

Kardiyovasküler Tedavide Yeni Ufuklar: Hücresel Kardiyomioplasti ve Kök Hücre Transplantasyonu

New Horizons in Cardiovascular Treatment: Cellular Cardiomyoplasty and Stem Cell Transplantation

Dr. Yonca Aktaş, Dr. Sinan Aydoğdu, Dr. Erdem Diker

Ankara Numune Hastanesi Kardiyoloji Bölümü, Ankara

Özet

Günümüzde konjestif kalp yetmezliği ve bu duruma neden olan en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilen akut miyokard infarktüsü; cerrahi yöntemler, mekanik yardımcı cihazlar, ilaç tedavisi ve organ transplantasyonundaki gelişmelere rağmen ölümlerin başta gelen nedenleri arasındadır. Bu yaklaşımlar sadece miyokardın daha fazla bozulmasını önleyecektir; ancak asıl altta yatan patofizyoloji olan fibrozisle kardiyak remodelinge etki etmeyecektir. Genetik alandaki ilerlemelerin fibrozisin önlenerek, hasarlı miyokardda kardiyomyosit rejenerasyonu olasılığını gündeme getirmesi üzerine çalışmalar bu yönde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla kök hücreleri de içeren farklı hücre tipleri denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalardan sonra hücresel kardiyomioplasti ve kök hücre implantasyonunun insanlar üzerindeki etkilerini araştırmak üzere pilot çalışmalar başlatılmıştır. Şu ana kadar insan çalışmalarından elde edilen veriler gelecekte yapılacak çalışmalar için umut vericidir. Ancak transplantasyon sonrası riski, uzun dönemdeki etkinlik ve güvenirliliği belirlemede daha büyük, randomize klinik çalışmalara ihtiyaç vardır. (*Anadolu Kardiyol Derg 2003; 3: 340-7*)

Anahtar Kelimeler: Hücresel kardiyomioplasti, kök hücre implantasyonu, kardiyak "remodeling", insan pilot çalışmaları

Abstract

Today, congestive heart failure and acute myocardial infarction, which is accepted as the main factor that contributes to the development of heart failure, are major causes of deaths despite advances in surgical procedures, mechanical assistance devices, drug therapy and organ transplantation. However, these procedures only prevent further myocardial deterioration and do not act on the underlying pathophysiology which are fibrosis and cardiac remodeling. As further advances in genetics provide the possibility of preventing fibrosis and cardiomyocyte regeneration in damaged myocardium, studies are being made in this way. For this reason, a variety of cell types including stem cells were used and successful results were obtained. After studies on animal models; pilot studies to explore the effect of cellular cardiomyoplasty and stem cell implantation on humans have been started. Data that have been gained from human studies till now are encouraging for further studies in this era. But there is a need for larger-scale randomized trials to determine the post-transplantation risk, as well as long-term safety and efficacy. (*Anadolu Kardiyol Derg 2003; 3: 340-7*)

Key Words: Cellular cardiomyoplasty, stem cell implantation, cardiac remodeling, human pilot studies

Giriş

Akut miyokard infarktüsü ve kalp yetersizliği; tedavideki gelişmelere rağmen halen kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerindedir. Bu nedenlere bağlı kardiyomyosit kaybı, fibrozis, non-kontraktıl skar dokusu, hasarlı miyokard duvarının incelmeleri, anevrizma gelişimi ile kardiyak fonksiyonların kaybı; kalp postmitotik bir organ olarak kabul edildiğinden yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına neden olmuştur. Moleküler ve hücresele kardiyolojideki ilerlemeler; kardiyovasküler biyoloji ve tedavi üzerinde şimdiden pek çok etkiye neden olmuştur. Gen, protein ve hücre bazlı çalışmalar; normal kardiyovasküler fonksiyonlar hakkındaki bilgiler dışında, gelecekteki tanı ve tedavi yöntemlerini temelden etkileyecektir.

Çeşitli kardiyovasküler hücre tiplerinin in vitro olarak laboratuvar ortamında kültüre edilmesi; orijinal veya genetik olarak modifiye edilmiş kardiyovasküler hücre transplantasyonu kullanarak çeşitli kardiyovasküler bozuklukların tedavisi olasılığını gündeme getirmiştir. Bunun üzerine; proliferasyon kapasitesi bulunmayan ve terminal olarak farklılaşmış kabul edilen kardiyomyositlerin yenilenmesi amacıyla hücre transplantasyonu farklı hücreler kullanılarak pek çok çalışmada incelenmiştir (1).

Kök Hücreler

İnsan vücudunda farklı hücre tiplerine dönüşebilme ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip hücrelere "Kök Hücre" denmektedir. Kök hücre çalışmaları

1998'de insan embriyosundan kök hücrelerin elde edilip kültürlerde çoğaltılmasından sonra hız kazanmıştır. Bu hücreler kontrol edilebildiği takdirde laboratuvar ortamında istenilen hücre türüne dönüştürülebilmektedir (2).

Sperm ile oositin fertilizasyonu sonrası tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye sahip olan "Zigot" meydana gelir. Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip olan bu ilk hücrelere "Totipotent Hücre" denir. Fertilizasyonu izleyen ilk 4-5 gün içerisinde tek hücreden meydana gelen tüm hücreler aynı güce sahiptir yani ilk 4 gün içerisinde oluşan hücreler uterusu yerleştirildiğinde her biri tek başına bir organizma, yani insan oluşturabilecek güçtedir. Beşinci günden sonra meydana gelen hücreler "Blastosit" denilen küresel bir şekil alırlar. Bu hücre kümesinden alınan hücrelerin her birine "Embriyonik Kök Hücre" denmektedir. Bu küre içerisindeki hücreler vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahiptirler ancak tek başlarına tüm organizmayı oluşturamazlar. Gerekli ortam sağlandığında bu hücreler bilinen yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilmektedirler. Bu nedenle bu hücrelere "Plüripotent Hücre" de denmektedir (3). Embriyonun daha ileri gelişim aşamalarında ise hücreler biraz daha özelleşerek erişkin kök hücrelerine dönüşmektedir. Bu hücrelere de "Multipotent veya Progenitor Hücre" denmektedir. İnsan vücudunda ancak belirli birkaç hücre türüne dönüşebilen erişkin kök hücreleri, laboratuvar koşullarında gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında çok daha fazla hücre türüne dönüşebilmektedir (4).

Sonuçta kök hücreler üç kaynaktan elde edilmektedir;

1) İnsan veya hayvan embriyosundan elde edilen "embriyonik kök hücreler"

2) Embriyoda daha ileride sperm veya oositi meydana getirecek üreme hücreleri olan, embriyonun genital bölgesinden elde edilen "embriyonik jerm hücreleri"

3) Erişkinlerde bulunan "erişkin kök hücreler"

Bunun dışında "Embriyonik Karsinoma Hücreleri" de bulunmaktadır. Bu hücreler spontan olarak veya deneysel olarak embriyonik hücrelerin ekstrauterin bölgelere transferiyle indüklenmiş jerm hücreli tümörlerin diferansiye olmamış embriyonik bölgelerinden elde edilmişlerdir. Bu hücreler beslenme ortamından bağımsız olarak kontrolsüz proliferasyon gösterirler (4).

Memeli embriyolarında bulunan bu üç tip plüripotent kök hücre dizisi embriyonik bir ortama (blastosit veya blastomer evresindeki embriyo) ekildiğinde

normal embriyonik hücreler gibi davranırlar. Embriyonik kök hücreler ve embriyonik jerm hücreleri; kültür ortamı veya diferansiyasyonu stimüle edici bir faktör varlığında normal ve stabil bir karyotip meydana getirerek rejenerasyon gösterebilirler. Fare embriyonik kök hücre (5), embriyonik jerm hücre (6) ve embriyonik karsinoma hücre (7) kültürleri in vitro kardiyomiyositleri üretmek için kullanılmışlardır.

Embriyonik kök hücrelerin in vitro olarak diferansiyasyonu "Embriyoid cisimcikler" (EC) denilen bir başlangıç agregasyonu basamağını gerektirir. "Embriyoid cisimcikler" çok geniş çaplı özel hücre tiplerine diferansiye olma kapasitesine sahiptir. "Embriyoid cisimciklerin" gelişimi ile beraber kardiyomiyositler hücre tabakalanması gösterir. Kültürde kalma süresine göre "Embriyoid cisimciklerden" diferansiye olan kardiyomiyositlerde 3 farklı diferansiyasyon evresi görülür:

1- Erken evre; primer miyokard veya pacemaker benzeri hücreler

2- Orta evre

3- Terminal evre; atriyal/ ventriküler/ nodal/ his/ Purkinje benzeri hücreler

Embriyonik kök hücre kökenli kardiyomiyositlerde kardiyak gen ürünü ekspresyonu, iyi gelişmiş miyofibril ve sarkomerik protein yapımı da görülmüştür. Sonuçta fare embriyonik kök hücreleri, embriyonik jerm hücreleri ve embriyonik karsinoma hücrelerinin "Embriyoid cisimciklere" diferansiyasyonu; gen ekspresyonu, miyofibril yapı ve kardiyomiyosit fonksiyonları hakkında in vivo kardiyak gelişimi gösteren kültür sistemini oluşturur.

Daha özel tekniklerle izole edilen insan embriyonik kök hücreleri (HES=Human Embryonic Stem Cells) de fare embriyonik hücre kültürleri gibi in vitro kardiyomiyositleri üretme ve kardiyomiyositlere diferansiyasyon ile kardiyak gelişimi incelemek üzere kullanılmıştır. Embriyonik kök hücre dizilerinin ilk olarak 1994'de elde edilmiş ve 1998'de Thompson ve ark. (2) tarafından laboratuvarında üretilmeye başlanmıştır. İnsan gelişimi hakkındaki mekanizmaları açıklama açısından HES hücreleri önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Kardiyak gelişim ve fonksiyon açısından da fare embriyonik kök hücreleriyle birlikte yapılan in vitro çalışmalar daha çok bilgi sağlayacaktır.

HES hücre kökenli kardiyomiyositler erken evre kardiyak dokuya uyumlu fonksiyonel ve yapısal özellikler göstermişlerdir. Hücre replasman tedavisinde kullanılmaları için 5 hedef sağlamış olmalıdır:

1-Spesifik hücre dizileri saptanmış olmalıdır (atriyum/ ventrikül/ pacemaker hücreleri).

2-In vivo kardiyomiyosit farklılaşmasının normal

fizyolojik yolla olduğu gösterilmelidir. 3-Transplantasyonun etkinliği hem küçük hem büyük hayvan modellerinde gösterilmelidir.

4-ES hücre kökenli tümör oluşumuna karşı emin olunmalıdır.

5-İmmünolojik rejeksiyon önlenmiş olmalıdır.

Henüz HES hücrelerinin fare embriyonik kök hücreleriyle karşılaştırıldığında; kendini yenileme, genetik manipülasyonlara cevap ve gelişim kapasitesi hakkındaki bilgiler sınırlıdır.

Klinik olarak da; HES hücre kökenli kardiyomiyositlerden tedavi amaçlı uygun miktarda saf hücre popülasyonları elde edilip edilemeyeceği ve transplantasyon sonrası kalpte etkin fonksiyon görüp görme-yeceği henüz bilinmemektedir. Şu ana kadar öğrendiklerimiz çoğunlukla fare embriyonik kök hücreleriyle yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. İnsan gelişimi hakkındaki mekanizmaları araştırma açısından HES hücreleri yeni bir kaynak olacaktır (8).

Hücresele Kardiyomioplastide Kök Hücre Transplantasyonuna Kadar Olan Gelişim Aşamaları

1. Satelit hücre transplantasyonu; 1961'de Mauro tarafından tanımlanan "Satellit Hücreler" (9) yetişkin kasında bulunan, diferansiye olmamış, rezerv hücreler olup; kas hasarı durumunda rejenerasyonu sağlayan miyogenik kök hücrelerdir. Miyositlerle karşılaştırıldığında satelit hücreler iskemiye daha dayanıklıdır. Marelli ve Chiu tarafından diferansiye olmamış satelit hücreler ilk olarak 1992'de miyokarda implante edilmiştir (10). Chiu ve ark. (11) otolog iskelet satelit hücre transplantasyonu sonrası hücreler arası sol ventrikülde "gap junction" ve "interkalat disk" oluşumunu göstermişlerdir. Ayrıca homojen skarla çevrili implantasyon alanında kardiyomiyosit benzeri kas hücrelerine dönüştüklerini tespit etmişlerdir (11). Taylor ve ark. (12) da transplante satelit hücrelerin ventrikül fonksiyonlarını iyileştirdiğini göstermişlerdir. Satelit hücreler malign potansiyellerinin olmaması, immün süpresyona gerek duyulmaması ve etik sorunlar içermemesi nedeniyle avantajlıdır. Ancak izolasyonları ve transplantasyon için uygun sayıda kültüre edilmeleri kas dokusundaki popülasyonları düşük olduğu için zordur.

2. İskelet kası hücre (miyoblast) transplantasyonu; Otolog ve heterolog "İskelet Miyoblastları" yüksek proliferasyon kapasiteleri, matür fibrillere diferansiyasyon ve satelit hücrelerden daha kolay elde edilip çoğaltılabilmeleri nedeniyle daha fazla tercih nedeni haline gelmiştir.

İmplantasyon sonrası miyoblastların Soonpa, Murry ve Taylor tarafından infarktli miyokarda diğer hücrelerle bağlantı kurup, anjiyogenik etkileriyle bölgesel kardiyak fonksiyonları düzelttiğinin gösterilmesinden sonra (13-15); 1999'da iskelet miyoblastlarının intrakardiyak transplantasyonu sonrası in situ olarak 2 tip çizgili hücreye diferansiye olduğu rapor edilmiştir (16). İnfarktli alanın merkezinde iskelet kası spesifik miyogenin içeren hücreler saptanırken, periferinde miyogenin içermeyen ve immatür kardiyomiyosit görülmüştür. İskelet hücre kümeleri tespit edilmiştir.

İnfarkt sonrası iskelet kası miyoblastlarının sol ventrikül fonksiyonları üzerindeki etkileri 2000 yılına gelindiğinde fetal kardiyomiyositlerle karşılaştırılmıştır. İskelet kası miyoblastlarının sol ventrikül fonksiyonlarını düzeltmede fetal kardiyomiyositler kadar etkili oldukları görülmüştür. Ancak daha önceki çalışmalardan farklı olarak; kardiyomiyositler ile greftlenen iskelet kası miyoblastları arasında elektriksel ilişkiyi gösteren "connexin" 43 ekspresyonu olmadığı, dolayısıyla gap junction destekli elektriksel ilişkinin bulunmadığı gösterilmiştir. İnfarkt alanında kas dokusu oluşumunun ve miyoblastların primer elastiki özelliklerinin; skar dokusunun fiziksel özelliklerini değiştiren kardiyak dokunun kompliyansını düzelttiği ve progresif dilatasyona engel olarak remodelingi sınırlandırdığı rapor edilmiştir (17).

İskelet miyoblast transplantasyonunun miyokard infarktüsü sonrası skar incelmelerini önlediği, ventriküller remodelingi sınırlandırarak kardiyak performansı arttırdığı 2001'de gösterilmiştir (18).

3. Düz kas hücre transplantasyonu; Satelit hücrelere göre daha kolay elde edilip, kültüre edilebilen yetişkin düz kas hücreleri; proliferasyon kapasiteleri yüksek, VEGF gibi anjiyogenik faktörleri de salgılayabilen diğer bir hücre grubudur. Yapılan çalışmalarda transplante edilen düz kas hücrelerinin sol ventrikül dilatasyonunu sınırladığı ve kardiyak fonksiyonları iyileştirdiği saptanmıştır. Ancak henüz konakçı miyokard ile gap junction oluşturdukları gösterilememiştir (19). Sol ventrikül fonksiyonlarını iyileştirmede düz kas kasılması yavaş olabilir ancak yararlı etkileri skar alanında kontraksiyonu iyileştirmekten çok ventrikül dilatasyonunu önleyerek ortaya çıkar.

Allojenik gastrik kaynaklı düz kas hücre transplantasyonu da denenmiş ve ventrikül dilatasyonunu sınırlandırarak miyokardiyal elastisiteyi koruduğu gösterilmiştir (20).

4. Kalp hücre transplantasyonu; Yetişkin kalp hücresele transplantasyonu miyokarda senkron kasılmayı sağlamada nonkardiyak hücre transplantasyonu

nundan daha büyük potansiyele sahiptir. Hayvan çalışmalarında atriyal ve ventriküler hücrelerin ventriküler skar dokusuna implantasyonu sonrası yaşadıkları ve skar genişlemesini engelleyerek ventrikül fonksiyonlarını iyileştirdikleri gösterilmiştir (21). Her ne kadar bu hücreler transplantasyon için ideal gibi gözükse de; elde edilmeleri zordur, proliferasyon kapasiteleri çok azdır ve iskemik alanda yaşayabilmeleri miyositlere göre oldukça azdır (22).

Kök Hücre Transplantasyonları

1. Fetal kardiyomiyositler; Bishop ve ark. (23) fare embriyonik miyokardının inokülasyonla kültüre edilip implante edilebileceğini gösterip, implante embriyonik kardiyomiyositlerin proliferasyon ve diferansiyasyona uğradığını bildirmişlerdir. Soonpa ve ark. (24) fetal kardiyomiyositlerin greftlenip normal miyokard ile kaynaştıklarını ilk rapor edenlerdir. Fetal kardiyomiyositlerin inoküle embriyonik dokularda anjiyogenez ile neovaskülarizasyonu da sağladıkları gösterilmiştir (25). Fetal kardiyomiyosit transplantasyonunun skar dokusunu sınırlandırıp, kalp fonksiyonlarını iyileştirdiği, infarktli alanın %40'ını kaplayan kardiyak doku ve kan damarları oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir (26). Bu dönemdeki çeşitli çalışmalarda; farklı tekniklerle oluşturulmuş hasarlı miyokarda transplante fetal kardiyomiyositlerin yeni kardiyak doku oluşumunu sağlayarak, normal kardiyomiyositlerle gap junctionlar oluşturduğu ve senkronize kontraksiyon sağlayarak kardiyak fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir. Ancak bu hücre grubu kullanımı ile ilgili geri adım özellikle immün rejeksiyondan kaynaklanmıştır. Tüm çalışmalarda siklosporin kullanılmasına rağmen kısmi veya tam rejeksiyon görülmüştür. Ayrıca etik sorunlarda bulunmaktadır.

2. Embriyonik kök hücreler; Hesheler ve ark. (27) plüripotent embriyonik kök hücrelerin embriyonik cisimciklere dönüşerek kültüre edildiğinde özelleşmiş kardiyak doku fenotipi oluşturduğunu göstermişlerdir. Etzion ve ark. (28) da embriyonik kök hücre kaynaklı kardiyomiyositlerin sol ventrikül dilatasyonunu, infarkta bağlı incelmeyi ve miyokardiyal disfonksiyonu düzelttiğini göstermişlerdir. Embriyonik kök hücre transplantasyonunun miyokard infarktüsü sonrası konjestif kalp yetersizliğindeki etkileri de araştırılmıştır. Embriyonik kök hücrelerin hasarlı miyokarda canlı kalmalarının dışında, 6 hafta sonra matür kardiyomiyositlere dönüştüğü gösterilmiştir. Bununla birlikte sol ventrikül fonksiyonları ve izometrik kontraktilitede belirgin artış, infarkt alanının küçültülerek duvar gerili-

min önlenmesi, papiller kas kontraktilitesinde düzelleme ve mikrosirkülasyonda artış sağlanmıştır (29).

3. Embriyonik kök hücre dizileri kaynaklı kardiyomiyositler; İnsan blastositlerinden embriyonik kök hücre dizilerinin (HES) elde edilmesinden sonra (30); in vitro koşullarda >250 ikilenme zamanı ("doubling time") ve stabil karyotiple fenotip sağlanmıştır (31). Ardından insan embriyonik kök hücreleri; atım yapan kardiyomiyositler dahil, 3 jerm dizisine diferansiyasyonun korunduğu beslenme ortamından bağımsız kültürlerde de üretilmişlerdir (32). Uygun kültür ortamında HES kaynaklı kardiyomiyositlerin kardiyak gen ekspresyonu yaparak, kardiyoaaktif ilaçlara yanıt verdiği ve yeni zenginleştirme yöntemleriyle uzun süreli stabil kalmaları sağlanarak, hücre transplantasyonunda kullanılabilecekleri gösterilmiştir (33).

4. Erişkin kök hücreler; Günümüzde sadece kemik iliği, iskelet kası, deri, sindirim sistemi, göz, diş, karaciğer, deri ve beyinde erişkin kök hücreleri tespit edilmiştir. Erişkin kök hücrelerin embriyonal kök hücrelerinden farkı; dokulardan izole edilip kültürde yetiştirilmeleri daha zordur, büyüme ve çoğalmaları daha uzun zaman alır ve tüm hücre türlerine diferansiyasyonları mümkün değildir.

Kemik iliği ve kanda bulunan kök hücrelerin; kan hücreleri dışında kas, sinir, kemik, karaciğer ve damar hücrelerine de dönüşebildiği gösterilmiştir. "Kemik İliği Stromal Hücreleri" ne "Mezenkimal Kök Hücre" de denir (34). Bu hücrelerin in vitro olarak kemik, kırık, adipositler, miyositler ve kardiyomiyositlere diferansiyasyon gösterilmiştir (35). Kemik iliği stromal hücrelerinin miyojenik diferansiyasyon ve matür organize kontraktıl protein oluşturduğu; alıcı kardiyomiyositleriyle gap junction aracılı ilişki kurduğu gösterilmiştir (36). Makino ve ark. (37) kemik iliği stromal hücrelerinden kardiyomiyojenik bir hücre dizisi elde etmişler ve bu hücrelere kültür ortamında 5-Azasitidin uyguladıklarında; kardiyomiyojenik diferansiyasyonla beraber troponin I ekspresyonu yaptıklarını göstermişlerdir. Miyositler dışında kemik iliği stromal hücrelerinin endotel ve düz kas hücrelerine de diferansiyasyon olduğu rapor edilmiştir (38).

Kemik iliği kaynaklı endotelial kök hücrelerin infarktli miyokarda implantasyonu sonrası yeni damar oluşumuyla kardiyak remodelingi azalttığı gösterilmiştir (39). Kemik iliği mononükleer hücrelerinin infarkt alanına transplantasyonu sonrası endotel dizi diferansiyasyonu sağlarken; kollateral damar oluşumundaki artış perfüzyon defektini %83 azaltmış, ejeksiyon fraksiyonunda %48 iyileşme sağlamıştır (40). Erişkin kök hücre grubuna dahil edilen karaciğer

kökenli kök hücrelerinin de; karaciğerde in vivo olarak hepatositlere diferansiye olurken, kalpte kardiyak dizi ve iyi diferansiye miyosit fenotipine diferansiye olduğu gösterilmiştir (41).

Hücrel Kardiyoplasti Yöntemleri

1. Cerrahi hücrel kardiyoplasti (epi-kardiyal yaklaşım); Torakotomi sırasında hücrelerin doğrudan miyokard içine enjekte edilmesine dayalı bir yöntemdir. En doğru ve en iyi hücre dağıtımı torakotomi sırasında doğrudan görülerek yapılabilir. Hayvan çalışmalarının çoğunda bu yaklaşım uygulanmaktadır. Hastalara uygulama ise genellikle koroner arter baypas sırasında cerrahi işlemlerle birlikte yapılmaktadır. Bu işlemin uygulandığı 10 hastalık bir çalışmada; 1 hasta mezenterik iskemi, 1 hasta da inme nedeniyle ölmüştür. Dört hastada ventriküler taşikardi gelişmiş ve 2'sine implantabl kardiyoverter defibrilatör (ICD) takılmıştır. Tüm hastaların lokal ve global ventrikül fonksiyonlarında belirgin iyileşme gözlenmiştir. Yine bu yöntemle 2 hastaya ventriküler "assist device" implantasyonu sırasında otolog miyoblast implantasyonu yapılmış ancak takipler sırasında hastalardan biri sepsis nedeniyle ölmüş, diğerine kalp transplantasyonu yapılmıştır. Koroner arter baypas ile kombine kardiyoplasti uygulaması çok merkezli bir çalışmayla denenmeye başlanmıştır (42-44).

2. Transkateter endokardiyal yaklaşım (femoral arter yoluyla); Transtorasik yaklaşıma göre daha az invazif olan bu yöntem; bu işlem için özel üretilmiş kateterlerle floroskopi eşliğinde femoral arterden girilerek uygulanır. Bu amaçla 3-boyutlu haritalama NOGA kateter sistemi de kullanılmaktadır. Bu işlemin uygulandığı 5 hastalık bir çalışmada 1 hastaya ICD takılmıştır. Tüm hastaların işlem öncesi ejeksiyon fraksiyonları işlem sonrasında MUGA yönteminde %39'dan %56'ya; ventrikülografi yönteminde %45'ten %54'e yükselmiştir. Avrupa'da bu yöntemin kullanıldığı çok merkezli bir çalışma yürütülmektedir. Amerika'da da çok merkezli bir çalışma planlanmıştır (43,44)

3. Transkateter intramiyokardiyal yaklaşım (koroner ven yoluyla); Bu yöntem için düzenlenen kateter henüz yeni olup araştırmaları devam etmektedir. Floroskopi altında femoral ven yoluyla uç kısmına IVUS probu eklenmiş bir kateterle kalbe ulaşılarak koroner sinüsten kardiyak venlere girilir ve hücreler enjekte edilir. Arter venle beraber seyrettiğinden infarkt alanına ulaşmak nispeten kolaydır. Bu yöntemin

kullanıldığı 10 hastalık bir çalışma başlatılmıştır (43).

4. İntrakoroner yaklaşım; İnfarkt alanına hücrelerin verilmesi teknik olarak kolaydır. PTCA ile birlikte uygulanabilir. Bu yöntemin uygulandığı çeşitli hayvan çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmalarda intrakoroner yolla verilen miyoblastların kardiyak dokuya geçerek burada konakçı doku hücreleriyle füzyon oluşturdıkları gösterilmiştir (43,45).

5. İntravenöz yaklaşım; Basit ve daha az invazif olan bu yöntemin morbiditesi de düşüktür. Gerektiğinde işlemin tekrarı kolaydır. Ashara ve ark. (43) kemik iliği ve periferik kandan elde edilen endotelial progenitör hücreleri bu yöntemle uygulamışlar ve bu hücrelerin iskemik bölge ile yüzeyel olarak birleşip matür endotelial hücrelere dönüşerek ventrikül fonksiyonlarını arttırdıklarını göstermişlerdir.

İnsan Kaynaklı Çalışmalar

Miyoblast hücre transplantasyonunun ilk insan pilot çalışmasında; erken birinci faz sonuçları yararlı kardiyovasküler etkilere sahip olduğunu göstermiştir ancak araştırmacılar aritmileri içeren potansiyel risklerin belirlenmesi gerektiğini belirtmişlerdir (46). Miyokard infarktüsü geçirmiş ve ejeksiyon fraksiyonları (EF) 34%-61% , kalp yetersizliği sınıfı 3 olan 13 hastada yapılan bu çalışmada; hasta takip süresi henüz tamamlanmamış olmasına rağmen yapılan 3., 6. ve 12. ay kontrollerinde özellikle 1 hastada dikkat çekici iyileşme görülmüştür. Bazal EF'si 17.6% olan bu hastanın EF'si 3. ayda 26.2%, 6. ayda 45.6%'ya yükselmiştir. İzlenen diğer 8 hastanın 6'sında aynı zamanda yapılan kontrollerde EF'de orta düzeyde iyileşme saptanmıştır. Bunun dışında 2 hastaya ventriküler taşikardiye bağlı ICD takılmış ve 2 hastada ölüm rapor edilmiştir. Bunun üzerine çalışma aritmiler açısından hasta güvenilirliği için bir süre durdurulmuş ve çalışma protokolü yeniden gözden geçirilmiştir. Şu anki çalışmaya alınma kriteri olarak da hücre transplantasyonundan 3 ay önce ICD takılan hastalar olarak belirlenmiştir. Böylece hastalarda aritmilere karşı maksimum koruma sağlanarak çalışmaya devam edilme kararı alınmıştır.

Otolog iskelet miyoblast transplantasyonu ile ilgili bir çalışmada; miyokard infarktüsü sonrası ciddi sol ventrikül disfonksiyonu bulunan, EF < %35 olan 10 hastada koroner arter baypas operasyonu sırasında yapılmıştır (47). Hastaların kendi periferik kas biyopsisi sonucu elde edilen iskelet miyoblastları; dobutamin ekokardiyografi (EKO) ve pozitron emisyon tomografi (PET) ile belirlenen akinetik, revasküleri-

zasyonun olmadığı miyokardiyal skar alanlarına enjekte edilmiştir. Operasyon sonrası 18. ayda 1 hasta inme nedeniyle ölmüş; yaşayan 9 hastanın 4'ünde ventriküler taşikardi gelişmesi nedeniyle ICD takılmıştır. İmplantabl kardiyoverter defibrilatör takılan hastaların 8 aylık takibinde sadece 1 hastada ICD'ye bağlı şok gelişmiş olup, diğerlerinde aritmi gözlenmemiştir. Tüm hastaların kalp yetersizliği sınıfı $2.7 \pm 0.2'$ den $1.6 \pm 0.1'$ e iyileşme gösterirken, EF'si $24 \pm 1\%$ den $34 \pm 1\%$ e yükselmiştir. Operasyon sonrası 3. ayda kardiyak fonksiyonlarda meydana gelen düzelmede bir daha bozulma olmamıştır. Ayrıca hücre implantasyonuna bağlı hiçbir komplikasyon gelişmemiştir. Sonuçta bu veriler otolog iskelet miyoblastlarının kullanımını ve güvenilirliğini desteklemektedir. Bunun üzerine çok merkezli, randomize faz 2 çalışmaları 2002 sonbaharında başlatılmıştır.

İskemik kardiyomiyopatili hastalarda otolog miyoblast transplantasyonunun güvenilirliğini araştıran, miyokard infarktüsü geçirmiş ve EF < %30 olan 13 hastalık bir çalışmada da başlangıç sonuçları oldukça umut vericidir (48). Koroner arter baypas uygulanan 9 hastayla, sol ventrikül "assist device" implantasyonu yapılan 4 hastanın 6 aylık takibinde hiçbir hastada hücre transplantasyonuna bağlı komplikasyon gelişmemiştir. Ayrıca bu hastaların 3. hafta kontrollerinde EF'leri %21' den %29' a yükselmiş olup, sonraki kontrollerinde de herhangi bir düşüş gözlenmemiştir. Çalışmanın ileri takip sonuçları beklenmektedir.

İngiliz çalışma grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada; infarktüs geçirmiş, EF'leri düşük, 14 hastaya koroner arter baypas operasyonu sırasında kendi sternumlarından alınan kemik iliği hücreleri miyokardın skar alanına enjekte edilmiştir (49). Operasyon öncesi, operasyondan 6 hafta sonra ve 10. ayda dobutaminli stres EKO uygulanarak hücresele kardiyomiyoplastinin bölgesel ve global olarak sol ventrikül fonksiyonları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bölgesel duvar hareket skoru; hücresele kardiyomiyoplasti öncesi 2.41 olup, 6. hafta kontrolünde 2.16 ve 10. ay kontrolünde 2.09 olarak bulunmuştur. Bu skurun giderek azalması duvar hareket bozukluğunun zamanla azaldığını göstermektedir. Global duvar hareket skoru da; hücresele kardiyomiyoplasti öncesi 1.96 olup, 6. hafta kontrolünde 1.64 ve 10. ay kontrolünde 1.65 olarak bulunmuştur. Sonuçta; miyokardın skar alanına otolog kemik iliği transplantasyonu güvenilir olup, hem bölgesel hem global duvar hareketlerinde iyileşme ile kardiyak fonksiyonlarda artış sağlamaktadır. Ayrıca 10 aylık

takip süresi boyunca hiçbir hastada ventriküler aritmi gelişmemiştir.

Daha önceki deneysel çalışmalarda kan veya kemik iliği kaynaklı progenitor hücrelerin infarktüs sonrası remodeling üzerinde yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. İskemik kalp hastalığı olan kişilerde ise otolog progenitor hücre transplantasyonunun uygunluk ve güvenilirliği bilinmemektedir. Bu amaçla akut miyokard infarktüsü geçirmiş, 20 hasta üzerinde otolog progenitor hücrelerin intrakoroner infüzyonuyla yapılan bir çalışmanın (TOPCARE-AMI) 4.ay kontrol sonuçları açıklanmış olup, gelecekte yapılacak çalışmalar için oldukça umut vericidir (50). İlk ST segment elevasyonlu infarktüs geçiren ve akut koroner reperfüzyonla stent uygulanan bu hastaların 9'na kemik iliği kaynaklı, 11' ne ise kan kaynaklı progenitor hücrelerin intrakoroner infüzyonu yapılmıştır. Bu pilot çalışmayla global sol ventrikül EF'sinde belirgin artış, infarkt alanında duvar hareketlerinde belirgin iyileşme, sol ventrikül endsistolik volümlerinde azalma ve remodeling olayı üzerinde yararlı etkiler görülmüştür. Sol ventrikül fonksiyonundaki iyileşmeye ek olarak infarktli arterde koroner akım rezervinin tamamen normale döndüğü ve pozitron emisyon tomografiyle(PET) değerlendirilen infarktli segmentlerde miyokardiyal canlılığın belirgin olarak arttığı saptanmıştır.

Her iki hücre grubu arasında sonuçlar arasında farklılık gözlenmemiştir. Daha önceki çalışmaların her iki hücre grubuyla iskemik dokularda neovaskülarizasyonu arttırdığının gösterilmesine dayanarak; ventriküler fonksiyonlardaki iyileşmenin neoanjiyogenezi stimüle etmesine dayandığı öne sürülmüştür. En önemlisi hastaların hiçbirinde intrakoroner infüzyona bağlı iskemik hasar, akut inflamatuvar yanıt, kemik iliği kaynaklı mononükleer hücrelere bağlı kardiyak dışı hücrelerle skar oluşumu artışı görülmemiştir. Daha önceki pilot çalışmalarda görülen ve en önemli kısıtlamalardan biri olan malign aritmi komplikasyonu da gelişmemiştir.

Sonuçta akut miyokard infarktüsü sonrası progenitor hücre infüzyonuyla 4. ayda görülen belirgin iyileşmenin ileri takip sonuçlarında (12. ay kontrolü); sol ventrikül remodelingi üzerindeki etkileri daha iyi belirlenebilecek ve etkilerin devamlı olup olmadığı anlaşılacaktır. Yine de akut miyokard infarktüsü geçiren hastalarda bu yeni tedavi formunun kısa ve uzun süreli klinik sonuçlarının olumlu olup olmadığını göstermek için daha büyük, randomize çalışmaların sonuçlarına ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

1. Leiden JM. Principles of cardiovascular molecular biology and genetics. In: Braunwald E, Zipes D, Libby P, editors. Heart Disease; Textbook of Cardiovascular Medicine. 6th edition. Pennsylvania: WB Saunders; 2001. p.1955-76.
2. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92; 7844-8.
3. Bongso A. Behaviour of human embryos in vitro in the first 14 days: blastocyst transfer and embryonic stem cell production. Clin Sci (Colch) 1996; 91; 248-9.
4. www.nih.gov/news/stemcell/primer.htm;
www.nih.gov/news/stemcell/fullrptstem.pdf
5. Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol. 1985;87:27-45.
6. Rohwedel J, Sehlmeier U, Shan J, Meister A, Wobus AM. Primordial germ cell-derived mouse embryonic germ cells in vitro resemble undifferentiated stem cells with respect to differentiation capacity and cell cycle distribution. Cell Biol Int 1996;20:579-87.
7. Skerjanc IS. Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cells. Trends Cardiovasc Med 1999;9:139-43.
8. Boheler KR, Cxyz J, Tweedie D, Yang HT, Anisimov SV, Wobus AM. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. Circ Res 2002;91:189-201.
9. Mauro A: Satellite cell of skeletal muscle fibers. J Biophys Biochem Cytol 1961;9:493-5.
10. Marelli D, Desrosiers C, El-Alfy M, Kao RL, Chiu RC-J. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. Cell Transplant 1992;1:383-90.
11. Chiu RC-J, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: Myocardial regeneration with satellite cell implantation. Ann Thorac Surg 1995;60:12-8.
12. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. Nature Med 1998;4:929-33.
13. Koh GY, Klug MG, Soonpah MH, Field LJ. Differentiation and long-term survival of C2C12 myoblast grafts in heart. J Clin Invest 1993;92:1548-54.
14. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. J Clin Invest 1996;98:2512-23.
15. Robinson SW, Cho PW, Levitsky HI, et al. Arterial delivery of genetically labeled skeletal myoblasts to the murine heart: long-term survival and phenotypic modification of implanted myoblasts. Cell Transplant 1996;5:77-91.
16. Atkins BZ, Lewis CW, Kraus WE, Hutcheson KA, Glover DD, Taylor DA. Intracardiac transplantation of skeletal myoblasts yields two populations of striated cells in situ. Ann Thorac Surg 1999;67:124-9.
17. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. J Thorac Cardiovasc Surg 2000;119:1169-75.
18. Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. Circulation 2001;103:1920-7.
19. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation 1999;100:247-56.
20. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Merante F, Mickel DAG. Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. J Mol Cell Cardiol 1999;31:513-22.
21. Taylor DA. Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblast for ischemic heart disease and heart failure. Curr Control Trials Cardiovasc Med 2001;2:208-10.
22. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. Science 1997;275:965-7.
23. Bishop SP, Anderson PG, Tucker DC. Morphological development of the rat heart growing in oculo in the absence of hemodynamic work load. Circ Res 1990;66:84-102.
24. Soonpa MH, Koh GY, Klug MG, Field LJ. Formation of intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. Science 1994;264:98-101.
25. Rongish BJ, Torry RJ, Tucker DC, Tomanek RJ. Neovascularization of embryonic rat hearts cultured in oculo closely mimics in utero coronary vessel development. J Vasc Res 1994;31:205-5.
26. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function. Ann Thorac Surg 1996;62:654-61.
27. Hescheler J, Fleishmann BK, Lentini S, et al. Embryonic stem cell: a model to study structural and functional properties in cardiomyocytes. Cardiovasc Res 1997;36:149-62.
28. Etzion S, Battler A, Barbash IM, et al. Influence of embryonic cardiomyocyte transplantation on the progression of heart failure in rat model of extensive myocardial infarction. J Mol Cell Cardiol 2001;33:1321-30.
29. Min J-Y, Yang Y, Converso KL, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. J Appl Physiol 2002;92:288-96.
30. Thompson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998;282:1145-7.(Nat Biotechnol

- 2000;18:399-404.
31. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000;227:271-8.
 32. Xu C, Inokuma MS, Denham J, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotech* 2001;19:971-4.
 33. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK: Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91:501-8.
 34. Prockop DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4.
 35. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
 36. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, Chedrawy E, Eliopoulos N, Chiu RC. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:999-1006.
 37. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705.
 38. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
 39. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430-6.
 40. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands and cytokines. *Circulation* 2001;104:1046-52.
 41. Malouf NN, Coleman WB, Grisham JW, et al. Adult-derived stem cells from the liver become myocytes in the heart in vivo. *Am J Pathol* 2001;158:1929-35.
 42. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE. Survival, integration and differentiation of cardiomyocyte grafts. *Circulation* 1999;100:193-202.
 43. Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al. Transplanted cor blood-derived endothelial precursor cells augmented postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000;105:1527-36.
 44. Taylor DA, Aleem SA. Treating cardiovascular disease in the 21st century: a brief review of potential targets for cardiac gene therapy. *Egypt Heart J* 1997;49:391-7.
 45. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature Medicine* 1998;4:923-33.
 46. Serruys PW: Myoblast transplantation may have CV benefits. *Today in Cardiology* 2002; 5: 32-3.
 47. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Jacoby DB, Dinsmore J. Transplantation of autologous skeletal myoblasts in patients with severe left ventricular dysfunction: a medium appraisal. *Circulation* 2002; 106 (Suppl 2): 19; 463.
 48. Galinanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell P. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: interim results from the United States experience. *Circulation* 2002; 106 (Suppl 2): 19; 462.
 49. Dib N, McCarthy P, Campbell A, Dinsmore J, Yeager M. Safety and efficacy of transplantation of autologous bone marrow into scarred myocardium for the enhancement of cardiac function in man. *Circulation* 2002; 106 (Suppl 2): 19; 463.
 50. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106:3009-17.