

Jaakko Uusitalo
SYDANLIHASSOLUN UUSIUTUMINEN

Syventävien opintojen kirjallinen työ
Syyslukukausi 2021

Jaakko Uusitalo
SYDANLIHASSOLUN UUSIUTUMINEN

Sydäntutkimuskeskus, Kardiologia ja kardiiovaskulaarilääketiede
Syyslukukausi 2021
Vastuuhenkilö: dosentti Pia Salo

Turun Yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkistettu
Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

Uusitalo, Jaakko: SYDÄNLIHASSOLUN UUSIUTUMINEN
Syventävien opintojen kirjallinen työ, 21 s., ei liites.
Fysiologia
Lokakuu 2021

Sydänlihaksen vaurioituessa supistumiskykyinen sydänlihaskudos korvautuu supistumiskyvyttömällä arpikudoksella. Sydäninfarkti on yleinen syy sydänlihaskudon vaurioitumiselle ja arpeutumisen vuoksi sydämen vajaatoiminnalle. On kiehtova ajatus, että arpikudoksen sijaan infarktialue korvautuisi supistumiskykyisellä ja sydämen normaalia sähköistä toimintaa noudattavalla lihaskudoksella, sydäninfarktin sairastamisen jälkeinen toimintakyky pysyisi parempana.

Tässä kirjallisuuskatsauksessa selvitetään sydänlihassolun uusiutumiseen tähtävien hoitojen tämänhetkistä tutkimustilannetta perehtymällä julkaistuihin tutkimuksiin ja katsaustartikkeleihin aiheen tiimoilta.

Sydänlihassolun uusiutumista on tutkittu ainakin parinkymmenen vuoden ajan ja tutkimuksen painopiste on siirtynyt omien sydänlihassolujen palauttamisesta jakautumiskykyisiksi suurelta osin kantasoluihin, jotka viedään sydämeen ja yritetään saada muodostamaan sydänlihaskudosta arpialueelle. Myös uusia menetelmiä sydänlihassolun luonnollisten korjausmekanismien aktivoimiseksi ja ohjelmoidun solukuoleman estämiseksi kehitellään.

Tähän mennessä useimpien kantasolupohjaisten hoitojen kohdalla on todettu, ettei kantasoluja ole onnistuttu jalostamaan sydänlihaskudokseen integroituviksi supistumiskykyisiksi soluiksi. Kuitenkin useiden solupohjaisten hoitomuotojen kohdalla tutkimuksissa on huomattu positiivisia vaikutuksia sydämen toiminnassa ja infarktiarven pienentymisessä. Nämä vaikutukset on tulkittu parakriiniseksi ja tämän vuoksi onkin käynnistynyt uusia tutkimuslinjoja positiivisten parakriinisten vaikutusten hyödyntämiseksi infarktiarven pienentämiseksi ja sydämen toiminnan parantamiseksi infarktin jälkeen.

Kliiniseen vaiheeseen sydänlihassolun uusiutumiseen tähtävissä kantasoluhoidoissa on viimeisimpänä siirtynyt PSC-CM-kantasoluhoidot. Soluja viedään sydänlihaskudokseen agiografian yhteydessä ruiskuttamalla, avokirurgiassa injisoimalla tai avokirurgiassa kudosteknologian keinoin rakennetun siirteen avulla. Prekliinisissä tutkimuksissa on saatu lupaavaa näyttöä siitä, että näillä menetelmillä voitaisiin saada aiheutettua todellista supistumiskykyisen lihaskudoksen lisääntymistä arpialueelle. Kuitenkin turvallisuudessa on huomattu suuria ongelmia, suuremmilla eläimillä tehdyissä tutkimuksissa siirre on toiminut vaarallisten kammiorytmihäiriöiden alkupisteinä ja eläimiä on kuollut rytmihäiriöihin. On myös esitetty vastakkainen näkemys siitä, että muodostaako siirteen solut todellisesti sydänlihaskudosta vai onko tämänkin hoidon vaikutus kuitenkin ensisijaisesti parakriininen. Alkavat kliiniset tutkimukset tuovat todennäköisesti lähiaikoina mielenkiintoista lisätietoa menetelmän tehosta ja turvallisuudesta.

Sisällys

1. Johdanto	2
2. Sydänlihassolun uusiutuminen	2
2.1 Sydänlihassolun uusiutumisesta	2
2.2 Sydänlihassolujen uusiutuminen alemmilla selkärankaisilla	4
2.3 Solusykli, solunjakautuminen ja kantasolut	4
2.4 Tapoja sydänlihassolun uusiutumisen stimuloimiseen	5
3. Tutkimukset infarktiarven korvaamiseksi lihaskudoksella	6
3.1 ASC (Adult Stem Cell) -pohjaiset hoidot	6
3.2 PSC (Pluripotent Stem Cell) -pohjaiset hoidot	7
3.3 PSC-CM -hoidon ongelmia	10
3.4 Muita lähestymistapoja infarktiarven pienentämiseksi	13
4. Päätelmät	15
Lähteet	16

1. Johdanto

Sydäninfarkti johtuu useimmiten valtimotaudin aiheuttamasta plakkiruptuurasta, joka tukkii jonkin sydäntä verisuonittavista sepelvaltimoista. Jatkuvasti työskentelevä sydänlihaski ei kestä hapenpuutetta pitkään ja sydänlihassolut menevät kuolioon tukkeutuneen valtimon ravitsemalta alueelta, ellei verisuonta saada avattua riittävän nopeasti. Menetetty sydänlihassolut korvautuvat supistumiskyvyttömällä arpikudoksella. Mikäli arpeutunut alue on laaja, sydän ei pysty pumppaamaan verta riittävän tehokkaasti ja syntyy sydämen vajaatoiminta. Se huonontaa ihmisen fyysistä suorituskykyä ja laskee elämänlaatua. Sydämen vajaatoiminta myös lisää kuolleisuutta. Parantavaa hoitoa sydämen vajaatoimintaan ei ole, mutta osan lääkkeitä on todettu parantavan ennustetta.

On looginen ajatus, että jos sydänlihassoluja uudistuisi infarktiarven alueella, sydämen toiminta voisi palautua hyväksi infarktin jälkeen. Sydänlihaksen uusiutumista ei kuitenkaan tapahdu riittävästi korjatakseen vaurioituneen alueen aikuisella ihmisellä tai muullakaan nisäkkäällä. Kuitenkin vastasyntyneellä hiirellä sydäninfarktin jäljet korjautuvat sydänlihassolun uusiutumisen vuoksi kokonaan (Zhang ym. 2015). Monet tutkijat ovat vuosien mittaan yrittäneet saada kehitettyä menetelmää, jolla ihmisen sydänlihassoluja saataisiin uusiutumaan ja korvaamaan infarktin vaurioittamaa kudosta.

Tämän kirjallisuuskatsauksen tarkoituksena on selvittää sydänlihassolun uusiutumiseen tähtäävien hoitojen tilannetta. Työssä on käytetty lähteenä Pubmed- ja Web of Science-tietokannoista löydettyjä artikkeleita sydänlihaksen uusiutumisen ja siihen tähtäävien hoitojen osalta.

2.1 Sydänlihassolun uusiutumisesta

Käsitys, että aikuisen ihmisen sydänlihassoluilla ei ole uusiutumispotentiaalia on lähtöisin 1970- ja 1980-luvuilla tehdyistä tutkimuksista (Zhang ym. 2015). Konsensus oli, että sydänlihassolujen jakautumista tapahtuu voimakkaasti sikiöllä, mutta saavutettuaan täyden lukumäärän, solut poistuvat solusyklistä ja erilaistuvat voimakkaasti, eivätkä enää palaa solusykliin (Erokhina ym. 1986). Teoriaa jakautumiskyvyttömistä kardiomyosyyteistä puolsivat myös tutkimukset, joissa patologisesti suurentuneita sydämiä verrattiin

normaalikokoisiin ja päädyttiin samaan solumäärään: kasvun täytyi johtua solujen hypertrofiasta (Zak 1973).

2000-luvun alusta lähtien asiaa on tutkittu uudelleen. Tutkimuksissa saatiin viitteitä sydänlihassolujen jakautumisesta, mutta tutkimustulosten tulkinnassa oli vaikeuksia: millainen tulos olisi luotettava osoittamaan sydänlihassolujen todellista uusiutumista? Osassa tutkimuksista on todettu solusykliin siirtymistä esimerkiksi mikroskopiassa nähtävien mitoosikuvioiden tai välillisesti DNA-synteesistä kertovan leimatun tymidiiniin perusteella. Nämä merkit eivät ole johtaneet välttämättä sytokineesiin vaan sydänlihassolun tuma on voinut jakautua johtaen kaksi- tai useampitumaisiin soluihin. Tiedetään myös, että sydänlihaskudoksessa tapahtuvat solunjakautumiset ovat pääasiassa muiden kuin sydänlihassolujen jakautumista. Sydänlihaskudoksen massasta 90% on sydänlihassoluja, mutta lukumäärällisesti niitä on vain 40 %. Muita kudoksen soluja ovat esimerkiksi fibroblastit, endoteelisolut ja verisuonten seinämien sileälihassolut (Nag 1980, Zhang ym. 2015.)

Radioaktiivisella tymidiinillä tehdyssä tutkimuksessa todettiin, että 24 tunnissa alle 0,0005% aikuisen jyräjän sydänlihassoluista merkkautui tymidiinillä kertoen solusyklin vähäisestä aktiivisuudesta. Tämä johtaisi noin 1% vuotuisen sydänlihassolujen uusiutumiseen. (Soonpaa 1997.) Kuitenkin on todettu, että polyploidisaatiota ja tumanjakautumista tapahtuu sydänlihassoluissa ilman sytokineesiä, minkä vuoksi näistä tuloksista ei voida suoraan päätellä, että solusykliin siirtyminen johtaisi solunjakautumiseen (Zhang ym. 2015). Ihmisen sydänlihassoluissa esiintyy polyploidiaa ja monitumaisuutta siinä määrin, että kaksitumaisia soluja on terveessä sydämessä n. 25% (Laflamme ja Murry 2011).

¹⁴CO₂-määrittelyyn perustuvassa tutkimuksessa päädyttiin tulokseen, että noin 1 % 25 - vuotiaan ihmisen sydänlihassoluista uusiutuu vuodessa ja 75 vuoden iässä vastaava luku on 0,45%. Tutkimus perustui ydinaseiden testaamisen kieltävän sopimuksen jälkeen ilmakehän ¹⁴CO₂ -pitoisuuden radikaaliin laskuun, jonka perusteella voitiin määrittää olivatko solut syntyneet sopimusta ennen vai sen jälkeen. Tutkimuksessa tutkittiin vainajien sydämiä. (Bergmann ym. 2009.)

Ihmisen sydänlihassolun jakautumispotentiaalin tutkiminen on vaikeaa ja virhelähteitä on paljon. Tämänhetkinen käsitys aiheesta on, että jakautumispotentiaalia on pienissä määrin, kuitenkin selvästi liian vähän infarktiarven korjaamiseen. (Bergmann ym. 2009, Le ym. 2017, Senyo ym. 2013.)

2.2 Sydänlihassolujen uusiutuminen alemmilla selkärankaisilla

On tiedossa, että esimerkiksi seeprakaloilla sydänlihaksen uusiutuu kypsien sydänlihassolujen jakautumisen kautta vielä aikuisenakin. Solut dedifferentoituvat, jakautuvat ja differentoituvat uudelleen korjaten sydämen rakenteen. (Gabern 2013.) Nisäkkäillä ei ole todettu aikuisen yksilön sydänlihaksen spontaania korjautumista, mutta heti syntymän jälkeen vaurioitettu sydän korjautuu hiirellä normaaliksi (Porrello 2011).

2.3 Solusyklistä, solunjakautumisesta ja kantasoluista

Solusykliksi sanotaan solunjakautumiseen liittyvää kiertoa, jossa erotetaan neljä vaihetta, joista yksi on varsinainen solunjakautuminen eli somaattisella solulla mitoosi. Mitoosin lopussa tapahtuu usein soluliman jakautuminen eli sytokineesi, jonka tuloksena on kaksi erillistä solua. Useimmiten kypsät somaattiset solut ovat tehtävänsä suorittaessaan solusyklin ulkopuolella, eli mitään solunjakautumiseen tähtäviä prosesseja ei tapahdu. Sikiön kardiomyoblasteissa eli sydänlihaksen kantasoluissa on kuitenkin supistumiskykyisiä sarkomeerejä, jotka purkautuvat solunjakautumisen ajaksi ja rakentuvat uudelleen sytokineesin jälkeen.

Solunjakautumisessa monistetaan solun perimä ja se jaetaan molempiin tytärsoluihin. On mahdollista, että solunjakautuminen pysähtyy DNA:n monistamisen jälkeen, jolloin ei synnykään kahta tytärsolua, vaan alkuperäisessä solussa on kaksinkertainen perimä (diploidia) tai useampikertainen perimä (polyploidia). On myös mahdollista, että tuma jakautuu ilman soluliman jakautumista, jolloin tuloksena on kaksitumainen solu.

Kantasolut ovat soluja, joista voi erilaistua kypsiä somaattisia soluja. Kantasoluja luokitellaan sen mukaan, millaisiksi soluiksi niillä on potentiaalia erilaistua. Totipotentteista kantasoluista voi erilaistua mitä tahansa eliön soluja. Pluripotentteista kantasoluista (PSC) voi erilaistua kaikkia slutyyppejä paitsi sikiökalvot ja istukka. Aikuisen kantasolut (ASC)

ovat yläkäsitelä soluille joita on monissa aikuisen kudoksissa. Näistä monet ovat multipotentteja ja voivat erilaistua esimerkiksi tiettyjen kudostyyppien soluiksi. Tällaisia ovat esimerkiksi mesenkymaaliset kantasolut (MSC).

2.4 Tapoja sydänlihassolun uusiutumisen stimuloimiseen

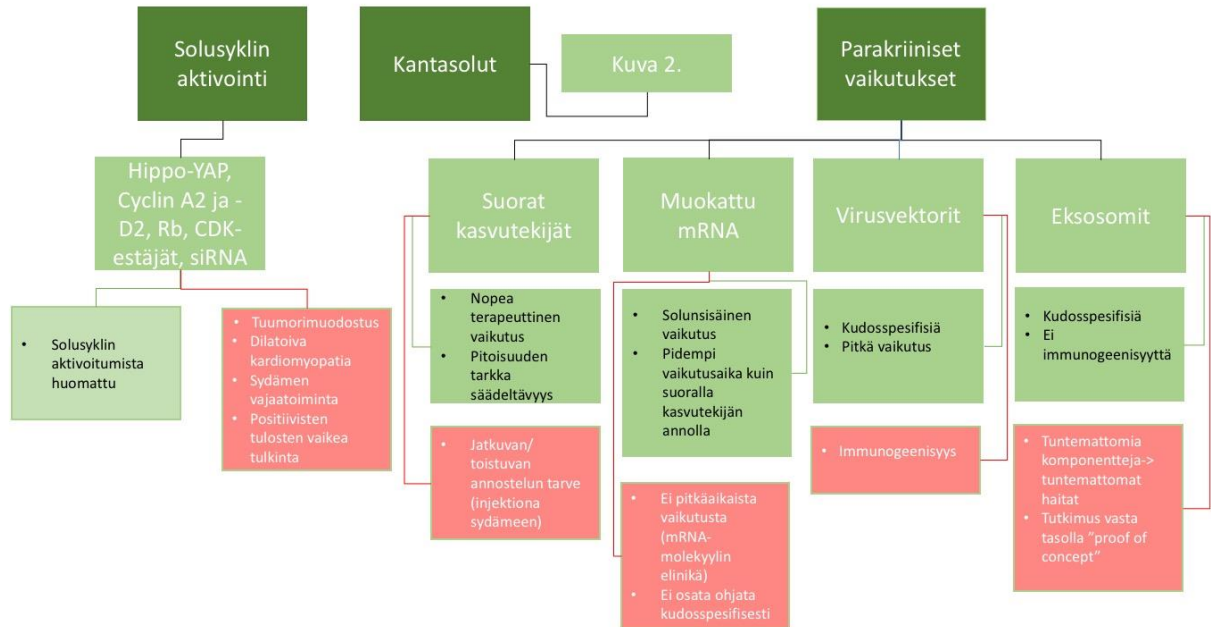
Sydänlihassolun uusiutumisesta aikuisella nisäkkäällä ei tiedetä, että tapahtuuko se valmiina kudoksessa olevien kantasolujen kautta vai esimerkiksi dedifferentiaation kautta. In vitro on löydetty kantasoluja, joilla on potentiaalia erilaistua sydänlihassoluksi, mutta on epäselvää esiintyykö niitä in vivo. (Gago-Lopez ym. 2014, Messina ym. 2014.)

Monissa tutkimuksissa lähestymistapana on ollut suora kardiomyosyytien solusykliin palaamisen aktivaatio (Kuva 1). Tiedetään, että jakautuvat kardiomyosyytit ilmentävät paljon solusykliaktivaattoreita ja hyvin vähän solusyklin inhibiittoreita (Poolman ym. 1998). Tiedetään myös, että solusykliin siirtyminen estyy, kun solusykliä aktivoivat geenit hiljennetään ja pakataan tiheäksi heterokromatiiniksi. Heterokromatiiniksi pakkautumista estettiin poistamalla retinoblastooma- (Rb-) geenin tuotetta. Näin saatiin sydänlihassolut jakautumaan, mutta aiheutettiin myös dilatoiva kardiomyopatia ja sydämen vajaatoiminta. (Sdek ym. 2011.) Toinen lähestymistapa oli proliferaatiota säätelevän Hippo-YAP-signalointireitin stimulointi. Tällä tavoin saatiin aikuisella hiirellä infarktiarpea pienemmäksi ja vasemman kammion toimintaa parannettua ilman, että aiheutui vajaatoimintaa. (Lin ym. 2014.) Tutkimusstrategioina on ollut myös tunnettujen onkogeenin aktivoiminen transgeenisillä hiirillä. Näillä strategioilla saatiin solusykliaktiivisuutta nostettua, mutta lisäksi aiheutui kasvaimia (Field 1988), kardiomyopatioita (De Leon ym. 1994) ja laajaa apoptoosia (Kirshenbaum ym. 1996).

Solusykliä stimuloivien Cyclin D2:n ja A2:n ilmennyksellä saatiin infarktiarpea pientymään (Pasumarthi ym. 2005, Shapiro 2014). Transgeenisillä eläimillä tehdyissä tutkimuksissa ei kuitenkaan voida päästä varmuuteen siitä, onko sydänlihassolut alunperinkään täysin differentioituneita ja mitä muita vaikutuksia tilanteeseen on sillä, että solusykliä stimuloivat proteiinit ovat jatkuvasti läsnä yksilön kehityksessä (Shapiro 2014).

Solusyklin inhibiittorien kuten CDK-estäjät p21, p27 ja p57 kolmoisestolla siRNA:n avulla on saatu aikuisia kardiomyosyyttejä jakautumaan. Tätä lähestymistapaa ei ole vielä saatu

kliinisiin kokeisiin ihmisellä. Tutkimuksessa löydettiin 40 miRNA- molekyyliä, joilla on vaikutusta sydänlihassolun proliferaatioon. Näistä 2 lisäsi myosyytien proliferatiota ja pienensi infarktiarpea parantaen vasemman kammion funktiota hiirillä. (Zhang ym. 2015.)



Kuva 1.

3. Tutkimukset infarktiarven korvaamiseksi lihaskudoksella

Kantasoluja on tutkittu paljon tavoitteena sydäninfarktiarven pienentäminen ja sydänlihaksen funktion parantaminen. Hypoteesi tämän taustalla on se, että mikäli saataisiin vietyä sydäninfarktiarpeen kantasoluja, jotka pystyisivät muodostamaan toimivaa sydänlihaskudosta, voitaisiin mahdollisesti infarktiarpea pienentää ja korvata toimivalla sydänlihaskudoksella.

3.1 ASC (Adult Stem Cell) -pohjaiset hoidot

Ensimmäiseksi tutkimuskohteeksi valikoituivat lupaavien prekliinisten tutkimusten perusteella poikkijuovaisen lihaksen kantasolut, myoblastit, joiden toivottiin pystyvän tuottamaan sopivissa olosuhteissa supistumiskykyistä sydänlihaskudosta. Kliinisessä ensimmäisen vaiheen tutkimuksessa (MAGIC) ei todettu paranemista vasemman

kammion ejektiofraktiossa (LV-EF) ja tutkimus jouduttiin keskeyttämään etuajassa kammiooperäisten rytmihäiriöiden lisääntymisen vuoksi. (Menasché ym. 2008.) Ongelmaksi paljastui myöhemmin, että solut eivät ilmentäneet aukkoliitoksen proteiineja, jotka ovat välttämättömiä elektrofysiologiselle viestinnälle sydänlihaksen solujen välillä (Roell ym. 2007).

Luuytimeistä johdetuilla soluilla (bone-marrow derived cells, BMDC) edettiin kliiniseen tutkimukseen seuraavana. Alunperin spekulointiin, että luuytimen soluilla olisi potentiaalia muodostaa kardiomyosyyttejä, mutta myöhempi näyttö on toistuvasti osoittanut, että näin ei ole. (Rose ym. 2009.) Myöhemmin jo kyseenalaistetun tutkimuksen perusteella mononukleaariset BMD-solut saivat hiiren sydänlihaksen uusiutumaan (Orlic ym. 2001). Tämän innoittamana päädyttiin maailmanlaajuisesti useisiin klinisiin kokeisiin, joista on haasteellista muodostaa kokonaiskuvaa, koska sekoittavia tekijöitä eri tutkimusasetelmissä on paljon, ja tuloksia hoidon hyödyllisyyden puolesta ja vastaan saatiin runsaasti. Tutkimusasetelmat ja menetelmät erosivat toisistaan valtavasti. (Selvakumar ym. 2020.) Mesenkymaaliset kantasolut (MSC) päätyivät tutkimuksen kohteeksi seuravana vastaavanlaisin tuloksin: osassa tutkimuksista näytti että potilaat saivat hoidosta parannusta infarktinjälkeiseen vasemman kammion ejektiofraktioon, mutta toiset tutkimukset eivät saaneet tätä hyötyä näkyviin. Systemaattisen Cochrane-katsauksen mukaan mikään näistä luuytimen kantasoluista ei aiheuta todellista sydänlihaskudoksen uusiutumista ja vaikka niiden käyttö tutkimuksissa on turvallista, ei niiden hyödyistä ole luotettavaa näyttöä. Mahdolliset positiiviset vaikutukset todennäköisesti liittyvät parakriinisiin ja endokriinisiin vaikutuksiin, eikä BMD-soluilla ole kykyä muuntatua sydänlihassoluiksi. (Fisher ym. 2016.)

Vuonna 2011 tutkimuksesta saatiin tulos, että sydämen eteisissä on kantasoluja, jotka voidaan eristää ja monistaa ex vivo. Näillä c-kit+ -soluilla olisi tutkimuksen mukaan kykyä erilaistua sydänlihassoluiksi ja muodostaa koronaarivaltimoita. (Bolli ym. 2011.) Myöhemmin tämä tutkimus vedettiin pois, kun ilmeni, että dataa on manipuloitu. Kuitenkin kliinisiä tutkimuksia ehdittiin aloittaa ja käynnissäoleva tutkimus keskeytettiin, kun tieteellinen pohja tutkimusten takana kyseenalaistettiin. (Selvakumar ym. 2020.)

Cardiosphere-derived cells -käsite on syntynyt siitä, että endomyokardiumin biopsiasta eristettyjä soluja viljeltäessä niitä ryhmittyy spontaanisti pallomaisiksi ryppäiksi, jotka

sisältävät useaa eri solutyyppejä. Näistä on eristetty useita kantasoluille tyypillisiä merkkiaineita ilmentäviä soluja ja prekliinisissä eläinkokeissa on saatu niiden avulla lupaavia tuloksia sydäninfarktin jälkeisen arven pienentymisestä ja vasemman kammion toiminnan parantumisesta. (Selvakumar ym. 2020.) Kliininen ensimmäisen faasin tutkimus CADUCEUS osoitti arpialueen pienentymistä myös ihmisellä, mutta vasemman kammion toiminta ei parantunut (Patel ym. 2016). Toisen faasin tutkimus ALLSTAR keskeytettiin, koska siinä ei saatu enää toistettua ensimmäisen faasin tutkimuksen mukaista arpialueen pienentymistä. Cardiosphere derived cell -solut eivät ole enää iskemia-arven parantamiseen tähtäävän tutkimuksen aiheena, mutta tutkimus jatkuu Duchennen lihasdystrofiaan liittyvän kardiomyopatian hoidon osalta. (Selvakumar ym. 2020.)

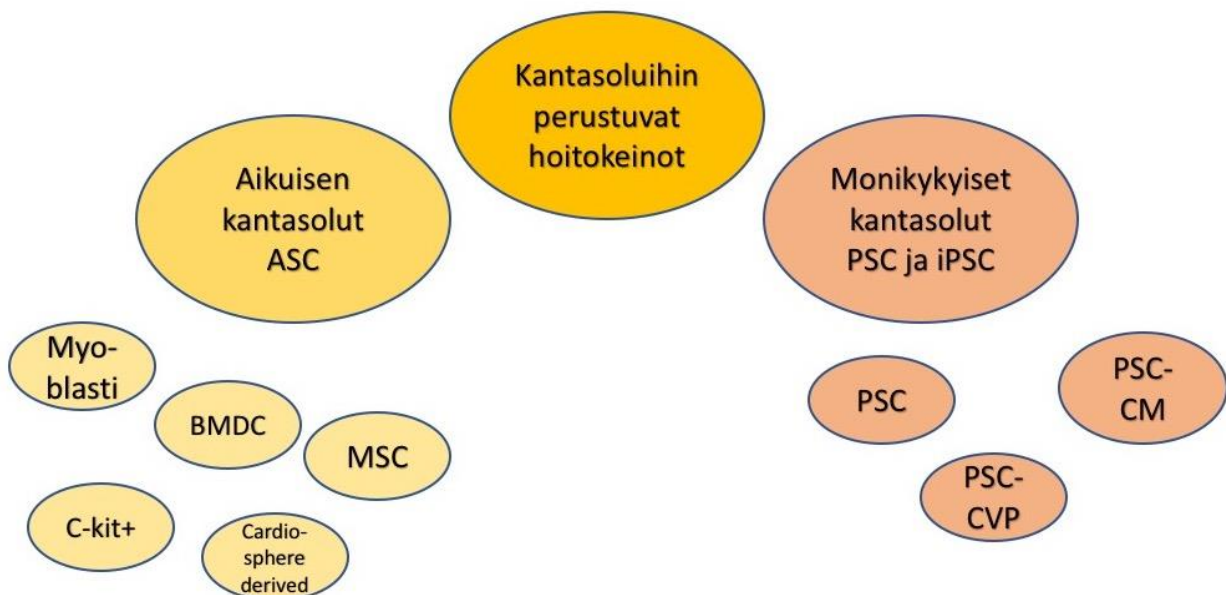
3.2 PSC (Pluripotent Stem Cell) -pohjaiset hoidot

Pluripotentit kantasolut (PSC) eli monikykyiset kantasolut pystyvät nimensä mukaisesti erilaistumaan usean eri solulinjan soluiksi. Alkionkehityksessä kaikki yksilön solut polveutuvat pluripotentista kantasoluista. Ohjelmoidut pluripotentit kantasolut (iPSC) ovat somaattisista soluista laboratoriossa in vitro tehtyjä pluripotentteja kantasoluja. Pluripotentista kantasoluista osataan nykyään tehdä usealla menetelmällä sykkiviä sydänlihassoluja in vitro (Mummery ym. 2012.) Tämän vuoksi kyseessä on houkutteleva kohde tutkittavaksi sydäninfarktiarven hoidossa. Ensimmäiset yritykset siirtää PSC soluja sydänlihaskudokseen epäonnistuivat, koska pelkkä sydänlihas ympäristönä ei saanut niitä muuntumaan sydänlihaskudokseksi. Tuloksena oli muunmuassa teratoomia. (Nussbaum ym. 2007.)

Tutkimuksen painopiste siirtyi PSC-pohjaisiin kardiovaskulaarisiin progenitorisoluihin (PSC-CVP) ja PSC-pohjaisiin kardiomyosyytteihin (PSC-CM). Näitä jalostetaan laboratoriossa PSC-soluista kohti sydämen soluja ja pyritään istuttamaan ne arven alueelle sopivassa kehitysvaiheessa. Tarkoituksena on, että ne liittyisivät sydänlihaksen ja muodostaisivat toimivaa sydänlihaskudosta. PSC-CVP-soluilla ajateltiin olevan potentiaalia muuntua sekä sydänlihassoluiksi, että verisuonia muodostaviksi soluiksi, minkä ajateltiin mahdollisesti parantavan graftin kiinnittymistä verrattuna PSC-CM -soluihin. Tutkimukset eläinkokeissa kuitenkin osoittivat, ettei potentiaalia toimivaksi sydänlihakseksi ollut in vivo ja että verisuonimuodostustakaan ei tapahtunut. Joitain positiivisia vaikutuksia todettiin,

mutta niiden takana todennäköisesti on samantyyppiset parakriiniset vaikutukset kuin ASC - soluilla. (Selvakumar ym. 2020.)

PSC-CM -solujen kohdalla tilanne vaikuttaa olevan toisin. Laajoissa eläintutkimuksissa on osoitettu, että PSC-CM -soluja infarktialueelle viemällä on saatu aikaan infarktiarven korjautumista toimivalla lihaskudoksella. Aikaisempien vaiheiden tutkimukset pienillä eläimillä osoittivat, että tällä tekniikalla saatiin infarktialueelle toimiivaa lihaskudosta, joka yhdistyi sähköisesti eläimen omaan sydänlihaskudokseen ja paransi sydämen toimintaa. (Caspi ym. 2007, Laflamme ym. 2005.) Vuonna 2014 julkaistiin laaja tutkimus eläimillä, jossa tutkittiin PSC-CM -soluja hoitona iskeemiseen kardiomyopatiaan ja saatiin hyviä tuloksia. Kädellisillä tehdyissä eläinkokeissa saatiin korvattua arpea lihaskudoksella, joka sai ravitsemuksensa isännän verenkierrosta ja tuotti supistusvoimaa arven alueella. 3 kk kuluttua hoidosta ejektiofraktio hoidetuilla oli palannut lähes normaaliksi. (Liu ym. 2018, Shiba ym. 2016.) Tämän parannuksen syyksi on ehdotettu suoraa graftin supistumiskykyä, eikä pelkkiä parakriinisia vaikutuksia, kuten aiemmin mainituilla soluhoidoilla. Lupaavien tulosten vuoksi pienen otoskoon kliinisiä tutkimuksia ihmisillä on käynnissä Kiinassa ja Japanissa sekä suunnitteilla Pohjois-Amerikassa ja Euroopassa (Mallapaty 2020).



Kuva 2.

3.3 PSC-CM -hoidon ongelmia

Vaikka kardiomyosyyttihoidolla on saatu lupaavia tuloksia eläinkokeissa, myös haasteita on ilmennyt, ja ennen kuin siitä voidaan odottaa kliiniseen käyttöön tulevaa sovellusta, on ratkaistava joitain ongelmia. Isommilla eläimillä, kuten kädellisillä ja sioilla tehdyissä tutkimuksissa ilmeni kammioperäisiä rytmihäiriöitä, jotka johtivat jopa kuolemaan. Pienemmillä eläimillä tehdyissä kokeissa näitä ei tullut esille. Selkeitä eroja näissä eri ryhmissä olivat ainakin sydämen koko, solusiirteen koko ja sydämen leposyke. Leposyke pienillä eläimillä on välillä 240-600 ja kädellisillä 100-130 luokassa, sioilla vielä hitaampi vastaten paremmin ihmisen leposyketä. Nopea leposyke voi pienemmillä eläimillä peittää mahdollisen graftin aiheuttaman arytman. Myös sydämen kokoero pienten ja isojen eläinten välillä oli suuri: 0,15-3 grammasta 37-52 grammaan. Myös istutettujen solujen määrä oli isommilla eläimillä kymmenkertainen, joten myös johtumismatka istutettujen solujen välillä oli isoilla eläimillä paljon pidempi. Yksi tutkimus tehtiin sioilla, joiden sydän on lähempänä ihmisen sydämen kokoa ja leposyke suurinpiirtein samaa tasoa. Tutkimuksessa soluja saaneilla sioilla arpialueen supistuminen parani, mutta kaksi seitsemästä siasta kuoli kammiotakyarytmian vuoksi seuranta-aikana. (Selvakumar ym. 2020, Romagnuolo ym. 2019.) Ihmisen sydän on suurikokoinen ja leposyke suhteellisen harva, joten voidaan olettaa vastaavankaltaisia ongelmia ilmenevän ihmiselläkin, mikäli ongelmaa ei saada ratkaistua (Romagnuolo ym. 2019).

Hypoteeseja rytmihäiriön syistä on ollut. Yksi mahdollinen aiheuttaja on se, että solujen kypsyysaste voi vaikuttaa aktiopotentialin johtumisnopeuteen. Kun johtuminen on hitaampaa, aktiopotentiali saattaa alkaa kiertämään siirteen eri osien välillä aiheuttaen takyarytmianoduksen. Antohetkellä solujen kypsyys vastaa sikiön sydänsolujen kypsyyttä. Ensimmäisten viikkojen aikana ne kypsyvät ja vastaavasti rytmihäiriöherkkyys vähenee. Tämä tukee sitä, että solujen kypsyysasteen ja rytmihäiriöiden välillä voi olla yhteys. (Selvakumar ym. 2020.)

Toinen mahdollinen selittävä tekijä on aukkoliitosproteiinien liian vähäinen ilmentyminen istutuksen jälkeen. In vitro on huomattu, että siirteen solut synkronoituvat paremmin isäntäsolujen kanssa, jos konneksiini 43:n pitoisuus on korkeampi. In vivo -kokeissa on huomattu sen olevan matala ensimmäisten viikkojen ajan istuttamisen jälkeen ja nuosevan

myöhemmin. Rytmihäiriöalttius sen sijaan laskee samalla aikajänteellä. Nämä löydökset tukevat aukkoliitosproteiinien osallisuutta arytmogeneesiin. (Severs 2001.)

Kolmas mahdollinen syy takyarytmioiden taustalla ajatellaan olevan siirrettyjen solujen heterogeenisyys: PSC-CM -soluja on useita eri tyyppisiä. Osa soluista on tyypiltään vastaavia kuin sinussolmukkeessa, osa eteisen seinämän soluja vastaavia ja osa kammiotyyppisiä. Myös oikean ja vasemman kammion solujen on todettu eroavan toisistaan, mutta näitä tyyppisiä ei ole eroteltu vielä PSC-CM -solujen kohdalla. (Kondo ym. 2006, Molina ym. 2014.) Solmuketyypisten solujen itsenäinen tahdistustaipumus on solutyypeistä suurin ja eteistyyppin soluilla on jonkin verran tahdistustaipumusta. Kammiotyyppin soluilla tahdistustaipumusta ei ole juuri ollenkaan. On ehdotettu, että mikäli solupopulaatio saataisiin puhdistettua hyvin, niin että hoidossa käytettävät solut olisivat vain kammiotyyppisiä, arytmogeenisyys vähenisi. (Liew ym. 2020.)

Istutettujen solujen selviäminen uudessa isännässään ei ole täydellistä. Iskeemiset olosuhteet infarktoituneessa sydämessä, kudostuhon aiheuttama inflammaatio ja immunipuolustuksen välittämä hyljintäreaktio ovat kukin osaltaan tämän taustalla. (Khodayari ym 2019). Ainakin muiden kuin autologisten kantasolujen kohdalla immuunipuolustus pyrkii tuhoamaan siirretyt solut. Eläinkokeissa eläimet ovat immunosuppressoituja, jotta siirretyt solut säilyisivät pitempään. Voimakas immuunisuppressio saattaa altistaa infektioille ja se saattaa ainakin sairaampien potilaiden kohdalla olla merkittävä ongelma. Autologisten iPSC- solujen johdoksista tehty siirre saattaisi ratkaista hyljintäongelman. Kuitenkin tämänhetkisellä teknologialla iPSC-solujen valmistamiseen laboratoriossa voi mennä kuukausia, joten akuuttivaiheen hoidoksi siitä ei tässä vaiheessa ole. (Selvakumar 2020.)

Antotavalla on myös vaikutusta solujen selviytymiseen ja vaaditaan lisää tutkimuksia siitä, mikä olisi optimaalinen antotapa. Soluja on annettu laskimonsisäisesti, katetriteitse sepelvaltimoon sekä injektoiden myokardiumiin joko katetrin avulla tai avoleikkauksessa. Tällä hetkellä käsitys on, että solut säilyvät parhaiten avokirurgiassa tehtävällä transepikardiaalisella injektioilla myokardiumiin. Tämä on toisaalta myös invasiivisin tekniikka ja riski systeemiselle embolisaatiolle on suuri. Muita riskejä ovat sydämen seinämän repeytymisvaara ja akuutti inflammaatio. Tälläkin tekniikalla soluja karkaa

verenkiertoon, lymfakiertoon ja vuotaa perikardiumiin. Sydämen jatkuva liike ja supistelu vaikeuttavat solujen säilymistä. (Selvakumar ym. 2020, Wollert ja Drexler 2005.)

Katetriteitse tehtävä transendokardiaalinen injektio on vähemmän invasiivinen toimenpide. Sillä saadaan myös soluja vietyä selaisillekin alueille, joihin ei avokirurgisesti päästä, kuten kammioiden väliseinään. Tässäkin tekniikassa on riski systeemiselle embolialle ja lisäksi solut jakautuvat epätasaisemmin, mikä voi altistaa rytmihäiriöille. (Selvakumar 2020.)

Sepelvaltimon sisäinen annostelu on ollut ACS- tutkimuksissa tekniikoista käytetyin, koska se on helppo yhdistää pallolaajennustoimenpiteeseen. Solut laitetaan suoraan tukkeutuneeseen valtimeen, joten ne päätyvät infarktialueelle. Tällä tekniikalla ei ole kuitenkaan saatu merkittävästi soluja jäämään myocardiumiin, vaan lähes kaikki huuhtoutuvat pois. Tämän tekniikan käyttö voi tulla kyseeseen, mikäli haetaan vain parakriinisiä vaikutuksia, mutta solujen istuttamiseen tehokkuus ei liene riittävä. Tarvittaisiin erittäin suuri solumäärä, joka valtimeen ruiskutettuna voisi johtaa embolioihin kudoksissa. (Nakamura ja Murry 2019.) Solujen selviytymisasteeksi parhaimmillaankin on arvioitu alle 2% (Hong ym. 2013, Zeng ym. 2007).

Kudosteknologian avulla valmistettuja rakenteita on kokeiltu ratkaisuksi siirrettyjen solujen selviämiseen. Soluista ja biomateriaaleista on muodostettu levyjä, soluja on asetettu väliaineeseen ja laboratoriossa on rakennettu sydänlihaskudostakin. Näitä on asetettu avokirurgiassa epikardiaalisesti vauriokohtaan. Tällä tavoin onkin saatu solujen selviytymistä paremmaksi ja nopeutettua siirrettyjen solujen kypsymistä. Eläinkokeissa on myös todettu sydämen funktion parantumista. Tekniikan soveltamisessa on silti vielä haasteita. Graffit ovat vielä verrattaen lyhytikäisiä, verisuonituksen muodostuminen on epätehokasta, niiden asettamiseen tarvitaan avosydänkirurgiaa ja Isokokosiin grafteihin liittyy arytmioiden vaara. (Liew ym. 2020). Käynnissä olevassa kliinisessä kokeessa Japanissa on valittu antotavaksi soluista rakennetut levyt (Mallapaty 2020).

Teratooman vaara on olemassa, jos elimistöön päätyy epäkypsiä pluripotentteja kantasoluja, joiden erilaistuminen jää kesken. Toistaiseksi eläinkokeissa ei ole huomattu teratoomien muodostumista, mutta tutkittavien eläinten määrät ovat olleet pieniä. Tarvitaan suuren otoskoon tutkimuksia huolellisesti valmistelluilla solupopulaatioilla ja läheisesti

ihmistä muistuttavilla eläimillä, ennen kuin turvallisuutta tämän suhteen voidaan arvioida luotettavasti. (Liew ym. 2020.)

Tarvittavien solujen määrä on suuri ja laboratorioden kapasiteetti nykyisellään ei riitä laajemman mittakaavan hoitojen toteuttamiseen. Myös solujen puhdistusprosessissa on kehitettävää. Teknisesti hoidon toteuttamisessa olisi haasteita nykyteknologialla, vaikka tieteellisesti saataisiinkin kehitettyä toimiva hoitomuoto. Myöskään annettavien solujen optimaalista annosta ei vielä tiedetä. Tiedetään, että iskeemisessä variossa sydänlihassoluja voi menettää miljoona kappaletta. (Selvakumar 2020.)

Myös PSC-CM-solujen kohdalla on joissain tutkimuksissa esitetty, että sydänlihaskvauriota korjaava mekanismi olisikin enemmän parakriininen, vaikka oletuksena on ollut sydänlihassolujen muodostuminen kantasoluista. Tutkimuksessa tarkasteltiin infarktialueella olevia soluja siitä näkökulmasta, ovatko ne uusia vai vanhoja. Myös toimivien solujen määrää tutkittiin. Tuloksena saatiin, että todennäköisesti soluterapia on pelastanut alkuperäisiä sydänlihassoluja, eikä niinkään korvannut niitä uusilla. Soluhoidon lisäämä toimiva sydänlihassolukko oli huomattavasti isompi kuin graftin koko, mikä viittasi siihen, että soluhoido saati alkuperäisiä sydänlihassoluja selviämään paremmin. Myöskään solujen proliferaatioon viittaavia merkkejä ei nähty. Tutkimuksessa tarkasteltiin kantasoluperäisten sydänlihassolujen erittämiä molekyylejä ja todettiin solujen tuottavan antiapoptoottisia, proangiogeenisiä ja promigratorisia välittäjäaineita. (Tachibana ym. 2017)

3.4 Muita lähestymistapoja infarktiarven pienentämiseksi

Monissa tutkimuksissa, joissa soluhoido on tarkasteltu, on saatu positiivisia tuloksia, vaikka tavoitteeseen sydänlihassolujen korvautumisesta ei olisikaan päästy. Näiden positiivisten tulosten taustalla on nykykäsityksen mukaan parakriiniset vaikutukset, jotka muokkaavat immuunivastetta, suojaavat soluja apoptoosilta ja vaikuttavat solujen proliferaatioon. Tutkimuksen alla on soluttomia hoitoja, joissa pyritään aiheuttamaan soluhoidoien parakriinisiä positiivisia vaikutuksia kasvutekijöillä, modifioiduilla RNA-molekyyleillä ja eksosomeilla ilman soluhoidoien haasteita. (Liew ym. 2020.)

Suoraviivaisin lähestymistapa parakriinisten vaikutusten aikaansaamiseksi on

kasvutekijöiden suora injektio infarktoituneeseen sydämeen. Tässä lähestymistavassa etuna ovat nopea terapeutinen vaikutus ja kasvutekijöiden pitoisuuden tarkka säädeltävyys. VEGF-kasvutekijän vaikutusta on tutkittu sillä ajatuksella, että alueen verisuonituksen parantaminen parantaa kudoksen hapensaantia ja selviytymistä. Toinen lähestymistapa on antiapoptoottisten aineiden käyttö suojaamaan hapenpuutteen vaurioittamia sydänlihassoluja. Antiapoptoottisista kasvutekijöistä on kokeiltu ainakin HGF- , PDGF- ja IL-kasvutekijää. Myös joitain sydänlihassolun proliferaatiota indusoivia kasvutekijöitä on kokeiltu. Näistä kaikilla on saatu prekliinisissä tutkimuksissa lupaavia tuloksia turvallisuuden ja tehon suhteen. Ongelmana kuitenkin lyhyt puoliintumisaika kudoksessa, minkä vuoksi tarvitaan jatkuvaa tai toistuvaa infuusiota sydämeen. Aineet eivät myöskään ole spesifisiä. (Liew ym. 2020.)

Muokattuja mRNA-molekyylejä eli modRNA- molekyylejä on tutkittu parakriinisten aineiden kuljettamisessa kohdesolukoon, koska verrattuna suoraan infuusioon, mRNA:n tuottamat proteiinit toimivat myös solunsisäisesti ja niiden vaikutusaika on pidempi. Myös immunogeenisyyttä tällä hoidolla on vähemmän. mRNA-molekyylit eivät integroidu isäntäsolun perimään, joten kasvainmuodostus ei tällä hoidolla ole ongelma. Kuitenkaan pitkäaikaisista ekspressiosta ei mRNA:n avulla saada, joten potentiaalinen modRNA - pohjainen hoitomuoto soveltuisi vain käyttötarkoituksiin, joissa riittää lyhytaikainen proteiinin ilmentäminen, kuten kardiomyosyyttien remodelaation edistäminen tai proliferaation tukeminen. Ongelmana modRNA-hoidossa on tällä hetkellä se, että ei ole keksitty tapaa saada RNA-molekyylejä ohjautumaan kudosspesifisesti. (Magadum ym. 2019.)

Virusvektorien avulla voidaan saada pitkäaikaisesti ilmennettyä haluttuja proteiineja solussa. Virusvektoreissa on ongelmana immunogeenisyys ja niillä viruksilla, jotka saavat integroitua perimänsä isäntäsolun perimään, on riski syöpien syntymiseen ja isäntäsolun toiminnan häiriintymiseen. Adenovirusvektori ja AAV eli adeno-associated virus ovat sellaisia, jotka eivät integroi perimää isäntäsolun genomiin, joten kasvainmuodostus ei ole niiden kohdalla ongelma. Adenovirus on kuitenkin voimakkaasti immunogeeninen. AAV on vain lievästi immunogeeninen, mutta senkin kohdalla immunologinen reaktio haittaa käyttökelpoisuutta hoidoissa. Virusvektoreiden hyvä puoli on siinä, että niistä saadaan tehtyä kudosspesifejä. (Magandum ym. 2019.)

Myokardiumin on todettu erittävän eksosomeja iskeemisen vaurion yhteydessä. Eksosomeista tiedetään, että solut viestivät niillä läheisten solujen kanssa, mutta niitä eritetään myös verenkiertoon ja ne saattavat kantaa viestejä kaukaisempiin kudoksiin. Oletetaan myös, että eksosomien pinnalla on molekyyliä, jotka ohjaavat niiden kudoshakeutumista. PSC-CM -solujen erittämät eksosomit voidaan eristää ja niillä on eläinkokeissa todettu olevan sydänlihasta suojaavaa vaikutusta. Vaikutusta mahdollisesti voitaisiin tehostaa muokkaamalla geneettisesti luovuttajasoluja pakkaamaan eksosomeihin enemmän sydänlihasta suojelevia aineita. Eksosomien tutkimus hoitovaihtoehtona on alussa, mutta proof of concept on jo näytetty eräässä tutkimuksessa. Kaikkia eksosomien sisältämiä aineita ei tunneta, joten odottamattomia sivuvaikutuksia saattaa ilmetä. (Magadum ym. 2019, Liew ym. 2020.)

4. Päätelmät

Iskeemisen sydäntapahtuman aiheuttaman infarktiarven pienentämiseen ja parantamiseen tähtääviä hoitoja on tutkittu viimeisten parinkymmenen vuoden aikana monelta kantilta. Lupaavia tuloksia on saatu, mutta toistaiseksi ei ole keksitty toimivaa hoitomuotoa. Edelleen tutkimuksen alla on lupaavia prekliinisiä tuloksia antaneita hoitoja, kuten PSC-CM soluhoito, sekä endogeenistä korjautumista stimuloivia hoitoja kasvutekijöillä, modifioidulla RNA:lla sekä eksosomeilla. PCS-CM hoito on edennyt pienessä mittakaavassa kliiniseen vaiheeseen, josta odotetaan tärkeää tietoa hoidon turvallisuudesta ja tehosta ihmisellä. Laajempaan kliiniseen käyttöön siirtymiseen on vielä matkaa, koska toimiessaankin hoito olisi nykytilanteessa mahdoton toteuttaa laajassa mittakaavassa. Aiheen ympärillä on ollut valtava määrä kinnostusta jo parin vuosikymmenen ajan ja käynnissäolevia tutkimuksiakin on useita. Kuitenkin tavoite sydänlihaskorjauksen on vaikea ja monimutkainen. Tämänhetkisen tiedon valossa selvää on, että tutkimusta aiheen ympärillä on paljon, eikä toimivan hoitomuodon löytyminen tulevaisuudessa vaikuta mahdottomalta. Kuitenkin tällä alalla on erityisen tärkeää saada toistettua tutkimukset, joissa on saatu positiivisia tuloksia, ettei hoitoja aleta tarjoamaan virheellisten päätelmien tai tulosten pohjalta, vaikka paine kliinisten sovellusten käyttöönottamiselle onkin valtava.

Lähteet

Bergmann, O., Bhardwaj, R. D., Bernard, S., ym. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, N.Y.)*. 2009; 324(5923), 98–102.

Bolli, R., Chugh, A. R., D'Amario, D., ym. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011; 378(9806), 1847–1857 (Takaisinvento 2019)

Caspi, O., Huber, I., Kehat, I., ym. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *Journal of the American College of Cardiology*. 2007; 50(19), 1884–1893

De Leon, J. R., Federoff, H. J., Dickson, D. W., ym. Cardiac and skeletal myopathy in beta myosin heavy-chain simian virus 40 tsA58 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91(2), 519–523.

Erokhina, I. L. ja Rumyantsev, P. P. Ultrastructure of DNA-synthesizing and mitotically dividing myocytes in sinoatrial node of mouse embryonal heart. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 1986; 18(12), 1219–1231.

Field L. J. Atrial natriuretic factor-SV40 T antigen transgenes produce tumors and cardiac arrhythmias in mice. *Science (New York, N.Y.)*. 1988; 239(4843), 1029–1033.

Fisher, S. A., Doree, C., Mathur, A. ym. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2016; 12(12), CD007888.

Gago-Lopez, N., Awaji, O., Zhang, Y., ym. THY-1 receptor expression differentiates cardiosphere-derived cells with divergent cardiogenic differentiation potential. *Stem cell reports*. 2014; 2(5), 576–591.

Garbern, J. C. ja Lee, R. T. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell stem cell*. 2013; 12(6), 689–698.

Hong, K. U., Li, Q. H., Guo, Y., *ym*. A highly sensitive and accurate method to quantify absolute numbers of c-kit⁺ cardiac stem cells following transplantation in mice. *Basic research in cardiology*. 2013; 108(3), 346.

Khodayari, S., Khodayari, H., Amiri, A. *ym*. Inflammatory Microenvironment of Acute Myocardial Infarction Prevents Regeneration of Heart with Stem Cells Therapy. *Cell Physiol Biochem*. 2019; 53: 887-909

Kirshenbaum, L. A., Abdellatif, M., Chakraborty, S., & Schneider, M. D. Human E2F-1 reactivates cell cycle progression in ventricular myocytes and represses cardiac gene transcription. *Developmental biology*. 1996; 179(2), 402–411.

Kondo, R. P., Dederko, D. A., Teutsch, C., *ym*. Comparison of contraction and calcium handling between right and left ventricular myocytes from adult mouse heart: a role for repolarization waveform. *The Journal of physiology*. 2006; 571(Pt 1), 131–146.

Laflamme, M. A., Gold, J., Xu, C., *ym*. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *The American journal of pathology*. 2005; 167(3), 663–671.

Laflamme, M., Murry, C. Heart Regeneration. *Nature*. 2011;473(7347):326-35

Le, T. Y., Thavapalachandran, S., Kizana, E., & Chong, J. J. New Developments in Cardiac Regeneration. *Heart, lung & circulation*. 2017; 26(4), 316–322.

Liew, L., Ho, B., Soh, B. Mending a broken heart: current strategies and limitations of cell-based therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1): 138

Lin, Z., von Gise, A., Zhou, P., *ym*. Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an experimental murine MI model. *Circulation research*. 2014; 115(3), 354–363.

Liu, Y. W., Chen, B., Yang, X., ym. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nature biotechnology*. 2018; 36(7), 597–605

Magadum, A., Kaur, K., ja Zangi, L. mRNA-Based Protein Replacement Therapy for the Heart. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2019; 27(4), 785–793.

Mallapaty, S. Stem Cells For Heart Disease Tested In China. *Nature*, 2020; 581, 249-250

Menasché, P., Alfieri, O., Janssens, S., ym. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008; 117(9), 1189–1200.

Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., ym. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation research*. 2004; 95(9), 911–921.

Molina, C. E., Johnson, D. M., Mehel, H., ym. Interventricular differences in β -adrenergic responses in the canine heart: role of phosphodiesterases. *Journal of the American Heart Association*. 2014; 3(3), e000858.

Mummery, C. L., Zhang, J., Ng, E. S., ym. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circulation research*. 2012; 111(3), 344–358.

Nag A. C. Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution. *Cytobios*. 1980; 28(109), 41–61.

Nakamura, K., & Murry, C. E. Function Follows Form - A Review of Cardiac Cell Therapy. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2019; 83(12), 2399–2412

Nussbaum, J., Minami, E., Laflamme, M. A. ym. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response.

FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2007; 21(7), 1345–1357.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410:701-705. (Vedetty takaisin?)

Pasumarthi, K. B., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Soonpaa, M. H., & Field, L. J. Targeted expression of cyclin D2 results in cardiomyocyte DNA synthesis and infarct regression in transgenic mice. *Circulation research*. 2005; 96(1), 110–118.

Patel, A. N., Henry, T. D., Quyyumi, A. A., et al. Ixmyelocel-T for patients with ischaemic heart failure: a prospective randomised double-blind trial. *Lancet*. 2016; 387(10036), 2412–2421.

Poolman, R.A., Brooks, G. Expressions and activities of cell cycle regulatory molecules during the transition from myocyte hyperplasia to hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 1998; 30: 2121–2135

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science*. 2011; 331, 1078–1080.

Roell, W., Lewalter, T., Sasse, P., et al. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature*. 2007; 450(7171), 819–824.

Romagnuolo, R., Masoudpour, H., Porta-Sánchez, A., et al. Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate the Infarcted Pig Heart but Induce Ventricular Tachyarrhythmias. *Stem cell reports*. 2019; 12(5), 967–981.

Rose, R. A., Jiang, H., Wang, X., et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro. *Stem cells*. 2008; 26(11), 2884–2892.

Sdek, P., Zhao, P., Wang, Y., ym. Rb and p130 control cell cycle gene silencing to maintain the postmitotic phenotype in cardiac myocytes. *The Journal of cell biology*. 2011; 194(3), 407–423

Selvakumar, D., Clayton, Z., Chong, J. Robust Cardiac Regeneration: Fulfilling the Promise of Cardiac Cell Therapy. *Clin. Ther.* 2020; 42(10): 1857-1879

Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, ym. Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 2013;493:433-436.

Severs N. J. Gap junction remodeling and cardiac arrhythmogenesis: cause or coincidence?. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2001; 5(4), 355–366.

Shapiro, S. D., Ranjan, A. K., Kawase, Y., ym. Cyclin A2 induces cardiac regeneration after myocardial infarction through cytokinesis of adult cardiomyocytes. *Science translational medicine*. 2014; 6(224), 224ra27.

Shiba, Y., Gomibuchi, T., Seto, T., ym. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*. 2016; 538(7625), 388–391.

Soonpaa, M. H. ja Field, L. J. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *The American journal of physiology*. 1997; 272(1 Pt 2), H220–H226.

Tachibana, A., Santoso, M. R., Mahmoudi, M., ym. Paracrine Effects of the Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Myocytes Salvage the Injured Myocardium. *Circulation research*. 2017;121(6), e22–e36

Wollert, K. C., & Drexler, H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circulation research*. 2005; 96(2), 151–163.

Zak R. Cell proliferation during cardiac growth. *The American journal of cardiology*. 1973; 31(2), 211–219.

Zeng, L., Hu, Q., Wang, X., ym. Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodeling. *Circulation*. 2007; 115(14), 1866–1875.

Zhang, Y., Mignone, J., MacLellan, W. Cardiac Regeneration and Stem Cells. *Physiol Rev*. 2015; 95(4): 1189–1204