viszonylag rezisztensek a hipoxia indukált apoptózisra [45]. Állatkísérletek során az iszkémiás sérülésen átesett szívizomszövetbe injektált mioblasztok funkcionális javulást értek el [46-48]. Annak ellenére, hogy képesek beépülni az infarktus területére, a mioblasztok nem képesek a szinkronizált működéshez kiemelten fontos gap junction kapcsolatokat a rezidens kardiomiocitákkal [49], amely potenciálisan arrithmiák kialakulásához vezethet. Jelenleg is folyik a MARVEL vizsgálat (NCT00526253), amely a miokardiális infarktus utáni mioblaszt transzplantáció biztonságosságát és hatékonyságát vizsgálja.

A miokardiális infarktus utáni endotheliális progenitor sejt transzplantáció javította a neovaszkularizációt és a bal kamrai funkciót miokardiális infarktus patkány

modelljében [50]. Jelenleg is folyik a fázis 2-es IMPACT-CABG vizsgálat (NCT01033617), amely CD133 endotheliális marker alapján szelektált csontvelői sejteket injektál miokardiális infarktus vagy szívelégtelenség következtében végzett koronária artéria bypass graft műtétek során.

A csontvelő eredetű mononukleáris sejtpopuláció tartalmaz heamotopoetikus őssejteket, mesenchymális őssejteket és endotheliális progenitor sejteket, azonban ki kell hangsúlyozni, hogy jelentős része nem őssejt. Ezekből a sejtpopulációkból a mesenchymális őssejteket a sejt kultúrák tenyésztőedény műanyag felületéhez való kitapadás alapján lehet kiszelektálni. Azonban több vizsgálat (NCT00442806, NCT00279175) is használja ezeket a kevert sejtpopulációkat, az izolálás gyorsasága és a több különféle sejt típus esetleges egymást kiegészítő hatásmechanizmusai miatt. Ugyanígy a zsírszövet eredetű processed lipoaspirate vagy stromal vascular fraction, melyet például az APOLLO vizsgálatban (NCT00442806) használtak szintén egy kevert sejtpopuláció, amelynek nagy része nem őssejt.

### 1.2.1 Őssejtek

Az emberi szervezet az őssejtek által rendelkezik egy endogén regenerációs és helyreállító mechanizmussal. Mára csaknem minden szövettípusban kimutatták őssejtek jelenlétét. Az első őssejtekkel kapcsolatos kutatás Becker munkacsoportjához fűződik [51]. Besugárzott egerekbe injektáltak csontvelő eredetű sejteket és észrevették, hogy az állatok lépében csomók keletkeznek, a beinjektált sejtek számával arányosan. Arra jutottak, hogy minden egyes csomó egyetlen csontvelő eredetű sejtől származik. Később bebizonyították, hogy ezek a sejtek látszólag végtelen számú osztódásra képesek. Definíció szerint az őssejtek két esszenciális tulajdonsággal rendelkeznek: az önmegújítás képessége (azaz a populációjuk fenntartása mitotikus osztódásokkal) és az a képesség, hogy megfelelő körülmények között különböző szövetspecifikus sejtekké képesek differenciálódni [52]. Differenciációs potenciálon alapuló csoportosításuk szerint megkülönböztetünk totipotens, pluripotens, multipotens, oligopotens és unipotens sejteket. A totipotens sejtek képesek mind embrionális, mind extraembrionális irányba differenciálódni, teljes, életképes szervezetet tudnak létrehozni. Ilyen sejt a zigóta és annak az első néhány osztódásával létrejövő utódsejtjei.

A pluripotens sejtek a totipotens sejtek leszármazottjai, melyek mindhárom csíralemez irányú differenciálódásra képesek. A multipotens sejtek egymással közeli rokonságban levő sejtípusokká képesek alakulni, ebbe a csoportba tartoznak például a mesenchymális őssejtek. Az oligopotens sejtek csak korlátozott differenciációra képesek, mint például a limfoid vagy mieloid őssejtek. Az unipotens sejtek pedig csak egyfajta sejté képesek alakulni, de megvan bennük az önmegújítás képessége, ami megkülönbözteti őket a nem-őssejtektől.

Több elmélet született az őssejtek sejtvonala-determinációjának magyarázatára. Az egyik legprominensebb az őssejtek mikrokörnyezetének az úgynevezett stem cell niche-nek tulajdonít kulcsszerepet. A niche magában foglalja a sejt és a környező extracelluláris mátrix közti interakciót valamint az intercelluláris kommunikációban résztvevő jelzőmolekulákat. Ez a háromdimenziós mikrokörnyezet befolyásolja vagy irányítja a génextpressziót és fenntartja az őssejtek önmegújító képességét vagy irányítja differenciációjukat [53, 54]. Az elmélet szerint a niche erős befolyásával lenne magyarázható a felnőtt őssejtek plaszticitása, amikor az őssejt differenciációs potenciáljának nem megfelelő terminálisan differenciált sejteket hoz létre. Beszámoltak többek közt izomba implantált humán neuronális őssejt vázizom irányú differenciálódásáról [55], valamint idegszövetbe implantált csontvelő eredetű sejtek idegsejtté differenciálódásáról [56, 57]. A transzdifferenciáció jelensége, amikor egy terminálisan differenciálódott sejt egy másik sejtípusá alakul szintén a niche hatásával lenne magyarázható: például májsejtek szigetsejtté transzdifferenciálódása [58].

Az őssejtterápiák magukban hordozzák a szöveti helyreállító folyamatok segítségével kívül a sérült szívműködés regenerálásának és a szívfunkció visszaállításának ígéretét is [5].

### 1.2.2 Őssejt típusok

Az őssejtek eredetük szerint három fő csoportra oszthatók fel: embrionális őssejtekre, felnőtt szervezetből származó őssejtekre, illetve indukált pluripotens sejtekre. Létezik még néhány, ebbe a három csoportba nem egyértelműen besorolható őssejt is, mint az amnionfolyadékából és a köldökzsinórból nyert őssejtek.

### 1.2.2.1 *Embrionális őssejtek*

Egér eredetű embrionális őssejtek izolálását először 1981-ben a Nobel-díjas Sir Martin John Evans csoportja publikálta [59]. Humán embrionális őssejtek sikeres izolálására 17 évet kellett várni, 1998-ban James Thomson csoportjának sikerült [60]. Jelenleg több száz embrionális őssejt vonallal rendelkezünk.

A pluripotens embrionális őssejtek 5-6 napos blasztociszták embriócsomójából származnak. A humán blasztociszták forrása jelenleg *in vitro* megtermékenyítésből származó számfeletti embriók, illetve klónozás (nukleáris transzfer) amely során a donor sejt nukleuszát egy enukleált oocitába helyezik.

Jellemzőik a magas alkalikus foszfatáz és telomeráz aktivitás, illetve bizonyos antigének (SSEA-3 és 4, TRA-1-60 és 81) jelenléte [61].

*In vitro* tenyésztésük speciális körülményeket igényel. A jelenleg általánosan alkalmazott sejt kultúrában az embrionális őssejteket egy a növekedésükhöz szükséges faktorokat termelő fibroblaszt rétegen, speciális médium felhasználásával tenyésztik. A klinikai felhasználáshoz egy testidegen molekuláktól mentes kultúra megteremtése kiemelt fontosságú [62, 63].

A szuszpenzióban növesztett ESC-k spontán celluláris aggregátumokat formálnak, melyeket embrioid testeknek nevezünk. Ezek a struktúrák részlegesen rendezett szövetszerű képleteket hoznak létre, amelyben mezodermális, ektodermális és endodermális markereket kifejező sejtek találhatóak.

A regeneratív medicina nagy reményeket fűz az embrionális őssejtekhez, mivel ezek a potenciálisan örökéletű sejt vonalak egy teljesen karakterizált stabil sejtforrást jelenthetnek. Klinikai alkalmazásukat 3 fő probléma hátráltatja. A nem differenciált pluripotens embrionális őssejtek nagy tumorképző potenciállal rendelkeznek, ezért szignifikáns veszélyt jelenthetnek a recipiens számára [64, 65]. Másodsorban az allogén alkalmazás miatt a transzplantáció után immun-rejekció alakulhat ki. Végül az embrionális őssejt vonalak előállítása és felhasználása egy sor etikai kérdést is felvet, mint az embrió morális státusza, az élet szentsége vagy a terápiás klónozás. Az Európai Unióban minden egyes tagállam önállóan foglalhat állást humán embriók morális státuszával és az őssejtkutatással kapcsolatban.

Az etikai kérdések egy része megkerülhető olyan stratégiák alkalmazásával, melyek nem károsítják az embriót, ilyen például a preimplantációs genetikai diagnózishoz nyert mintákból történő ESC izolálás.

Az említett problémák ellenére az embrionális őssejtek terápiás alkalmazása már a klinikai vizsgálatok fázisába lépett ([66], NCT01217008).

#### 1.2.2.2 *Felnőtt őssejtek*

Az emberi test szinte minden szövetéből sikerrel izoláltak már őssejteket (csontvelő [67], zsírszövet [68], központi idegrendszer [69], retina [70], bőr [71]), noha az adott szöveten belül kevés található ezekből a sejtekből. A felnőtt őssejtek multipotens differenciációs potenciállal rendelkeznek. Élettani szerepük az elpusztult sejtek pótlása, a sérült szövetek helyreállítása. A szív regenerációjával kapcsolatban a leginkább kutattak a mesenchymális őssejtek és a szív eredetű őssejtek.

##### 1.2.2.2.1 *Mesenchymális őssejtek*

Csontvelő eredetű őssejtek izolálását és jellemzését először Friedenstein publikálta [72, 73]. Csontvelőt izoláltak, majd azt műanyag sejttenyésztő edényekben inkubálták négy órán keresztül. Ezután a nem letapadt sejteket eltávolították. Így egy heterogén sejtpopulációt kaptak, amiben egyes sejtek fibroblasztokhoz hasonló, orsószzerű morfológiát mutattak és *in vitro* körülmények között gyorsan osztódva különálló kolóniákat hoztak létre. Ezeket a sejteket colony forming unit fibroblasztoknak (CFU-F) nevezték el. Később felfedezték, hogy ezek a sejtek multipotens potenciállal rendelkeztek és több mesenchymális sejtvonallá képesek differenciálódni, úgy mint csont [74], ínshalag [75], zsír [76], porc [77, 78] és izom [79]. Sikerrel izoláltak hasonló sejteket különböző mesenchymális szövetekből, mint synovium [80], ín [81], vázizom [82], zsírszövet [68], illetve perifériás vérből [83]. Ez a sejtpopuláció úgy tűnik, hogy megtalálható a legtöbb posztnatális szervben [84] és mesenchymális őssejteknek nevezzük őket [67].

A Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy az alábbi minimális kritériumokat javasolta a mesenchymális őssejt definíciójához [85]:

- Standard sejtkultúrás körülmények közt ki kell tapadjanak a sejttenyésztő edények műanyagához
- Rendelkezniük kell a CD105, CD73, CD90 sejtfelszíni markerekkel, valamint nem expresszálják a CD45, CD34, CD14 vagy CD11b, CD79 $\alpha$  vagy CD19 és HLA-DR markereket.
- Képesnek kell lenniük oszteoblaszt, adipocita és kondroblaszt irányú differenciációra *in vitro*.

A csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek különböző irányú *in vitro* differenciáltatására több protokoll is létezik. Dexametazon, aszkorbinsav és béta-glicerofoszfát jelenlétében oszteoblaszt irányba [86]; aszkorbinsav, dexametazon és TGF- $\beta$  (transzformációs növekedési faktor  $\beta$ ) hatására kondrocita irányba; míg a tenyésztőmédiomot dexametazonnal, inzulinnal, indometacinnal, izobutil-metil-xantinnal, valamint L-glutaminnal kiegészítve adipocita irányba [87] tudták differenciáltatni a sejteket.

A csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek a különböző irányú differenciálódási képességük mellett képesek immunszuppresszív folyamatok mediálására is [88, 89]. A csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek a legtöbbit kutatott és leginkább ismert őssejtcsoport, a klinikai vizsgálatok döntő többségében ezt a sejttípust alkalmazzák.

Habár a csontvelő stabil és megbízható forrása a mesenchymális őssejteknek, a csontvelő kinyerése invazív eljárás és az izolált őssejtek száma alacsony és korfüggő [87]. Ezzel szemben a zsírszövetből nagy mennyiségű őssejt nyerhető ki és maga a zsírszövet is könnyedén és nagy mennyiségben hozzáférhető [90]. Az izolált sejtek *in vitro* körülmények között hosszú távon fenntarthatók stabil osztódási idővel és alacsony szeneszcenciával.

A zsírszövet eredetű őssejtek karakterizálását célzó kutatások azt találták, hogy a fenotípus és a transzkriptom meglehetősen hasonlít a csontvelő eredetű őssejtekére [91, 92] és szintén rendelkeznek immunszabályozási funkciókkal [93], azonban egyes kísérletek azt mutatták, hogy differenciációs potenciáljuk bizonyos körülmények között eltérő lehet [94].

A zsírszövet eredetű őssejteket lehetséges többek közt oszteogén [95], kondrogén [96] és adipogén [97] irányba differenciáltatni. Rangappa kutatócsoportjának sikerült elérni

kardiomiocita differenciációt, mely után a sejtek spontán összehúzódásokat végeztek és ezt az állapotot 2 hónapig stabilan megtartották dedifferenciálódás nélkül [98].

#### *1.2.2.2.2 Szív eredetű őssejtek*

Az elképzelés, miszerint a szív egy terminálisan differenciált szerv és nem zajlik benne sejt-turnover, nem keletkeznek új kardiomiociták megdől [99-101]. Több különböző őssejt populációt is izoláltak különböző állatfajok szívéből, illetve humán szívből is, mint az isl-1+ szív eredetű őssejtek [102], c-kit+ szív eredetű őssejtek [103], cardiosphere eredetű őssejtek [104], side-population kardiális progenitorok [105]. Torella és munkatársai szerint [106] felnőtt emlősök szívében a c-kit+ szív eredetű őssejtek felelősek a legnagyobb mértékben a szerv regenerációjáért.

A szív eredetű őssejtek képesek hosszú távú önmegeújításra és differenciációra a szív fő sejttypusaivá: szívizomsejteké és a vaszkuláris struktúrát felépítő endotel- és simaizomsejteké [107]. A egyes kutatások szerint a szív eredetű őssejtek az embrionális fejlődés maradványait reprezentálják. Ezek a sejtek a szív úgynevezett niche-eiben találhatóak, ahol védve vannak a káros behatásoktól. A csoportosulások elszórtan helyezkednek el a miokardiumban, az eloszlásuk úgy tűnik, hogy összefügg a szívfal feszülésének különböző szintjeivel: az őssejtek száma fordítottan arányos a szív adott anatómiai része által fenntartott nyomással. A szív eredetű őssejtek a pitvarokban és a szívcsúcsnál gyűlnek össze, míg a kamrák fala kevesebbet tartalmaz belőlük. Sanada és munkacsoportja arról számolt be [108], hogy lehetséges a kardiomiocita regeneráció fokozása a szív niche-eiben található nyugvó c-kit+ őssejt faktorral (SCF) történő aktiválása révén.

A szív önmegeújító folyamatainak és homeosztázisának megértésével lehetőség nyílna ezen természetes folyamatok elősegítésére a sérült miokardium regenerációját javítva. A szív eredetű őssejtek valószínűsíthetően sokkal hatékonyabbak az új miokardium előállításában [109], mint a más szervekből származó progenitor sejtek, mivel eredendően a szívizom regenerálása a feladatuk [110, 111] és az extra-kardiális eredetű felnőtt őssejtek kardiomiocita irányú differenciációs potenciálja epigenetikusan korlátozott [112].



### 1.2.2.3 *Indukált pluripotens sejtek*

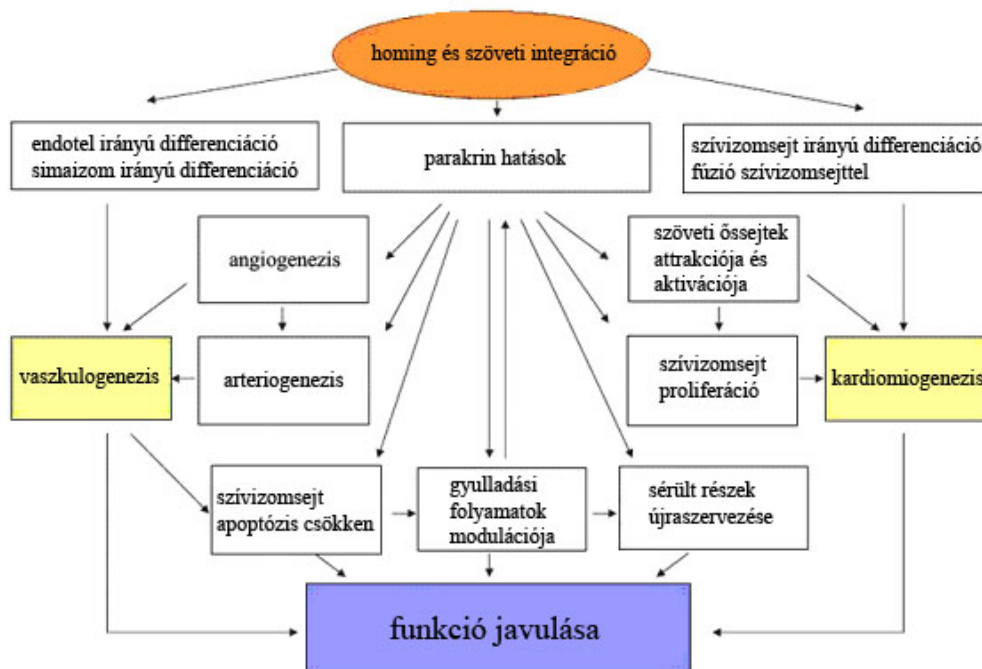
2006-ban a Shinya Yamanaka vezette kutatócsoport arról számolt be, hogy szomatikus sejtek újraprogramozásával az embrionális őssejtekéhez hasonló pluripotens állapotú sejteket állított elő [113, 114]. A sejtek újraprogramozását 4 transzkripciós faktor (Oct3/4, Sox2, c-Myc és Klf4) retrovirális overexpressziójával érték el. Ezeket a sejteket indukált pluripotens sejteknek nevezték el, és az eredeti rágcsáló sejteken végzett kísérleteket sikeresen megismételték emberi sejtekkel is [115]. Az indukált pluripotens sejtek számos vonatkozásban hasonlítanak az embrionális őssejtekhez (expresszált gének, kromatin metilációs mintázat, differenciációs potenciál), nagy előnyük azonban, hogy a módszer nem igényel humán embriókat, így nem állít etikai aggályokat, valamint lehetséges a recipiens saját sejtjeinek alkalmazása [111]. A recipiens sejtjeiből előállított indukált pluripotens sejtek szingénikusak (azonos örökítő anyaggal rendelkeznek) ezért elméletileg nem váltanak ki immunreakciót. Ennek ellenére került már olyan cikk publikálásra, amely szingénikus indukált pluripotens sejtek T-sejt mediálta immun-rejekciójáról számol be [116]. A vírusvektorok felhasználásával előállított indukált pluripotens őssejtek esetében a véletlenszerű régiókba beépülő gének következtében megnövekedhet a tumorképződés valószínűsége, ezért a biztonságos felhasználás érdekében kutatások folynak a vírusokat mellőző indukációs technikákkal kapcsolatban. Ígéretes megoldás lehet a fehérjék útján történő indukció [117]. További probléma, hogy csakúgy mint az embrionális őssejtek esetén, itt is felmerül a teratómaképzés veszélye [118].

A téma fontosságát jelzi, hogy Shinya Yamanaka munkáját 2012-ben orvosi Nobel-díjjal honorálták, melyet Sir John Bertrand Gurdon brit kutatóval megosztva vehetett át.

### 1.2.3 Az őssejtkezelések hatásmechanizmusa

Az őssejtkezelések során tapasztalt jótékony hatásban valószínűleg több folyamat vesz részt. Ezek közt szerepel a parakrin faktorok szekretálása (amivel befolyásolják a gyulladásos választ, fibrózist, és neovaszkularizációt [5]), a sejt-sejt kontaktus során bekövetkező citoplazma- és kompartmentcsere, a kardiomiocita apoptózis gátlása, a differenciálódás és halott kardiomiociták pótlása és a sérült sejtekkel való fúzió (5. ábra).

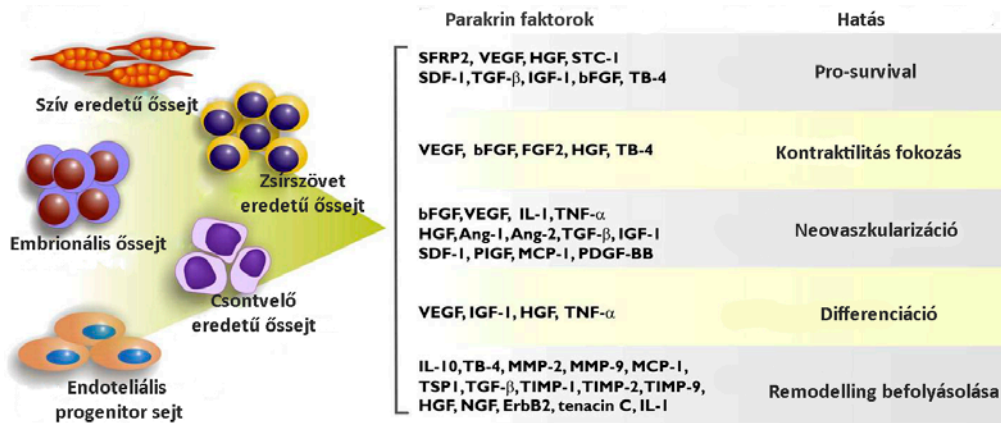
Ezen folyamatok egymás mellett, egymás hatását elősegítve jelennek meg, megoszlásuk valószínűleg az alkalmazott sejttípustól és a mikrokörnyezeti tényezőktől függ. A mechanizmusok aránya feltehetően dinamikusan változik a gyógyulás során is. Kezdetben a sejtek parakrin gyulladáscsökkentő és antiapoptotikus hatása, később az érképzés és az elpusztult szívizomszövet pótlása és regenerálása lehet a legfontosabb.



**5. ábra:** A sejterápiák feltételezett hatásmechanizmusa – Dimmeler és mtsai, Arterioscler Thromb Vasc Biol 2008, 28: 208-216 [110]

### 1.2.3.1 Parakrin hatások

Az őssejtek számos parakrin hatású molekulát szekretálnak (6. ábra), melyek többek közt antiapoptotikus, gyulladáscsökkentő és angiogenezist serkentő hatásokkal rendelkeznek [119].



**6. ábra:** Óssejtek által kibocsátott parakrin faktorok – Mirotsov és mtsai, J Mol Cell Cardiol 2011, 50: 280-289 [119]

Bizonyítottan antiapoptotikus hatású faktorok például a bázikus fibroblaszt növekedési faktor (bFGF), a hepatocita növekedési faktor (HGF) és az inzulinszerű növekedési faktor (IGF). Sadat és munkatársai kimutatták, hogy zsírszövet eredetű őssejtek IGF-1-et és VEGF-et szekretáltak iszkémián átesett szívizomsejtek környezetében. Mind az IGF-1-nek, mind a VEGF-nek antiapoptotikus és angiogenetikus hatása van [120]. *In vitro* kokultúrában hematopoetikus őssejtek apoptózis inhibíciót értek el kardiomiocitákban az antiapoptotikus AKT/PKB út aktiválásával [121]. További feltételezett antiapoptotikus hatás a nukleáris faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) aktivitás gátlása, csökkent tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) és interleukin-6 (IL-6) termelés, illetve fokozott interleukin-10 (IL-10) expresszió [122-124]. Felmerült olyan parakrin hatású vegyületek kibocsátásának lehetősége is, melyek a szöveti őssejteket serkentve erősíthetik az endogén reparációs mechanizmust [125].

#### 1.2.3.1.1 Gyulladás szabályozása

Leírták, hogy az MSC-k fokozott IL-6 szekréciója a STAT3 transzkripciós faktoron keresztül csökkenti a neutrofilek apoptózisát így növeli azok életidejét [126]. Ezen túl a fokozott IL-6 szekréció befolyásolja a neutrofil aktivációt is a respiratory burst

(oxidative burst, gyors ROS szekréció) csökkentésén keresztül [127, 128]. Miokardiális infarktus utáni MSC transzplantáció megnöveli az M2 makrofágok számát [129]. Bár a mechanizmus még nem teljesen tisztázott, valószínűleg parakrin faktorok által mediált, mint az interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, prostaglandin-E2, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B, nitrogén-monoxid, hem-oxigenáz-1, HGF és a TGF- $\beta$ 1 [122, 129, 130]. MSC-k által szekretált faktorokról leírták, hogy szupresszálják a T-sejt, NK (természetes ölü) sejt és B-sejt proliferációt és attenuálják a dendritikus sejtek érését [127, 131-133].

#### 1.2.3.1.2 Fibrózis szabályozása

Az infarktus utáni őssejt-transzplantáció befolyásolja a heg-formációt, és javítja a kamrafunkciót. Különböző tanulmányok leírták, hogy az infarktus utáni őssejtkezelés csökkenti a kamrafal elvékonyodását [134], növeli a frakcionális rövidülést [135], csökkenti a fibrózist és heg-méretet [124, 136-138]. A hatásban résztvevő eddig azonosított faktorok a TGF- $\beta$ , TIMP-ek (metalloproteináz szöveti inhibitor) és MMP-k (mátrix metalloproteináz) [139, 140]. *In vitro* kísérletek során kimutatták a mesenchymális őssejtek parakrin faktorok révén csökkentik a fibroblaszt proliferációt és a kollagén szintézist [110, 141], amely csökkentheti a miokardiális infarktus utáni remodellinget.

#### 1.2.3.1.3 Angiogenezis szabályozása

Habár a terápiásan alkalmazott őssejtek képesek az érstruktúrákba beépülni, ennek gyakorisága meglehetősen csekély. Az angiogenezishez és arteriogenezishez vezető molekuláris folyamatok mediátorai többek közt a nitrogén-monoxid, VEGF, bFGF, HGF és az angiopoietin. Ezek a folyamatok az endotheliális sejtek és a vaszkuláris simaizomsejtek migrációjához, proliferációjához, érnövekedéshez és -éréshez, valamint extracelluláris mátrix szintéziséhez vezetnek. Leírták, hogy az infarktus után alkalmazott őssejt-transzplantáció képes fokozni a kapilláris denzitást a sértett területen [142], amely többek közt az őssejtek VEGF termeléséhez köthető [143].

#### 1.2.3.2 Differenciáció

Az őssejtterápiák elsődleges célja alapvetően az elpusztult kardiomiociták pótlása volt. Jelenleg is folyik a kardiomiocita pótlásra legmegfelelőbb őssejttípus keresése. Az

őssejtek nem elkötelezettek egyetlen sejt vonal irányában, ezért fontos a megfelelő differenciációs szignálok jelenléte. Az 1. táblázat felsorolja a kardiogén irányba differenciált őssejteket és a differenciáláshoz alkalmazott eljárásokat.

**1. táblázat:** Kardiogén irányba differenciált őssejtek – Zamilpa és mtsai, World J Cardiol 2014, 6: 610-620 [5] alapján

SEJT TÍPUS	DIFFERENCIÁLTATÁS MÓDSZERE	REFERENCIA
Embriionális őssejt	embrioid test – mediált differenciáltatás	[144, 145]
	matrix sandwich kultúra + Activin A, BMP4, bFGF	[54]
Indukált pluripotens őssejt	matrix sandwich kultúra + Activin A, BMP4, bFGF	[54]
	reprogramozott kardiális fibroblasztok transzdifferenciáltatása embrioid test-alapú módszer + transz-well kondicionált médium kokultúra rendszer	[146]
	kardiális fibroblasztok direkt reprogramozása <i>in vivo</i> Gata4, Mef2c és Tbx5 lokális bejuttatásával	[147]
	reprogramozott felnőtt fibroblasztok szuszpenziós embrioid test-mediált differenciálása	[148, 149]
Csontvelő eredetű mesenchymális őssejt	5-azacytidine kezelés által indukált <i>in vitro</i> differenciáció	[150]
	Infarktus után G-CSF-fel mobilizált és a sérült miokardiumba jutott őssejtek <i>in vivo</i> differenciálódása	[151]
	<i>In vivo</i> differenciációja a miokardiumba juttatott sejteknek	[152]
	Inzulint, DMSO-t és aszkorbinsavat tartalmazó kardiogén differenciációs médium használata	[153]
Zsír szövet eredetű mesenchymális őssejt	Szívizomszövet eredetű sejtmentes extraktum vagy szívizomszövettel kondicionált médium	[154]
	Kokultúra direkt kontaktusban kontraháló szívizomsejtekkel	[155]
	0,1%-os DMSO 48 órán át	[156]
Amnion folyadék eredetű őssejt	Miokardiumba transzplantált sejtek <i>in vivo</i> differenciációja	[157]
	<i>In vitro</i> differenciáció embrioid test formáción át	[158]
Köldökszinórvér eredetű őssejt	Kokultúra elsődleges neonatális patkány kamrai miocitákkal	[159]
	Kokultúra neonatális egér kardiomiocitákkal	[160]
Wharton kocsonya eredetű mesenchymális őssejt	5-azacytidine kezelés indukált <i>in vitro</i> differenciáció vagy kardiomiocita-kondicionált médiumban növesztés	[161]
Cardiosphere-ek	Kokultúra neonatális patkány kardiomiocitákkal	[104]
Szív eredetű side populáció sejtek	Kezelés oxytocinnal vagy trichostatin A-val	[162]

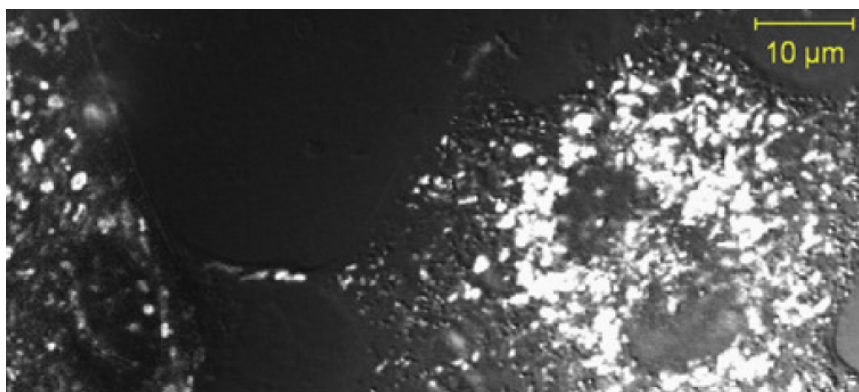
DMSO - Dimetilszulfoxid; G-CSF - granulocita kolónia stimuláló faktor

A kardiomiocita irányú differenciáció ellenőrzésére gyakran használják a GATA-4, miocita specifikus enhancer faktor (MEF) 1 és 2A, 2C, 2D és az Nkx2.5 transzkripció

faktorok expresszióját, illetve a miozin könnyű lánc (MLC)-2 $\nu$ , miozin nehéz lánc (MHC) és foszfolambán,  $\alpha$ -aktin, szívspecifikus troponin T, szívspecifikus titin, dezmin és connexin-43 molekulákat [144, 145, 150, 152, 153].

### 1.2.3.3 Membrán nanocsövek

Több sejttípus esetén kimutatták, hogy képesek más sejtekkel membrán nanocsöveket kialakítani (7. ábra). A nanocsövek átmérője 100 nm-es nagyságrendű, hossza több mikrométer is lehet, bennük több esetben mitokondriumok áramlását figyelték meg [163]. Beszámoltak arról is, hogy ilyen nanocsöveken keresztül létrejöhet „kommunikáció” szívizomsejtek és humán mesenchymális őssejtek között, illetve, hogy a nanocsövön keresztül mitokondriumok juthatnak az őssejtből a szívizomsejtbe [164]. A nanocsöveket [163] és a bennünk zajló mitokondrium transzfer [165] kutatócsoportunk is leírta.



**7. ábra:** Membrán-nanocsőben lezajló mitokondrium transzfer - Fáziskontraszt és fluoreszcens kép, a fluoreszcens képen a MitoTracker festékkel jelölt mitokondriumok fehér jelet adnak – Pankotai és mtsai, Mitochondrion 2012, 12: 352-356 [165]

Mivel ismert, hogy az iszkémia-reperfúziós károsodás során sérül a mitokondriumok funkciója [166], ezért izgalmas lehetőséget jelent, hogy a terápiásan alkalmazott sejtek képesek lehetnek aktív mitokondrium-transzfer által helyreállítani az aerob metabolizmust sérült mitokondriummal rendelkező sejtekben [167]. Azonban a folyamatosan változó nanotubuláris hálózat fiziológias funkciója és lehetséges szerepe *in vivo* sejterápiák esetén még nem felderített [168-171].

#### 1.2.3.4 Sejtfúzió

A miokardiális infarktus utáni őssejt-transzplantációról leírták, hogy képes az apoptotikus szívizomsejtek megmentésére és érett kardiomiociták létrehozására sejtfúzió által [172, 173]. Több kutatócsoport megfigyelt *in vitro* körülmények között sejtfúziót a hím eredetű embrionális őssejtek és egyéb típusú nőstény sejtek – például ideg [174] és csontvelő eredetű sejtek [175] – közt. Közöltek *in vivo* eredményeket is csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek (BMSC) fúziójáról Purkinje neuronokkal, kardiomiocitákkal és hepatocitákkal [173]. A fúzió után a sejtek kettős fenotípust mutattak, különösen nagyméretű sejtmagot tartalmaztak, amiben számos nukleoluszt lehetett megfigyelni, XXXY tetraploid kromoszómszámmal rendelkeztek.

Jelzett sejtekkel végzett *in vitro* kísérletekben tapasztalt, munkacsoportunk által is megfigyelt jelenség a két sejtmagot tartalmazó, kettős jelölésű sejtek megjelenése [163]. Valószínűleg a megmentési folyamatok közé tartozó jelenség során egy őssejt egy sérült sejttel fuzionál így kompartmenteket és citoplazmát oszt meg vele, ezzel javítva annak állapotát [176]. Minden bizonnyal az angiogenezisben is része van a sejtfúziónak [177, 178]. Mindazonáltal a fúzió előfordulásának alacsony gyakorisága miatt nem lehet ezzel magyarázni a miokardiális infarktus utáni őssejtterápia állatkísérletes modelljeiben leírt jelentős szívfunkciójavulást [179].

#### 1.2.4 Őssejtterápiák preklinikai és klinikai eredményei

Az első klinikailag alkalmazott őssejtkezelés a csontvelő-transzplantáció, az első sikeres beavatkozásra 1968-ban került sor. Az őssejt-transzplantáció a hagyományos kezelés kiegészítéseként használható leukémiában, egyes limfómákban (pl. Hodgkin-kór) és aplasztikus anémiában. Gyermekkorban egyes genetikai betegségek kezelésére is alkalmas: thalasszémiában, sarlósejtes vérszegénység és néhány veleszületett anyagcsere- vagy immunhiányos betegség (például krónikus granulomatózis). Az őssejtek olyan esetekben is felhasználhatók, ha daganatos betegségek (például emlőrák kezelésére adott nagy dózisu kemoterápia vagy sugárkezelés) következtében elpusztult a csontvelő. Nagy reményeket fűzünk az őssejtterápiákhoz az olyan degeneratív betegségekben, ahol jelentős sejtpusztulás jön létre és nem áll rendelkezésre kielégítő terápia. Intenzív kutatás folyik többek közt az alábbi betegségek őssejtterápiás kezelésével kapcsolatban:

gerincvelő sérülések és motor neuron rendellenességek (pl. ALS) [180], neurodegeneratív betegségek – Alzheimer-kór, Parkinson-kór, Huntington-kór [181], demyelinizációs betegségek (sclerosis multiplex) [182], diabétesz mellitusz [183], stroke [184], égés, fekélyek – bőr graft [185], retina betegségek [186], csontvelő-átültetés [187], csont, porc, porckorong, meniszkusz, ín- és ínszalag betegségek [188-190], muszkuláris disztrófia (Duchenne muszkuláris disztrófia) [191], valamint májelégtelenség [192].

A számos egyéb felhasználás mellett prominens kutatási terület őssejtek alkalmazása miokardiális infarktus után.

#### *1.2.4.1 Őssejtterápia miokardiális infarktus után*

Az állatmodellekben alkalmazott miokardiális infarktus utáni sejtkézelés irodalmában beszámoltak neonatális- [193], fetális- [194] és felnőtt kardiomiociták [195], szkeletális mioblasztok [48], köldökzsínórvér eredetű sejtek [196], endoteliális progenitor sejtek [50], embrionális őssejtek [197], csontvelő eredetű őssejtek [198], hematopoetikus őssejtek [199], mesenchymális őssejtek [200, 201] indukált pluripotens sejtek [202] és szív eredetű őssejtek [203] használatáról.

Klinikai vizsgálatok folytak és folynak többek közt szkeletális mioblasztokkal (NCT00526253), csontvelő eredetű őssejtekkel (NCT00279175, NCT01569178, NCT01693042, NCT00874354), endoteliális progenitor sejtekkel/CD133+ sejtekkel (NCT00529932, NCT01187654), csontvelő, zsírszövet- és köldökzsínór- (NCT01946048) eredetű mesenchymális őssejtekkel, valamint szív eredetű őssejtekkel (NCT01458405).

Tekintettel arra, hogy a legtöbb vizsgálat és kutatásunk is a csontvelő és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtekkel foglalkozik, ezért az alábbiakban az ezekkel az őssejtekkel folytatott vizsgálatokat foglalom össze.

Leírták csontvelő és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek akut miokardiális infarktus utáni alkalmazásának jótékony hatásait kis- és nagyállatmodellekben is (2. és 3. táblázat). A sejtranszplantáció sok esetben csökkentette az infarktus által érintett terület kiterjedését, növelte az ejekciós frakciót, és fokozta az angiogenezist.

Megnehezíti a különböző kutatócsoportok eredményeinek összehasonlítását a standardizálás hiánya, ugyanis eltérések figyelhetők meg a kísérleti protokollokban a



bejuttatott sejtdózis, a bejuttatás módja, a sejtek passzázsszáma és a bejuttatás időpontja között. A terápiához általában alacsony passzázsszámú sejteket használtak, jellemzően p5 vagy ennél kisebb [204], de akad példa p30-as sejtek eredményes alkalmazására is [205]. A sejtek bejuttatása leggyakrabban közvetlenül az infarktus után (<1 óra) történik [204], de van olyan protokoll is, ahol csak 14 nappal az infarktus után kerül rá sor [206].

**2. táblázat:** Csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek alkalmazása akut miokardiális infarktus állatmodelljeiben – Elnakish és mtsai, Stem Cells Int 2012, 2012: 646038 [207] alapján

ÁLLATMODELL	DÓZIS	BEJUTTATÁS	EREDMÉNY	REFERENCIA
egér	0,05-0,5 ×10 <sup>6</sup>	intramiokardiális injekció	csökkent infarktusméret és fibrózis	[208]
egér	1 ×10 <sup>6</sup>	intramiokardiális injekció	növekedett LVEF	[209]
patkány	6 ×10 <sup>6</sup>	intramiokardiális injekció	növekedett LVEF, csökkent infarktusméret	[210]
patkány	5 ×10 <sup>6</sup>	intravénás infúzió	javult szívfunkció, csökkent infarktusméret	[211]
sertés	75-100 ×10 <sup>6</sup>	transzendokardiális injekció	csökkent hegméret, növekedett LVEF	[212]
sertés	10 ×10 <sup>6</sup>	intrakoronáriás infúzió	növekedett LVEF, csökkent hegméret	[213]
bárány	25-450 ×10 <sup>6</sup>	intramiokardiális injekció	csökkent infarktus-kiterjedés és EDV, növekedett arteriogenezis és LVEF	[214]

EDV – végdiasztolés térfogat; LVEF – balkamrai ejekciós frakció

**3. táblázat:** Zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek alkalmazása akut miokardiális infarktus állatmodelljeiben Naaijken és mtsai, Stem Cell Rev 2014, 10: 389-398 [204] alapján

ÁLLATMODELL	DÓZIS	BEJUTTATÁS	EREDMÉNY	REFERENCIA
Egér	0,5 ×10 <sup>6</sup>	intramiokardiális injekció	növekedett LVEF és angiogenezis	[215]
Egér	1 ×10 <sup>6</sup>	intramiokardiális injekció	csökkent infarktusméret, növekedett LVEF és angiogenezis	[216]
Patkány	5 ×10 <sup>6</sup>	intramiokardiális injekció	növekedett LVEF és angiogenezis	[217]
Patkány	100 ×10 <sup>6</sup>	intravénás infúzió	csökkent infarktusméret, növekedett LVEF és angiogenezis	[218]
sertés	50 ×10 <sup>6</sup>	intramiokardiális injekció	csökkent infarktusméret, növekedett LVEF	[219]
sertés	2 ×10 <sup>6</sup>	intrakoronáriás infúzió	növekedett LVEF és angiogenezis	[220]

LVEF – balkamrai ejekciós frakció

Egyre több klinikai vizsgálat is alátámasztja a sejtbejuttatás megvalósíthatóságát és az őssejtterápia biztonságosságát. Számos multicentrikus vizsgálat van folyamatban, amelyek a kezelések hatékonyságát vizsgálják (4. és 5. táblázat).

**4. táblázat:** Csontvelő eredetű mesenchymális őssejteket alkalmazó klinikai vizsgálatok – Matar és mtsai, Springerplus 2014, 3: 440 [112] alapján

VIZSGÁLAT NEVE VAGY KUTATÓ	AZONOSÍTÓ	CSOPORTOK	VÉGPONT	BETEGSZÁM	BEJUTTATÁS MÓDJA	BESOROLÁS
ESTIMATION	NCT01394432	MSC vs. placebo	LVESV	50	intramiokardiális	hatásosság, fázis 3
SEED-MSC	NCT01392105	MSC vs. nincs intervenció	LVEF	80	intrakoronáriás	biztonságosság + hatásosság, fázis 2/3
Anastasiadis és mtsai	NCT01753440	allogén MSC	LVEF	30	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 2/3
Anastasiadis és mtsai	NCT01759212	allogén MSC	LVF	10	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 2/3
Perin és mtsai	NCT00555828	25 vs. 75 vs. 150 millió allogén MSC vs. placebo	biztonságosság + LVF	25	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 1/2
PROMETHEUS*	NCT00587990	kis dóziszú vs. nagy dóziszú MSC vs. Placebo	SAE	45	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 1/2
MESAMI	NCT01076920	MSC infúzió	biztonságosság + LVF	10	intramiokardiális	biztonságosság, fázis 1/2
MSC-HF	NCT00644410	MSC vs. placebo	LVF	60	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 1/2
POSEIDON-Pilot*	NCT01087996	auto-MSC (20,100 vagy 200 millió) vs. allo-MSC (20, 100 vagy 200 millió)	SAE + LVF	30	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 1/2
BMCs vs. MSCs TAC-HFT*	NCT00768066	MSC (100 vagy 200 millió) vs. BMC (100 vagy 200 millió)	SAE + LVF	67	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 1/2

\* - publikált eredmények vagy előzetes eredmények. Minden vizsgálat, ahol nem volt másképp feltüntetve autológ sejteket használt. BMC - csontvelő eredetű sejtek; LVEF - balkamrai ejekciós frakció; LVESV - balkamrai végszisztolés volumen; LVF - balkamra funkció; MSC- mesenchymális őssejt; SAE - súlyos kedvezőtlen esemény

**5. táblázat:** Zsírszövet eredetű mesenchymális őssejteket alkalmazó klinikai vizsgálatok – Matar és mtsai, Springerplus 2014, 3: 440 [112] alapján

VIZSGÁLAT NEVE VAGY KUTATÓ	AZONOSÍTÓ	CSOPORTOK	VÉGPONT	BETEGSZÁM	BEJUTTATÁS MÓDJA	BESOROLÁS
ATHENA	NCT01556022	MSC vs. placebo	SAE + LVEF	45	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 2
ADVANCE	NCT01216995	MSC vs. placebo	SAE + Infarktus méret	216	intrakoronáriás	biztonságosság + hatásosság, fázis 2
Percero és mtsai	NCT01502514	MSC infúzió	QOL	10	intramiokardiális	biztonságosság + hatásosság, fázis 1/2

Minden vizsgálat, ahol nem volt másképp feltüntetve autológ sejteket használt. LVEF - balkamrai ejekciós frakció; MSC- mesenchymális őssejt; QOL - életminőség; SAE - súlyos kedvezőtlen esemény

A klinikai eredmények értelmezését és összehasonlítását szintén nehezíti a metodikák standardizálásának hiánya (sejt-dózis, sejtkezelés, a transzplantáció időzítése, a

bejuttatás módja) valamint a tanulmányokban szereplő populáció elkerülhetetlen heterogenitása [112].

A kezdeti klinikai vizsgálatok egymáshoz hasonló eredményeket mutattak. A bal kamrai ejekciós frakció növekedett, csökkent a végszisztolés térfogat és javult a véráramlás a sérült területen a sejtttranszplantációt követő 4-6 hónapban [110]. Janssens randomizált kísérlete nem mutatott szignifikáns javulást a szív kontraktilitásában, de az infarktus által érintett területek mérete csökkent [221].

A kezdeti vizsgálatokban tapasztalt jótékony hatásokat megerősíti a 204 fő részvételével végzett, 1:1 arányban randomizált kettős vak REPAIR-AMI (NCT00279175). Az ejekciós frakció szignifikáns növekedését mutatták ki a csontvelő eredetű MSC-vel kezelt csoportnál a placebo kapott csoporthoz képest, a kezelést követően négy hónappal. A beavatkozást követő egy évben a halálesetek és a szívelégtelenség miatti ismételt kórházi kezelések gyakorisága az MSC-vel kezelt pácienseknél alacsonyabb volt [222, 223]. Fontos megállapítás, hogy azon betegek, akik alacsonyabb ejekciós frakcióval rendelkeztek, közel háromszor nagyobb mértékű javulást mutattak a kezelés hatására, tehát a BMSC terápia a legjobb hatással a súlyosabb infarktusos betegekre volt [110]. Felmerült a kérdés, hogy a sejtek beadásának időpontja befolyásolja-e a regeneráció mértékét? Az eredmény elsőre meglepő lehet: azon betegek kardiális funkcionális paraméterei, akik az infarktust követő négy napon belül kaptak sejterápiás kezelést nem javultak számottevően, ellenben a 4. és a 8. nap között kezelt betegek esetén megfigyelt szignifikáns javulással [222]. Egy másik kutatócsoport patkányokban az elülső leszálló szívkoszorúér lekötésével hozott létre infarktust, majd a kísérleti állatokat sejterápiával kezelte. A három kísérleti csoportba az infarktus vége után egy órával, egy héttel, illetve két héttel intramiokardiális injekcióval juttattak be mesenchymális őssejteket. A kezelés hatását négy hét elteltével értékelték ki. Eredményeik szerint az infarktus után egy héttel kezelt csoport értékei voltak a legkedvezőbbek, az őssejterápia pozitív hatása ebben a csoportban volt a legnagyobb [123]. Ezen adatok azt sugallják, hogy a reperfúziót követő egy héten belül a mikrokörnyezet változik, ezáltal modulálva a homing mechanizmust és a beültetett sejtek funkcionális aktivitását. Jól ismert, hogy a reperfúzió átmeneti változást indukál például a VEGF és a SDF-1 expressziójában [110, 224].

### 1.2.5 Lehetőségek a sejterápiák hatékonyságának fokozására

Számos klinikai vizsgálat és állatkísérlet megerősítette, hogy a miokardiális infarktus utáni őssejt-transzplantáció biztonságos és képes fokozni a gyógyulást és a szívfunkciót, azonban több általános limitációt is leírtak. Noha a klinikai vizsgálatok biztonságosnak bizonyultak, a kezelések csak relatív csekély hatással voltak a szívfunkcióra [225]. A miokardiális infarktus utáni őssejterápia egyik legnagyobb akadálya a csekély beépülés és alacsony túlélés, ami csökkenti a potenciális regenerációs és funkcionális hatásokat. Klinikai vizsgálatokban 24 órával bejuttatás után csupán a bejuttatott csontvelő eredetű őssejtek 3,2%-a maradt meg és egyéb tanulmányok is kisebb mint 10% retenciót írtak le [226-231]. Az alacsony túlélés valószínűsíthető okai az anoikis [232], lehetséges immun-rejekció és oxidatív környezet által kiváltott apoptózis. A bejuttatási mód szempontjából az intravénás infúzió csökkent hatékonyságát a bejuttatott sejtek non-target szövetekben és szervekben való megakadása okozhatja (mint a csontvelő, tüdők, máj és lép) [233, 234]. Az intrakoronáriásan és intramiokardiálisan bejuttatott sejtek retencióját a sérült szívben kialakult kedvezőtlen mikrokörnyezet csökkenti [235, 236]. Mindazonáltal az eddigi eredmények alapján remény van biztonságos és effektív terápiák kialakítására és a kedvezőtlen remodelling csökkentésére.

#### 1.2.5.1 *Homing befolyásolása*

A homing folyamatában résztvevő sejtek képesek a sérült területekre migrálni. Stromal cell-derived factor-1-et (SDF-1) overexpresszáló transzfektált fibroblasztokat a peri-infarktusos zónába injektálva azok fokozták a hematopoetikus őssejt homingot patkány modellben [237]. Transzfektált fibroblasztokkal expresszáltatott monocita kemotaktikus fehérje-3 fokozta az mesenchymális sejt beépülést [238]. Sertés modellben inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1) és hepatocita növekedési faktor (HGF) kombinációja aktiválta az endogén szív eredetű őssejteket [239], míg egér modellben a timozin  $\beta$ 4 játszott fontos szerepet az epikardiális progenitor sejtek mobilizálásában [240, 241].

### 1.2.5.2 Előkezelések sejterápiákban

Ígéretes eredményeket mutat a sejtek túlélésének növelésére azok előkezelése fizikai, kémiai, farmakológiai vagy genetikai manipulációkkal mind *in vitro* iszkémiás modellekben, mind *in vivo* transzplantáció esetén [242].

Több kutatócsoport publikálta anoxiás és hipoxiás kezelések donor sejtek túlélését fokozó hatását [243-245]. A hipoxiás kezelés a hipoxia-indukált faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) stabilizációját és nukleáris transzlokációját eredményezi, amely befolyással van több olyan gén expressziójára amelyek lehetővé teszik a sejtek túlélését alacsony oxigén szint mellett [242, 246, 247]. Leírták, hogy hipoxiás előkezelés csökkentette a sejtek apoptotikus indexét, stabilizálta a mitokondriális membránpotenciált és megnövelte a Bcl-2 és VEGF expresszióját, és növelte az Akt foszforilációját [248]. Mesenchymális őssejtek hipoxiás kezelése szintén hatással van a proliferáció ütemére, differenciációra illetve módosítja a parakrin aktivitást [249]. A hipoxiás prekondicionáláson átesett MSC-k a normoxiás kultúrában tartott MSC-khez képest fokozott hatással bírnak a vaszkularizáció stimulálására fokozott VEGF, angiopoietin-1 expresszió és jobb poszt-transzplantációs túlélés következtében [250].

Hősokk előkezelés szintén képes szignifikánsan csökkenteni sejtek apoptózisát [251].

Lehetséges a sejtek előkezelése különböző farmakológiai manipulációkkal is, mint a mitokondriális káliumcsatorna-nyitó diazoxid. A diazoxiddal prekondicionált MSC-k túlélése az NF- $\kappa$ B foszforilásán keresztül fokozódik [252]. Csontvelő eredetű őssejteket stroma-eredetű faktor-1 (SDF-1) kemokinnel előkezelve növekszik azok beadást követő túlélőképessége [253].

Túlélést elősegítő szignálmolekulák, mint az Akt [201, 254], Bcl2 [255] overexpressziójának alkalmazása is ígéretes eredményeket mutat. Fibroblaszt növekedési faktor-2 (FGF-2) transzgenikus expressziója szignifikánsan javítja a donor MSC-k túlélését [256].

Szintén a sejtek hatékonyságának fokozását célozzák az úgynevezett „engineered delivery”-k mint például a szívszövet építése különböző vázakon [257-259] vagy a bejuttatásra kerülő sejtek mikrokapszulázása [226, 260].

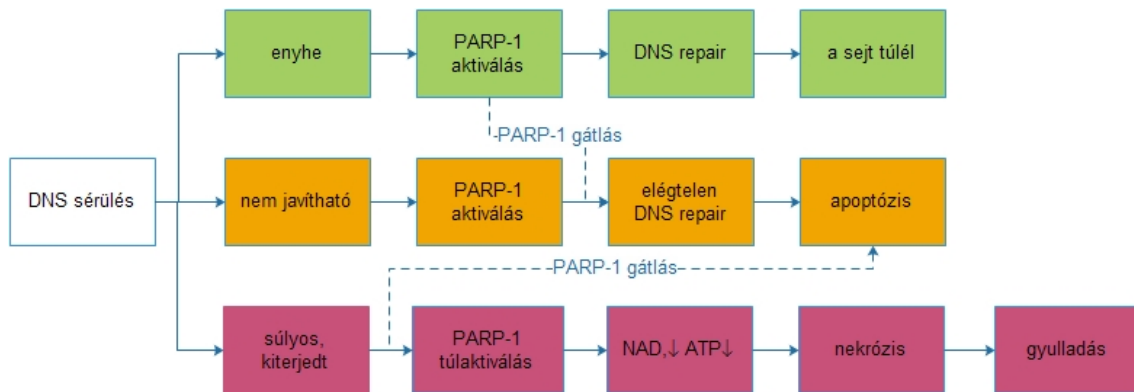
### 1.2.5.3 A poli(ADP-ribóz) polimeráz-1

Az oxidatív stressz által okozott DNS törések aktiválják a PARP-1 (poli(ADP-ribóz) polimeráz-1) enzimet. A PARP-1 enzim célfehérjéit több a NAD molekulákból származó ADP-ribóz egység hozzákapcsolásával módosítja, azon egy poli(ADP-ribóz) (PAR) polimert képezve. A PAR-iláció befolyással van több sejtszintű folyamatra, míg az intenzív PAR-iláció akár a sejt halálához is vezethet [261].

A PARP-1-et eredetileg mint egy DNS nick szenzor enzimet írták le, amely aktiválódik a DNS egyik, vagy mindkét szálának együttes törése esetén [262]. Ez az enzim a 17 tagú PARP enzim-család tagja [261]. A PARP-1 az egyik legnagyobb mennyiségben előforduló fehérje a sejtben [263]. A PARP-1 a törött DNS végekhez az N-terminális DNS kötő domén cink-ujj motívumával kapcsolódik. Ilyen DNS töréseket okozhatnak a reaktív oxigén fajták (ROS), reaktív nitrogén fajták (RNS), ionizáló sugárzások, illetve DNS törés jön létre az alkiláló ágensek okozta károsodás repair-je során. Szintén az enzim aktiválásához vezet különböző DNS struktúrák megjelenése [264], különböző fehérjékkel való interakció [265], továbbá a PARP-1 bizonyos posztranszlációs módosításai [266, 267].

A PARP-1 enzim által katalizált PAR-iláció megváltoztatja a célfehérje fiziológiai tulajdonságait, ami eredményezheti a módosított fehérje aktivációját, inhibícióját vagy intracelluláris transzlokációját, illetve kapcsolódást PAR-kötő motívummal rendelkező fehérjékhez. Ezen túl a PARP-1 képes célfehérjék aktiválására direkt fehérje-fehérje kölcsönhatás révén, valamint hatást gyakorol egyéb NAD-ot felhasználó enzimekre is szubsztrát-kompetíció által. A PARP-1 befolyással van több fontos sejtszintű folyamatra, mint a genom organizációja [268], a transzkripció [268, 269], replikáció [270] és DNS-repair (bázis-kivágás repair, egy-szál törés repair) [271-273]. Ezeken keresztül pedig hatással lehet a sejt proliferációjára [274], differenciációjára [275], metabolizmusára és részt vehet a nekrotikus sejthalál kialakításában [276, 277]. A PARP-1 transzkripciós szabályozója a gyulladásos mediátorok közül az indukálható nitrogén-oxid szintetáz, az NF- $\kappa$ B és a TNF- $\alpha$  fehérjéknek [278].

A miokardiális infarktus és a sejtterápiák szempontjából legnagyobb relevanciával a PARP-1 oxidatív stressz-indukált sejthalálban játszott szerepe bír. Jelenlegi elképzelések szerint [279] a DNS károsodást szenvedett sejtek előtt három lehetséges útvonal van (8. ábra).



**8. ábra:** A PARP-1 szerepei DNS károsodásban [263] alapján. ATP - adenzin-triszfoszfát; DNS – dezoxiribonukleinsav; NAD - nikotinamid-adenin-dinukleotid; PARP-1 - poli(ADP-ribóz) polimeráz-1

Az első útvonalon, az enyhe DNS károsodás után a PARP-1 aktiválódik és facilitálja a DNS-repairt, melyben szerepet játszik a DNS-repair enzimekkel (XRCC1 és DNS-dependens protein kináz (DNA-PK)) való interakciója. Ennek eredményeképp a DNS sérülés javításra kerül és a sejt túlél. A második útvonalon a súlyosabb DNS károsodás apoptotikus sejthalálhoz vezet, melynek során a kaspázok inaktíválják a PARP-1-et, ezzel a szervezet megszabadul a súlyos DNS károsodást szenvedett sejtektől. A harmadik útvonalon a nitrozatív vagy oxidatív stressz által okozott kiterjedt DNS károsodás hatására a PARP-1 túlaktiválódik. A fokozott PARP-1 aktivitás pedig elfogyasztja a sejt NAD és ennek következtében ATP készleteit. A csökkent rendelkezésre álló NAD mennyiség akadályozza a glikolízist és mitokondriális respirációt. Dawson és munkatársai demonstrálták [280], hogy a PARP-1 által mediált glikolízis inhibíció nem csupán a PARP-1 NAD fogyasztásának következménye, hanem a hexokináz gátlása is szerepet játszik benne, melyet az enzimhez kötődő PAR mediál. A lecsökkent ATP készlet megakadályozza az apoptotikus út megfelelő működését. A sejtek nekrozissal pusztulnak el, mely során megbomlik a sejtmembrán integritása és a sejtől gyulladást keltő anyagok jutnak az intracelluláris térbe. PARP-1 tehát szerepet játszik a DNS-repairben, de képes a sejt energiakészleteit kimerítve sejt-diszfunkciót és nekrozist okozni, ezen túl képes pro-inflammatorikus gének transzkripcióját fokozni. A PARP inhibíció lehetővé teszi az oxidatív stresszen átesett sejtek ATP és NAD készleteinek megőrzését, ezáltal lehetővé teszi számukra a normális funkció visszanyerését vagy az apoptotikus sejthalált, amely a szervezet számára jóval

kedvezőbb (8. ábra). Ezzel szemben enyhe károsodás esetén alkalmazott PARP inhibitorok akadályozzák a DNS-repairt és az apoptotikus utat promotálják. Ennek megfelelően különböző körülmények közt alkalmazott PARP inhibitorok képesek lehetnek bizonyos DNS-károsító daganatellenes gyógyszerek citotoxicitásának fokozására [281-283], más körülmények közt pedig a sejt-nekrózis és gyulladás csökkentésére [263].

A PARP-1 aktiváció szerepet játszik az infarktus utáni reperfüziós-sérülésben. ADP-ribóz polimerek akkumulációja figyelhető meg infarktust követően a nekrotikus zónában és a „veszélyeztetett területen”, az emelkedett PARP aktivitás kimutatható még 24 órával a reperfüzió után is [284].

A PARP inhibitorok többsége a benzamid farmakoforra épül, amely a NAD nikotinamid részéhez hasonlít, ezért erős affinitással kötődik a PARP-1 enzimhez. A második és harmadik generációs inhibitorok esetében a nyitott benzamid struktúra ciklizálásával, majd ehhez a gyűrű-struktúrához további gyűrűket kapcsolva jelentősen növelték az inhibitorok hatékonyságát. PARP inhibitorokkal való kezelés csökkenti az infarktus méretet és javítja a kontraktilitást. Ennek háttérében az akut fázisban a sejtek energiakészleteinek megőrzése (és ezáltal a nekrozis gátlása), a későbbi fázisokban pedig a gyulladáshoz való válasz csökkentése állhat [263, 285].



## 2 Célkitűzések

A bevezetésben felvázolt körülmények miatt igen fontos a miokardiális infarktus utáni sejtherápia során alkalmazott sejttípusok összehasonlítása és az előkezelések vizsgálata. Kísérleteink során *in vitro* megközelítést alkalmaztunk a miokardiális infarktus utáni sejtherápia komplex eseményeinek modellezésére.

Munkám során céljaim voltak:

- jellemezni a munkacsoport által használt *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellt,
- összehasonlítani csontvelő és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek túlélését poszt-iszkémiás viszonyok közt,
- összehasonlítani csontvelő és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek direkt hatásait iszkémia-reperfúziós sértésen átesett kardiomioblasztokra,
- megvizsgálni PARP inhibitorral történő előkezelés hatását terápiásan használt H9c2 sejtek poszt-iszkémiás viszonyok közti túlélésére
- megvizsgálni hogyan befolyásolja az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett kardiomioblasztok túlélésére kifejtett hatást a terápiásan használt sejtek PARP inhibitorral való előkezelése.

### 3 Módszerek

#### 3.1 Felhasznált eszközök

A kísérletek során a H9c2 sejtekhez 4,5 g/l glükóz és 4 mM L-glutamin tartalmú DMEM médiumot használtunk (PAA, E15-810), melyet kiegészítettünk 10% magzati marha szérummal (GIBCO, 10270-106), 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel (Biochrom AG, A2213). A mesenchymális őssejtekhez 1 g/l glükóz és 4 mM L-glutamin tartalmú DMEM médiumot használtunk (PAA, E15-806), melyet kiegészítettünk 10% magzati marha szérummal, 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel. Az iszkémia-reperfúzió modellben glükóz- és L-glutamin mentes DMEM médiumot használtunk (PAA, E15-079). A spektrofotometriás mérések során fenolvörös-mentes DMEM médiumot használtunk (PAA, E15-877). A sejtek mosásához PBS-t (PAA, H15-002), a sejtszámoláshoz 0,4%-os Tripánkék oldatot (SIGMA, T8154) használtunk. Az adherens sejtek felszedéséhez tripszin EDTA 10X-es oldatból készített (PAA, L11-003) 5X-ös vagy 1X-es hígítást használtunk, a hígításhoz PBS-t alkalmaztunk. Az oxidatív stressz modellezéséhez hidrogén-peroxidot (SIGMA-ALDRICH, 21,676-3), PARP inhibitoroként pedig PJ34-et (Inotek Pharmaceuticals Corp.) használtunk. A felhasznált fluoreszcens festékek a Vybrant DiD (Vybrant Multicolor Cell- Labelling Kit részeként, Invitrogen, V22889), Calcein AM (LIVE/DEAD Viability/Citotoxicity assay részeként, Molecular Probes, L3224) és Ethidium homodimer (LIVE/DEAD Viability/Citotoxicity assay Kit részeként, Molecular Probes, L3224) voltak. A metabolikus aktivitás mérést PrestoBlue Cell Viability reagenssel végeztük használtunk (Invitrogen, A-13262). Méréseink során konfokális mikroszkópot (Zeiss, LSM 510), áramlási citométert (BD Biosciences, FACSCalibur) és spektrofotométert (BioTek, PowerWave Xs mikrolemez spektrofotométer) használtunk.

### 3.2 *Felhasznált sejtípusok*

#### 3.2.1 H9c2 sejt vonal

A H9c2 patkány embrionális kardiomioblaszt sejt vonal (ATCC, Wesel, Németország) BB1X típusú vándorpatkány embrionális szívszövetéből származik. A sejteket 4,5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó DMEM médiumban tartottuk fenn, amelyet 10% magzati marha szérummal, valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel egészítettünk ki. A sejtinkubátorban 37°C-os 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó, 100%-os páratartalmú atmoszféra volt biztosítva. A sejteken hetente kétszer cseréltünk médiumot. A fenotípus megőrzése érdekében 70-80%-os konfluencia elérésénél a sejteket passzáltuk [163, 286, 287]. A kísérletek során használt H9c2 sejtek 5-15 passzázsúak voltak.

#### 3.2.2 Humán csontvelő eredetű mesenchymális őssejt

A humán csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek (hBMSC) laborunkban kerültek izolálásra ortopédiai műtétekből származó mintákból. Az összes eljárás a Semmelweis Egyetem etikai bizottságának jóváhagyásával zajlott. A csontvelőminták fiatal, 2-20 év közötti standard ortopédiai műtéteken áteső betegektől származtak, a páciensek vagy szüleik informált beleegyezésével, a magyar Egészségügyi Tudományos Tanács etikai irányelvei alapján. Csak olyan minták kerültek felhasználásra, melyeket klinikai javallat alapján egyébként is eltávolítottak volna. A mintákból a csontvelő T75-ös sejttenyésztő flakákba került és 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített 1 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó DMEM médiummal 10 ml-re egészítettük ki. A flakákat 37°C-os 5% CO<sub>2</sub> tartalmú nedvesített atmoszférán inkubáltuk 3 napig. Ez alatt az idő alatt a hBMSC-k kitapadtak a tenyésztőfelülethez, a többi alakos elemet pedig PBS-sel való mosással távolítottuk el. A hBMSC-eket 1 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített DMEM médiumban, 37°C-os 5% CO<sub>2</sub> tartalmú nedvesített atmoszférájú inkubátorban tartottuk fenn. Hetente kétszer cseréltünk médiumot, a teljes konfluencia elérését

megelőzően pedig passzáltuk a sejteket. A kísérletek során használt hBMSC-k 1-10 passzázsúak voltak.

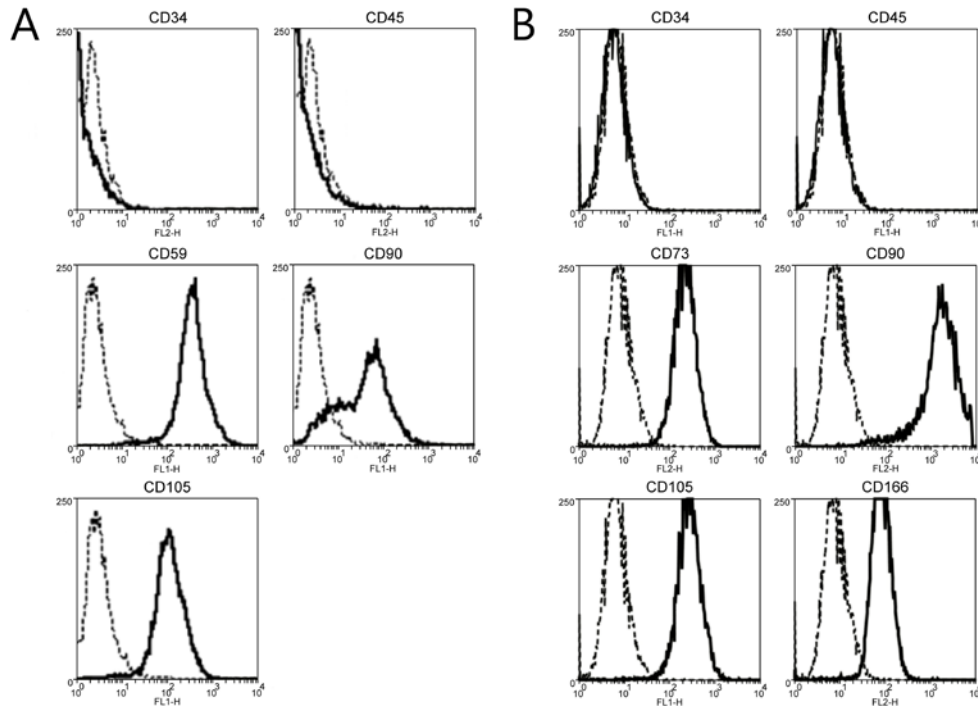
A sejtek karakterizálása során a sejtek pozitívak voltak a mesenchymális őssejtekre specifikus CD73, CD90, CD105, és CD166 markerekre, de nem fejezték ki a hematopoetikus sejtekre specifikus CD34 és CD45 markereket (9. ábra).

### 3.2.3 Humán zsírszövet eredetű őssejt

A humán zsírszövet eredetű őssejtekhez (hASC) a hamburgi Eppendorf Klinika II. számú Anatómia Intézetével létrejött együttműködés révén jutottunk hozzá. A sejtek egészséges 22-50 év közötti nők önkéntes, kozmetikai célú zsírleszívásából származó mintáiból kerültek izolálásra. Az eljárás a páciensek tudtával és beleegyezésével, illetve a Hamburgi Orvosi Kamara Etikai Bizottságának (Ethic Committee of the Chamber of Physicians) jóváhagyásával zajlott. Az izolálás első lépése a zsírleszívásból származó minta PBS-sel történő mosása volt, ezt követte a szövet 0,075%-os kollagenáz oldattal való emésztése 37°C-on 30 percig. Az enzimaktivitás semlegesítése 10% magzati marha szérummal, 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml sztreptomicinnel és 100 U/ml nisztatinnal kiegészített DMEM médiummal történt. A minták 1500 rpm-en 10 percig történő centrifugálása után a reszuszpendált pellet 75 cm<sup>2</sup>-es sejtenyésztő flaskákba került. A sejteket ezután 37°C-os 5% CO<sub>2</sub> tartalmú nedvesített atmoszférájú inkubátorban voltak fenntartva. 24 óra elteltével a nem-letapadt sejtek mosással lettek eltávolítva [68]. Az első hét során a tenyésztő médium antimikotikumot tartalmazott és 2-3 naponta került a lecserélésre. Ezután a sejtek nisztatin nélküli médiumban voltak fenntartva. A sejtek tripszinizálással végzett passzálása minden esetben a teljes konfluencia elérése előtt megtörtént [288].

Laborunkban a hASC-eket 1 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített DMEM médiumban, 37°C-os 5% CO<sub>2</sub> tartalmú nedvesített atmoszférájú inkubátorban tartottuk fenn. Hetente kétszer cseréltünk médiumot, a teljes konfluencia elérését megelőzően pedig passzáltuk a sejteket. A kísérletek során használt hASC-k 5-15 passzázsúak voltak.

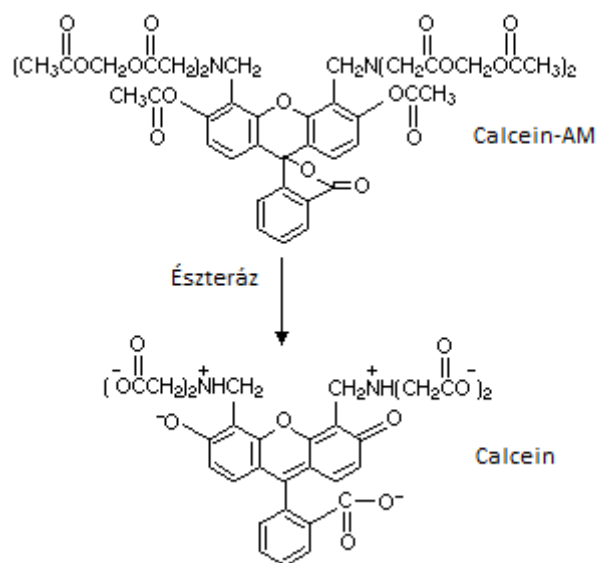
Az áramlási citometriás karakterizálás szerint [288] a hASC-k pozitívak voltak a mesenchymális őssejtekre jellemző CD90 és CD105 markerekre, valamint a stem cell antigen 1 (Sca-1) homológ CD59 markerre, azonban negatívak voltak a limfohematopoetikus CD34 és CD45 markerekre (9. ábra).



**9. ábra:** A áramlási citometriás karakterizálás alapján az őssejtek rendelkeztek a vizsgált mesenchymális őssejtekre jellemző markerekkel és nem expresszálták a limfohematopoetikus markereket – szaggatott vonal: izotípus kontrol, vastag vonal: specifikus antitest A) humán zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek B) humán csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek

### 3.3 Élő/halott jelölés – calcein-ethidium homodimer

Az élő és halott sejtek megkülönböztetéséhez calcein és ethidium homodimer (EthD) festékeket használtunk fel. A sejtmembránon áthatolni képes, nem fluoreszcens calcein-AM-et egy intracelluláris észteráz enzimátikus konverzió révén fluoreszcens membrán-impermeabilis calceinné alakítja (10. ábra).

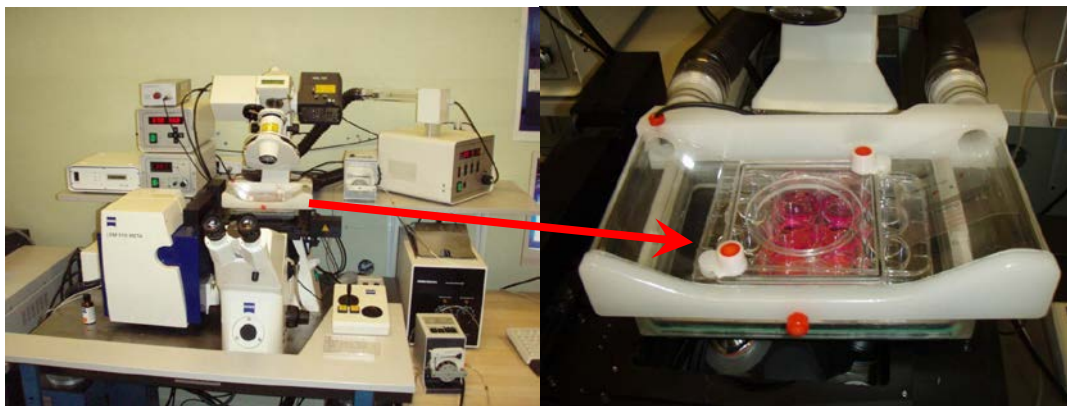


**10. ábra:** Calcein-AM konverziója calceinné az élő sejtekben

A hidrofil calcein az élő sejtekben intenzív, zöld fluoreszcenciát mutat (excitáció/emisszió: 494 nm / 517 nm). Amennyiben a membránintegritás megromlik, a festék visszatartása csökken, és a sejt fluoreszcens festődése fokozatosan eltűnik. A calceint 1:12000-es (4,17 nM) hígításban alkalmaztuk. A konfokális mikroszkóppal a gerjesztéshez 488 nm-es argon lézert használtunk, a mérés pedig 517/25 filter után történt. Az áramlási citométer használata során szintén 488 nm-es argon lézert használtunk a gerjesztéshez, a mérés pedig egy 530/30-as filter közbeiktatásával történt. Az ethidium homodimer (excitáció/emisszió: 528 nm / 617 nm) erős pozitív töltéssel rendelkezik, ezért az ép sejtmembránon nem képes átjutni, így az egészséges sejteket nem jelöli, kizárólag a sérült membránnal rendelkező sejtekbe képes bejutni. A DNS-hez való kötődés során a fluoreszcens aktivitása 40-szeresére növekszik, így a sérült és az elpusztult sejtek magja élénk, piros fluoreszcens jelet ad. Az EthD-t 1:3000-es (333 nM) hígításban alkalmaztuk. A konfokális mikroszkóppal a gerjesztéshez 543 nm-es hélium-neon lézert használtunk, a mérés pedig 583/55 filter után történt. Az áramlási citométer használata során 488 nm-es argon lézert használtunk a gerjesztéshez, a mérés pedig egy 661/16 filter közbeiktatásával történt. Ezen festékek alkalmazása esetén a háttér-fluoreszcencia értéke alacsony, mivel természetüktől fogva a festékek nem, vagy csak kis mértékben fluoreszcensek a sejtekkel való kölcsönhatást megelőzően [289, 290].

### 3.4 Iszkémia-reperfúzió modell

*In vitro* H9c2 kardiomioblaszt kultúrában az oxigén és glükóz megvonásával modelleztük az iszkémiás környezetet. A sejtek inkubációja DMEM glükóz- és L-glutamin mentes médiumban (PAA, E15-079), 0,5% oxigén ( $\approx 4$  Hgmm) és 99,5% nitrogén összetételű atmoszférában, 37°C-on zajlott (PECON inkubációs rendszer, Erbach-Bach, Germany). Az inkubációs rendszer segítségével szabályozható a hőmérséklet és az O<sub>2</sub> koncentráció és lehetőség van mikroszkóppal folyamatosan követni a folyamatokat (11. ábra).

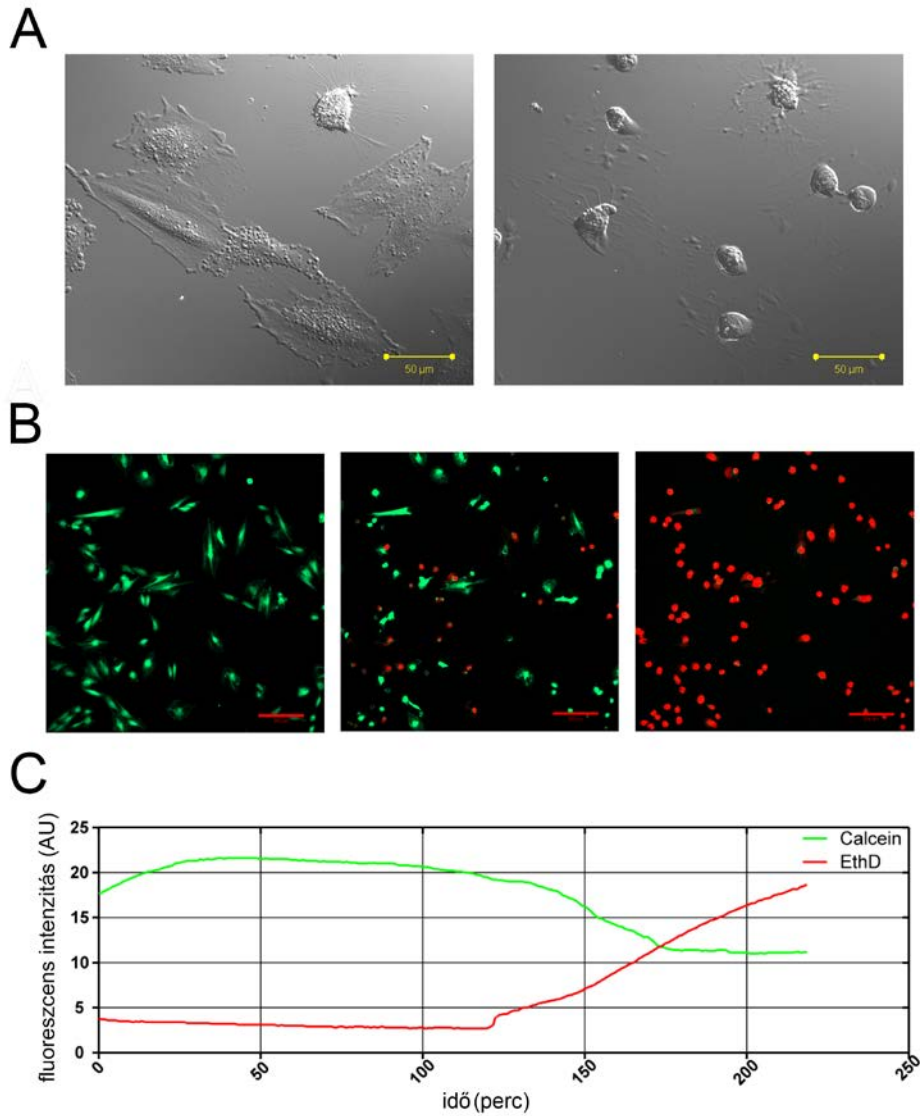


**11. ábra:** Az inkubációs rendszer. A bal oldalon a konfokális mikroszkóp és az inkubációs rendszer elemei (oxigén szenzor, szén-dioxid szenzor, hőmérséklet-szabályzó), a jobb oldalon az inkubációs kamra látható

A hipoxiás inkubáció után a médiumot 5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnel kiegészített DMEM médiumra cseréltük, ezután a sejteket 37°C-os 5% CO<sub>2</sub> tartalmú nedvesített atmoszférájú inkubátorba helyeztük [163].

A szimulált iszkémia optimális időtartamának meghatározása kísérleti úton történt. A két napos protokoll első napján a H9c2 sejteket 42 mm-es tárgylemezre tettük ki, majd egy napig 37°C-on, 5%-os CO<sub>2</sub>-t tartalmazó atmoszférán inkubáltuk. Az egy napos várakozás oka az volt, hogy a sejtek biztosan letapadjanak az új felszínhez és normális működési mintázatot (növekedést, sejtciklust, sejt-sejt kapcsolatokat) mutassanak. A második napon történt az oxigén és glükóz megvonása, melynek során az alkalmazott glükózmentes médiumot az élő és halott sejtek megkülönböztetését lehetővé tevő

fluoreszcens festékekkel egészítettük ki (calcein-AM és ethidium-homodimer). Konfokális mikroszkóppal 1 kép/perc gyakorisággal felvételeket készítve nyomon követtük a két fluoreszcens festék intenzitás-változását (12. ábra). Az eredmények alapján a kísérletek során 160 perces oxigén- és glükóz megvonást használtunk.



**12. ábra:** Iszkémiás sértés. A) A bal oldali képen látható a H9c2 sejtek normál sejtkultúrák morfológiája, a jobb oldali kép az iszkémiás sértésen átesett, összehúzódott, felkerekedett sejteket mutatja. A skála 50  $\mu\text{m}$ -es B) A szimulált iszkémia időtartama alatt elhaló sejtek citoplazmájukból elvesztik az élő sejtekre jellemző zöld calcein jelet és magjuk piros ethidium homodimer festődést mutat. Zöld – calcein fluoreszcens jele, piros: EthD fluoreszcens jele, a skála 200  $\mu\text{m}$ -es C) A fluoreszcens festékek jele az iszkémiás sértés során. EthD – ethidium homodimer, AU – önkényes egység



A kísérletek során 12 lyukú lemezeket használtunk és a lemezre a szimulált iszkémiás sértést megelőzően egy nappal raktuk ki a H9c2 kardiomioblaszt sejteket 1 ml médiumban. A kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd lyukanként 3 ml glükózmentes médiumot pipettáztunk a sejtekre, amit a szimulált iszkémia után 3 ml friss tenyésztő médiumra cseréltünk.

### **3.5 A terápiásan alkalmazott sejtek jelölése -Vybrant DiD**

Mivel kísérleteink során nagyon fontos volt, hogy a kokultivációt követően is el tudjuk különíteni a sértett és a hozzáadott sejteket, ezért Vybrant DiD (excitáció/emisszió: 644 nm / 663 nm) fluoreszcens membránfestéket alkalmaztunk a hozzáadott sejtek jelölésére. Ez a lipofil indokarbocianin festék a sejtek plazmamembránjába épül be az inkubálás során, amely jelölés napokig megmarad. A festéket 1:2000-es hígításban alkalmaztuk (500 nM). A konfokális mikroszkóppal 633 nm-es hélium-neon lézerrel történt a gerjesztés, a mérés pedig 650LP filter után történt. Az áramlási citométer használata során 635 nm-es vörös dióda-lézert használtunk a gerjesztéshez, a mérés pedig egy 670LP filter közbeiktatásával történt.

### **3.6 A hozzáadott sejtek PARP inhibitor előkezelése**

A kísérleteinkben használt PJ34 (Inotek Pharmaceuticals Corp., Beverly, MA, USA) egy fenantridinon származék, *in vitro* citoprotektív hatással bír, dózisfüggően csökkenti a stimulált makrofágok pro-inflammatorikus citokin és kemokin termelését [291]. *In vivo* miokardiális infarktus modellben pedig kardioprotektív hatással bírt, csökkentve az infarktusméretet és javítva a funkció visszanyerését [292].

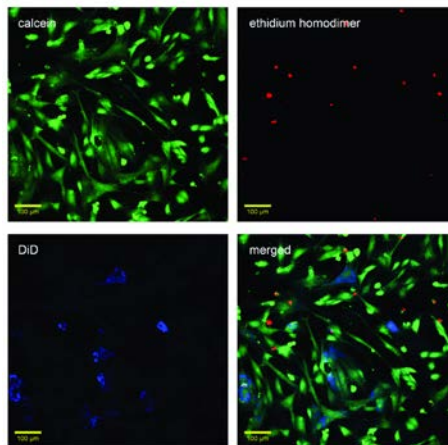
A sejtek PJ34 PARP inhibitorral történő előkezelése 1 órán keresztül zajlott normál sejt kultúrák körülmények között, a sejtek tápoldatát kiegészítve a megfelelő koncentrációjúra (10  $\mu$ M vagy 100  $\mu$ M) PJ34-el vagy a kontroll esetében PBS oldattal. Az inkubációs idő letelte után a PARP inhibitor a sejtek kétszeri PBS-es mosásával távolítottuk el. A kezelést közvetlenül az iszkémia-reperfúzió átesett sejtekhez való hozzáadás előtt végeztük.

### 3.7 hASC kondicionált médium

A hASC kondicionált médium (AKM) előállításához hASC sejteket inkubáltunk 100 mm-es Petri-csészében, 10 000 sejt/cm<sup>2</sup> konfluenciával, 8 ml 1 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomocinnal kiegészített DMEM médiumban, 37°C-os, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú, 100%-os páratartalmú atmoszférával rendelkező inkubátorban. 48 óra után a médiumot leszívtuk és félreraktuk a kísérletekhez.

### 3.8 Konfokális mikroszkóp

Az EthD gerjesztéshez 543 nm-es hélium-neon lézert használtunk, a mérés pedig 583/55 filter után történt. A calcein gerjesztéshez 488 nm-es argon lézert használtunk, a mérés pedig 517/25 filterrel történt. A Vybrant DiD esetében 633 nm-es hélium-neon lézerral történt a gerjesztés, a mérés pedig 650LP filter után történt. A 13. ábra egy reprezentatív képet mutat, melyen a halott sejtek magja pirosan (EthD festődés), az élő sejtek citoplazmája zölden (calcein festődés), a terápiásan alkalmazott sejtek pedig kéken (DiD festődés) jelennek meg.



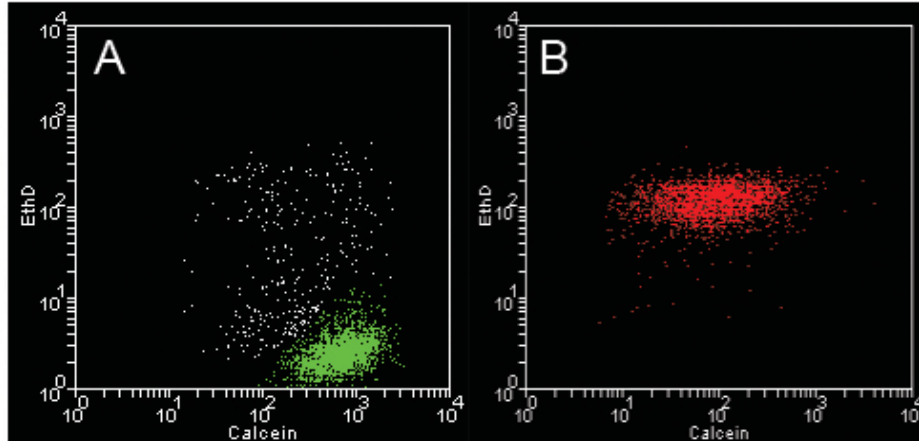
**13. ábra:** Az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett kardiomioblasztok a hozzáadott őssejtekkel, 24 óra kokultúra után. A konfokális mikroszkóppal készített reprezentatív kép. Zöld – calcein jel az élő sejtek citoplazmájában, piros – az elhalt sejtek magját festő ethidium homodimer jele, kék – a terápiásan használt őssejtek vybrant DiD festékkel történt membránjelölése, merged – mindhárom csatorna együttes képe. A skála 100 µm-es

### 3.9 Áramlási citometria

Kísérleteink során 24 órával a szimulált iszkémiás sértést követően tripszinációval választottuk fel a sejteket a tenyésztőlemez felületéről, majd 8 perc 1200 rpm-en végzett centrifugálást követően az élő/halott festékek PBS oldatában reszuszpendáltuk a pelletet. A calceint 1:12000-es, azt EthD-t pedig 1:3000-es hígításban alkalmaztuk. A mérésekhez BD Biosciences, FACSCalibur áramlási citométert és a CellQuest programot használtunk.

Az áramlási citométer kalibrálásához az élő kontroll standard sejt kultúrák körülmények közt fenntartott, kezeletlen H9c2 sejtek voltak, a kísérleti csoportokkal azonos festést alkalmazva. A halott kontrollhoz pedig standard sejt kultúrák körülmények közt fenntartott H9c2 sejteket 1 óráig 10 mM-os  $H_2O_2$ -dal inkubáltuk, melyeket a kísérleti csoportokkal azonos módon festettünk.

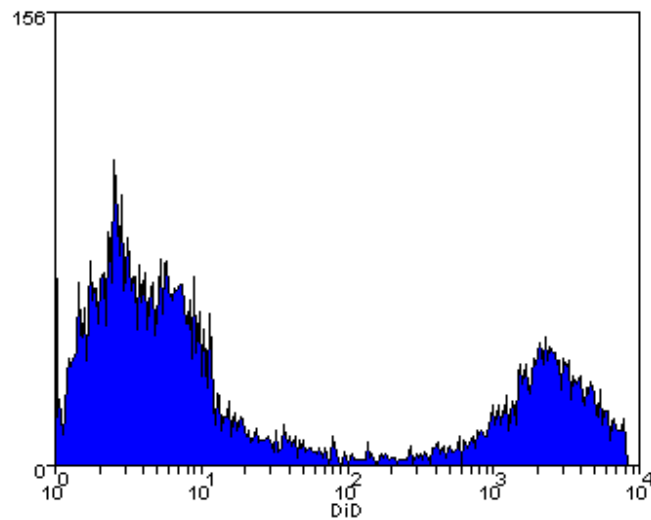
A várakozásnak megfelelően, az áramlási citometriánál használt kontrollok közül a halott kontroll EthD-rel festődött, calceinnel nem, az élő kontroll pedig calceinnel festődött, de EthD-rel nem (14. ábra).



**14. ábra:** Az áramlási citometriás kontrollok. A) erős calcein festődést mutató élő kontroll B) erős ethidium homodimer festődést mutató, 10 mM  $H_2O_2$ -dal előlt halott kontroll. EthD – ethidium homodimer

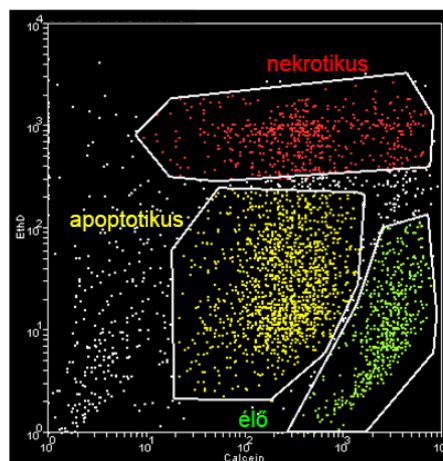
A terápiásan alkalmazott sejtek DiD jelölése egyértelműen elkülönítette őket a sértésen átesett, jelöletlen sejtektől. A kísérletek során a DiD jel alapján történő, úgynevezett

kapuzással különböztettük meg az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejteket és a hozzáadott terápiás sejteket (15. ábra).



**15. ábra:** A DiD festék hisztogramján egyértelműen elkülönül az iszkémiás sértésen átesett jelöletlen sejtek és DiD membránfestékkel jelölt terápiásan alkalmazott sejtek csoportja

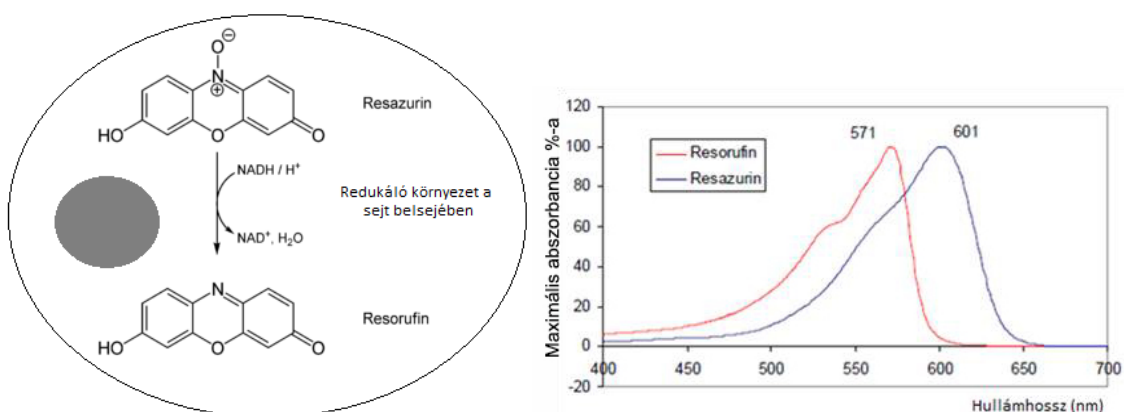
A kísérleti csoportokban az EthD-Calcein dot-ploton megtalálható (16. ábra) a calceinnel erősen festődő élő és az EthD-val erősen festődő nekrotikus sejt populáció, ezen túl megjelent egy köztes festődésű, apoptotikusnak definiálható [293] sejt populáció is.



**16. ábra:** A calcein-ethidium homodimer dot-plot-on 3 sejt populáció különíthető el: az erős calcein festődésű élő sejtek populációja, az erős ethidium homodimer festődésű nekrotikus sejtek populációja és a köztes festődési apoptotikus sejt populáció EthD – ethidium homodimer

### 3.10 Metabolikus aktivitás mérése

Az élő sejtek redukáló képességét felhasználva lehetséges a sejtproliferáció és anyagcsere-intenzitás kvantitatív mérése. Számos módszer ismert az irodalomban, amely ezen az elven működik, jelen méréseinkben a PrestoBlue reagenst alkalmaztuk. A reagens membránpermeabilis, kék színű resazurin komponenst tartalmaz, amely nem fluoreszcens. Az élő sejtekben piros színű erősen fluoreszcens resorufin vegyületté redukálódik. A kiértékelés elvégezhető fluoreszcencia méréssel vagy két hullámhosszon történő abszorbanciaméréssel, ugyanis a redukció során a festék abszorbanciája eltolódik 600 nm-ről (resazurin) 570 nm-re (resorufin) (17. ábra).

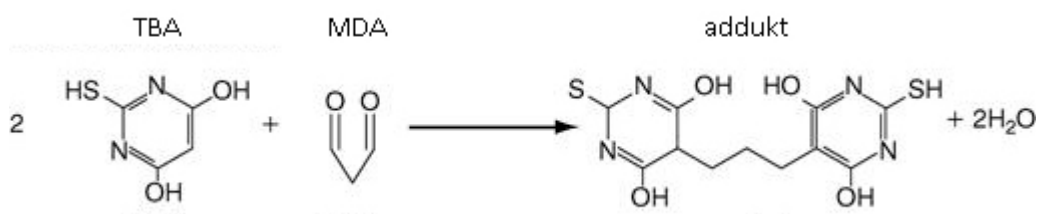


**17. ábra:** Az alkalmazott metabolikus aktivitás mérés a resazurin festék sejteken belül bekövetkező redukciója során létrejött abszorbancia eltolódáson alapul.

A metabolikus aktivitás mérését 24 órával a szimulált iszkémia-reperfúzió után végeztük. A 12 lyukú lemezen a médiumot lecseréltük lyukanként 1 ml friss 10% PrestoBlue reagenssel kiegészített médiumra. 24 órás standard sejtkultúras körülmények közti inkubáció (az alacsony sejtszám miatt volt szükség ilyen hosszú inkubációra) után 200 µl médiumból 570 és 600 nm-en mértük az abszorbancia értékeket. A gyártó utasításainak megfelelően az 570 nm-en mért abszorbancia értékeket a 600 nm-en mért abszorbancia értékekkel normalizáltuk (az 570 nm-en mért abszorbancia értékből kivontuk a 600 nm-en mért abszorbancia értéket).

### 3.11 Malondialdehyd mérés

Az iszkémiás szívizomsérülés során keletkező reaktív oxigén vegyületek lipidperoxidációt okozhatnak. A malondialdehyd (MDA) a többszörösen telített zsírsavak peroxidációjának leginkább alkalmazott markere. A mennyiségi analízis többnyire a tiobarbitursavval (TBA) adott reakcióján alapul, melyet magas hőmérsékleten, savas körülmények között kell véghezvinni. A két TBA és egy MDA molekula kondenzációjával keletkező vegyület 532 nm-en spektrofotométerrel detektálható (18. ábra) [294].

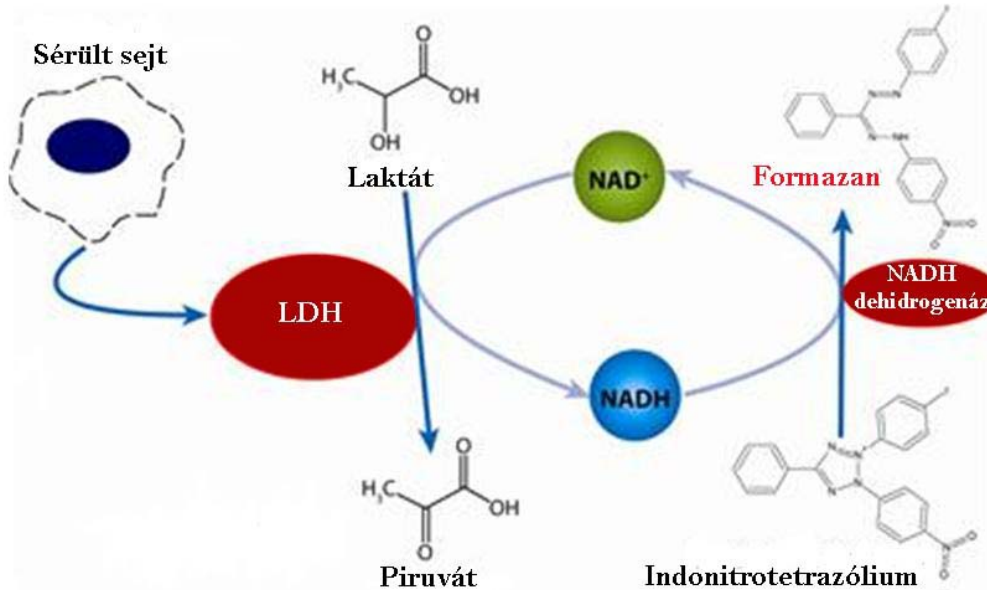


**18. ábra:** A malondialdehyd kimutatása a tiobarbitursavval adott színes reakciótermék spektrofotometriás detektálásával történik. MDA – malondialdehyd; TBA - tiobarbitursav

A malondialdehyd mérését a szimulált iszkémia befejezése után 5 órával végeztük, a médiumból, mivel irodalmi adatok szerint az MDA koncentráció ebben az időpontban éri el a maximumát [295]. A méréshez szükséges oldatok összekészítése 1,5 ml űrtartalmú Eppendorf csövekben történt. Először 50  $\mu\text{l}$  8,1%-os SDS oldat, majd 375  $\mu\text{l}$  20%-os ecetsav oldat, majd 150  $\mu\text{l}$  desztillált víz került bemérésre. Ezután következett 50  $\mu\text{l}$  bemérése a malondialdehyd kalibrációs sor elemeiből (0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 8  $\mu\text{M}$ , 16  $\mu\text{M}$ ) vagy a mintákból. A kalibrációs sor elkészítése 3 mM koncentrációjú törzsoldatból a H9c2 sejtekhez használt médiummal történt, hogy a felhasznált oldószer ne okozzon eltérést az abszorbanciákban. Utolsó lépésként a reakció elindítása frissen készített, 95°C-os, 0,8%-os tiobarbitursav (375  $\mu\text{l}$ ) hozzáadásával történt. A reakcióelegy 1 órán keresztül vízfürdőben 95°C-on inkubálódott. Az abszorbanciát a reakcióelegy 200  $\mu\text{l}$ -éből 96 lyukú lemezen, triplikátumban mértünk 532 nm-en [295].

### 3.12 Laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérés

A laktát-dehidrogenáz enzimaktivitás mérése egy kapcsolt reakció segítségével történik. Ennek során a laktát-dehidrogenáz enzim (LDH) a tejsavat piruváttá alakítja, a reakcióban keletkezett redukált koenzim pedig az indonitrotetrazólium formazánná redukálása során regenerálódik (19. ábra).



**19. ábra:** A sérült sejtekből felszabaduló laktát-dehidrogenáz mennyiségét egy kapcsolt reakció színes végtermékének spektrofotometriás mérésével határozzuk meg.

A laktát-dehidrogenáz mérését a szimulált iszkémia befejezése után 24 órával végeztük. A negatív kontrollhoz használt sejteket normál körülmények között tenyésztettük (5% CO<sub>2</sub>, 90-95% páratartalom, 37 °C), ezt vettük 0%-os LDH felszabadulásnak. A pozitív kontrollhoz használt sejteket a mérés megkezdése előtt 30 perccel pár csepp Triton-X-szel kezeltük, ezáltal a sejteket lizáltuk, ezt tekintettük 100%-os LDH felszabadulásnak. A mérés a sejteken található médiumból történt. A méréseket triplikátumban egy 96 lyukú-lemezen, 100 µl mintából végeztük. Lyukanként 100 µl reagens oldat hozzáadása után 30 perc időtartamú sötét inkubáció következett. Az abszorbancia értékek mérése két hullámhosszon történt: 490 nm-en, ahol a formazánnak van elnyelése és 650 nm-en, ahol a reakciótermék nem ad jelet, ez a referencia hullámhossz. A mérést követően a

referenciával korrigáltunk (a 490 nm-en mért abszorbanciaértékből kivontuk a 650 nm-en mért abszorbanciaértéket).

### 3.13 *Kísérleti protokollok*

#### 3.13.1 Iszkémia-reperfúzió modell jellemzése

A kísérletek során 12 lyukú lemezeket használtunk és a lemezre a szimulált iszkémiás sértést megelőző nap lyukanként 100 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet raktunk ki 1 ml médiumban. A kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd lyukanként 3 ml glükózmentes médiumot pipettáztunk a sejtekre. A sejteket 160 percig 0,5% oxigén ( $\approx 4$  Hgmm) és 99,5% nitrogén összetételű atmoszférában, 37°C-on inkubáltuk. A hipoxiás inkubáció után a médiumot lyukanként 3 ml 5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100  $\mu$ g/ml sztreptomocinnal kiegészített DMEM médiumra cseréltük, ezután a sejteket 37°C-os, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú, nedvesített atmoszférájú inkubátorba helyeztük a kiértékelésig.

A laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérését a szimulált iszkémia befejezése után 24 órával végeztük a sejtek médiumából.

A malondialdehid mérését a szimulált iszkémia befejezése után 5 órával végeztük, a sejtek médiumából.

#### 3.13.2 Csontvelő és zsírszövet eredetű őssejtek hatásainak összehasonlítása *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellben

A kísérletek során 12 lyukú lemezeket használtunk és a lemezre a szimulált iszkémiás sértést megelőző nap lyukanként 30 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet raktunk ki 1 ml médiumban. A kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd lyukanként 3 ml glükózmentes médiumot pipettáztunk a sejtekre. A sejteket 160 percig 0,5% oxigén ( $\approx 4$  Hgmm) és 99,5% nitrogén összetételű atmoszférában, 37°C-on inkubáltuk. A hipoxiás inkubáció után a különböző csoportokat az alábbiak szerint kezeltük:

- Kezeletlen csoport (I-R modell): a médiumot lyukanként 3 ml 5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml



penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített DMEM médiumra cseréltük,

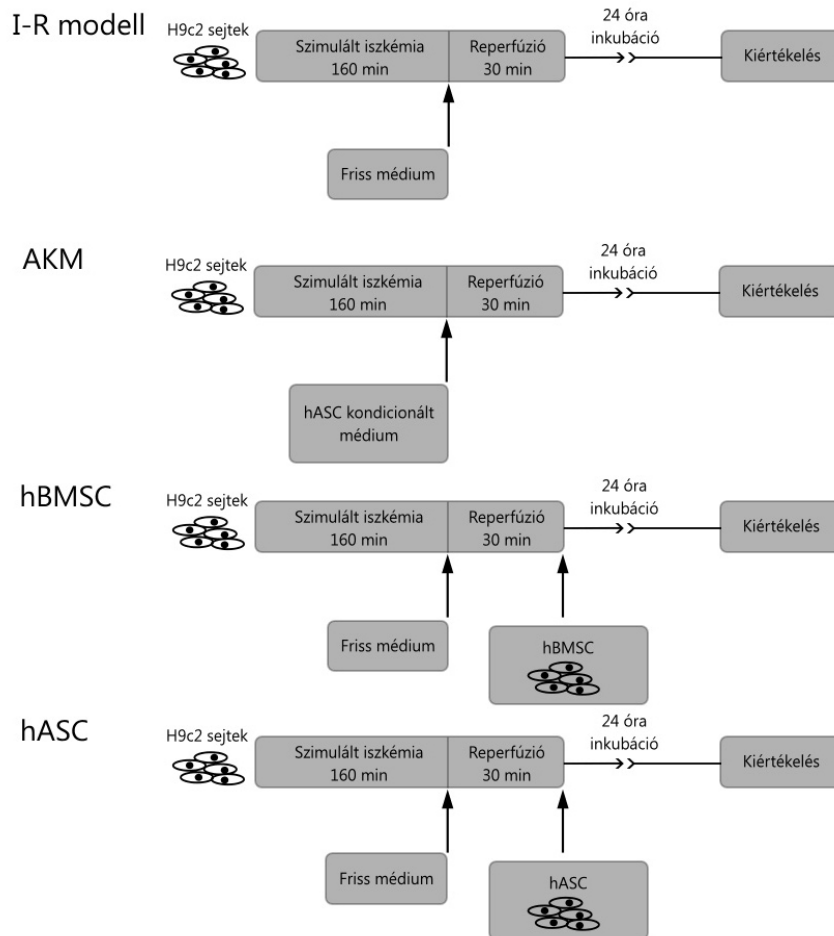
- ASC kondicionált médiummal (AKM) kezelt csoport: a médiumot lyukanként 3 ml ASC kondicionált médiumra cseréltük,
- hBMSC-vel kezelt csoport (hBMSC): a médiumot lyukanként 3 ml 5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített DMEM médiumra cseréltük, majd 30 perccel a reoxigenizáció után 20 000 DiD jelölt hBMSC-tadtunk hozzá.
- hASC-vel kezelt csoport (hASC): a médiumot lyukanként 3 ml 5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100 µg/ml sztreptomicinnel kiegészített DMEM médiumra cseréltük, majd 30 perccel a reoxigenizáció után 20 000 DiD jelölt hASC-tadtunk hozzá.

Ezek után a sejteket 37°C-os, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú, 100%-os páratartalmú atmoszférával rendelkező inkubátorba helyeztük a kiértékelésig.

Az áramlási citometriás mérést a szimulált iszkémia-reperfúzió befejezése után 24 órával végeztük.

A laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérését a szimulált iszkémia-reperfúzió befejezése után 24 órával végeztük a sejtek médiumából. Ez a módszer nem képes különbséget tenni a terápiásan alkalmazott sejtek és az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közt, azok együttes populációjáról adnak információkat. A különböző csoportok a kísérleti protokollból adódóan eltérő számú sejtet tartalmaztak (kontroll csoport -30 000 H9c2 sejt; ASC kondicionált médiummal kezelt csoport – 30 000 H9c2 sejt; hBMSC-vel kezelt csoport - 30 000 H9c2 sejt és 20 000 hBMSC; hASC-vel kezelt csoport - 30 000 H9c2 sejt és 20 000 hASC). Az ebből adódó különbségeket a teljes sejtszámmal való normalizálással korrigáltuk.

A metabolikus aktivitás mérését a szimulált iszkémia-reperfúzió befejezése után 24 órával végeztük. A hBMSC-vel és hASC-vel kezelt csoportokban, hogy kiküszöböljük a hozzáadott őssejtek metabolizmusából adódó különbséget, a mért értékből kivontuk 20 000 őssejt metabolikus aktivitás értékét (20. ábra).



**20. ábra:** Csontvelő és zsírszövet eredetű őssejtek iszkémia-reperfúziós sértésen átesett kardiomioblasztokra kifejtett hatásainak összehasonlításához alkalmazott protokoll. hBMSC – humán csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek; hASC – humán zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek

### 3.13.3 Terápiás sejtek PJ34 PARP inhibitorral való előkezelésének hatása *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellben

#### 3.13.3.1 Előkísérletek

A PJ34 citotoxicitásának meghatározását 96 lyukú lemezen, 10 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet tartalmazó csoportokon végeztük. A sejtek tápoldatát kiegészítettük a megfelelő koncentrációjúra (10  $\mu$ M vagy 100  $\mu$ M) PJ34-el vagy a kontroll esetében PBS oldattal. Egy óra normál sejt kultúrás inkubáció után a kiértékelést LDH felszabadulás méréssel végeztük.

A PARP oxidatív stressz elleni protektív hatásának vizsgálatát 96 lyukú lemezen, 10 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet tartalmazó csoportokon végeztük. A sejtek tápoldatát kiegészítettük a megfelelő koncentrációjúra (10  $\mu$ M vagy 100  $\mu$ M) PJ34-el vagy a kontroll esetében azonos térfogatú PBS oldattal. Egy óra normál sejt kultúrás inkubáció után hidrogén-peroxidot adtunk a lyukakba (400  $\mu$ M végső koncentráció). Két óra inkubáció után a kiértékelést LDH felszabadulás méréssel végeztük.

### 3.13.3.2 Kísérletek

A kísérletek során 12 lyukú lemezeket használtunk és a lemezre a szimulált iszkémiás sértést megelőző nap lyukanként 30 000 H9c2 kardiomioblaszt sejtet raktunk ki 1 ml médiumban. A kezelés előtt a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, majd lyukanként 3 ml glükózmentes médiumot pipettáztunk rájuk. Ezután a sejteket 160 percig 0,5% oxigén ( $\approx$ 4 Hgmm) és 99,5% nitrogén összetételű atmoszférában, 37°C-on inkubáltuk. A hipoxiás inkubáció után a médiumot lyukanként 3 ml 5 g/l glükózt és 4 mM L-glutamint tartalmazó, 10% magzati marha szérummal valamint 100 U/ml penicillinnel és 100  $\mu$ g/ml sztreptomocinnel kiegészített DMEM médiumra cseréltük

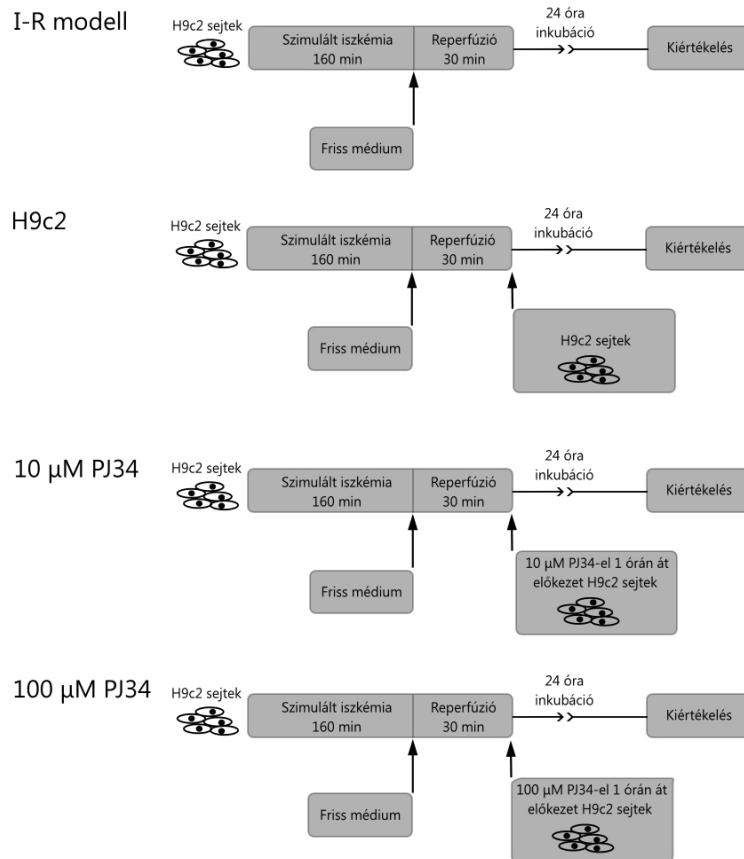
A hipoxiás inkubáció után a különböző csoportokat az alábbiak szerint kezeltük:

- Kezeletlen csoport (I-R modell): semmilyen további kezelésben nem részesült,
- H9c2 kardiomioblasztokkal kezelt csoport (H9c2): 30 perccel a reoxigenizáció után 20 000 DiD jelölt H9c2 kardiomioblaszt sejtet adtunk hozzá.
- 10  $\mu$ M PJ34-el előkezelt H9c2 kardiomioblasztokkal kezelt csoport (10  $\mu$ M PJ34): 30 perccel a reoxigenizáció után 20 000 DiD jelölt 10  $\mu$ M PJ34-el 1 órán át előkezelt H9c2 kardiomioblaszt sejtek adtunk hozzá.
- 100  $\mu$ M PJ34-el előkezelt H9c2 kardiomioblasztokkal kezelt csoport (100  $\mu$ M PJ34): 30 perccel a reoxigenizáció után 20 000 DiD jelölt 100  $\mu$ M PJ34-el 1 órán át előkezelt H9c2 kardiomioblaszt sejtek adtunk hozzá.

Ezek után a sejteket 37°C-os, 5% CO<sub>2</sub> tartalmú, 100%-os páratartalmú atmoszférával rendelkező inkubátorba helyeztük a kiértékelésig (21. ábra).

Az áramlási citometriás mérést a szimulált iszkémia-reperfúzió befejezése után 24 órával végeztük. A laktát-dehidrogenáz felszabadulás mérését a szimulált iszkémia-

reperfúzió befejezése után 24 órával végeztük a sejtek médiumából. A metabolikus aktivitás mérést a szimulált iszkémia-reperfúzió befejezése után 24 órával végeztük.



**21. ábra:** Terápiás sejtek PJ34 PARP inhibitorral való előkezelésének hatását vizsgáló protokoll

### 3.14 Adatelemzés és statisztika

Az áramlási citometriás adatok kiértékeléséhez a Weasel programot (The Walter and Eliza Hall Institute, Parkville, VIC, Australia), a statisztikai elemzés és a diagramok elkészítéséhez a Graphpad Prism programot (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) használtuk. A statisztikai kiértékeléshez kétoldali kétmintás páratlan t-próbát, illetve egy utas varianciaanalízist (ANOVA) és Newman-Keuls post hoc tesztet végeztünk. Az eredmények minden esetben átlag  $\pm$  SEM alakban kerültek megadásra. A 0,05-nél kisebb p értékeket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

## 4 Eredmények

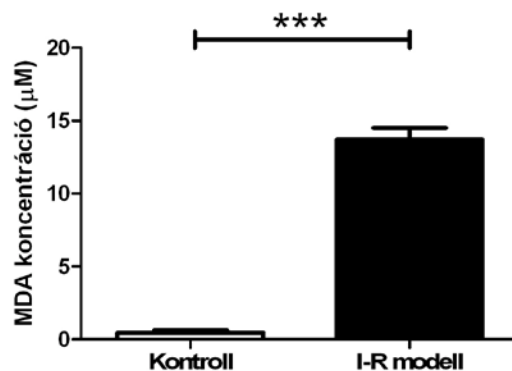
### 4.1 Iszkémia-reperfúzió modell jellemzése

Áramlási citometriás méréseink alapján az iszkémia-reperfúzió modell szignifikánsan csökkentette az élő sejtek számát ( $12,13 \pm 0,75\%$ ) a kezeletlen kontrollhoz ( $90,36 \pm 2,60\%$ ) képest (22. ábra).



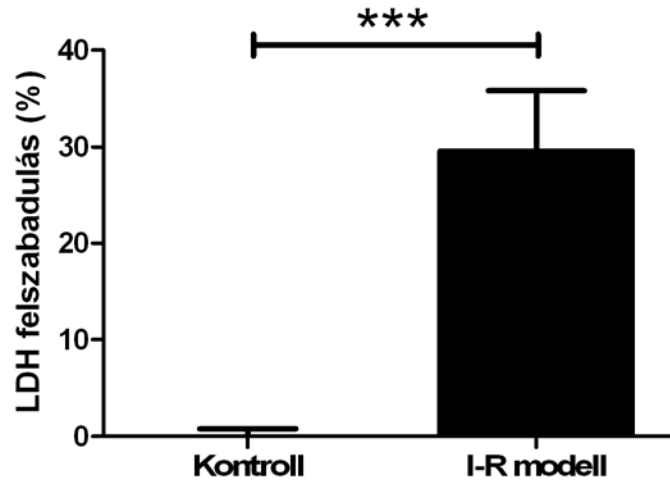
**22. ábra:** Az áramlási citometriás mérés szerint az iszkémia-reperfúzió modell szignifikánsan csökkentette az élő sejtek számát. Kontroll:  $90,36 \pm 2,60\%$ , I-R modell:  $12,13 \pm 0,75\%$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , kétoldali t-próba,  $n = 7-31$

Az oxidatív stressz mértéke az MDA szint meghatározás alapján szignifikánsan emelkedett az iszkémia-reperfúzió modellben ( $13,70 \pm 0,81 \mu\text{M}$ ), a kezeletlen kontrollhoz ( $0,47 \pm 0,18 \mu\text{M}$ ) képest (23. ábra).



**23. ábra:** A malondialdehid-szint meghatározás alapján az iszkémia-reperfúziós sértés szignifikáns oxidatív stresszt okozott. Kontroll:  $0,47 \pm 0,18 \mu\text{M}$ , I-R modell:  $13,70 \pm 0,81 \mu\text{M}$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , kétoldali t-próba,  $n = 6$

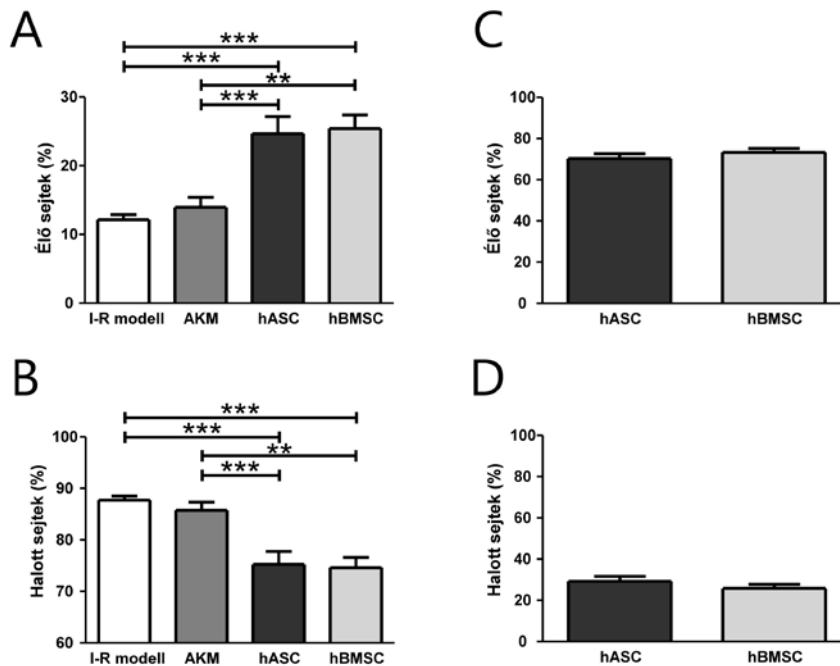
Az iszkémia-reperfúzió modell a médiumból mért LDH-szint szignifikáns emelkedéséhez vezetett ( $29.58 \pm 6.21\%$ ) a kezeletlen kontrollhoz ( $0.00 \pm 0.81\%$ ) képest (24. ábra).



**24. ábra:** Az iszkémia-reperfúziós sértés szignifikánsan növelte a laktát-dehidrogenáz felszabadulást. Kontroll:  $0,00 \pm 0,81\%$ , I-R modell:  $29,58 \pm 6,21\%$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , kétoldali t-próba,  $n=12$

#### 4.2 Csontvelő és zsírszövet eredetű őssejtek hatásainak összehasonlítása *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellben

Kísérleteinkben az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek túlélése a kezeletlen csoportban  $12,13 \pm 0,75\%$  volt. A túlélő kardiomioblasztok aránya szignifikánsan emelkedett mind a hASC-vel ( $24,66 \pm 2,49\%$ ), mind a hBMSC-vel ( $25,41 \pm 1,99\%$ ) kezelt csoportokban, a kondicionált médiummal kezelt csoportban ( $13,94 \pm 1,44\%$ ) nem találtunk szignifikáns változást. A csontvelő eredetű mesenchymális őssejtekkel és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtekkel kezelt csoportok közt nem volt szignifikáns különbség, viszont mindkét őssejttel kezelt csoportban szignifikánsan nagyobb volt a poszt-iszkémiás sejtek túlélése, mint a kondicionált médiummal kezelt csoportban (25A ábra).



**25. ábra:** Áramlási citometriás eredmények. A) Az élő poszt-iszkémiás sejtek aránya. I-R modell:  $12,13 \pm 0,75\%$ , AKM:  $13,94 \pm 1,44\%$ , hASC:  $24,66 \pm 2,49\%$ , hBMSC:  $25,41 \pm 1,99\%$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=17-31$  B) A halott poszt-iszkémiás sejtek aránya. I-R modell:  $87,71 \pm 0,82\%$ , AKM:  $85,75 \pm 1,57\%$ , hASC:  $75,24 \pm 2,49\%$ , hBMSC:  $74,62 \pm 1,99\%$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ , ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=17-31$  C) Az élő terápiás sejtek aránya. hASC:  $70,30 \pm 2,35\%$ , hBMSC:  $73,30 \pm 1,92\%$ .  $n=17-31$  D) A halott terápiás sejtek aránya. hASC:  $29,20 \pm 2,42\%$ , hBMSC:  $25,81 \pm 1,89\%$ .  $n=17-31$

Az iszkémia-reperfúziós sértés után kezelés nélkül a poszt-iszkémiás sejtek  $87,71 \pm 0,82\%$ -a pusztult el. Ez az érték szignifikánsan kisebb volt a hASC és hBMSC kezelt csoportokban (hASC:  $75,24 \pm 2,49\%$ ; hBMSC:  $74,62 \pm 1,99\%$ ), de nem változott szignifikánsan a kondicionált médiummal kezelt csoportban (AKM:  $85,75 \pm 1,57\%$ ). A hASC és hBMSC kezelt csoportok közt nem volt szignifikáns különbség (25B ábra).

A hozzáadott terápiás sejteket vizsgálva azt találtuk, hogy a hozzáadott őssejtek túlnyomó többsége életben volt, mind a hASC-k ( $70,30 \pm 2,35\%$ ), mind a hBMSC-k ( $73,30 \pm 1,92\%$ ) használata esetén és nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a két csoport közt (25C ábra). Nem volt szignifikáns különbség az elpusztult őssejtek arányában sem (hASC:  $29,20 \pm 2,42\%$ , hBMSC:  $25,81 \pm 1,89\%$ ) (25D ábra).

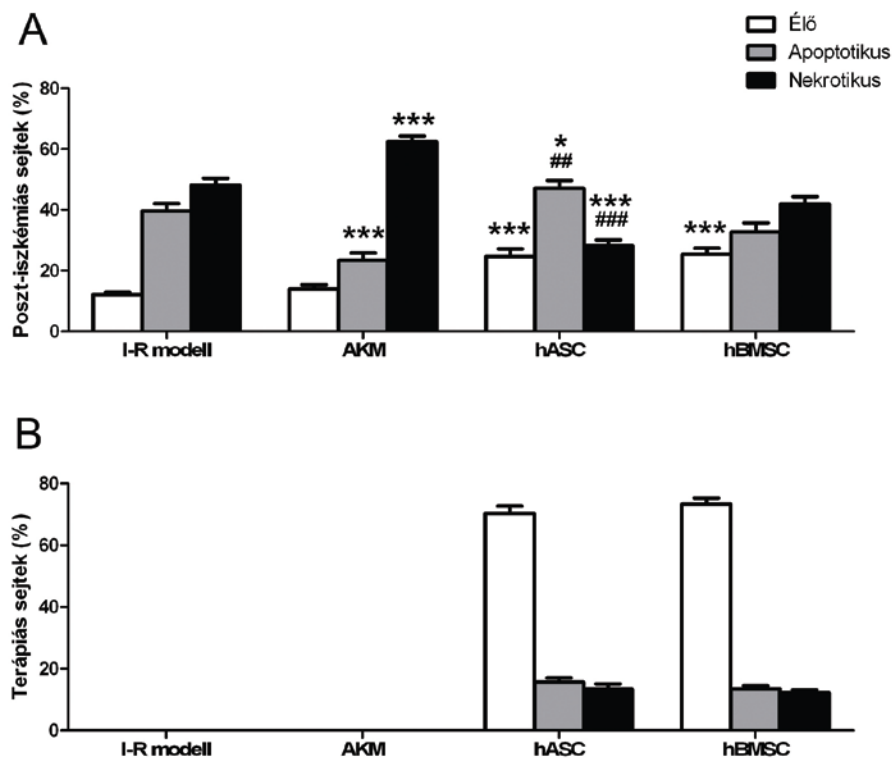
PhD munkám összefoglalása kapcsán elvégeztem egy, a PJ34-es kísérleteknél bevezetett, részletesebb kiértékelést is a nyers adatokból, melynek során a nekrotikus és apoptotikus sejtek külön értékelhetők (26. ábra).

Az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közül az apoptotikus sejtek aránya  $39,62 \pm 2,44\%$  volt a kezeletlen csoportban, mely érték szignifikánsan alacsonyabb volt a kondicionált médiummal kezelt ( $23,36 \pm 2,51\%$ ) és a hASC-vel kezelt (hASC:  $47,08 \pm 2,61\%$ ) csoportokban, de nem változott szignifikánsan a hBMSC-vel kezelt csoportban (hBMSC:  $32,75 \pm 2,92\%$ ). A hASC-vel kezelt csoportban szignifikánsan magasabb volt a poszt-iszkémiás apoptotikus sejtek aránya, mint a hBMSC kezelt csoportban (26A ábra).

A kezeletlen csoportban az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közül a nekrotikus sejtek aránya  $48,09 \pm 2,28\%$  volt, mely érték szignifikánsan csökkent a hASC-vel kezelt csoportban ( $28,16 \pm 1,94\%$ ), szignifikánsan nőtt a kondicionált médiummal kezelt csoportban ( $62,39 \pm 1,89\%$ ) és nem változott szignifikánsan a hBMSC-vel kezelt csoportban ( $41,88 \pm 2,46\%$ ). A hASC-vel kezelt csoportban szignifikánsan alacsonyabb volt a poszt-iszkémiás nekrotikus sejtek aránya a hBMSC-vel kezelt csoporthoz képest (26A ábra).

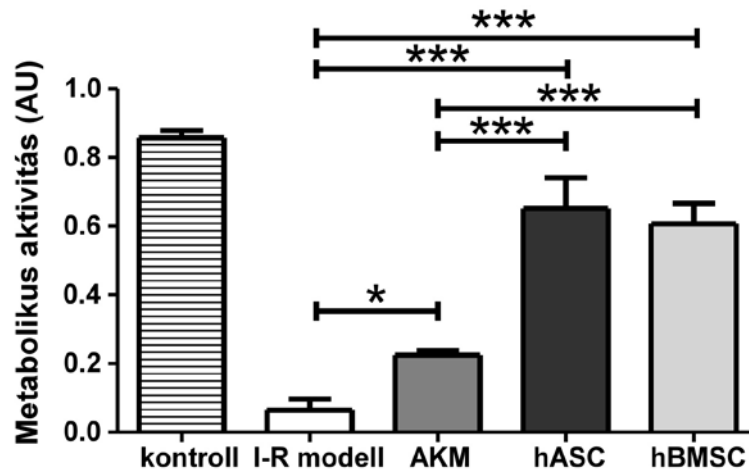
A hozzáadott terápiás sejteket vizsgálva nem volt szignifikáns különbség a két csoport között az apoptotikus (hASC:  $15,79 \pm 1,22\%$ , hBMSC:  $13,51 \pm 1,02\%$ ) és a nekrotikus (hASC:  $13,41 \pm 1,67\%$ , hBMSC:  $12,29 \pm 0,96\%$ ) őssejtek arányában sem (26B ábra).





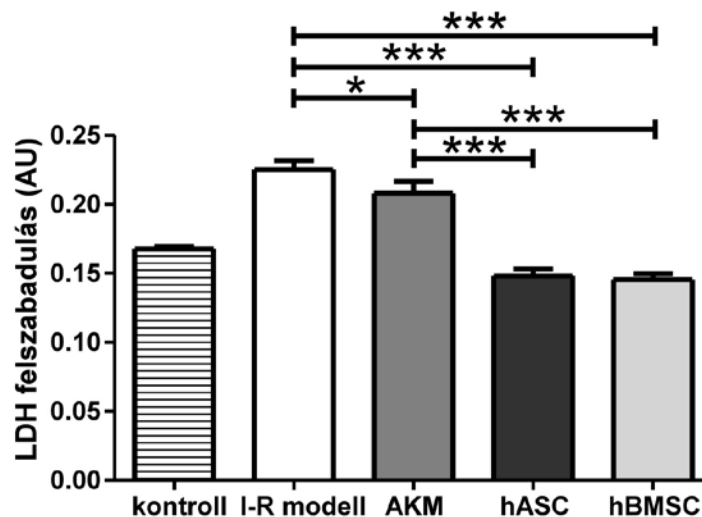
**26. ábra:** Áramlási citometriás mérés. A) Az élő, apoptotikus és nekrotikus poszt-izskémiás sejtek aránya. I-R modell: élő:  $12,13 \pm 0,75\%$ , apoptotikus:  $39,62 \pm 2,44\%$ , nekrotikus:  $48,09 \pm 2,28\%$ ; AKM: élő:  $13,94 \pm 1,44\%$ , apoptotikus:  $23,36 \pm 2,51\%$ , nekrotikus:  $62,39 \pm 1,89\%$ ; hASC: élő:  $24,66 \pm 2,49\%$ , apoptotikus:  $47,08 \pm 2,61\%$ , nekrotikus:  $28,16 \pm 1,94\%$ ; hBMSC: élő:  $25,41 \pm 1,99\%$ , apoptotikus:  $32,75 \pm 2,92\%$ , nekrotikus:  $41,88 \pm 2,46\%$ . \*\*:p<0,01 vs. I-R modell, \*\*\*:p<0,001 vs. I-R modell, #:p<0,01 vs. hBMSC, ###:p<0,001 vs. hBMSC, ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt, n=17-31 B) Az élő, apoptotikus és nekrotikus terápiás össejtek aránya. hASC: élő:  $70,30 \pm 2,35\%$ , apoptotikus:  $15,79 \pm 1,22\%$ , nekrotikus:  $13,41 \pm 1,67\%$ ; hBMSC: élő:  $73,30 \pm 1,92\%$ , apoptotikus:  $13,51 \pm 1,02\%$ , nekrotikus:  $12,29 \pm 0,96\%$ . n=17-31

A metabolikus aktivitás mérése megerősítette az áramlási citometriás eredményeinket. A sejtek metabolikus aktivitása szignifikánsan magasabb volt hASC ( $0,652 \pm 0,089$  AU, önkényes egység) és hBMSC kezelés ( $0,607 \pm 0,059$  AU) után, mint a kezeletlen csoportban ( $0,065 \pm 0,033$  AU). A kondicionált médiummal kezelt csoportban, bár kisebb mértékben, de szintén szignifikánsan emelkedett a metabolikus aktivitás ( $0,225 \pm 0,013$  AU). Nem volt statisztikailag szignifikáns különbség a hASC-vel és a hBMSC-vel kezelt csoportok közt (27. ábra).



**27. ábra:** Metabolikus aktivitás mérés. Kontroll:  $0,858\pm 0,021$  AU, I-R modell:  $0,065\pm 0,033$  AU, AKM:  $0,225\pm 0,013$  AU, hASC:  $0,652\pm 0,089$  AU, hBMSC:  $0,607\pm 0,059$  AU, \*:  $p<0,05$ , \*\*\*:  $p<0,001$ , ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=3$

Az LDH felszabadulás értéke szignifikánsan csökkent a kezeletlen csoporthoz ( $0,225\pm 0,006$  AU) képest, mind a hASC-vel ( $0,148\pm 0,005$  AU), mind a hBMSC-vel kezelt ( $0,146\pm 0,004$  AU) csoportban. A kondicionált médiummal való kezelés ( $0,208\pm 0,009$  AU) egy kisebb, de szintén szignifikáns csökkenést okozott. Nem volt szignifikáns különbség a hASC-vel és a hBMSC-vel kezelt csoportok között (28. ábra).

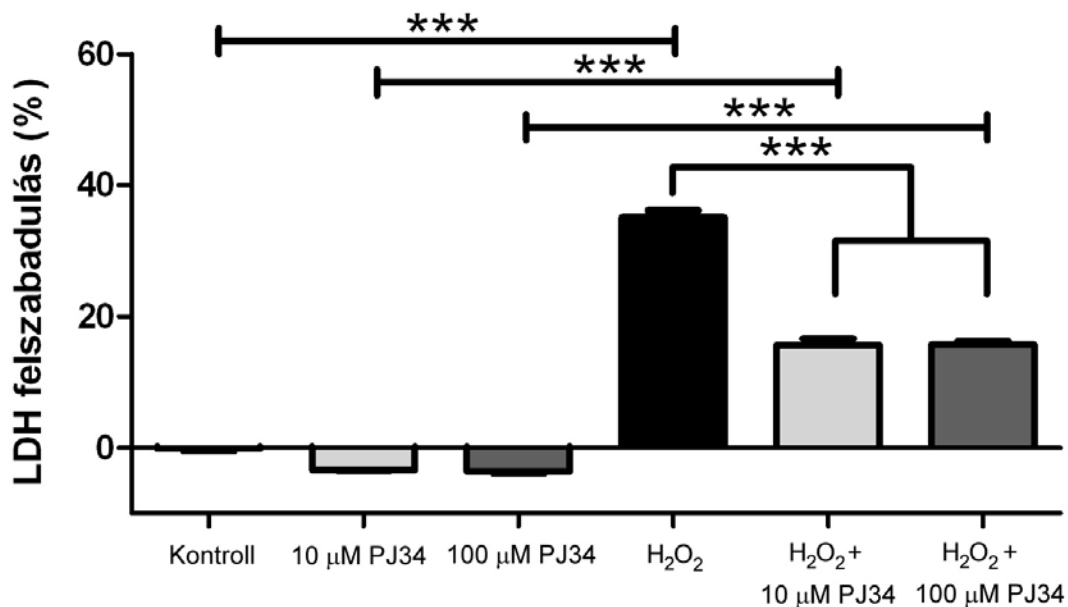


**28. ábra:** Laktát-dehidrogenáz felszabadulás. Kontroll:  $0,167\pm 0,002$  AU, I-R modell:  $0,225\pm 0,006$  AU, AKM:  $0,208\pm 0,009$  AU, hASC:  $0,148\pm 0,005$  AU, hBMSC:  $0,146\pm 0,004$  AU, \*:  $p<0,05$ , \*\*\*:  $p<0,001$ , ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=3$

### 4.3 Terápiás sejtek PJ34 PARP inhibitorral való előkezelésének hatása *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellben

Eredményeink szerint nem növelte az LDH felszabadulást a kontroll csoporthoz képest ( $-0,18 \pm 0,36\%$ ) a PJ34 PARP inhibitorral való 1 órás kezelés sem a  $10 \mu\text{M}$ -os ( $-3,40 \pm 0,16\%$ ), sem a  $100 \mu\text{M}$ -os ( $-3,61 \pm 0,27\%$ ) koncentráció alkalmazása esetén.

A 2 órás  $400 \mu\text{M}$ -os  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezeléssel modellezett oxidatív stressz szignifikánsan növelte az LDH felszabadulás értékét ( $35,14 \pm 1,01\%$ ) a kontroll csoporthoz képest. Az 1 órás PJ34 PARP inhibitor előkezelés szignifikánsan csökkentette  $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés hatását mind a  $10 \mu\text{M}$ -os ( $15,65 \pm 0,95\%$ ) mind a  $100 \mu\text{M}$ -os ( $15,69 \pm 0,54\%$ ) csoportban (29. ábra).



**29. ábra:** PJ34 citotoxicitás és oxidatív stressz elleni védelem. Kontroll:  $-0,18 \pm 0,36\%$ ,  $10 \mu\text{M}$  PJ34:  $-3,40 \pm 0,16\%$ ,  $100 \mu\text{M}$  PJ34:  $-3,61 \pm 0,27\%$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ :  $35,14 \pm 1,01\%$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2 + 10 \mu\text{M}$  PJ34:  $15,65 \pm 0,95\%$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2 + 100 \mu\text{M}$  PJ34:  $15,69 \pm 0,54\%$ . \*\*\*:  $p < 0,001$ , ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=6$

Kísérleteinkben az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek túlélése a kezeletlen csoportban  $36,44 \pm 5,05\%$  volt, amely nem változott szignifikánsan előkezelést nem kapott H9c2-sejtek hozzáadásának hatására ( $42,81 \pm 5,11\%$ ), viszont szignifikánsan emelkedett a  $10 \mu\text{M}$  PJ34 PARP inhibitorral előkezelt terápiás sejtek hozzáadásának hatására ( $52,07 \pm 5,80\%$ ) és a  $100 \mu\text{M}$  PJ34 PARP inhibitorral előkezelt terápiás sejtek hozzáadásának hatására is ( $54,95 \pm 5,55\%$ ).

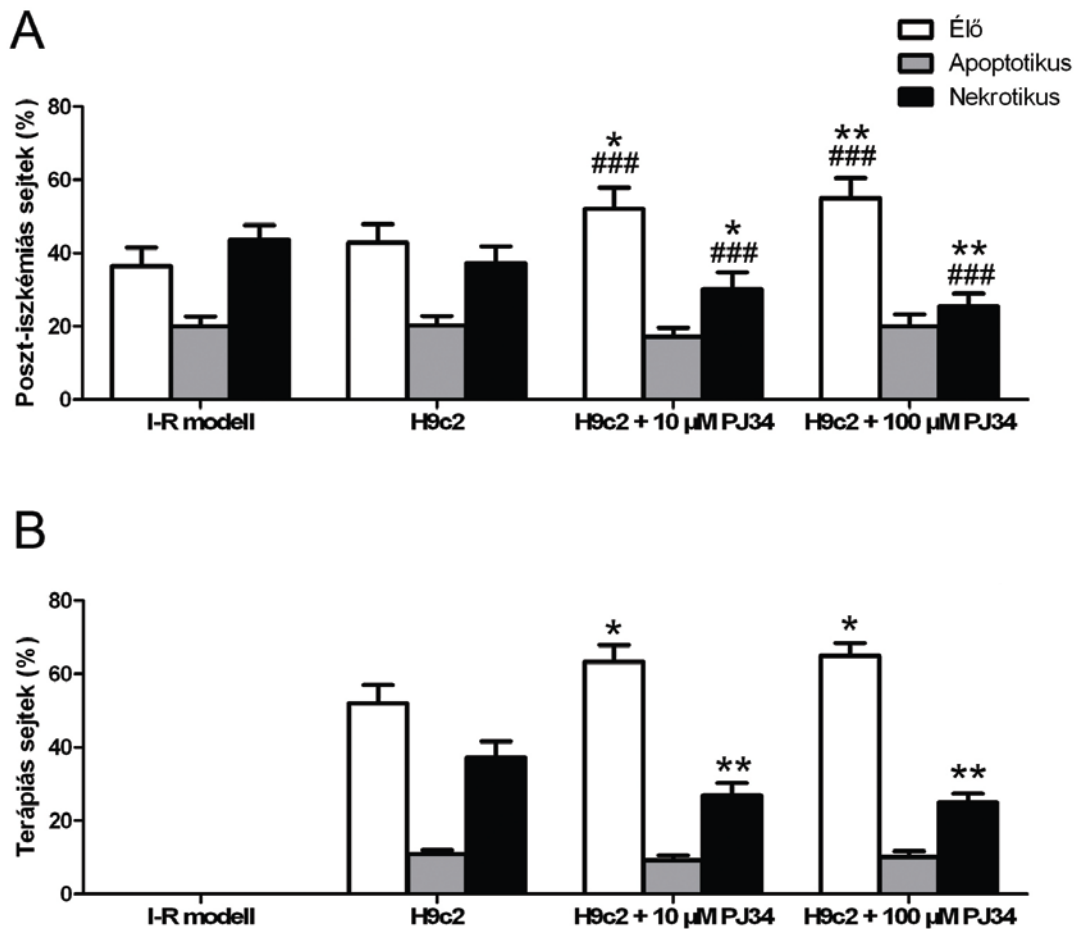
Az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közt az apoptotikus sejtek aránya nem mutatott szignifikáns eltérést a kísérleti csoportok között (I-R modell:  $19,94 \pm 2,75\%$ , H9c2:  $20,23 \pm 2,62\%$ , H9c2 +  $10 \mu\text{M}$  PJ34:  $17,20 \pm 2,42\%$ ; H9c2 +  $100 \mu\text{M}$  PJ34:  $20,05 \pm 3,23\%$ ).

Az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek közt nekrotikus sejtek aránya a kezeletlen csoportban  $43,64 \pm 4,00\%$  volt, amely nem változott szignifikánsan előkezelést nem kapott H9c2-sejtek hozzáadásának hatására ( $37,29 \pm 4,55\%$ ), viszont szignifikánsan csökkent a  $10 \mu\text{M}$  PJ34 PARP inhibitorral előkezelt terápiás sejtek hozzáadásának hatására ( $30,18 \pm 4,60\%$ ) és a  $100 \mu\text{M}$  PJ34 PARP inhibitorral előkezelt terápiás sejtek hozzáadásának hatására is ( $25,52 \pm 3,47\%$ ) (30A ábra).

A hozzáadott terápiás sejteket vizsgálva az eredmények azt mutatják, hogy a PJ34 PARP inhibitorral előkezelt terápiás sejtek túlélése szignifikánsan emelkedett az előkezelést nem kapott terápiás sejtekhez képest (H9c2:  $52,02 \pm 5,01\%$ , H9c2 +  $10 \mu\text{M}$  PJ34:  $63,38 \pm 4,50\%$ , H9c2 +  $100 \mu\text{M}$  PJ34:  $64,99 \pm 3,47\%$ ).

A terápiásan kezelt sejtek közti apoptotikus sejtek arányában nem volt szignifikáns különbség a különböző csoportok közt (H9c2:  $10,87 \pm 1,12\%$ , H9c2 +  $10 \mu\text{M}$  PJ34:  $9,22 \pm 1,28\%$ ; H9c2 +  $100 \mu\text{M}$  PJ34:  $10,18 \pm 1,55\%$ ).

A PJ34 PARP inhibitorral való előkezelés szignifikánsan csökkentette a terápiás sejtek nekrozisát (H9c2:  $37,23 \pm 4,40\%$ , H9c2 +  $10 \mu\text{M}$  PJ34:  $26,83 \pm 3,49\%$ , H9c2 +  $100 \mu\text{M}$  PJ34:  $24,96 \pm 2,43\%$ ) (30B ábra).



**30. ábra:** Áramlási citometriás mérések. A) Az élő, apoptotikus és nekrotikus poszt-iszkémiás sejtek aránya. I-R modell: élő:  $36,44 \pm 5,05\%$ , apoptotikus:  $19,94 \pm 2,75\%$ , nekrotikus:  $43,64 \pm 4,00\%$ ; H9c2: élő:  $42,81 \pm 5,11\%$ , apoptotikus:  $20,23 \pm 2,61\%$ , nekrotikus:  $37,29 \pm 4,55\%$ ; H9c2 + 10  $\mu\text{M}$  PJ34: élő:  $52,07 \pm 5,80\%$ , apoptotikus:  $17,20 \pm 2,42\%$ , nekrotikus:  $30,18 \pm 4,60\%$ ; H9c2 + 100  $\mu\text{M}$  PJ34: élő:  $54,95 \pm 5,55\%$ , apoptotikus:  $20,05 \pm 3,23\%$ , nekrotikus:  $25,52 \pm 3,47\%$ , \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  vs. H9c2, ###:  $p < 0,001$  vs. I-R modell, ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=18$

B) Az élő, apoptotikus és nekrotikus terápiás sejtek aránya. H9c2: élő:  $52,02 \pm 5,01\%$ , apoptotikus:  $10,87 \pm 1,12\%$ , nekrotikus:  $37,23 \pm 4,40\%$ ; H9c2 + 10  $\mu\text{M}$  PJ34: élő:  $63,38 \pm 4,50\%$ , apoptotikus:  $9,22 \pm 1,28\%$ , nekrotikus:  $26,83 \pm 3,49\%$ ; H9c2 + 100  $\mu\text{M}$  PJ34: élő:  $64,99 \pm 3,47\%$ , apoptotikus:  $10,18 \pm 1,55\%$ , nekrotikus:  $24,96 \pm 2,43\%$ , \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  vs. H9c2, ANOVA, Newman-Keuls post hoc teszt,  $n=18$

## 5 Megbeszélés

Eredményeink alapján valószínűsíthető, hogy a könnyebben hozzáférhető zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek alkalmasabbak iszkémia-reperfúziós károsodás csökkentésére, mint a csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek, illetve, hogy a terápiás sejtek túlélése és hatékonysága PJ34 PARP inhibitor előkezeléssel fokozható.

Kísérleteinkben egy *in vitro* megközelítést alkalmaztunk a miokardiális infarktus utáni sejterápia komplex eseményeinek modellezésére, amely különböző hátrányokkal és előnyökkel rendelkezik az *in vivo* megközelítéshez képest. Az *in vitro* sejt kultúrák körülmények nem tudják megfelelően modellezni a szívműködés háromdimenziós struktúráját, annak komplex sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix kapcsolataival, valamint nem tudja visszaadni a miokardiális infarktus utáni komplex eseményeket, mint a gyulladásos-folyamat vagy az érzékelés hatásai. Azonban az *in vivo* modellek egyik limitációja, hogy nem képesek élesen elhatárolni a kezelések direkt, a parenchymális sejteken kifejtett hatását, illetve a környezet befolyásolásán keresztül létrejövő hatásokat (leukociták inaktiválása vagy csökkent migrációja, angiogenezis, stb.). Mivel méréseink során a sejtképzés poszt-iszkémiás sejtekre gyakorolt direkt hatásaira fókuszáltunk, ezért a feltett kérdéseinkre megítélésünk szerint a modell releváns információkat nyújtott.

Kísérleteink során H9c2 patkány kardiomioblaszt sejteket használtunk, amely embrionális patkány szívműködéséből származik. A H9c2 sejtek rendelkeznek mind a vázizom-, mind a szívműködésre jellemző elektrofiziológiai és biokémia tulajdonságokkal [287, 296], mindazonáltal gyakran használt sejt típus iszkémia-reperfúziós sértést vizsgáló kísérletekben [297-299] és csoportunk is többéves tapasztalattal rendelkezik ezen sejtek használatáról. Chen és munkatársai összehasonlították H9c2 sejtek és primer neonatális patkány kardiomiociták reakcióját hidrogén-peroxid kezelés után [300], a vizsgált paraméterek (felvétel a tenyésztőedény felszínéről, nukleáris kondenzáció, sejtterület változás, sejtenkénti összfehérje mennyiség) tekintetében nem találtak jelentős különbséget a sejtek közt.

Demonstráltuk, hogy oxigén- és glükóz megvonás majd normál sejt kultúrák oxigén- és glükóz szintek visszaállítása után az oxidatív stressz markere, az MDA szintje emelkedett, ahogy az *in vivo* iszkémia-reperfúzió után is megfigyelhető. A membrán-

integritással fordítottan arányos LDH felszabadulás mérés alapján megállapíthatjuk, hogy az alkalmazott sértés szignifikáns membránkárosodást okozott, tehát az iszkémia-reperfúziós károsodás modellezésére alkalmas.

Kísérleteink során összehasonlítottuk a zsírszövet és csontvelő eredetű mesenchymális őssejtkezelések az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett kardiomioblasztokra gyakorolt hatásait és azt találtuk, hogy mind a csontvelő, mind a zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek direkt módon fokozták az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett kardiomioblasztok túlélését. Az LDH felszabadulás mértéke őssejtkezelés után szignifikánsan csökkent, a metabolikus aktivitás pedig szignifikánsan emelkedett, ami megfelel az áramlási citometriás adatoknak, ahol azt láttuk, hogy nőtt a túlélő sejtek és csökkent az elpusztult sejtek aránya. Nem találtunk szignifikáns különbséget a csontvelő és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek poszt-iszkémiás sejtek túlélésére kifejtett hatása közt. Továbbá maguknak a mesenchymális sejteknek a túlélése is azonos volt, tehát a poszt-iszkémiás viszonyok közti túlélési kapacitásuk valószínűleg igen hasonló. Azonban a halott sejteket figyelembe véve a hASC-vel történt kezelés mind a kezeletlen csoporthoz képest, mind hBMSC-vel való kezeléshez képest szignifikánsan csökkentette a nekrotikus sejtek arányát és növelte az apoptotikus sejtekét, vagyis az elpusztult sejteket a szabályozott apoptotikus sejthalál felé irányította. Ez nagy előny lehet *in vivo*, ugyanis a nekrozis során a sejtek membránintegritása megszűnik, a sejtből a környező térbe lizoszomális enzimek és „danger signal” molekulák szabadulnak fel, amelyek tovább károsítják a környező sejteket és gyulladás kialakulásához vezetnek [301]. Továbbá irodalmi adatok arra mutatnak, hogy *in vivo* az apoptotikus debris eltávolítása anti-inflammatorikus választ indukálhat [301-304]. Ezek a megfigyeléseink azért fontosak, mert több cikk [305-307] is beszámolt arról, hogy zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek alkalmazása esetén jobb eredményeket tapasztaltak, mint csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek esetén, a hatásmechanizmus azonban egyelőre nem teljesen tisztázott. Tudomásunk szerint mi voltunk az elsők, akik összehasonlították a zsírszövet- és csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtekre gyakorolt direkt hatásait. Rasmussen és mtsai leírták, hogy patkány modelljükben miokardiális infarktus követő őssejt-transzplantáció humán zsírszövet eredetű mesenchymális őssejteket alkalmazva javította a ejekciós frakciót, míg azonos donortól származó csontvelő

eredetű mesenchymális őssejtek esetén nem tapasztaltak szignifikáns javulást ebben a paraméterben [305]. Egy másik kutatócsoport eredményei szerint, a zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek nagyobb proliferatív aktivitással bírnak, nagyobb mértékben expresszálják a VEGF és HGF faktorokat és gerincvelő sérülést követően nagyobb angiogenezis fokozó hatással rendelkeztek, mint a csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek, míg migráció szempontjából nem találtak köztük különbséget [306]. A zsírszövet eredetű mesenchymális őssejteket szintén effektívebbnek találták felületi sérülések kezelésére, valamint kimutatták, hogy nagyobb hatást gyakorolt a fibroblaszt-migrációra, továbbá, hogy mindkét sejtípus fokozza a fibroblasztok proliferációját [307]. Ez utóbbi problematikus lehet a miokardium regenerálása szempontjából, a hegképződés fokozása miatt. Ezen túl Ngo és munkatársai leírták [308], hogy a sejt kultúrás körülmények közt fenntartott csontvelő eredetű mesenchymális sejtek több miofibroblaszt markerre pozitívan festődnek és kollagént szintetizálnak, vagyis *in vitro* hajlamosak miofibroblaszt fenotípust felvenni. Altman és kollégái pedig arról számoltak be [75], hogy csontvelő eredetű mesenchymális őssejtek csupán mechanikai stressz hatására is hajlamosok fibroblaszt irányú differenciációra. Noha a korai vizsgálatok szerint a csontvelő és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek hasonló immunszuppresszív tulajdonságokkal rendelkeznek [93], újabb tanulmányok alapján a zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek nagyobb hatással vannak a B-sejtek [309] és a dendritikus sejtek [310] működésére. Fontos megemlíteni, hogy az említett különbségek adódhatnak a BMSC és ASC populációk alapvető heterogenitásából, valamint az izolációs és sejt kultúrás protokollokból is [311].

A hASC-k és hBMSC-k alkalmazásával elért hasonló eredmények megerősítik, hogy a hASC-k egy valós alternatívát jelenthetnek az elterjedtebben használt hBMSC-kkel szemben a sejt-terápiák gyorsan fejlődő területén. A szubkután zsírszövet egy vonzó forrás autológ mesenchymális őssejtek izolálására, mivel zsírszövet zsírleszívás által könnyen nyerhető, mely műveletet rutinszerűen alkalmaznak évente több ezer ember esetén. A mesenchymális őssejtek a csontvelői sejtek igen csekély hányadát alkotják, az összes sejt 0,001-0,01%-át képviselik, továbbá egyes vizsgálatok szerint a számuk és a differenciációs kapacitásuk fordítottan arányos az életkorral [312]. Az egy gramm zsírszövetből kinyerhető őssejtek hozama több nagyságrenddel meghaladja az egy milliliter csontvelőből nyerhető őssejteket [311, 313, 314], és jóval nagyobb



mennyiségű zsírszövet nyerhető biztonságosan. Kimutatták, hogy mind a hBMSC-k, mind a hASC-k képesek oszteogén, adipogén, kondrogén és miogén irányokba differenciálódni [68, 315, 316] és parakrin faktorok szekretálásával képesek antiapoptotikus hatást kelteni és fokozni az angiogenezist [317, 318]. Mivel modellünkben a hASC-k és hBMSC-k egyforma mértékben fokozták az iszkémia-reperfúziós sértésen átesett sejtek túlélését, valamint a hASC-k szignifikánsan csökkentették a nekrozist, ezért eredményeink tovább erősítik azt a feltételezést, hogy a zsírszövet a terápiásan használt felnőtt őssejtek egy praktikusabb, jobb forrása, mint a csontvelő. Az első fázis I-es klinikai vizsgálat, mely zsírszövet eredetű őssejteket használt szívinfarktus után (NCT00442806) véget ért, és a zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek miokardiális infarktus utáni alkalmazhatóságáról és biztonságosságáról számolt be [319]. A vizsgálat megállapította, hogy a zsírszövet kinyeréséhez a miokardiális infarktus akut fázisában végzett periumbilikális zsírleszívás és az intrakoronáriás infúzióval történő sejtbejuttatás biztonságos volt, nem találtak mikrovaszkuláris elzáródás vagy megváltozott áramlás jelét és a 6 hónapos utánkövetés során sem volt a kezeléssel kapcsolatos súlyos kedvezőtlen esemény. A terápia szignifikánsan csökkentette a hegeképződést és a perfúziós defektust, valamint a szívfunkció a javulása irányába mutató trendet mutatott.

Kísérleteink során a terápiás sejtek hozzáadása után azért alkalmaztunk 24 órás kokultivációs időt, mert ez az időablak korábbi kísérleteink alapján elég a hozzáadott sejtek kitapadásához és a hatás kialakulásához, de nem következik be alatta jelentős sejtosztódás [163], és kizárja a sejtek differenciálódásának szerepét, amihez hosszabb idő szükséges. Figyelembe kell vennünk, hogy humán őssejteket használtunk a kísérletekben, de mivel immunválasz nem tud létrejönni modellünkben, ezért ennek nem lehetett jelentős hatása, és az irodalomban is széles körben használnak humán terápiás sejteket állatmodellekben [320-322]. Modellünkben a sértésen átesett sejtek túlélése kétszeresére nőtt, azonban ki kell hangsúlyoznunk, hogy kísérleteinkben a terápiásan használt őssejtek túlnyomó többsége életben maradt, ellentétben az *in vivo* terápiás alkalmazásokkal, ahol a bejuttatott sejtek nagy része a transzplantáció után nem sokkal elpusztul [301].

A kondicionált médiumot zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtek felhasználásával készítettük, mert proliferációs képességeik jobbak, mint a csontvelő eredetű

mesenchymális őssejteké [311], így adott idő alatt feltehetően nagyobb parakrin koncentrációt lehetett elérni a médiumban. Az áramlási citometriás mérések szerint a kondicionált médium nem volt szignifikáns hatással a sértett sejtek túlélésére, ami összhangban van a munkacsoport korábbi eredményeivel, ahol a csontvelő eredetű őssejtek sejt-kultúrás inzerter keresztül nem voltak képesek fokozni a sértett sejtek túlélését [163]. A kondicionált médium enyhén csökkentette az LDH felszabadulást és növelte a metabolikus aktivitást. Ezt azt jelentheti, hogy a mesenchymális sejtek által kibocsátott parakrin faktorok közt vannak olyan vegyületek, amelyek direkt hatással bírnak a poszt-izkémias sejtekre. Az áramlási citometriás adatok szerint a kondicionált médium bár az élő sejtek arányára nem volt hatással, de szignifikánsan csökkentette az apoptotikus sejtek arányát és növelte a nekrotikus sejtekét, amely ellentétes a hASC-k hatásával. A hASC kondicionált médium és hASC-k eltérő hatása a sejt-sejt kapcsolat kiemelkedő fontosságára utalhat a megmentési folyamatban, de másrészt azt is jelentheti, hogy a parakrin molekulákból nagyobb koncentrációkra van szükség a pozitív hatás kiváltásához. Az irodalmi adatok ismeretében valószínű, hogy a sejterápia hatása nagyrészt parakrin faktorok révén jön létre, de az őssejtnak szüksége van a mikrokönyezet vagy a sérült sejtrel létrejött kontaktus indukáló hatására, hogy a parakrin faktorokat megfelelő mennyiségben szekretálja. Lehetséges, hogy kísérleteink során a kondicionált médiumban a parakrin faktorok nem érték el a túlélést fokozó hatás kiváltásához szükséges szintet. Több kutatócsoport is beszámolt róla, hogy a kondicionált médium koncentráálásával biztató eredményeket érnek el [323, 324]. Felmerül annak a lehetősége, hogy a szekretált molekulák csak közvetlen közelből tudnak hatni, ahol lokális koncentrációjuk megfelelően magas szintet képes elérni, lehetséges, hogy csak direkt sejt-sejt kapcsolat tudja biztosítani a megfelelő közelséget. Ilyen „mikroparakrin” hatás jön létre például a csontvelőben hematopoetikus őssejtek és specializált niche oszteoblasztok közt az „endoszteális niche-őssejt szinapszis”-ban [325]. Korábbi vizsgálatok is kiemelték a sejt-sejt kapcsolat lehetséges szerepét az őssejtkezelések kapcsán, a hatásmechanizmus tekintetében a membrán-nanocsöveken létrejövő mitokondrium-transzport merült fel [163, 164].

Vizsgálataim második felében előkísérletek során megvizsgáltuk az alkalmazott PARP inhibitor, a PJ34 citotoxicitását, valamint a hatásosságát  $H_2O_2$  kezeléssel modellezett oxidatív stressz hatásának kivédésében. Eredményeink szerint az alkalmazott

koncentrációk nem voltak citotoxikusak és az irodalmi adatoknak megfelelően [326] csökkentették az oxidatív stressz okozta károsodást. Az eredmények azt is mutatják, hogy a 2 órás 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ -os kezelés hasonló mértékű károsodást okozott, mint az iszkémia reperfüzió modellünk ( $\text{H}_2\text{O}_2$  kezelés – 35,14 $\pm$ 1,01% LDH felszabadulás, I-R modell, 29,58 $\pm$ 6,21% LDH felszabadulás). Ismereteink szerint elsőként publikáltunk kvantitatív életképességi adatokat PARP inhibitorral előkezelt terápiás sejtek poszt-iszkémiás sejtekre kifejtett direkt hatásával kapcsolatban.

A terápiás sejtek PJ34 előkezelést vizsgáló *in vitro* iszkémia-reperfüziós kísérletekben a H9c2 kardiomioblaszt vonalat használtuk a terápiásan alkalmazott sejtek szerepében is. Kutatócsoportunk korábbi kísérleteiben kimutattuk, hogy *in vitro* iszkémia-reperfüzió modellünkben a H9c2 sejtek képesek betölteni a terápiásan alkalmazott sejtek szerepét és fokozni a sértésen átesett sejtek túlélését [165], ezekben a kísérletekben a terápiásan alkalmazott H9c2 sejtek a mesenchymális őssejtekhez hasonló hatást értek el, arra utalva, hogy az alkalmazott sejtek multipotenciája nem feltétlenül szükséges a hatás kialakításához.

Korábbi kísérleteinkkel ellentétben [165] jelen kísérleteink során a kezeletlen H9c2 terápiás sejtek nem bírtak szignifikáns hatással, bár pozitív tendenciát mutattak, ennek feltételezhetően az erősebb iszkémia-reperfüziós sértés lehetett az oka. A terápiásan alkalmazott H9c2 sejtek PJ34 előkezelése növelte maguknak a terápiás sejteknek a túlélését és emelkedett az iszkémia-reperfüziós sértésen átesett kardiomioblasztok túlélése is, ami feltehetőleg legalább részben a terápiás sejtek jobb túléléséből fakad. *In vivo* miokardiális infarktus utáni sejterápiában ez azt jelentheti, hogy a PJ34 előkezelt terápiás sejtek képesek lehetnek a nagyobb oxidatív károsodást szenvedett területeken is túlélni és pozitív hatásukat kifejteni. A fokozott túlélés háttérében álló lehetséges mechanizmussal kapcsolatban emlékeznünk kell, hogy a miokardiális iszkémia-reperfüzió utáni károsodásban jelentős szerepet játszik a PARP enzim oxidatív stressz általi aktivációja [327]. Korábbi tanulmányok bemutatták, hogy a PARP inhibitorok megszakítják az intracelluláris oxidáns termelés és az adhézión-receptor expresszió és mononukleáris sejt infiltráció pozitív-visszacsatolás hurkait [279].

A nagyobb koncentrációban alkalmazott PJ34 kezelés nem vezetett a kezelés hatásának szignifikáns növekedéséhez, ebből arra következtethetünk, hogy már a 10  $\mu\text{M}$ -os koncentrációjú PJ34-el történő 1 órás előkezelés is a PARP enzim közel teljes

gátlásához vezetett. Ez annak a következménye, hogy a sejt kultúrák kísérletekben használt koncentráció felső tartományát céloztuk meg [328], egyrészt mert a sejtek csak egy rövid, 1 órás előkezelés idejéig voltak kitéve a PJ34-nek, másrészt mert elsősorban azt akartuk eldönteni, hogy működhet-e a koncepció.

A PARP inhibitorok használatával kapcsolatban aggodalomra adhat okot azok a DNS javító mechanizmusok blokkolásán keresztül kifejtett lehetséges genotoxikus hatása. Bízató azonban, hogy az irodalmi adatok megcáfolják az önmagában alkalmazott PARP inhibitorok genotoxikus hatását, bakteriális reverz mutációs, *in vitro* kromoszóma aberrációs és csontvelői mikronukleusz tesztek sem mutatták ki genotoxikus hatást PARP inhibitor kezelés után [329].

Az irodalomban többen számoltak már be a terápiásan alkalmazott sejtek előkezelésének pozitív hatásairól. Yao és mtsai a lipopoliszachariddal prekondicionált mesenchymális őssejteket alkalmaztak miokardiális infarktus patkány modelljében [330]. Arról számoltak be, hogy a terápiásan alkalmazott sejtek jobban éltek túl, fokozták a vaszkularizációt és csökkentették a fibrózist. Hahn és mtsai növekedési faktorokat alkalmaztak mesenchymális őssejtek előkezeléseként, majd a sejtek túlélését vizsgálták 30 óra 0,5% O<sub>2</sub> szintű hipoxia kezelés után [331]. Tripánkék-exklúziós mérést végezve azt találták, hogy 20%-al több sejt élte túl a kezelést. A sejteket *in vivo* infarktus modellben alkalmazva azok szignifikánsan javították a szisztolés funkciót és csökkentették az infarktusméretet a kezeletlen MSC-khez képest. Kubo és mtsai egér csontvelő eredetű MSC-ken végzett 30 perces H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> előkezelést [332]. A kezelés hatására nőtt a sejtek VEGF expressziója és az endoteliális irányú differenciációs készsége. Mangi és mtsai az előkezelésként alkalmazott retrovirális manipulációval elérték a terápiásan alkalmazott sejtek Akt overexpresszióját, ami jelentősen fokozta azok hatékonyságát *in vivo* miokardiális infarktus modellben [254]. A PARP inhibitor előkezelés citoprotektív és gyulladáscsökkentő hatása jól kiegészítheti a parakrin faktorok expresszióját fokozó előkezeléseket. A PARP inhibitorok citoprotektív hatásukat a sejt energiakészleteinek megőrzésén keresztül fejtik ki, így lehetséges, hogy tovább tudják fokozni más hatásmechanizmussal rendelkező kezelések citoprotektív hatását, de ennek felderítésére további vizsgálatok szükségesek.

## 6 Következtetések

Eredményeink alapján a csontvelő és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejtekkel való kezelés direkt hatásokon keresztül és azonos mértékben növeli sérült kardiomioblasztok túlélését *in vitro* iszkémia-reperfúzió modellünkben. A két őssejtípus túlélése a poszt-iskémiás környezetben szintén hasonló. Azonban a hASC-k a hBMSC-khez képest szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentették a nekrozist, az apoptotikus sejthalál felé terelve a sérült sejteket, amely részben magyarázhatja az ASC sejtek *in vivo* kísérletekben megfigyelt nagyobb hatékonyságát. A könnyen és nagy mennyiségben hozzáférhető zsírszövet egy ígéretes forrás autológ mesenchymális őssejtek kinyerésére, a hASC-k valós alternatívát jelenthetnek az hBMSC-kkel szemben a miokardiális infarktuson átesett szív kezelésére. További vizsgálataink alapján a terápiásan felhasznált sejtek PARP inhibitorral való előkezelése növelte azok túlélését poszt-iskémiás körülmények között és fokozta sérült kardiomioblasztokra kifejtett terápiás hatásukat. Ha az eredményeinket további *in vivo* tanulmányok is megerősítik, lehetőségessé válhat a sejtalapú terápiák hatékonyságának növelése ASC-k szélesebb körű felhasználásával, továbbá a felhasznált sejtek PARP inhibitorral történő előkezelése útján.

## 7 Összefoglalás

A szív- és érrendszeri betegségek, komoly egészségügyi és társadalmi problémát jelentenek. Ezek közt az egyik legjelentősebb a miokardiális infarktus, melynek jelenlegi kezelése a szív normál keringésének visszaállítását célozzák. Bár ezek az eljárások jelentősen növelik a várható élettartamot, azonban a súlyos szívinfarktus utáni kontraktilisszövet-veszteség és hegeképződés gyakran szívelégtelenség kialakulásához vezet. A sejterápiák magukban hordozzák a sérült szívizom regenerálásának és a szívfunkció visszaállításának ígérését, de egyelőre az eredmények jelentősen elmaradnak a várakozásoktól. A hatékonyabb őssejterápiák kialakításának akadályá egyrészt, hogy nem tisztázott, melyik sejtípus a legalkalmasabb, másrészt kismértékű a terápiás sejtek beépülése és túlélése. *In vitro* iszkémia-reperfúzió modellünkben összehasonlítottuk a humán csontvelő (BMSC) és humán zsírszövet eredetű (ASC) őssejtek direkt hatásait, továbbá a terápiásan hozzáadott sejtek poli(ADP-ribóz) polimeráz (PARP)-gátlásának hatását. Az iszkémia-reperfúziós sértést H9c2 kardiomioblaszt sejteken oxigén és glükóz megvonását követő reoxigenizációval modelleztük, majd ezt követően vizsgáltuk fluoreszcensen jelölt terápiás sejtek hozzáadásának hatásait. Calcein és ethidium homodimer kettős jelölést alkalmazva, áramlási citométerrel mértük az élő, apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát. Mértük továbbá a laktát-dehidrogenáz felszabadulást és a sejtek metabolikus aktivitását. Demonstráltuk, hogy a BMSC-vel és ASC-vel való kezelés direkt hatásokon keresztül, azonos mértékben növeli sérült kardiomioblasztok túlélését és a két őssejtípus túlélése a poszt-iszkémiás környezetben szintén hasonló. Azonban az ASC-k a BMSC-khez képest szignifikánsan nagyobb mértékben csökkentették a kardiomioblasztok nekrozisát, az apoptotikus sejthalál felé terelve a sérült sejteket. Vizsgálataink második felében leírtuk, hogy terápiás sejtek PARP inhibitorral való előkezelése növelte azok túlélését poszt-iszkémiás körülmények között és fokozta sérült kardiomioblasztokra kifejtett terápiás hatásukat. Eredményeink támogatják annak lehetőségét, hogy a sejthalapú terápiák hatékonysága növelhető a jobban hozzáférhető, potenciálisan hatékonyabb ASC-k szélesebb körű felhasználásával, továbbá egy viszonylag egyszerű előkezelési lépéssel.

## 8 Summary

Cardiovascular diseases are a major health concern and social problem. Among them one of the most significant is myocardial infarction. Current treatments for myocardial infarction aim to restore the normal circulation of the heart. These interventions greatly increase the life expectancy, but the loss of contractile tissue and scarring after a serious myocardial infarction frequently lead to heart failure. Cell therapies hold the promise of regenerating the injured heart and restoring cardiac function, but the results are far below our expectations so far. The main obstacles of establishing more effective cell therapies are the uncertainty of the most suitable cell type and the low engraftment and survival rate of the administered therapeutic cells. In our *in vitro* ischemia-reperfusion model we compared the direct effects of human bone marrow (BMSC) and human adipose tissue-derived stem cell (ASC) treatment, furthermore the effect of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition on the added therapeutic cells. We modeled the ischemia-reperfusion injury by oxygen and glucose deprivation followed by reoxygenation on H9c2 cardiomyoblast cells and investigated the effects of adding fluorescently labeled therapeutic cells. We used calcein and ethidium homodimer staining and flow cytometry to measure the ratio of live, apoptotic and necrotic cells. Furthermore we measured the cells' lactate dehydrogenase release and the metabolic activity. We demonstrated that both BMSCs and ASC treatment increased the survival of the injured cardiomyoblast through direct effects and with the same efficacy. The survival of the added stem cells in the post-ischemic environment was also similar. However, the ASCs compared to BMSCs significantly reduced the necrosis of the cardiomyoblasts, directing the damaged cells toward apoptotic cell death. In the second part of our experiments, we described that PARP inhibitor pretreatment of the therapeutic cells increased their survival in post-ischemic conditions, and increased their therapeutic effects exerted on the injured cardiomyoblasts. Our results support the possibility of increasing the efficiency of cell-based therapies by the broader application of the more accessible and potentially more effective ASCs, and by a relatively simple pretreatment step.

## 9 Irodalomjegyzék

- [1] European-Comission. Special Eurobarometer 412 - Sport and Physical Activity. European Comission, 2014:
- [2] Nichols M TN, Luengo-Fernandez R, Leal J, Gray A, Scarborough P, Rayner M. European Cardiovascular Disease Statistics 2012. European Heart Network, Brussels, European Society of Cardiology, Sophia Antipolis, 2012: 14-15, 119
- [3] Rosamond WD, Chambless LE, Heiss G, Mosley TH, Coresh J, Whitsel E, Wagenknecht L, Ni H and Folsom AR. (2012) Twenty-two-year trends in incidence of myocardial infarction, coronary heart disease mortality, and case fatality in 4 US communities, 1987-2008. *Circulation*, 125: 1848-1857
- [4] Orn S, Manhenke C, Anand IS, Squire I, Nagel E, Edvardsen T and Dickstein K. (2007) Effect of left ventricular scar size, location, and transmuralty on left ventricular remodeling with healed myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 99: 1109-1114
- [5] Zamilpa R, Navarro MM, Flores I and Griffey S. (2014) Stem cell mechanisms during left ventricular remodeling post-myocardial infarction: Repair and regeneration. *World J Cardiol*, 6: 610-620
- [6] Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, Bravata DM, Dai S, Ford ES, Fox CS, Fullerton HJ, Gillespie C, Hailpern SM, Heit JA, Howard VJ, Kissela BM, Kittner SJ, Lackland DT, Lichtman JH, Lisabeth LD, Makuc DM, Marcus GM, Marelli A, Matchar DB, Moy CS, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nichol G, Paynter NP, Soliman EZ, Sorlie PD, Sotoodehnia N, Turan TN, Virani SS, Wong ND, Woo D, Turner MB, American Heart Association Statistics C and Stroke Statistics S. (2012) Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 125: e2-e220
- [7] Kumar V, Abbas AK, Aster JC and Robbins SL. *Robbins Basic Pathology*. Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2013: 6-22; 377
- [8] Sussman MS and Bulkley GB. (1990) Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Methods Enzymol*, 186: 711-723



- [9] Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H and Yang XF. (2013) Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol*, 6: 19
- [10] Nallamothu BK, Bradley EH and Krumholz HM. (2007) Time to treatment in primary percutaneous coronary intervention. *N Engl J Med*, 357: 1631-1638
- [11] *A belgyógyászat alapjai* 1. Medicina, 2007:
- [12] Kloner RA, Ellis SG, Lange R and Braunwald E. (1983) Studies of experimental coronary artery reperfusion. Effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation*, 68: 18-15
- [13] Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414: 813-820
- [14] Bogdan C, Rollinghoff M and Diefenbach A. (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol*, 12: 64-76
- [15] Stamler JS, Singel DJ and Loscalzo J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 258: 1898-1902
- [16] Frangogiannis NG, Smith CW and Entman ML. (2002) The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 53: 31-47
- [17] Bell D, Jackson M, Nicoll JJ, Millar A, Dawes J and Muir AL. (1990) Inflammatory response, neutrophil activation, and free radical production after acute myocardial infarction: effect of thrombolytic treatment. *Br Heart J*, 63: 82-87
- [18] Ma Y, Yabluchanskiy A and Lindsey ML. (2013) Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 6: 11
- [19] Nahrendorf M, Pittet MJ and Swirski FK. (2010) Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction. *Circulation*, 121: 2437-2445
- [20] Zamilpa R, Ibarra J, de Castro Bras LE, Ramirez TA, Nguyen N, Halade GV, Zhang J, Dai Q, Dayah T, Chiao YA, Lowell W, Ahuja SS, D'Armiento J, Jin YF and Lindsey ML. (2012) Transgenic overexpression of matrix metalloproteinase-9 in macrophages attenuates the inflammatory response and

- improves left ventricular function post-myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 53: 599-608
- [21] Frangogiannis NG. (2012) Regulation of the inflammatory response in cardiac repair. *Circ Res*, 110: 159-173
- [22] Swirski FK and Nahrendorf M. (2013) Macrophage-stem cell crosstalk after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 62: 1902-1904
- [23] Frangogiannis NG. (2006) The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*, 8: 1907-1939
- [24] Sutton MG and Sharpe N. (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*, 101: 2981-2988
- [25] Hochman JS, Sleeper LA, Webb JG, Sanborn TA, White HD, Talley JD, Buller CE, Jacobs AK, Slater JN, Col J, McKinlay SM and LeJemtel TH. (1999) Early revascularization in acute myocardial infarction complicated by cardiogenic shock. SHOCK Investigators. Should We Emergently Revascularize Occluded Coronaries for Cardiogenic Shock. *N Engl J Med*, 341: 625-634
- [26] Yip HK, Wu CJ, Chang HW, Wang CP, Cheng CI, Chua S and Chen MC. (2003) Cardiac rupture complicating acute myocardial infarction in the direct percutaneous coronary intervention reperfusion era. *Chest*, 124: 565-571
- [27] Cleland JG, Torabi A and Khan NK. (2005) Epidemiology and management of heart failure and left ventricular systolic dysfunction in the aftermath of a myocardial infarction. *Heart*, 91 Suppl 2: ii7-13; discussion ii31, ii43-18
- [28] Mathers CD and Loncar D. (2006) Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*, 3: e442
- [29] O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, Casey DE, Jr., Chung MK, de Lemos JA, Ettinger SM, Fang JC, Fesmire FM, Franklin BA, Granger CB, Krumholz HM, Linderbaum JA, Morrow DA, Newby LK, Ornato JP, Ou N, Radford MJ, Tamis-Holland JE, Tommaso CL, Tracy CM, Woo YJ, Zhao DX, Anderson JL, Jacobs AK, Halperin JL, Albert NM, Brindis RG, Creager MA, DeMets D, Guyton RA, Hochman JS, Kovacs RJ, Kushner FG, Ohman EM, Stevenson WG, Yancy CW and American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice G. (2013) 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American

- College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, 127: e362-425
- [30] Antman EM, Anbe DT, Armstrong PW, Bates ER, Green LA, Hand M, Hochman JS, Krumholz HM, Kushner FG, Lamas GA, Mullany CJ, Ornato JP, Pearle DL, Sloan MA and Smith SC, Jr. (2004) ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction--executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to revise the 1999 guidelines for the management of patients with acute myocardial infarction). *J Am Coll Cardiol*, 44: 671-719
- [31] Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE, Jr., Chavey WE, 2nd, Fesmire FM, Hochman JS, Levin TN, Lincoff AM, Peterson ED, Theroux P, Wenger NK, Wright RS, Smith SC, Jr., Jacobs AK, Halperin JL, Hunt SA, Krumholz HM, Kushner FG, Lytle BW, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B, American College of C, American Heart Association Task Force on Practice G, American College of Emergency P, Society for Cardiovascular A, Interventions, Society of Thoracic S, American Association of C, Pulmonary R and Society for Academic Emergency M. (2007) ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Revise the 2002 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non ST-Elevation Myocardial Infarction): developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians, the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and the Society of Thoracic Surgeons: endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation and the Society for Academic Emergency Medicine. *Circulation*, 116: e148-304
- [32] Smith SC, Jr., Dove JT, Jacobs AK, Kennedy JW, Kereiakes D, Kern MJ, Kuntz RE, Popma JJ, Schaff HV, Williams DO, Gibbons RJ, Alpert JP, Eagle KA, Faxon DP, Fuster V, Gardner TJ, Gregoratos G and Russell RO. (2001) ACC/AHA guidelines for percutaneous coronary intervention (revision of the 1993 PTCA guidelines)-executive summary: a report of the American College

- of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee to revise the 1993 guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty) endorsed by the Society for Cardiac Angiography and Interventions. *Circulation*, 103: 3019-3041
- [33] Faxon DP. (2005) Coronary interventions and their impact on post myocardial infarction survival. *Clin Cardiol*, 28: I38-44
- [34] Grines CL, Cox DA, Stone GW, Garcia E, Mattos LA, Giambartolomei A, Brodie BR, Madonna O, Eijgelshoven M, Lansky AJ, O'Neill WW and Morice MC. (1999) Coronary angioplasty with or without stent implantation for acute myocardial infarction. Stent Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med*, 341: 1949-1956
- [35] Kaul TK, Fields BL, Riggins SL, Dacumos GC, Wyatt DA and Jones CR. (1995) Coronary artery bypass grafting within 30 days of an acute myocardial infarction. *Ann Thorac Surg*, 59: 1169-1176
- [36] Boersma E, Maas AC, Deckers JW and Simoons ML. (1996) Early thrombolytic treatment in acute myocardial infarction: reappraisal of the golden hour. *Lancet*, 348: 771-775
- [37] Zijlstra F, de Boer MJ, Hoorntje JC, Reiffers S, Reiber JH and Suryapranata H. (1993) A comparison of immediate coronary angioplasty with intravenous streptokinase in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 328: 680-684
- [38] Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J, Overlie P, Donohue B, Chelliah N, Timmis GC and et al. (1993) A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. The Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med*, 328: 673-679
- [39] (1997) A clinical trial comparing primary coronary angioplasty with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries in Acute Coronary Syndromes (GUSTO IIb) Angioplasty Substudy Investigators. *N Engl J Med*, 336: 1621-1628
- [40] Goumans MJ, Maring JA and Smits AM. (2014) A straightforward guide to the basic science behind cardiovascular cell-based therapies. *Heart*, 100: 1153-1157

- [41] Kardiológia. Semmelweis Kiadó, 2006:
- [42] Laflamme MA and Murry CE. (2011) Heart regeneration. *Nature*, 473: 326-335
- [43] Daar AS and Greenwood HL. (2007) A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 1: 179-184
- [44] Anversa P, Leri A, Rota M, Hosoda T, Bearzi C, Urbanek K, Kajstura J and Bolli R. (2007) Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts. *Stem Cells*, 25: 589-601
- [45] Menasche P. (2007) Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Prog Cardiovasc Dis*, 50: 7-17
- [46] Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT, Pouzet B, Schwartz K, Menasche P and Hagege AA. (2002) Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*, 106: I131-136
- [47] Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM and Hauschka SD. (1996) Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*, 98: 2512-2523
- [48] Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, Glower DD and Kraus WE. (1998) Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*, 4: 929-933
- [49] Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E and Charpak S. (2003) Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 7808-7811
- [50] Schuh A, Liehn EA, Sasse A, Hristov M, Sobota R, Kelm M, Merx MW and Weber C. (2008) Transplantation of endothelial progenitor cells improves neovascularization and left ventricular function after myocardial infarction in a rat model. *Basic Res Cardiol*, 103: 69-77
- [51] Becker AJ, Mc CE and Till JE. (1963) Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197: 452-454

- [52] Bajada S, Mazakova I, Richardson JB and Ashammakhi N. (2008) Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 2: 169-183
- [53] Watt FM and Hogan BL. (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 287: 1427-1430
- [54] Zhang J, Klos M, Wilson GF, Herman AM, Lian X, Raval KK, Barron MR, Hou L, Soerens AG, Yu J, Palecek SP, Lyons GE, Thomson JA, Herron TJ, Jalife J and Kamp TJ. (2012) Extracellular matrix promotes highly efficient cardiac differentiation of human pluripotent stem cells: the matrix sandwich method. *Circ Res*, 111: 1125-1136
- [55] Galli R, Borello U, Gritti A, Minasi MG, Bjornson C, Coletta M, Mora M, De Angelis MG, Fiocco R, Cossu G and Vescovi AL. (2000) Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci*, 3: 986-991
- [56] Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM and Low WC. (2002) Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol*, 174: 11-20
- [57] Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD and Crain B. (2003) Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 1364-1369
- [58] Alam T and Sollinger HW. (2002) Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation*, 74: 1781-1787
- [59] Martin GR. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 7634-7638
- [60] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282: 1145-1147
- [61] Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L and Ma L. (2012) Embryonic stem cell markers. *Molecules*, 17: 6196-6236

- [62] Fan Y, Wu J, Ashok P, Hsiung M and Tzanakakis ES. (2014) Production of Human Pluripotent Stem Cell Therapeutics under Defined Xeno-free Conditions: Progress and Challenges. *Stem Cell Rev*,
- [63] Rodin S, Antonsson L, Niaudet C, Simonson OE, Salmela E, Hansson EM, Domogatskaya A, Xiao Z, Damdimopoulou P, Sheikhi M, Inzunza J, Nilsson AS, Baker D, Kuiper R, Sun Y, Blennow E, Nordenskjold M, Grinnemo KH, Kere J, Betsholtz C, Hovatta O and Tryggvason K. (2014) Clonal culturing of human embryonic stem cells on laminin-521/E-cadherin matrix in defined and xeno-free environment. *Nat Commun*, 5: 3195
- [64] Lee EH and Hui JH. (2006) The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg Br*, 88: 841-851
- [65] Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, Yankelson L, Aronson D, Beyar R and Gepstein L. (2007) Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol*, 50: 1884-1893
- [66] Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, Mickunas E, Gay R, Klimanskaya I and Lanza R. (2012) Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*, 379: 713-720
- [67] Caplan AI. (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9: 641-650
- [68] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP and Hedrick MH. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7: 211-228
- [69] Gage FH. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science*, 287: 1433-1438
- [70] Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR and van der Kooy D. (2000) Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science*, 287: 2032-2036
- [71] Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR and Miller FD. (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol*, 3: 778-784
- [72] Friedenstein AJ, Piatetzky S, II and Petrakova KV. (1966) Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*, 16: 381-390

- [73] Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI and Frolova GP. (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6: 230-247
- [74] Beresford JN, Graves SE and Smoothy CA. (1993) Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *Am J Med Genet*, 45: 163-178
- [75] Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G and Kaplan DL. (2002) Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J*, 16: 270-272
- [76] Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, Leboy PS and Owen ME. (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci*, 102 (Pt 2): 341-351
- [77] Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM and Yoo JU. (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*, 238: 265-272
- [78] Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM and Johnstone B. (1998) The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*, 80: 1745-1757
- [79] Wakitani S, Saito T and Caplan AI. (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, 18: 1417-1426
- [80] De Bari C, Dell'Accio F, Vandenabeele F, Vermeesch JR, Raymackers JM and Luyten FP. (2003) Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol*, 160: 909-918
- [81] Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A and Noda M. (2003) Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res*, 287: 289-300
- [82] Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, Cummins J, Shuler T, Ghivizzani TC, Evans T, Robbins TD and Huard. (2000) Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J Orthop Res*, 18: 933-944



- [83] Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P and Robey PG. (2001) Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol*, 153: 1133-1140
- [84] da Silva Meirelles L, Chagastelles PC and Nardi NB. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*, 119: 2204-2213
- [85] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D and Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8: 315-317
- [86] Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI and Bruder SP. (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*, 64: 295-312
- [87] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S and Marshak DR. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284: 143-147
- [88] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S and Gianni AM. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99: 3838-3843
- [89] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A and Hoffman R. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*, 30: 42-48
- [90] Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK and Hedrick MH. (2005) Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med*, 54: 132-141
- [91] De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J and Hedrick MH. (2003) Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*, 174: 101-109

- [92] Katz AJ, Tholpady A, Tholpady SS, Shang H and Ogle RC. (2005) Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*, 23: 412-423
- [93] Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L and Blancher A. (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*, 129: 118-129
- [94] Afizah H, Yang Z, Hui JH, Ouyang HW and Lee EH. (2007) A comparison between the chondrogenic potential of human bone marrow stem cells (BMSCs) and adipose-derived stem cells (ADSCs) taken from the same donors. *Tissue Eng*, 13: 659-666
- [95] Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO and Gimble JM. (2001) Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng*, 7: 729-741
- [96] Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H and Guilak F. (2002) Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 290: 763-769
- [97] Gimble J and Guilak F. (2003) Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 5: 362-369
- [98] Rangappa S, Fen C, Lee EH, Bongso A and Sim EK. (2003) Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*, 75: 775-779
- [99] Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A and Anversa P. (2003) Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res*, 92: 139-150
- [100] Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A and Anversa P. (2002) Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, 346: 5-15
- [101] Molkenin JD and Houser SR. (2013) Are resident c-Kit<sup>+</sup> cardiac stem cells really all that are needed to mend a broken heart? *Circ Res*, 113: 1037-1039

- [102] Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S and Chien KR. (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*, 433: 647-653
- [103] Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD, Henning BJ, Stirparo GG, Papait R, Scarfo M, Agosti V, Viglietto G, Condorelli G, Indolfi C, Ottolenghi S, Torella D and Nadal-Ginard B. (2013) Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*, 154: 827-842
- [104] Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G and Giacomello A. (2004) Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*, 95: 911-921
- [105] Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA and Megey LA. (2002) The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett*, 530: 239-243
- [106] Torella D, Ellison GM and Nadal-Ginard B. (2014) Adult c-kit(pos) cardiac stem cells fulfill Koch's postulates as causal agents for cardiac regeneration. *Circ Res*, 114: e24-26
- [107] 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 and Anversa P. (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114: 763-776
- [108] Sanada F, Kim J, Czarna A, Chan NY, Signore S, Ogorek B, Isobe K, Wybieralska E, Borghetti G, Pesapane A, Sorrentino A, Mangano E, Cappetta D, Mangiaracina C, Ricciardi M, Cimini M, Ifedigbo E, Perrella MA, Goichberg P, Choi AM, Kajstura J, Hosoda T, Rota M, Anversa P and Leri A. (2014) c-Kit-positive cardiac stem cells nested in hypoxic niches are activated by stem cell factor reversing the aging myopathy. *Circ Res*, 114: 41-55
- [109] Ye J and Yeghiazarians Y. (2014) Cardiac stem cell therapy: review of the native cardiac progenitor cells and future direction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 63: 85-94

- [110] Dimmeler S, Burchfield J and Zeiher AM. (2008) Cell-based therapy of myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28: 208-216
- [111] Leri A, Kajstura J, Anversa P and Frishman WH. (2008) Myocardial regeneration and stem cell repair. *Curr Probl Cardiol*, 33: 91-153
- [112] Matar AA and Chong JJ. (2014) Stem cell therapy for cardiac dysfunction. *Springerplus*, 3: 440
- [113] Takahashi K and Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676
- [114] Takahashi K, Okita K, Nakagawa M and Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc*, 2: 3081-3089
- [115] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K and Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872
- [116] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z and Xu Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474: 212-215
- [117] Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R and Kim KS. (2009) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4: 472-476
- [118] Okita K and Yamanaka S. (2011) Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 366: 2198-2207
- [119] Mirotsov M, Jayawardena TM, Schmeckpeper J, Gneccchi M and Dzau VJ. (2011) Paracrine mechanisms of stem cell reparative and regenerative actions in the heart. *J Mol Cell Cardiol*, 50: 280-289
- [120] Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, Klein H and Alt E. (2007) The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 363: 674-679
- [121] Rosenberg M, Lutz M, Kuhl C, Will R, Eckstein V, Krebs J, Katus HA and Frey N. (2012) Coculture with hematopoietic stem cells protects cardiomyocytes against apoptosis via paracrine activation of AKT. *J Transl Med*, 10: 115

- [122] Du YY, Zhou SH, Zhou T, Su H, Pan HW, Du WH, Liu B and Liu QM. (2008) Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction. *Cytotherapy*, 10: 469-478
- [123] Jiang CY, Gui C, He AN, Hu XY, Chen J, Jiang Y and Wang JA. (2008) Optimal time for mesenchymal stem cell transplantation in rats with myocardial infarction. *J Zhejiang Univ Sci B*, 9: 630-637
- [124] Li Q, Turdi S, Thomas DP, Zhou T and Ren J. (2010) Intra-myocardial delivery of mesenchymal stem cells ameliorates left ventricular and cardiomyocyte contractile dysfunction following myocardial infarction. *Toxicol Lett*, 195: 119-126
- [125] Gnecci M, Zhang Z, Ni A and Dzau VJ. (2008) Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*, 103: 1204-1219
- [126] Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L and Pistoia V. (2008) Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*, 26: 151-162
- [127] van den Akker F, de Jager SC and Sluijter JP. (2013) Mesenchymal stem cell therapy for cardiac inflammation: immunomodulatory properties and the influence of toll-like receptors. *Mediators Inflamm*, 2013: 181020
- [128] van den Akker F, Deddens JC, Doevendans PA and Sluijter JP. (2013) Cardiac stem cell therapy to modulate inflammation upon myocardial infarction. *Biochim Biophys Acta*, 1830: 2449-2458
- [129] Ben-Mordechai T, Holbova R, Landa-Rouben N, Harel-Adar T, Feinberg MS, Abd Elrahman I, Blum G, Epstein FH, Silman Z, Cohen S and Leor J. (2013) Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol*, 62: 1890-1901
- [130] Bernardo ME and Fibbe WE. (2013) Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13: 392-402
- [131] Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R and Fibbe WE. (2006) Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34<sup>+</sup>-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177: 2080-2087

- [132] Pradier A, Passweg J, Villard J and Kindler V. (2011) Human bone marrow stromal cells and skin fibroblasts inhibit natural killer cell proliferation and cytotoxic activity. *Cell Transplant*, 20: 681-691
- [133] Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW and Dazzi F. (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, 105: 2821-2827
- [134] Yamada S, Nelson TJ, Kane GC, Martinez-Fernandez A, Crespo-Diaz RJ, Ikeda Y, Perez-Terzic C and Terzic A. (2013) Induced pluripotent stem cell intervention rescues ventricular wall motion disparity, achieving biological cardiac resynchronization post-infarction. *J Physiol*, 591: 4335-4349
- [135] Leor J, Gerecht S, Cohen S, Miller L, Holbova R, Ziskind A, Shachar M, Feinberg MS, Guetta E and Itskovitz-Eldor J. (2007) Human embryonic stem cell transplantation to repair the infarcted myocardium. *Heart*, 93: 1278-1284
- [136] Berry MF, Engler AJ, Woo YJ, Pirolli TJ, Bish LT, Jayasankar V, Morine KJ, Gardner TJ, Discher DE and Sweeney HL. (2006) Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H2196-2203
- [137] Fazel S, Chen L, Weisel RD, Angoulvant D, Seneviratne C, Fazel A, Cheung P, Lam J, Fedak PW, Yau TM and Li RK. (2005) Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 130: 1310
- [138] Williams AR, Suncion VY, McCall F, Guerra D, Mather J, Zambrano JP, Heldman AW and Hare JM. (2013) Durable scar size reduction due to allogeneic mesenchymal stem cell therapy regulates whole-chamber remodeling. *J Am Heart Assoc*, 2: e000140
- [139] Xu X, Xu Z, Xu Y and Cui G. (2005) Effects of mesenchymal stem cell transplantation on extracellular matrix after myocardial infarction in rats. *Coron Artery Dis*, 16: 245-255
- [140] Dixon JA, Gorman RC, Stroud RE, Bouges S, Hirotugu H, Gorman JH, 3rd, Martens TP, Itescu S, Schuster MD, Plappert T, St John-Sutton MG and Spinale FG. (2009) Mesenchymal cell transplantation and myocardial remodeling after myocardial infarction. *Circulation*, 120: S220-229

- [141] Galli D, Innocenzi A, Staszewsky L, Zanetta L, Sampaolesi M, Bai A, Martinoli E, Carlo E, Balconi G, Fiordaliso F, Chimenti S, Cusella G, Dejana E, Cossu G and Latini R. (2005) Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: a comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25: 692-697
- [142] Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, Liu P and Li RK. (2002) Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 123: 1132-1140
- [143] Zhang S, Jia Z, Ge J, Gong L, Ma Y, Li T, Guo J, Chen P, Hu Q, Zhang P, Liu Y, Li Z, Ma K, Li L and Zhou C. (2005) Purified human bone marrow multipotent mesenchymal stem cells regenerate infarcted myocardium in experimental rats. *Cell Transplant*, 14: 787-798
- [144] Boheler KR, Czyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV and Wobus AM. (2002) Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ Res*, 91: 189-201
- [145] Boheler KR, Crider DG, Tarasova Y and Maltsev VA. (2005) Cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. *Methods Mol Med*, 108: 417-435
- [146] Jiang B, Dong H, Li Q, Yu Y, Zhang Z, Zhang Y, Wang G and Zhang Z. (2013) Differentiation of reprogrammed mouse cardiac fibroblasts into functional cardiomyocytes. *Cell Biochem Biophys*, 66: 309-318
- [147] Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, Conway SJ, Fu JD and Srivastava D. (2012) In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 485: 593-598
- [148] Zwi-Dantsis L, Huber I, Habib M, Winterstern A, Gepstein A, Arbel G and Gepstein L. (2013) Derivation and cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells from heart failure patients. *Eur Heart J*, 34: 1575-1586
- [149] Zwi L, Caspi O, Arbel G, Huber I, Gepstein A, Park IH and Gepstein L. (2009) Cardiomyocyte differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Circulation*, 120: 1513-1523

- [150] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A and Ogawa S. (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*, 103: 697-705
- [151] Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K and Fukuda K. (2004) Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*, 104: 3581-3587
- [152] Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ and Kessler PD. (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation*, 105: 93-98
- [153] Shim WS, Jiang S, Wong P, Tan J, Chua YL, Tan YS, Sin YK, Lim CH, Chua T, Teh M, Liu TC and Sim E. (2004) Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 324: 481-488
- [154] Peran M, Lopez-Ruiz E, Gonzalez-Herrera L, Bustamante M, Valenzuela A and Marchal JA. (2013) Cellular extracts from post-mortem human cardiac tissue direct cardiomyogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*, 15: 1541-1548
- [155] Choi YS, Disting GJ, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han XL, Collas P, Morrison WA and Dilley RJ. (2010) Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med*, 14: 878-889
- [156] Okura H, Matsuyama A, Lee CM, Saga A, Kakuta-Yamamoto A, Nagao A, Sougawa N, Sekiya N, Takekita K, Shudo Y, Miyagawa S, Komoda H, Okano T and Sawa Y. (2010) Cardiomyoblast-like cells differentiated from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve left ventricular dysfunction and survival in a rat myocardial infarction model. *Tissue Eng Part C Methods*, 16: 417-425
- [157] Fang CH, Jin J, Joe JH, Song YS, So BI, Lim SM, Cheon GJ, Woo SK, Ra JC, Lee YY and Kim KS. (2012) In vivo differentiation of human amniotic epithelial cells into cardiomyocyte-like cells and cell transplantation effect on



- myocardial infarction in rats: comparison with cord blood and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 21: 1687-1696
- [158] Wang H, Chen S, Cheng X, Dou Z and Wang H. (2008) Differentiation of human amniotic fluid stem cells into cardiomyocytes through embryonic body formation. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 24: 1582-1587
- [159] Avitabile D, Crespi A, Brioschi C, Parente V, Toietta G, Devanna P, Baruscotti M, Truffa S, Scavone A, Rusconi F, Biondi A, D'Alessandra Y, Vigna E, Difrancesco D, Pesce M, Capogrossi MC and Barbuti A. (2011) Human cord blood CD34+ progenitor cells acquire functional cardiac properties through a cell fusion process. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300: H1875-1884
- [160] Orlandi A, Pagani F, Avitabile D, Bonanno G, Scambia G, Vigna E, Grassi F, Eusebi F, Fucile S, Pesce M and Capogrossi MC. (2008) Functional properties of cells obtained from human cord blood CD34+ stem cells and mouse cardiac myocytes in coculture. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H1541-1549
- [161] Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC and Chen CC. (2004) Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*, 22: 1330-1337
- [162] Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S and Komuro I. (2007) Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol*, 176: 329-341
- [163] Cselenyak A, Pankotai E, Horvath EM, Kiss L and Lacza Z. (2010) Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol*, 11: 29
- [164] Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK, Marey MV, Galkina SI, Isaev NK, Sheval EV, Polyakov VY, Sukhikh GT and Zorov DB. (2008) Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med*, 12: 1622-1631
- [165] Pankotai E, Cselenyak A, Ratosi O, Lorincz J, Kiss L and Lacza Z. (2012) The role of mitochondria in direct cell-to-cell connection dependent rescue of postischemic cardiomyoblasts. *Mitochondrion*, 12: 352-356

- [166] Chen Q, Camara AK, Stowe DF, Hoppel CL and Lesnefsky EJ. (2007) Modulation of electron transport protects cardiac mitochondria and decreases myocardial injury during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292: C137-147
- [167] Spees JL, Olson SD, Whitney MJ and Prockop DJ. (2006) Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 1283-1288
- [168] Koyanagi M, Brandes RP, Haendeler J, Zeiher AM and Dimmeler S. (2005) Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ Res*, 96: 1039-1041
- [169] Onfelt B, Nedvetzki S, Benninger RK, Purbhoo MA, Sowinski S, Hume AN, Seabra MC, Neil MA, French PM and Davis DM. (2006) Structurally distinct membrane nanotubes between human macrophages support long-distance vesicular traffic or surfing of bacteria. *J Immunol*, 177: 8476-8483
- [170] Onfelt B, Nedvetzki S, Yanagi K and Davis DM. (2004) Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J Immunol*, 173: 1511-1513
- [171] Onfelt B, Purbhoo MA, Nedvetzki S, Sowinski S and Davis DM. (2005) Long-distance calls between cells connected by tunneling nanotubules. *Sci STKE*, 2005: pe55
- [172] Yang WJ, Li SH, Weisel RD, Liu SM and Li RK. (2012) Cell fusion contributes to the rescue of apoptotic cardiomyocytes by bone marrow cells. *J Cell Mol Med*, 16: 3085-3095
- [173] Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ and Alvarez-Buylla A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature*, 425: 968-973
- [174] Ying QL, Nichols J, Evans EP and Smith AG. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416: 545-548
- [175] Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE and Scott EW. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416: 542-545

- [176] Garbade J, Schubert A, Rastan AJ, Lenz D, Walther T, Gummert JF, Dhein S and Mohr FW. (2005) Fusion of bone marrow-derived stem cells with cardiomyocytes in a heterologous in vitro model. *Eur J Cardiothorac Surg*, 28: 685-691
- [177] Kajstura J, Rota M, Whang B, Cascapera S, Hosoda T, Bearzi C, Nurzynska D, Kasahara H, Zias E, Bonafe M, Nadal-Ginard B, Torella D, Nascimbene A, Quaini F, Urbanek K, Leri A and Anversa P. (2005) Bone marrow cells differentiate in cardiac cell lineages after infarction independently of cell fusion. *Circ Res*, 96: 127-137
- [178] Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA and Field LJ. (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, 428: 664-668
- [179] Wen Z, Zheng S, Zhou C, Wang J and Wang T. (2011) Repair mechanisms of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *J Cell Mol Med*, 15: 1032-1043
- [180] Mariano ED, Batista CM, Barbosa BJ, Marie SK, Teixeira MJ, Morgalla M, Tatagiba M, Li J and Lepski G. (2014) Current perspectives in stem cell therapy for spinal cord repair in humans: a review of work from the past 10 years. *Arq Neuropsiquiatr*, 72: 451-456
- [181] Chan TM, Chen JY, Ho LI, Lin HP, Hsueh KW, Liu DD, Chen YH, Hsieh AC, Tsai NM, Hueng DY, Tsai ST, Chou PW, Lin SZ and Harn HJ. (2014) ADSC therapy in neurodegenerative disorders. *Cell Transplant*, 23: 549-557
- [182] Grade S, Bernardino L and Malva JO. (2013) Oligodendrogenesis from neural stem cells: perspectives for remyelinating strategies. *Int J Dev Neurosci*, 31: 692-700
- [183] Berezin AE. (2014) Diabetes mellitus and cellular replacement therapy: Expected clinical potential and perspectives. *World J Diabetes*, 5: 777-786
- [184] Jeong H, Yim HW, Cho YS, Kim YI, Jeong SN, Kim HB and Oh IH. (2014) Efficacy and safety of stem cell therapies for patients with stroke: a systematic review and single arm meta-analysis. *Int J Stem Cells*, 7: 63-69

- [185] Sun BK, Siprashvili Z and Khavari PA. (2014) Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science*, 346: 941-945
- [186] Ng TK, Fortino VR, Pelaez D and Cheung HS. (2014) Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World J Stem Cells*, 6: 111-119
- [187] Zuckerman T and Rowe JM. (2014) Transplantation in Acute Myeloid Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*, 28: 983-994
- [188] Wei CC, Lin AB and Hung SC. (2014) Mesenchymal stem cells in regenerative medicine for musculoskeletal diseases: bench, bedside, and industry. *Cell Transplant*, 23: 505-512
- [189] Bashir J, Sherman A, Lee H, Kaplan L and Hare JM. (2014) Mesenchymal stem cell therapies in the treatment of musculoskeletal diseases. *PM R*, 6: 61-69
- [190] Centeno CJ. (2014) Clinical challenges and opportunities of mesenchymal stem cells in musculoskeletal medicine. *PM R*, 6: 70-77
- [191] Govoni A, Magri F, Brajkovic S, Zanetta C, Faravelli I, Corti S, Bresolin N and Comi GP. (2013) Ongoing therapeutic trials and outcome measures for Duchenne muscular dystrophy. *Cell Mol Life Sci*, 70: 4585-4602
- [192] Huebert RC and Rakela J. (2014) Cellular therapy for liver disease. *Mayo Clin Proc*, 89: 414-424
- [193] Scorsin M, Marotte F, Sabri A, Le Dref O, Demirag M, Samuel JL, Rappaport L and Menasche P. (1996) Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation*, 94: II337-340
- [194] Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH and Kloner RA. (1996) Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation*, 94: II332-336
- [195] Sakai T, Li RK, Weisel RD, Mickle DA, Kim EJ, Tomita S, Jia ZQ and Yau TM. (1999) Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg*, 68: 2074-2080; discussion 2080-2071
- [196] Hirata Y, Sata M, Motomura N, Takanashi M, Suematsu Y, Ono M and Takamoto S. (2005) Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*, 327: 609-614

- [197] Singla DK, Hacker TA, Ma L, Douglas PS, Sullivan R, Lyons GE and Kamp TJ. (2006) Transplantation of embryonic stem cells into the infarcted mouse heart: formation of multiple cell types. *J Mol Cell Cardiol*, 40: 195-200
- [198] Haider H and Ashraf M. (2005) Bone marrow stem cell transplantation for cardiac repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H2557-2567
- [199] Deten A, Volz HC, Clamors S, Leiblein S, Briest W, Marx G and Zimmer HG. (2005) Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res*, 65: 52-63
- [200] Gnecci M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS and Dzau VJ. (2005) Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*, 11: 367-368
- [201] Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ and Pratt RE. (2006) Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*, 14: 840-850
- [202] Lalit PA, Hei DJ, Raval AN and Kamp TJ. (2014) Induced pluripotent stem cells for post-myocardial infarction repair: remarkable opportunities and challenges. *Circ Res*, 114: 1328-1345
- [203] Barile L, Messina E, Giacomello A and Marban E. (2007) Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis*, 50: 31-48
- [204] Naaijkens BA, van Dijk A, Kamp O, Krijnen PA, Niessen HW and Juffermans LJ. (2014) Therapeutic application of adipose derived stem cells in acute myocardial infarction: lessons from animal models. *Stem Cell Rev*, 10: 389-398
- [205] Ii M, Horii M, Yokoyama A, Shoji T, Mifune Y, Kawamoto A, Asahi M and Asahara T. (2011) Synergistic effect of adipose-derived stem cell therapy and bone marrow progenitor recruitment in ischemic heart. *Lab Invest*, 91: 539-552
- [206] Yang JJ, Yang X, Liu ZQ, Hu SY, Du ZY, Feng LL, Liu JF and Chen YD. (2012) Transplantation of adipose tissue-derived stem cells overexpressing heme oxygenase-1 improves functions and remodeling of infarcted myocardium in rabbits. *Tohoku J Exp Med*, 226: 231-241

- [207] Elnakish MT, Hassan F, Dakhlallah D, Marsh CB, Alhaider IA and Khan M. (2012) Mesenchymal stem cells for cardiac regeneration: translation to bedside reality. *Stem Cells Int*, 2012: 646038
- [208] Kudo M, Wang Y, Wani MA, Xu M, Ayub A and Ashraf M. (2003) Implantation of bone marrow stem cells reduces the infarction and fibrosis in ischemic mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*, 35: 1113-1119
- [209] Nakamura Y, Wang X, Xu C, Asakura A, Yoshiyama M, From AH and Zhang J. (2007) Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 25: 612-620
- [210] Li W, Ma N, Ong LL, Nesselmann C, Klopsch C, Ladilov Y, Furlani D, Piechaczek C, Moebius JM, Lutzow K, Lendlein A, Stamm C, Li RK and Steinhoff G. (2007) Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells*, 25: 2118-2127
- [211] Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, Yamagishi M, Mori H, Kangawa K and Kitamura S. (2004) Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 287: H2670-2676
- [212] Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I and Hare JM. (2010) Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res*, 107: 913-922
- [213] Qi CM, Ma GS, Liu NF, Shen CX, Chen Z, Liu XJ, Hu YP, Zhang XL, Teng GJ, Ju SH, Ma M and Tang YL. (2008) Transplantation of magnetically labeled mesenchymal stem cells improves cardiac function in a swine myocardial infarction model. *Chin Med J (Engl)*, 121: 544-550
- [214] Hamamoto H, Gorman JH, 3rd, Ryan LP, Hinmon R, Martens TP, Schuster MD, Plappert T, Kiupel M, St John-Sutton MG, Itescu S and Gorman RC. (2009) Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage. *Ann Thorac Surg*, 87: 794-801

- [215] Leobon B, Roncalli J, Joffre C, Mazo M, Boisson M, Barreau C, Calise D, Arnaud E, Andre M, Puceat M, Penicaud L, Prosper F, Planat-Benard V and Casteilla L. (2009) Adipose-derived cardiomyogenic cells: in vitro expansion and functional improvement in a mouse model of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 83: 757-767
- [216] Yu LH, Kim MH, Park TH, Cha KS, Kim YD, Quan ML, Rho MS, Seo SY and Jung JS. (2010) Improvement of cardiac function and remodeling by transplanting adipose tissue-derived stromal cells into a mouse model of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 139: 166-172
- [217] Li B, Zeng Q, Wang H, Shao S, Mao X, Zhang F, Li S and Guo Z. (2007) Adipose tissue stromal cells transplantation in rats of acute myocardial infarction. *Coron Artery Dis*, 18: 221-227
- [218] Zhu XY, Zhang XZ, Xu L, Zhong XY, Ding Q and Chen YX. (2009) Transplantation of adipose-derived stem cells overexpressing hHGF into cardiac tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 379: 1084-1090
- [219] De Siena R, Balducci L, Blasi A, Montanaro MG, Saldarelli M, Saponaro V, Martino C, Logrieco G, Soleti A, Fiobellot S, Madeddu P, Rossi G, Ribatti D, Crovace A, Cristini S, Invernici G, Parati EA and Alessandri G. (2010) Omentum-derived stromal cells improve myocardial regeneration in pig post-infarcted heart through a potent paracrine mechanism. *Exp Cell Res*, 316: 1804-1815
- [220] Valina C, Pinkernell K, Song YH, Bai X, Sadat S, Campeau RJ, Le Jemtel TH and Alt E. (2007) Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodelling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 28: 2667-2677
- [221] Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M and Van de Werf F. (2006) Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*, 367: 113-121

- [222] Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM and Investigators R-A. (2006) Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 355: 1210-1221
- [223] Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM and Investigators R-A. (2006) Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J*, 27: 2775-2783
- [224] McMullen NM and Pasumarthi KB. (2007) Donor cell transplantation for myocardial disease: does it complement current pharmacological therapies? *Can J Physiol Pharmacol*, 85: 1-15
- [225] Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M and Dawn B. (2007) Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*, 167: 989-997
- [226] Levit RD, Landazuri N, Phelps EA, Brown ME, Garcia AJ, Davis ME, Joseph G, Long R, Safley SA, Suever JD, Lyle AN, Weber CJ and Taylor WR. (2013) Cellular encapsulation enhances cardiac repair. *J Am Heart Assoc*, 2: e000367
- [227] Assis AC, Carvalho JL, Jacoby BA, Ferreira RL, Castanheira P, Diniz SO, Cardoso VN, Goes AM and Ferreira AJ. (2010) Time-dependent migration of systemically delivered bone marrow mesenchymal stem cells to the infarcted heart. *Cell Transplant*, 19: 219-230
- [228] Clifford DM, Fisher SA, Brunskill SJ, Doree C, Mathur A, Watt S and Martin-Rendon E. (2012) Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*, 2: CD006536
- [229] Goussetis E, Manginas A, Koutelou M, Peristeri I, Theodosaki M, Kollaros N, Leontiadis E, Theodorakos A, Paterakis G, Karatasakis G, Cokkinos DV and Graphakos S. (2006) Intracoronary infusion of CD133+ and CD133-CD34+



- selected autologous bone marrow progenitor cells in patients with chronic ischemic cardiomyopathy: cell isolation, adherence to the infarcted area, and body distribution. *Stem Cells*, 24: 2279-2283
- [230] Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, Menke A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Knapp WH and Drexler H. (2005) Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 111: 2198-2202
- [231] Huang XP, Sun Z, Miyagi Y, McDonald Kinkaid H, Zhang L, Weisel RD and Li RK. (2010) Differentiation of allogeneic mesenchymal stem cells induces immunogenicity and limits their long-term benefits for myocardial repair. *Circulation*, 122: 2419-2429
- [232] Grossmann J. (2002) Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-Anoikis". *Apoptosis*, 7: 247-260
- [233] Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA and Leor J. (2003) Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 108: 863-868
- [234] Fischer UM, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA and Cox CS, Jr. (2009) Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*, 18: 683-692
- [235] Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, Yeung AC, Johnstone BH, Yock PG and March KL. (2005) Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*, 112: I150-156
- [236] Grajek S, Popiel M, Gil L, Breborowicz P, Lesiak M, Czepczynski R, Sawinski K, Straburzynska-Migaj E, Araszkiwicz A, Czyz A, Kozłowska-Skrzypczak M and Komarnicki M. (2010) Influence of bone marrow stem cells on left ventricle perfusion and ejection fraction in patients with acute myocardial infarction of anterior wall: randomized clinical trial: Impact of bone marrow stem cell intracoronary infusion on improvement of microcirculation. *Eur Heart J*, 31: 691-702

- [237] Askari AT, Unzek S, Popovic ZB, Goldman CK, Forudi F, Kiedrowski M, Rovner A, Ellis SG, Thomas JD, DiCorleto PE, Topol EJ and Penn MS. (2003) Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet*, 362: 697-703
- [238] Schenk S, Mal N, Finan A, Zhang M, Kiedrowski M, Popovic Z, McCarthy PM and Penn MS. (2007) Monocyte chemotactic protein-3 is a myocardial mesenchymal stem cell homing factor. *Stem Cells*, 25: 245-251
- [239] Ellison GM, Torella D, Dellegrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez de Prado A, Vicinanza C, Purushothaman S, Galuppo V, Iaconetti C, Waring CD, Smith A, Torella M, Cuellas Ramon C, Gonzalo-Orden JM, Agosti V, Indolfi C, Galinanes M, Fernandez-Vazquez F and Nadal-Ginard B. (2011) Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol*, 58: 977-986
- [240] Smart N, Risebro CA, Melville AA, Moses K, Schwartz RJ, Chien KR and Riley PR. (2007) Thymosin beta4 induces adult epicardial progenitor mobilization and neovascularization. *Nature*, 445: 177-182
- [241] Smart N, Dube KN and Riley PR. (2013) Epicardial progenitor cells in cardiac regeneration and neovascularisation. *Vascul Pharmacol*, 58: 164-173
- [242] Haider H and Ashraf M. (2010) Preconditioning and stem cell survival. *J Cardiovasc Transl Res*, 3: 89-102
- [243] Kubo M, Li TS, Suzuki R, Shirasawa B, Morikage N, Ohshima M, Qin SL and Hamano K. (2008) Hypoxic preconditioning increases survival and angiogenic potency of peripheral blood mononuclear cells via oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H590-595
- [244] Rosova I, Dao M, Capoccia B, Link D and Nolte JA. (2008) Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26: 2173-2182
- [245] Tang YL, Zhu W, Cheng M, Chen L, Zhang J, Sun T, Kishore R, Phillips MI, Losordo DW and Qin G. (2009) Hypoxic preconditioning enhances the benefit of cardiac progenitor cell therapy for treatment of myocardial infarction by inducing CXCR4 expression. *Circ Res*, 104: 1209-1216

- [246] Nanduri J, Yuan G, Kumar GK, Semenza GL and Prabhakar NR. (2008) Transcriptional responses to intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol*, 164: 277-281
- [247] Yuan G, Nanduri J, Khan S, Semenza GL and Prabhakar NR. (2008) Induction of HIF-1 $\alpha$  expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca<sup>2+</sup> signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. *J Cell Physiol*, 217: 674-685
- [248] JA Wang TC, J Jiang, H Shi, C Gui, RH Luo, XJ Xie, MX Xiang, X Zhang. (2008) Hypoxic preconditioning attenuates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Acta Pharmacol Sin*, 74-82
- [249] Das R, Jahr H, van Osch GJ and Farrell E. (2010) The role of hypoxia in bone marrow-derived mesenchymal stem cells: considerations for regenerative medicine approaches. *Tissue Eng Part B Rev*, 16: 159-168
- [250] Hu X, Yu SP, Fraser JL, Lu Z, Ogle ME, Wang JA and Wei L. (2008) Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 135: 799-808
- [251] Nakamura Y, Yasuda T, Weisel RD and Li RK. (2006) Enhanced cell transplantation: preventing apoptosis increases cell survival and ventricular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291: H939-947
- [252] MR Afzal HH, NM Idris, S Jiang, RPH Ahmed, M Ashraf. (2010) Preconditioning promotes survival and angiomyogenic potential of mesenchymal stem cells in the infarcted heart via NF-kappaB signaling. *Antioxid Redox Signal*, 693-702
- [253] Z Pasha YW, R Sheikh, D Zhang, T Zhao, M Ashraf (2008) Preconditioning enhances cell survival and differentiation of stem cells during transplantation in infarcted myocardium. *Cardiovasc Res*, 134-142
- [254] Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS and Dzau VJ. (2003) Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med*, 9: 1195-1201
- [255] Kutschka I, Kofidis T, Chen IY, von Degenfeld G, Zwierzchoniewska M, Hoyt G, Arai T, Lebl DR, Hendry SL, Sheikh AY, Cooke DT, Connolly A, Blau HM,

- Gambhir SS and Robbins RC. (2006) Adenoviral human BCL-2 transgene expression attenuates early donor cell death after cardiomyoblast transplantation into ischemic rat hearts. *Circulation*, 114: I174-180
- [256] Song H, Kwon K, Lim S, Kang SM, Ko YG, Xu Z, Chung JH, Kim BS, Lee H, Joung B, Park S, Choi D, Jang Y, Chung NS, Yoo KJ and Hwang KC. (2005) Transfection of mesenchymal stem cells with the FGF-2 gene improves their survival under hypoxic conditions. *Mol Cells*, 19: 402-407
- [257] Leblanc AJ, Touroo JS, Hoying JB and Williams SK. (2012) Adipose stromal vascular fraction cell construct sustains coronary microvascular function after acute myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302: H973-982
- [258] Leblanc AJ, Nguyen QT, Touroo JS, Aird AL, Chang RC, Ng CK, Hoying JB and Williams SK. (2013) Adipose-derived cell construct stabilizes heart function and increases microvascular perfusion in an established infarct. *Stem Cells Transl Med*, 2: 896-905
- [259] Kim DH, Kshitiz, Smith RR, Kim P, Ahn EH, Kim HN, Marban E, Suh KY and Levchenko A. (2012) Nanopatterned cardiac cell patches promote stem cell niche formation and myocardial regeneration. *Integr Biol (Camb)*, 4: 1019-1033
- [260] Sart S, Ma T and Li Y. (2014) Preconditioning stem cells for in vivo delivery. *Biores Open Access*, 3: 137-149
- [261] Hegedus C and Virag L. (2014) Inputs and outputs of poly(ADP-ribosylation): Relevance to oxidative stress. *Redox Biol*, 2C: 978-982
- [262] Kim MY, Mauro S, Gevry N, Lis JT and Kraus WL. (2004) NAD<sup>+</sup>-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1. *Cell*, 119: 803-814
- [263] Jagtap P and Szabo C. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 4: 421-440
- [264] Lonskaya I, Potaman VN, Shlyakhtenko LS, Oussatcheva EA, Lyubchenko YL and Soldatenkov VA. (2005) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J Biol Chem*, 280: 17076-17083
- [265] Pinnola A, Naumova N, Shah M and Tulin AV. (2007) Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein

- binding to chromatin and induction of its enzymatic activity. *J Biol Chem*, 282: 32511-32519
- [266] Ju BG, Solum D, Song EJ, Lee KJ, Rose DW, Glass CK and Rosenfeld MG. (2004) Activating the PARP-1 sensor component of the groucho/ TLE1 corepressor complex mediates a CaMKKinase II $\delta$ -dependent neurogenic gene activation pathway. *Cell*, 119: 815-829
- [267] Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, Seluanov A and Gorbunova V. (2011) SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*, 332: 1443-1446
- [268] Kraus WL and Lis JT. (2003) PARP goes transcription. *Cell*, 113: 677-683
- [269] Kraus WL and Hottiger MO. (2013) PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles. *Mol Aspects Med*, 34: 1109-1123
- [270] Dantzer F, Nasheuer HP, Vonesch JL, de Murcia G and Menissier-de Murcia J. (1998) Functional association of poly(ADP-ribose) polymerase with DNA polymerase alpha-primase complex: a link between DNA strand break detection and DNA replication. *Nucleic Acids Res*, 26: 1891-1898
- [271] de Murcia G and Menissier de Murcia J. (1994) Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci*, 19: 172-176
- [272] de Murcia JM, Niedergang C, Trucco C, Ricoul M, Dutrillaux B, Mark M, Oliver FJ, Masson M, Dierich A, LeMeur M, Walztinger C, Chambon P and de Murcia G. (1997) Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 7303-7307
- [273] Huber A, Bai P, de Murcia JM and de Murcia G. (2004) PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair (Amst)*, 3: 1103-1108
- [274] Menisser-de Murcia J, Mark M, Wendling O, Wynshaw-Boris A and de Murcia G. (2001) Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggests a functional synergy in cell proliferation during development. *Mol Cell Biol*, 21: 1828-1832
- [275] Masutani M, Nozaki T, Watanabe M, Ochiya T, Hasegawa F, Nakagama H, Suzuki H and Sugimura T. (2001) Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase

- in trophoblastic cell differentiation during tumorigenesis. *Mutat Res*, 477: 111-117
- [276] Berger NA, Sims JL, Catino DM and Berger SJ. (1983) Poly(ADP-ribose) polymerase mediates the suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells. *Princess Takamatsu Symp*, 13: 219-226
- [277] Virag L, Robaszkiewicz A, Rodriguez-Vargas JM and Oliver FJ. (2013) Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med*, 34: 1153-1167
- [278] S Hauschildt PS, WGBessler, A Mulsch. (1992) Induction of nitric oxide synthase in L929 cells by tumour-necrosis factor alpha is prevented by inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem J*, 255-600.
- [279] Virag L and Szabo C. (2002) The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors. *Pharmacol Rev*, 54: 375-429
- [280] Andrabi SA, Umanah GK, Chang C, Stevens DA, Karuppagounder SS, Gagne JP, Poirier GG, Dawson VL and Dawson TM. (2014) Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 10209-10214
- [281] S Rottenberg JJ, A Kersbergen, E van der Burg, AO Nygren, SA Zander, PW Derksen, M de Bruin, J Zevenhoven, A Lau, R Boulter, A Cranston, MJ O'Connor, NM Martin, P Borst, J Jonkers. (2008) High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 17079-17084
- [282] PC Fong DB, TA Yap et al. (2009) Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med*, 123-134
- [283] Prakash Jagtap CS. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 421-440
- [284] Liaudet L, Szabo E, Timashpolsky L, Virag L, Cziraki A and Szabo C. (2001) Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences. *Br J Pharmacol*, 133: 1424-1430
- [285] Szabo G, Liaudet L, Hagl S and Szabo C. (2004) Poly(ADP-ribose) polymerase activation in the reperfused myocardium. *Cardiovasc Res*, 61: 471-480

- [286] Hescheler J, Meyer R, Plant S, Krautwurst D, Rosenthal W and Schultz G. (1991) Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart. *Circ Res*, 69: 1476-1486
- [287] Kimes BW and Brandt BL. (1976) Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res*, 98: 367-381
- [288] Kompisch KM, Lange C, Steinemann D, Skawran B, Schlegelberger B, Muller R and Schumacher U. (2010) Neurogenic transdifferentiation of human adipose-derived stem cells? A critical protocol reevaluation with special emphasis on cell proliferation and cell cycle alterations. *Histochem Cell Biol*, 134: 453-468
- [289] King MA. (2000) Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 155-166
- [290] technologies Id. LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit \*for mammalian cells\*, Product Information.
- [291] Jagtap P, Soriano FG, Virag L, Liaudet L, Mabley J, Szabo E, Hasko G, Marton A, Lorigados CB, Gallyas F, Jr., Sumegi B, Hoyt DG, Baloglu E, VanDuzer J, Salzman AL, Southan GJ and Szabo C. (2002) Novel phenanthridinone inhibitors of poly (adenosine 5'-diphosphate-ribose) synthetase: potent cytoprotective and antishock agents. *Crit Care Med*, 30: 1071-1082
- [292] Faro R, Toyoda Y, McCully JD, Jagtap P, Szabo E, Virag L, Bianchi C, Levitsky S, Szabo C and Sellke FW. (2002) Myocardial protection by PJ34, a novel potent poly (ADP-ribose) synthetase inhibitor. *Ann Thorac Surg*, 73: 575-581
- [293] Palma PF, Baggio GL, Spada C, Silva RD, Ferreira SI and Treitinger A. (2008) Evaluation of annexin V and Calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. *Braz J Infect Dis*, 12: 108-114
- [294] Del Rio D, Stewart AJ and Pellegrini N. (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 15: 316-328
- [295] Qian H and Liu D. (1997) The time course of malondialdehyde production following impact injury to rat spinal cord as measured by microdialysis and high pressure liquid chromatography. *Neurochem Res*, 22: 1231-1236

- [296] Sardao VA, Oliveira PJ, Holy J, Oliveira CR and Wallace KB. (2007) Vital imaging of H9c2 myoblasts exposed to tert-butylhydroperoxide-- characterization of morphological features of cell death. *BMC Cell Biol*, 8: 11
- [297] Singla DK and McDonald DE. (2007) Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 293: H1590-1595
- [298] Keyes KT, Ye Y, Lin Y, Zhang C, Perez-Polo JR, Gjorstrup P and Birnbaum Y. (2010) Resolvin E1 protects the rat heart against reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 299: H153-164
- [299] Huang GQ, Wang JN, Tang JM, Zhang L, Zheng F, Yang JY, Guo LY, Kong X, Huang YZ, Liu Y and Chen SY. (2011) The combined transduction of copper, zinc-superoxide dismutase and catalase mediated by cell-penetrating peptide, PEP-1, to protect myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J Transl Med*, 9: 73
- [300] Chen QM, Tu VC, Wu Y and Bahl JJ. (2000) Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes. *Arch Biochem Biophys*, 373: 242-248
- [301] Copland IB and Galipeau J. (2011) Death and inflammation following somatic cell transplantation. *Semin Immunopathol*, 33: 535-550
- [302] Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR and Girkontaite I. (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 390: 350-351
- [303] Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY and Henson PM. (1998) Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest*, 101: 890-898
- [304] Huynh ML, Fadok VA and Henson PM. (2002) Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest*, 109: 41-50
- [305] Rasmussen JG, Frobert O, Holst-Hansen C, Kastrup J, Baandrup U, Zachar V, Fink T and Simonsen U. (2014) Comparison of human adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in a myocardial infarction model. *Cell Transplant*, 23: 195-206



- [306] Zhou Z, Chen Y, Zhang H, Min S, Yu B, He B and Jin A. (2013) Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy*, 15: 434-448
- [307] Liu X, Wang Z, Wang R, Zhao F, Shi P, Jiang Y and Pang X. (2013) Direct comparison of the potency of human mesenchymal stem cells derived from amnion tissue, bone marrow and adipose tissue at inducing dermal fibroblast responses to cutaneous wounds. *Int J Mol Med*, 31: 407-415
- [308] Ngo MA, Muller A, Li Y, Neumann S, Tian G, Dixon IM, Arora RC and Freed DH. (2014) Human mesenchymal stem cells express a myofibroblastic phenotype in vitro: comparison to human cardiac myofibroblasts. *Mol Cell Biochem*, 392: 187-204
- [309] Bochev I, Elmadjian G, Kyurkchiev D, Tzvetanov L, Altankova I, Tivchev P and Kyurkchiev S. (2008) Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int*, 32: 384-393
- [310] Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altankova I and Kyurkchiev DS. (2009) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*, 126: 37-42
- [311] Strioga M, Viswanathan S, Darinskas A, Slaby O and Michalek J. (2012) Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*, 21: 2724-2752
- [312] Stolzing A, Jones E, McGonagle D and Scutt A. (2008) Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*, 129: 163-173
- [313] Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z and Hedrick MH. (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24: 150-154
- [314] Hass R, Kasper C, Bohm S and Jacobs R. (2011) Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 9: 12

- [315] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P and Hedrick MH. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13: 4279-4295
- [316] Peng L, Jia Z, Yin X, Zhang X, Liu Y, Chen P, Ma K and Zhou C. (2008) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev*, 17: 761-773
- [317] Hoke NN, Salloum FN, Loesser-Casey KE and Kukreja RC. (2009) Cardiac regenerative potential of adipose tissue-derived stem cells. *Acta Physiol Hung*, 96: 251-265
- [318] Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV and March KL. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*, 109: 1292-1298
- [319] Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, Geleijnse ML, Fernandez-Aviles F, Zijlsta F, Serruys PW and Duckers HJ. (2012) First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 59: 539-540
- [320] Yang D, Wang W, Li L, Peng Y, Chen P, Huang H, Guo Y, Xia X, Wang Y, Wang H, Wang WE and Zeng C. (2013) The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. *PLoS One*, 8: e59020
- [321] Alshammary S, Fukushima S, Miyagawa S, Matsuda T, Nishi H, Saito A, Kamata S, Asahara T and Sawa Y. (2013) Impact of cardiac stem cell sheet transplantation on myocardial infarction. *Surg Today*, 43: 970-976
- [322] Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, McCall F, Carvalho D, Suncion V, Morales AR, Da Silva J, Sussman MA, Heldman AW and Hare JM. (2013) Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction. *Circulation*, 127: 213-223
- [323] Pawitan JA. (2014) Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int*, 2014: 965849

- [324] Timmers L, Lim SK, Hoefler IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, Goumans MJ, Strijder C, Sze SK, Choo A, Piek JJ, Doevendans PA, Pasterkamp G and de Kleijn DP. (2011) Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res*, 6: 206-214
- [325] Wilson A and Trumpp A. (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 6: 93-106
- [326] Fiorillo C, Ponziani V, Giannini L, Cecchi C, Celli A, Nassi N, Lanzilao L, Caporale R and Nassi P. (2006) Protective effects of the PARP-1 inhibitor PJ34 in hypoxic-reoxygenated cardiomyoblasts. *Cell Mol Life Sci*, 63: 3061-3071
- [327] Burkle A. (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays*, 23: 795-806
- [328] Pyriochou A, Olah G, Deitch EA, Szabo C and Papapetropoulos A. (2008) Inhibition of angiogenesis by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ-34. *Int J Mol Med*, 22: 113-118
- [329] Vinod KR, Chandra S and Sharma SK. (2010) Evaluation of 5-aminoisoquinoline (5-AIQ), a novel PARP-1 inhibitor for genotoxicity potential in vitro and in vivo. *Toxicol Mech Methods*, 20: 90-95
- [330] Yao Y, Zhang F, Wang L, Zhang G, Wang Z, Chen J and Gao X. (2009) Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction. *J Biomed Sci*, 16: 74
- [331] Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, Kim TS, Kim MH, Chung JH, Bae JW, Oh BH, Park YB and Kim HS. (2008) Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 51: 933-943
- [332] Kubo M, Li TS, Suzuki R, Ohshima M, Qin SL and Hamano K. (2007) Short-term pretreatment with low-dose hydrogen peroxide enhances the efficacy of bone marrow cells for therapeutic angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292: H2582-2588

## 10 Publikációs lista

### A doktori értekezés tárgyát képező közlemények:

Szepes M, **Benkő Z**, Cselenyák A, Kompisch KM, Schumacher U, Lacza Z, Kiss L:  
*Comparison of the direct effects of human adipose- and bone-marrow-derived stem cells on postischemic cardiomyoblasts in an in vitro simulated ischemia-reperfusion model.*

Stem Cells Int. 2013;2013:178346. doi: 10.1155/2013/178346. Epub 2013 Jun 19. **IF: 2,806 – megosztott első szerzős közlemény**

Szepes M, Janicsek Z, **Benkő Z**, Cselenyák A, Kiss L:

*Pretreatment of therapeutic cells with poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor enhances their efficacy in an in vitro model of cell-based therapy in myocardial infarct.*

Int J Mol Med. 2013 Jan;31(1):26-32. doi: 10.3892/ijmm.2012.1186. **IF: 1,880**

### Egyéb lektorált tudományos közlemények:

Dongó E, **Benkő Z**, Csizmazia Á, Marosi G, Grottke A, Jücker M, Schumacher U, Kiss L.: *H2S preconditioning of human adipose tissue-derived stem cells increases their efficacy in an in vitro model of cell therapy for simulated ischemia.*

Life Sciences, 2014, in press doi: 10.1016/j.lfs.2014.07.023 **(2013-as IF: 2,296) – megosztott első szerzős közlemény**

Cselenyák A, **Benkő Z**, Szepes M, Kiss L, Lacza Z:

*Stem cell transplantation in an in vitro simulated ischemia/reperfusion model.*

J Vis Exp. 2011 Nov 5;(57):e3575. doi: 10.3791/3575.

Cselenyák Attila, **Benkő Zsolt**, Szepes Mónika, Dr. Horváth Eszter Mária, Dr. Lacza Zsombor, Dr. Kiss Levente:

*Az őssejtek szerepe a szívinfarktus kezelésében: in vitro kísérletes módszer a hatásmechanizmus vizsgálatára*

Érbetegségek – A Magyar Angiológiai és Érsebészeti Társaság tudományos folyóirata, 2011/1 3-11. oldal

Dr. Kiss Levente, Dongó Eleni, Janicsek Zsófia, Szepes Mónika, **Benkő Zsolt**, Cselenyák Attila, Dr. Lacza Zsombor:

*Őssejtterápia alkalmazásának eredményei perifériás artériás érbetegségben*

Érbetegségek – A Magyar Angiológiai és Érsebészeti Társaság tudományos folyóirata, 2010/3 33-38. oldal

## 11 Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom mindazoknak, akiknek a segítsége nélkül nem jöhetett volna létre ez az értekezés. Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek: Dr. Kiss Leventének hasznos tanácsaiért, támogatásáért és legfőképpen töretlen bizalmáért. Továbbá köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet jelenlegi és volt vezetőinek Prof. Dr. Kollai Márknak, Prof. Dr. Ligeti Erzsébetnek, Prof. Dr. Benyó Zoltánnak és az intézet valamennyi munkatársának, hogy olyan termékeny közeget biztosítottak, amely hozzájárult az értekezés megszületéséhez legfőképpen Dr. Cselenyák Attilának, Dr. Horváth Eszter Máriának és Váczi Gabriellának, akik nagymértékben hozzájárultak ismereteim gyarapításához, valamint a kísérleteim elvégzéséhez szükséges szakmai információk pontosításához. Külön köszönet illeti Szepes Mónikát, akinek kitartása nélkül nem jöhettek volna létre az értekezés tárgyát képező publikációk. Köszönöm a segítséget Dongó Eleninek, Csizmazia Ágnesnek, Janicsék Zsófiának és Dr. Lacza Zsombornak. Végül köszönettel tartozom szüleimnek és barátaimnak, akik mindig mellettem álltak, segítettek a munkámban és támogattak a döntéseimben.