

Otolog kök hücre tedavisi ve cerrahi miyokardiyal revaskülarizasyon - Rostock Üniversitesi tecrübesi

Autologous stem cell therapy with surgical myocardial revascularization - The Rostock University experience

Can Yerebakan, Murat Uğurlucan, Alexander Kaminski, Bernd Westphal, Andreas Liebold, Gustav Steinhoff

Rostock Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp Cerrahisi Kliniği, Rostock, Germany

ÖZET

Amaç: Akut ve kronik iskemik kalp hastalıklarının tedavisinde son yıllarda kök hücre tedavisi ilgi görmektedir. Amacımız 2001 yılından itibaren koroner arter baypas cerrahisi (KABG) ile birlikte uyguladığımız intrakardiyak kök hücre tedavisinde ulaştığımız orta dönem sonuçlarımızı tecrübelerimiz ışığında değerlendirmektir.

Yöntemler: Bu amaçla 2001 yılında 15 hasta ile başladığımız birinci faz (güvenilirlik) çalışmalarımızın 3 yıllık başarılı sonuçlar alınmıştır. İki bin üç yıldan itibaren 20 tedavi hastası ve 20 kontrol hastası olmak üzere, toplam 40 hasta ile başlanan prospektif, kontrollü ikinci faz (etkinlik) çalışmada KABG ile birlikte otolog kök hücre transplantasyonu uygulanmıştır. Tedavide kemik iliğinden elde edilmiş CD133⁺ kök hücreler kullanılmıştır. Hastaların orta dönem sonuçları klinik bulgular, Holter monitorizasyonu, ekokardiyografi, manyetik rezonans incelemesi, bilgisayarlı tomografi ve miyokard sintigrafisi ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizde eşleştirilmemiş t, Mann-Whitney U, tekrarlanan ölçümler ANOVA ve Ki-kare testleri kullanılmıştır.

Bulgular: İki bin bir yılında tedavi uygulanan ilk 15 hastada tedavi sonrası 6. ve 18. aylarda sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda (SVEF) istatistiksel olarak anlamlı yükselme tespit edilmiştir (preoperatif: %39.0±8.7; 6. ay: %50.2±8.5 ve 18. ay: %47.9±6.0; p=0.012). İki bin üç yıldan itibaren tedaviye alınan ve kök hücre transplantasyonu uygulanan hastalarda 6. ayda SVEF %37.4±8.4'ten %47.1±8.3'e çıkmıştır (p<0.001). Sadece KABG uygulanan fakat kök hücre tedavisi uygulanmayan grupta ise SVEF yükselmesine (%37.9±10.3'ten %41.3±9.1'a) rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm hastalar içerisinde toplam 2 hasta [1 hasta ilk (erken dönem) ve 1 hasta ikinci (geç dönem)] kardiyak dışı sebepler nedeniyle kaybedilmiştir. Hiçbir hastada uzun dönem takiplerde miyokarda kalsifikasyon, önemli ventriküler aritmi ve tümör oluşumu gözlenmemiştir.

Sonuç: Aortokoroner baypas ile eş zamanlı kemik iliğinden elde edilen otolog kök hücrelerin miyokarda direkt enjeksiyonu uzun dönem sonuçları da göz önüne alındığında güvenlidir. Hastaların tedavisine olumlu katkıları bulunmaktadır. Ancak bu tedavinin rutin klinik uygulamaya geçirilmesi çok merkezli çalışmaların detaylı uzun dönem sonuçlarının elde edilmesi ile mümkün olabilecektir. (*Anadolu Kardiyol Derg 2009; 9: 457-64*)

Anahtar kelimeler: Kök hücre, miyokard iskemisi, kalp yetersizliği, kalp cerrahisi

ABSTRACT

Objective: Stem cell therapy has gained great attraction in the treatment of acute and chronic myocardial diseases in recent years. The aim was to evaluate our experience in light of the middle term results of intramyocardial stem cell treatment with concomitant coronary artery bypass surgery (CABG) since 2001.

Methods: After encouraging initial results of the Phase I (safety) trial with the first 15 patients, a prospective, controlled Phase II (efficacy) study was begun with 40 patients aiming to determine functional benefit of stem cell treatment using bone marrow derived CD 133⁺ stem cell therapy with concomitant CABG in comparison to CABG only since 2003. Medium-term results of intervention were evaluated using patient's clinical findings, Holter monitoring, echocardiography, magnetic resonance imaging, computed tomography and myocardial scintigraphy. Statistical analyses were performed using unpaired t, Mann-Whitney U, ANOVA for repeated measurements and Chi-square tests.

Results: Left ventricular ejection fraction (LVEF) has increased significantly at 6th and 18th months follow-up in the first 15 patients who received therapy since 2001 (preoperative: 39.0±8.7%; 6th month: 50.2±8.5% and 18th month: 47.9±6.0%; p=0.012). In the late group of patients, LVEF

Yazışma Adresi/Address for Correspondence: Prof. Dr. Gustav Steinhoff, MD, PhD, University of Rostock, Department of Cardiac Surgery, Schillingallee 35, 18057, Rostock, Germany Tel: +49 381 494 6101 Faks: +49 381 494 6102 E-posta: gustav.steinhoff@med.uni-rostock.de, canyerebakan@hotmail.com, muratugurlucan@yahoo.com

© Telif Hakkı 2009 AVES Yayıncılık Ltd. Şti. - Makale metnine www.anakarder.com web sayfasından ulaşılabilir.
© Copyright 2009 by AVES Yayıncılık Ltd. - Available on-line at www.anakarder.com

increased from 37.4±8.4% to 47.1±8.3% (p<0.001) whilst although an increase in LVEF has been observed in the CABG alone group (from 37.9±10.3% to 41.3±9.1%) the increase has not been statistically significant. Mortality occurred in 2 patients [1 patient from the early and 1 patient from the medium term follow-up] due to non-cardiac reasons. Myocardial calcification, lethal ventricular arrhythmia, and tumor formation have not been observed in any of the patients in the long-term follow up.

Conclusion: Direct injection of bone marrow derived CD 133+ stem cells into the myocardium with concomitant CABG is safe. However, this treatment modality may only be applied as standard treatment after completion of the long term detailed results of prospective, randomized multicenter trials. (*Anadolu Kardiyol Derg 2009; 9: 457-64*)

Key words: Stem cell, myocardial ischemia, heart failure, cardiac surgery

Giriş

Koroner arter hastalığı, uygulanan çok çeşitli tedavi yöntemlerine rağmen günümüzde halen en önemli mortalite ve morbidite sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır. Akut miyokard enfarktüsü birçok hastada koroner arter hastalığının ilk semptomu olabilmekte ve maalesef her geçen gün gelişen tedavi yöntemlerine rağmen değişik miktarlarda önlenemez miyokard kaybına sebebiyet vermektedir. Miyokard kas hücresi kaybı zaman içerisinde sol ventrikül fonksiyonlarında bozulma ile birlikte hastaların yaşam sürelerini ve hayat kalitelerini azaltmaktadır. Son dönem kalp yetmezliği geliştiğinde ise günümüzde altın standart tedavi kalp transplantasyonudur.

Geçen 10 yılda rejeneratif tıptaki ilerlemelerle birlikte miyokard rejenerasyonu da ilgi kazanmıştır (1, 2). Miyokard hücrelerinin rejenerasyondan yoksun oldukları ya da çok az miktarda rejenerasyon kapasiteleri olduğu bilinmektedir. Ancak miyokard içinde rejeneratif hücrelerin tespit edilmesi bir şekilde bu hücrelerin manipüle edilmesi yönünde bir fikir doğurmuştur. Ayrıca, bu uyarının rejenerasyon kapasitesi olan kök hücrelerin miyokarda yerleştirilmesi ile de olabileceği düşünülmüştür. Bu temel doğrultusunda akut ya da kronik nedenlerle zarar görmüş kalp kasının tamirinde değişik hücre serileri denenmiştir (3-7).

Koroner arter baypas cerrahisi (KABG) operasyonu planlanan hastalar bu amaçla miyokard rejenerasyonunda kök hücre tedavisinin ilk klinik denemelerinin uygulandığı gruplar içerisinde. Bunun en açık sebebi, cerrahi sırasında enfarktüs sahasına ulaşmanın kolay olması ve kök hücrelerin saha içerisine ya da enfarktüs sahasının sınırlarına direk olarak enjekte edilmesinin kolaylığıdır. Bu yöntemin koroner anjiyografi sırasında koroner arter içine verilmesine göre avantajı, bu sayede hücrelerin direk olarak istenilen miyokard alanına yönlendirilmesine olanak sağlamasıdır (Resim 1).

Kalbe yönelik kök hücre tedavisinin klinik anlamda hayata geçirilmesi yoğun bir ön çalışma devresini gerektirmektedir. Günümüzde mevcut bilimsel veriler kullanılarak elde edilecek bilgiler ışığında potansiyel hastaların belirlenmesi ve tedavi görece hastaların yine bilimsel verilere dayanan kriterlere uygun olarak klinik çalışmaya dâhil edilmesi önemli noktalardır. Aksi takdirde deneme aşamasındaki tedavinin kontrolü zorlaşmakla birlikte alınan sonuçlarının geçerliliği tartışılır hale gelmektedir.

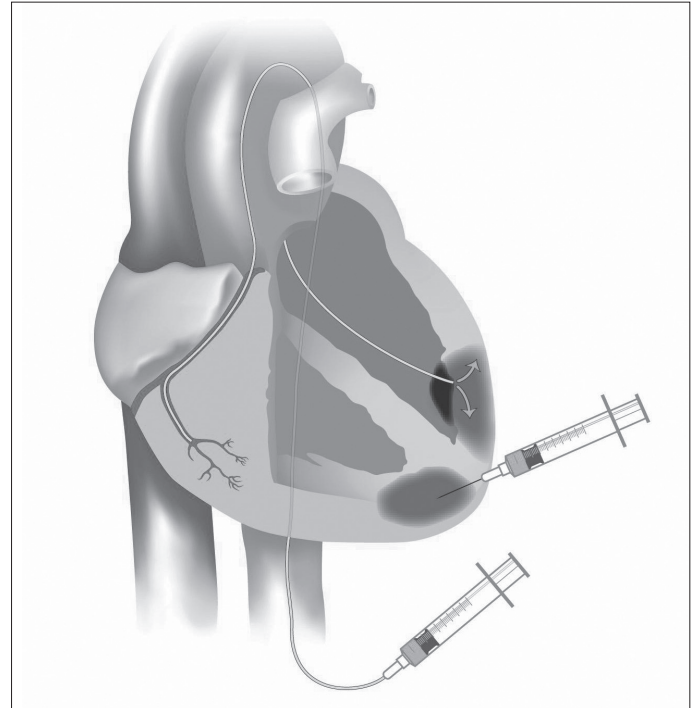
Kliniğimizde 2001 yılından itibaren, KABG ile birlikte intramiyokardiyal olarak kök hücre uygulaması klinik çalışmalar dahilinde pratiğe geçirilmiştir. Bu konuda kliniğimizde geliştirilen protokol ile kemik iliğinden elde edilen CD133⁺ kök hücreler cerrahi sırasında hasta miyokarda transepikardiyal olarak enjekte edilmektedir. Bu makalede kliniğimizde 2001 yılında başlayarak bu

güne kadar devam eden, kök hücre tedavisindeki çalışmaların hazırlanmasından, uygulama sürecine ve ileri dönem sonuçlarına ulaşılmasına kadar kazandığımız tecrübeler sunulacaktır. İlk 6 hastamızda aldığımız cesaret verici sonuçlar (7) ve devamında ileri aşama denemelerin orta dönem sonuçları değişik dergilerde yayınlanmıştır (8).

Kardiyak kök hücre tedavisinin kısa dönem güvenilirliği ve etkinliği konusunda çeşitli yayınlar bulunmasına rağmen literatürde bu tedavinin uzun dönem başarısı hakkında çok az sayıda bildiriye rastlanmaktadır (9). Hâlâ tedavinin aritmi (10), tümör oluşumu (11) ya da kalsifikasyon (12) gibi uzun dönem sonuçlarının güvenilirliği hakkında objektif veriler bulunmamaktadır. Araştırmamızın amacı kliniğimizde 2001 yılından bu yana KABG ile birlikte uygulanan kök hücre tedavisinde edindiğimiz tecrübeyi orta dönem sonuçları ışığında değerlendirmektir.

Yöntemler

Anabilim dalımızda 2001 yılından itibaren KABG ile birlikte kök hücre tedavisi uygulanmaktadır. Tedavi, üniversitemiz etik komitesince değerlendirilmiş ve onaylanmıştır. Ayrıca hastalar



Resim 1. Kök hücre tedavisinin kalbe uygulanmasında güncel yaklaşımlar: intrakoroner infüzyon, transendokardiyal, ve epikardiyal intramiyokardiyal enjeksiyon

işlem öncesi detaylı bir biçimde bilgilendirilmiş ve onamları alındıktan sonra tedaviye kabul edilmişlerdir. Kök hücre tedavisi için hasta seçim kriterleri:

- 1- En az 14 gün önce miyokard enfarktüsü geçirmiş olmak,
- 2- Miyokard enfarktüsüne sebep olan dışında baypas yapılması planlanan koroner arter varlığı,
- 3- Enfarkt sahası çevresinde belirgin akinetik sol ventrikül miyokardı bulunması, olarak belirlenmiştir.

Ayrıca yine pratiğimizde uyguladığımız çalışma dışı bırakılma kriterleri ise;

- 1- Uzun süreli, miyokard fonksiyonunda bozulmaya sebep olan kronik hastalığı olmak,
- 2- Acil cerrahi girişim gerektirmek,
- 3- Malign ventriküler taşikardi atağı geçirmiş olmak
- 4- KABG ile birlikte kapak cerrahisi gerektirmek, olarak kabul edilmiştir.

Koroner arter baypas cerrahisi ile birlikte kök hücre tedavisi uygulaması Haziran 2001'de başlamış ve erken dönem başarılı sonuçlar sayesinde 2003 yılından itibaren ikinci dönem çalışmalara devam edilmiştir.

Hastaların randomizasyonu

İlk 12 hastanın randomizasyonu kullanıma açık web tabanlı (<http://www.tufts.edu/~gdallal/PLAN.HTM>) sisteme göre yapılmıştır. Daha sonrasında hematoloji klas-B odasının kullanıma açık olduğu günlerin randomizasyonu ve yaptığımız çalışmayı kısıtlaması sebebiyle bir strateji değişikliğine gidilmiş ve hematoloji odasının kullanılabilirdiği haftalarda ameliyat olan hastalar kök hücre grubuna, diğer haftalarda ameliyat olanlar kontrol grubuna dahil edilmiştir. Bu odanın kullanılabilirliği çalışmayı yapan araştırmacıların kontrolü dışında olduğundan ortaya şu şekilde bir randomizasyon çıkmıştır: 010000110011100100010101010010101110111. Burada "0" kontrol grubundaki hastaları, "1" ise hücre grubundaki hastaları göstermektedir.

Kök hücre hazırlanması

Kemik iliği aspirasyonu başlangıçta lokal anestezi altında cerrahi girişimden 1 gün önce posteriyor süperiyor iliyak krestten yapılmıştır. Her hastadan yaklaşık 100 ml kemik iliği aspire edilmiştir. Daha sonra bu işlem ameliyat günü sabahı uygulanmış ve hücreler ameliyathanemiz dâhilinde bulunan kök hücre laboratuvarında izole edilerek uygulamaya hazır hale getirilmiştir (8).

Kemik iliği, aspirasyon yöntemi ile elde edilmiş ve pıhtılaşmanın önlenmesi için heparinize kaplara alınmıştır. PBS/EDTA ile dilüe edildikten sonra 20ml Ficoll (1077g/mg, Biochrom) üzerinde dikkatlice tabakalaştırılmıştır. Sonrasında sallanan kovalar içeren santrifüjör içinde 35 dakika santrifüj edilmiştir. Çökelti üzerinde biriken sıvı aspire edildikten sonra mononükleer hücre katmanı toplanmıştır. Demir ile konjuge anti-CD133 antikolar (Miltenyi CliniMacs System; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) kullanılarak CD133⁺ kök hücreler işaretlenmiştir. Çift hücre ayırma çemberleri, Mini-MACS LS kolonu (Miltenyi Biotec) kullanılarak üretici firmanın işlem protokolüne uygun şekilde çalıştırılmıştır. Ayırıştırma işlemi tamamlandıktan sonra elde edilen hücrelerin saflık derecesi akan hücre ölçer (flow cytometry) yöntemi ile analiz edilmiştir.

Cerrahi girişim

Tüm hastalar kardiyopulmoner baypas ve kardiyak arrest altında opere edilmişlerdir. Sol internal torasik arter, sıklıkla değerlendirilmiş olsa da kullanılabilirliğinde anteriyor duvarda revaskülarize edilebilecek damar aranmıştır. Revaskülarize edilecek diğer koroner arterler için ek olarak, safen ven ve/veya radyal arter çıkarılmıştır.

Gerekli ve mümkün olan tüm koroner anastomozlar yapılmıştır. Bunun yanında yine uygun durumlarda enfarktüse neden olmuş koroner artere de baypas yapılmıştır. Koroner anastomozlar bittikten sonra 1 cm² alana birden fazla olmayacak şekilde, belirlenen enfarkt sahasının sınırlarına, içinde hücreler bulunan 0.2 ml'lik solüsyonla 10 enjeksiyon (1.2-10 x 10⁶ hücre) yapılmıştır. Enfarktüs sahasının görülemediği durumlarda sintigrafi ile belirlenmiş perfüzyon defektinin bulunduğu sahaya ya da ekokardiyografi veya ventrikülografi ile gösterilmiş duvar hareket bozukluğu olan sahaya enjeksiyon uygulanmıştır. Sadece KABG cerrahisi uygulanan gruba sham enjeksiyonu yapılmamıştır. Enjeksiyonlar sırasında enjekte edilen süspanسیونun dışarı kaçmasını önlemek amacı ile üzerine birkaç saniye kadar tampon uygulanmıştır. Kök hücre implantasyonundan hemen sonra, aort klemp kaldırılmış ve operasyon alışılan şekilde bitirilmiştir. Bir gecelik yoğun bakımının ardından hastalar normal servisimizde 8-12 gün kadar kaldıktan sonra rehabilitasyon merkezlerine ya da kardiyoloji bölümüne sevk edilmiştir. Postoperatif standart medikal tedavide aspirin, beta bloker, statin ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri kullanılmıştır. İleri medikal tedavi için hastalar kardiyoloji bölümünde takip edilmiştir.

Hasta takibi

İlk dönem hastalardaki çalışmalarımızda birincil sonuç, operasyondan 12 ay sonra kardiyak hastalık nedeniyle ya da majör bir kardiyak sebeple ölüm olmaması olarak kabul edilmiştir. İkincil sonuçlar ise ventriküler aritmi insidansında azalma ve efor kapasitesi NYHA sınıf 3 ya da 4'ten gerileme şeklinde değerlendirilmiştir. Aynı parametreler hastaların uzun dönem takiplerinde de göz önünde bulundurulmuştur.

İleri aşama çalışmalarımızda yükümsüzlük hipotezi ortalama sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda KABG ile birlikte kök hücre tedavisi yapılan grup ile yalnızca KABG uygulanan grup arasında postoperatif 6 ay içinde fark görülmemesi şeklinde kurulmuştur. Bu fazda ise ikincil kazanımlar, takip döneminde, birinci faz birincil ve ikincil sonuçlarına ek olarak enfarkt sahası içerisinde miyokard perfüzyonu sağlanması şeklinde kabul edilmiştir.

Hastaların uzun dönem takiplerinde ise aşağıda sıralanmış tetkikler uygulanmıştır.

NYHA sınıfı

Hastalarımızın takip sırasında aile hekimleri tarafından kliniğimize tekrar sevkleri istenmiş ve kabulleri esnasında anamnezlerinde NYHA sınıfları belirlenmiştir.

Elektrokardiyografi (EKG)

Yapılan elektrokardiyografilerde yeni oluşan supraventriküler ve ventriküler aritmi, atriyoventriküler veya ventriküler bloklar,

iskemik değişiklikler ve ventriküler ekstrasistoller değerlendirilmiştir. Bu inceleme preoperatif dönemde, hastalar taburcu edilmeden önce ve operasyon sonrası 6. ayda gerçekleştirilmiş ve daha ileri dönemde 18 ay ve uzun dönem takipte tekrarlanmıştır.

24 saat Holter monitorizasyonu

Yirmi dört saat devamlı Holter EKG incelemesinde hastalarımızda bu süre içindeki supraventriküler ve ventriküler ekstrasistoller ve aritmiler incelenmiş, tehlikeli kalp blokları ve ventriküler aritmi görülüp görülmediğine bakılmıştır.

Ekokardiyografi

Transtorasik ekokardiyografi global olarak sol ventrikül kasılmasını ve kardiyak ölçümleri yapmak amacıyla çift kör şekilde, deneyimli, iki farklı kardiyolog tarafından yapılmıştır. Kardiyologlar kök hücre enjeksiyonunun varlığıyla ve yeriyile ilgili bilgilendirilmiştir. Tetkik Philips SONOS 7500 sistemiyle (Philips, Netherlands) yapılmıştır. Hastalar sol lateral pozisyonda ve başları hafif yukarıda kalacak şekilde incelenmiştir. Standard olarak parasternal kısa ve uzun eksen ve apikal 3, 4 ve 5 boşluk görüntülemelerine bakılmıştır. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu (SVEF) Simpson yöntemiyle belirlenmiştir.

Manyetik rezonans görüntüleme (MRI)

Gadolinium kontrastlı MRI'de sadece uzun dönem değerlendirilmeleri sırasında sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu (SVEF) belirlemek ve olası miyokard enflamasyonunu, nekroz veya tümör oluşumunu görüntülemek amacı ile yapılmıştır. Hastalar supin pozisyonda 1.5 T sistemiyle (Magnetom Avanto, Siemens, Erlangen, Germany) incelenmiştir. Sinyal alımında "phased-array" kardiyak coil kullanılmıştır. Bütün görüntüler nefes tutularak alınmış ve elektrokardiyografik karşılaştırma ile kaydedilmiştir. Manyetik rezonans görüntüleme analizi yarı otomatik şekilde hastaların gruplara aidiyetinden ve tetkik zamanından habersiz iki radyolog tarafından ayrı ayrı yapılmıştır. Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu, MRI kısa aks görünümünden Siemens Syngo Argus bilgisayar programı aracılığı ile elde edilmiştir. Ayrıca, radyologlar olası miyokard enflamasyonu, fibrotik değişiklikler ve tümör oluşumuna özellikle dikkat etmişlerdir.

Miyokard perfüzyon sintigrafisi

Hedef bölgelerdeki miyokard perfüzyonun belirlenmesi amacıyla hastalarda tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisi (SPECT), intravenöz 100 MBq Talyum klorid (TI 201) verilmesiyle uygulanmıştır. Tetkikler enjeksiyondan 5 dakika sonra 3 kollu gama kamerası aracılığıyla (IRIX; Philips Netherlands BV Medical Systems, Eindhoven, Netherlands) yapılmıştır. Hedef bölgedeki aktivite kantitatif olarak belirlenmiş ve preoperatif aktiviteye oranla gösterilmiştir.

Bilgisayarlı Tomografi

Kök hücre tedavisi ile birlikte doku değişimi fark edildiğine dair bildirilerin literatüre sunulmasından sonra takiplere bilgisayarlı tomografi de eklenmiştir.

İstatistiksel analiz

Tüm verilerin girişi ve değerlendirilmesi SPSS for Windows programı 15.0 versiyonu (SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) kullanılarak yapılmıştır. Deskriptif istatistiksel değerlendirme sadece önem arz eden değişkenler için uygulanmıştır. Yapılan istatistik değerlendirme sürekli değişkenlerin ortalama değerleri ve standart sapmaları, kategorik değişkenlerin frekans ve rölatif frekanslarının belirlenmesiyle yapılmıştır. Normal dağılımı olmayan sürekli değişkenler medyan ve aralık (range) olarak gösterilmiştir. Normal dağılımlı sürekli değişkenlerin karşılaştırılması eşleştirilmemiş t testi yardımıyla yapılmıştır. Normal dağılımdan yoksun değişkenler için (miyokard perfüzyonu) Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler için Ki-kare testi uygulanmıştır. Değişik zamanlardaki değişkenlerin gruplar içinde değerlendirilmesi (örneğin SVEF) karşılaştırılması tekrarlanan ölçümler için ANOVA yöntemiyle belirlenmiştir. Tüm p değerleri iki yönlü istatistik değerlendirmenin sonucu olarak çıkmış ve değer 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı kabul edilmiştir.

Bulgular

Anabilim dalımızda 2001-2006 yılları arasında toplam olarak 35 hastaya kardiyak kök hücre transplantasyonu tedavisi uygulanmıştır (Tablo 1). Erken dönem çalışma grubuna (2001-2003 yılları arası) 15 hasta dahil edilmiştir. Tüm hastalarda cerrahi girişim başarılı geçmiştir. Postoperatif erken dönemde 2 hastada internal torasik arter kaynaklı kanama nedeniyle operasyon gününde revizyon gerekmiştir. Bunun dışında herhangi bir komplikasyonla karşılaşılma ve hastalar postoperatif 3. haftada kardiyak rehabilitasyon programına alınmışlardır. Postoperatif 9. ayda 75 yaşındaki bir erkek hastamızda serebrovasküler hadise gelişmiş ve hasta inme nedeniyle kaybedilmiştir (hastaya otopsi yapılmadı). Diğer tüm hastalarımız sağlıklı olarak yaşamlarını sürdürmektedirler. Ancak toplamda 9 hastanın uzun dönem takipleri düzenli olarak yapılabilmektedir.

İki bin üç yılından itibaren çalışmaya dâhil edilen toplamda 20 hastaya KABG ile birlikte kök hücre transplantasyonu tedavisi uygulanmıştır. Kök hücre tedavisi uygulanan gruba ortalama kemik iliğinden elde edilmiş 7.2×10^6 CD133⁺ kök hücre implante edilmiştir. Postoperatif erken dönemde bir hastada düşük kardiyak debiyeye bağlı akut böbrek yetmezliği gelişmiştir. İnotropik destek ve geçici hemofiltrasyon ile hastada iyileşme sağlanmış ve hasta sorunsuz olarak taburcu edilmiştir. Ayrıca başka bir hastada ise derin sternum yara enfeksiyonu gelişmiş, bu hastanın da başarılı tedavi sonrası taburcu olması sağlanmıştır. Ancak uzun dönemde düzenli takiplerine uymayan bu hasta çalışma dışı bırakılmıştır. Operasyondan 21 ay sonra 68 yaşında bir bayan hastamız bilinmeyen bir sebeple kaybedilmiştir. Diğer tüm hastalar hayattadır ve sağlıklı bir şekilde yaşamlarını idame ettirmektedirler. Hastaların hiçbirinde miyokard enfarktüsü ya da ölüm olmamış ve yeni kardiyak girişime ihtiyaç duyulmamıştır. Yazının hazırlandığı dönemde kök hücre tedavisi uygulanan 13 hasta ve kontrol grubundan 6 hastada uzun dönem değerlendirmeler yapılmıştır.

Uzun dönem NYHA sınıfı faz 1 ve faz 2 çalışmalarında hücre tedavisi uygulanan hastaların 20 tanesinde belirlenmiştir. Bu

Tablo 1. Hastaların demografik özellikleri

Parametreler	KABG ve hücre enjeksiyonu (n=35)	KABG (n=20)	p*
Yaş, yıl	63.0±10.2	63.5±8.4	AD
Cinsiyet, erkek/kadın	30/5	16/4	AD
İnfarktüstten itibaren geçen zaman, hafta	8.0±2.0	7.5±1.5	AD
NYHA sınıfı			AD
II, n (%)	3 (9)	2 (10)	
II-III, n (%)	24 (69)	14 (70)	
III, n (%)	7 (20)	4 (20)	
Koroner arter darlığı			
LMCA, n (%)	14 (40)	7 (35)	AD
LAD, n (%)	32 (91)	20 (100)	AD
CX, n (%)	27 (77)	17 (85)	AD
RCA, n (%)	32 (91)	18 (90)	AD
Hedef kardiyak bölge			
Anterior, n	10	7	AD
Posteriyör, n	18	11	
Apeks, n	7	2	
Holter monitorizasyonu			
Önemli VES, n	0	0	
Atriyal fibrilasyon, n	0	0	
İntraoperatif			
Baypas sayısı ¹	3.5±1.0	3.6±0.8	AD
ITA kullanımı, n	29	20	
Postoperatif			
İnotrop ihtiyacı, n (%)	21 (60)	12 (60)	AD
Mekanik solunum desteği, saat	6.3±3.0	6.0±2.0	AD
Postop CK, IU	485 (181-3700)	507 (195-1166)	AD
Postop CK-MB, IU	24 (15-421)	28 (12-43)	AD
Yatış süresi, gün	14.0±2.5	12.0±2.0	AD

Değerler ortalama ± standart sapma, medyan (güven aralığı) ve oran/yüzde olarak verilmiştir
• - Eşleştirilmemiş t, Mann-Whitney U ve Ki-kare testleri
AD - anlamlı değil, CK- kreatin kinaz, CX - sirkumfleks arter, ITA - sol internal torasik arter, LAD - sol ön inen arter, LMCA - sol ana koroner arter, RCA - sağ koroner arter, VES - ventriküler ekstrasistol

hastaların NYHA sınıfları preoperatif değerlere oranla daha iyi olmasına karşın (preoperatif 2.5±0.4, uzun dönemde 1.7±0.3) sadece KABG tedavisi uygulanan hastalarla karşılaştırıldığında (preoperatif 2.6±0.3, uzun dönemde 1.9±0.5) istatistiksel anlamda bir fark görülmemiştir.

Özetlenecek olursa erken ve ikinci dönem kök hücre tedavisi uygulanan toplam 35 hastadan 2 tanesi kaybedilmiş, 1 hasta çalışmadan çıkarılmıştır. Kalan 32 hastadan 22 tanesine Haziran 2007 tarihi itibarıyla uzun dönem değerlendirmeler yapılmıştır. Toplam takip süresi Haziran 2007 tarihi itibarıyla 40.7±13.6 aydır. Bu süre içerisinde hiçbir hastada malign ventriküler aritmi olma-

mıştır. Sadece 1 hastada ventriküler ekstrasistollerde artış gözlenmiştir. İki bin bir yılında tedavi uygulanan ilk hastalarda tedavi sonrası 6 ve 18. aylarda SVEF'da istatistiksel olarak anlamlı yükselme tespit edilmiştir (preoperatif: %39±8.7; 6.ay: %50.2±8.5 ve 18. ay: %47.9±6.0; F=6.03, p=0.012). İki bin üç yılından itibaren tedaviye alınan ve kök hücre transplantasyonu uygulanan hastalarda 6. ayda SVEF %37.4±8.4'ten %47.1±8.3'e çıkmıştır (F=24.16, p<0.001). Sadece KABG uygulanan kök hücre tedavisi uygulanmayan grupta ise SVEF yükselmesi (%37.9±10.3'ten %41.3±9.1) preoperatif değere göre istatistiksel olarak anlamlı bulunsa da KABG ile eş zamanlı hücre tedavisi

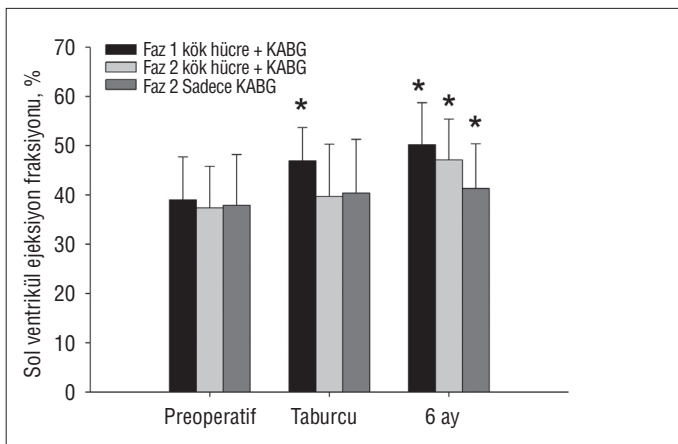
alan grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır (çift yönlü ANOVA, $p=0.03$) (Şekil 1).

Sol ventrikül diyastol sonu hacimlerine bakıldığında KABG ve kök hücre uygulanan gruplarda görsel olarak sadece KABG uygulanan gruba göre daha kesin bir düşüş görülmesine karşın bu değişikliklerde herhangi bir istatistik fark görülmemiştir (Şekil 2).

Uzun dönem ekokardiyografi verileri her iki dönemdeki kök hücre tedavisi uygulanan 10 hastada ve kontrol grubundaki 6 hastada mevcuttur. Kontrol grubundaki hastalar sayılarının henüz az olması nedeniyle sadece her iki faz çalışmadan katılan 10 kişilik KABG ve kök hücre tedavisi alan hastalarla değerlendirilmiştir. Bu 10 hastada sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu $39.4\pm 8\%$ olan preoperatif değerden 6 ay sonrasında $47.6\pm 9.7\%$ ve 18 ayda $42.7\pm 12.5\%$ 'e çıkmıştır. Uzun dönem değerlendirmelerinde ejeksiyon fraksiyonunun düşmediği hatta $43.7\pm 6.7\%$ ile 41 ay sonunda preoperatif değerinde kaldığı görülmüştür (Şekil 3).

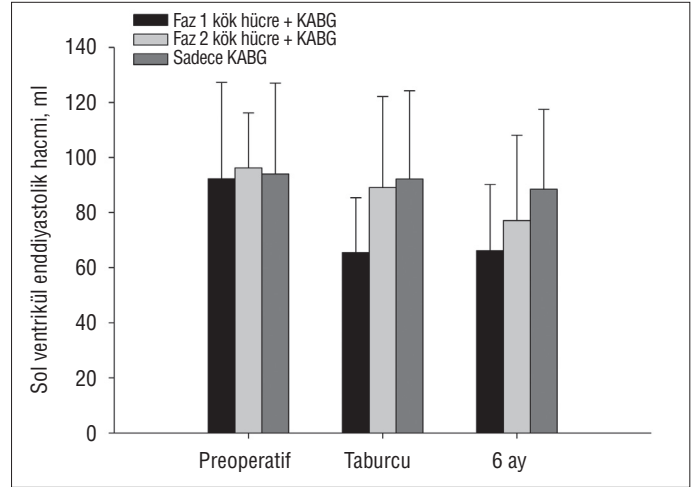
Kısa ve orta dönem Talyum sintigrafi sonuçlarına bakıldığında faz 1 hastalarından 13 hastanın sonucu değerlendirilmiştir. Bu hastalarda iki hafta sonra hücre nakledilen bölge ve çevresinde ortalama %15 kadar bir artış görülmüştür ($p<0.01$). Bu oran %14'lük bir artışla 6 ve 18 ay sonrasında stabil kalmıştır. Yine faz 2 çalışma grubundaki hastalara bakıldığında miyokard perfüzyonu hücre nakledilen bölgelerde 6 ay sonra KABG ve hücre tedavisi alan hastaların 11'inde artış göstermiştir ($p<0.05$). Bu durum sadece KABG tedavisi alan hastaların sadece 4'ünde gözlenmiştir. Altı ay sonra KABG ve hücre tedavisi alan grupta artış (mediyan 1.02, interkuartil aralık 0.95-1.11) sadece KABG alan gruba göre (mediyan 0.95, interkuartil aralık 0.91-1.03) daha fazla olmuştur. Uzun dönem sintigrafi sonuçları henüz tamamlanmamıştır.

Manyetik rezonans görüntüleme uzun dönemde toplam 19 hastaya uygulanmış ve hastalardan hiç birinde anormal morfolojik değişim gözlenmemiştir. Kardiyak bilgisayarlı tomografi incelemesi yapılan 22 hastadan hiç birinde ortalama 41 ayda tümör oluşumu ya da intramiyokardiyal kalsifikasyon kaydedilmemiştir. **Manyetik rezonans görüntüleme** sonuçlarında henüz kantitatif fonksiyonel değerlendirme yapılmamıştır.



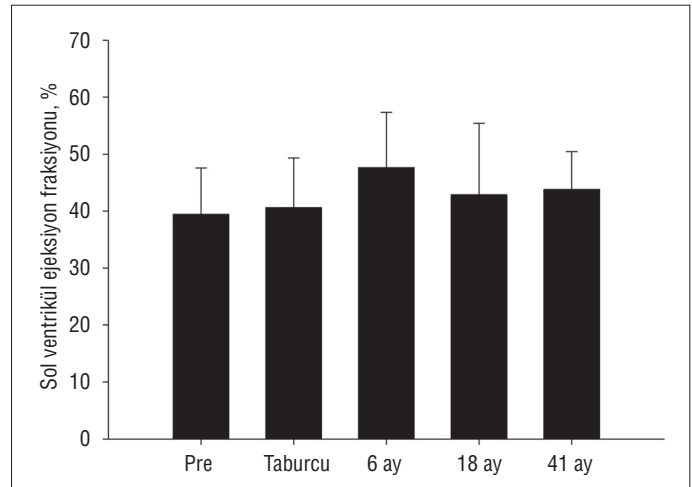
Şekil 1. Faz 1 ve faz 2 çalışmalarında KABG eşliğinde kök hücre tedavisi uygulanan hastaların ekokardiyografide belirlenen ejeksiyon fraksiyonundaki değişikliğin orta dönem sonuçlarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması.

* $p<0.05$ preoperatif değerlerle karşılaştırılması - tekrarlayan ölçümler için ANOVA testi
KABG - koroner arter baypas cerrahisi



Şekil 2. Faz 1 ve faz 2 çalışmalarında KABG eşliğinde kök hücre tedavisi uygulanan hastaların ekokardiyografide belirlenen sol ventrikül diyastol sonu hacmindeki değişikliğin orta dönem sonuçlarının kontrol grubuna göre karşılaştırılması

KABG- koroner arter baypas cerrahisi



Şekil 3. On hastadan oluşan bir alt grubun uzun dönem sol ventrikül ejeksiyon fraksiyon seyri. Bu küçük hasta grubunda (n=10) uzun dönemde sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir

Pre - preoperatif

Bilgisayarlı tomografi yine uzun dönemde 18 hastaya uygulanmış ve bulgularda tümör veya değişik doku oluşumuna rastlanmamıştır.

Tartışma

Kardiyovasküler sistem hastalıkları günümüzde gelişmiş ve gelişmekte olan ülke toplumlarında mortalite ve morbiditenin en önemli sebebi olarak karşımıza çıkmaktadır (13). Her ne kadar zaman içerisinde kalp ve damar hastalıklarını anlamada, mekanizmalarını çözmede büyük gelişmeler sağlanmış olsa da halen ileri evre kalp yetmezliği için transplantasyon dışında kabul edilmiş bir tamir yöntemi bulunmamaktadır (14). Genellikle, uygulanmakta olan tedaviler, gelişmiş olan miyokard iskemisinin ya da

miyokard hasarının daha fazla ilerlememesi için yardımcı ve koruyucu tedaviler olarak karşımıza çıkmaktadırlar (15). Özetle, perkütan ya da cerrahi revaskülarizasyon yöntemleri günümüzde kardiyovasküler sistem hastalıklarının tedavisi için en gerçekçi çözüm olarak görünmektedirler (13).

Uzun yıllar kalp dokusuna gelişimini tam olarak tamamlamış bir organ gözüyle bakılmış (1) olsa da özellikle 1990'ların ortalarında prekürsör hücrelerin farklı tip hücrelere dönüşebileceğini gösteren deneyler sayesinde rejeneratif tedaviler kardiyovasküler sistem alanına da hızlı bir giriş yapmıştır (13, 14). Kök hücreler tüm canlıların yapı taşlarıdır ve dokularda farklı bölgelerde uyur vaziyette bulunurlar. Özellikle doku kaybı ya da hasarı durumunda çoğalarak dokuyu yenilemek için programlanmışlardır. Gerekliğinde de farklı dokulara dönüşme özelliklerine sahiptirler (13). Tüm bu bilgiler ışığında farklı tip kök hücreler (hematopoetik, mezenkimal, kardiyak, iskelet kasından elde edilmiş kök hücreler gibi) miyokardın özellikle iskemik hasar sonrası yenilenmesinde birçok merkez tarafından deneysel ya da klinik çalışmalarda (13, 14), farklı uygulama yöntemleri ile sıklıkla denenmektedir (15, 16). Fakat bu araştırmalara ait uzun dönem sonuçlarını gösteren yayınlar literatürde sayıca azdır. Kök hücre tedavilerinin klinik pratikte rutin kullanım alanı bulabilmeleri için farklı merkezlerin uzun dönem sonuçlarına ihtiyaç vardır (7, 8, 12, 13). Kliniğimizdeki pratiğimiz (7, 8) konu ile ilgili insan uygulamalarının uzun dönem sonuçlarını gösteren ender çalışmalardan biridir.

Çalışmamız sonuçlarına göre kemik iliğinden elde edilmiş otolog pürifiye CD133/CD34⁺ kök hücrelerin sayıca 1x10⁷'ye kadar kronik iskemik kalp hastalığında miyokarda enjekte edilerek güvenle uygulanabileceği görülmüştür. Klinik uygulamalarda erken dönem çalışmaların sonuçları cesaret verici bulunmuş ve tedavi yeni hastaları da içerecek şekilde genişletilmiştir. İkinci dönemde çalışmalardan çıkarılabilecek esas sonuç kemik iliğinden elde edilmiş CD133⁺ hücrelerin KABG sırasında uygulamasının başarılı uzun dönem sonuçları ile uygulanabileceği şeklindedir. Olabilecek muhtemel yan etkiler göz önünde bulundurulduğunda, uzun dönemde anormal doku değişimi, tümör oluşumu ya da kalsifikasyon ile karşılaşılmasıdır. Ayrıca, 24 saatlik Holter izlemlerinde hiçbir hastada devam eden aritmi oluşmamıştır.

Tse ve ark. (9) 12 hastada uyguladıkları kateter yolu ile otolog kemik iliği mononükleer kök hücre nakli ile ilgili seriye ait uzun dönem (44 ay) sonuçlarını bildirmişlerdir. Bu süre literatürde bulunan en uzun takip sürelerinden biridir. Enjekte ettikleri CD34⁺ kök hücre sayısı bizim grubumuzla karşılaştırıldığında daha düşüktür. Ayrıca bu çalışmada da hücre implante edilen bölgede tümör ya da skar dokusu oluşumu veya kalsifikasyonla karşılaşmamışlardır; ventriküler aritmi gözlememişlerdir (9). Bizim hasta popülasyonumuzda %39.4±8 olan SVEF Tse ve ark.'larının (9) grubuna nazaran (%60±10) daha düşüktür. Bu da Tse ve ark.'larının hasta popülasyonunda anlamlı bir artış görülmeyen SVEF'de bizim hasta popülasyonumuzda anlamlı sonuçların elde edilmesinin asıl nedenidir. Ayrıca Tse ve ark. (9) çalışmalarında bir takım majör kardiyovasküler olayla karşılaşmışlardır. Bunun nedeni kateter yolu ile tam olarak istenen miyokard bölgelerine enjeksiyon yapılamaması ve sonrasında ilerleyen koroner arter hastalığı ile birlikte bu bölgelerde bulunan kök

hücrelerin bir takım majör kardiyovasküler olaylara neden olması olarak açıklanabilir. Yalnız günümüzde gelişen teknoloji artık NOGA® XP Cardiac Navigation System (Cordis Corporation, Johnson-Johnson Company) haritalandırması gibi yeni yöntemlerde istenilen miyokard bölgelerine hücre implantasyonunu mümkün kılmaktadır (17). Koroner arter baypas cerrahisi endikasyonu olmayan hastalarda bu tip girişimsel yöntemler tabii ki bir alternatif oluşturabilir.

Her ne kadar az sayıda hasta uzun dönem miyokard performansı değerlendirmesine tabi tutulabilmiş olsa da uzun dönem sonuçlarımız orta dönem sonuçlarına göre herhangi bir kötüye gidiş göstermemiştir. Bu konuda kesin bir karara varabilmek ve kök hücre transplantasyonu tedavisinin klinik avantajlarından bahsedebilmek için tüm hastalara ait uzun dönem güvenilirlik ve etkinlik sonuçları gerekmektedir.

Görülmektedir ki, KABG operasyonu sırasında kemik iliğinden elde edilmiş CD133⁺ kök hücrelerin de miyokarda enjeksiyonu fonksiyonel kapasiteye katkıda bulunmaktadır. Patel ve ark. (18) 20 hastada *off-pump* KABG sırasında intramiyokardiyal olarak verdikleri kemik iliğinden elde edilmiş CD34⁺ otolog kök hücrelerle bizim sonuçlarımıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ancak çalışmalarında varılan esas sonuç SVEF'de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kök hücre tedavisi uygulanan grupta 6. ayda görülen anlamlı artış (kontrol grubunda SVEF'deki artış: %6.5; kök hücre grubunda SVEF'deki artış: %16.7) ile vurgulanmıştır. Perin ve ark. (4), Fuchs ve ark. (19), Tse ve ark. (20)'nin çalışmalarında kateter ile intramiyokardiyal olarak enjekte edilen mononükleer kemik iliği hücre preparatlarının da kronik iskemik kalp hastalığında SVEF üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Son zamanlarda yapılan bir meta-analizde görülebileceği gibi hücre tedavilerinin sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonuna etkisi eğer yöntemler arasında bir ayırım yapmadan incelenirse 4 aylık bir takip süresinde (3-18 ay aralığı) kemik iliği kök hücreleri kullanılırsa %3.66'lık bir artış sağlandığı gözlenmiştir (21). Bu sonuçlar göz önüne alındığında KABG ve kök hücre tedavisinin kliniğimizde uygulanan şekliyle uzun dönemde gayet kabul edilebilir sonuçlar verdiği söylenebilir.

Çalışmamızın güvenli ve başarılı olduğu kronik miyokard iskemisi olan hastalarda kök hücre tedavisi sonrası, hastaların yaşamlarını devam ettirmeleri, miyokarda anormal doku değişikliklerinin gözlenmemesi ile ispat edilebilmektedir. Erken dönem intramiyokardiyal kemik iliği transplantasyonunun başarılı sonuçları yeni rejeneratif kök hücre tedavilerinin önünü açmaktadır. Ancak, belirlenmiş tedavi programlarının standart tedavi protokolleri olarak düzenlenebilmesi için halen sabır ve destek gerekmektedir.

Sonuç

Sonuç olarak kök hücre tedavisi, her ne kadar başarılı orta ve uzun dönem sonuçlar içerse de yöntem son derece yenidir. Kök hücre tedavisinin miyokard iskemisinde günümüz tedavi stratejileri ile birlikte kullanılmasının hızlandırılması için çok merkezli, kontrollü, randomize, çift kör prospektif üçüncü faz çalışmalar gerektiği inancındayız.

Kaynaklar

1. Anversa P, Kajstura J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998; 83: 1-14.
2. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-76.
3. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-9.
4. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-302.
5. Wollert KC, Drexler H. Mesenchymal stem cells for myocardial infarction: promises and pitfalls. *Circulation* 2005; 112: 151-3.
6. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, et al. Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularisation and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005; 112: 173-80.
7. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Schümichen C, et al. Autologous bone marrow stem cell transplantation for myocardial regeneration after myocardial infarction. *Lancet* 2003; 361: 45-6.
8. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133⁺ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007; 133: 717-25.
9. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, et al. Safety of catheter-based intramyocardial autologous bone marrow cells implantation for therapeutic angiogenesis. *Am J Cardiol* 2006; 98: 60-2.
10. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-83.
11. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE, Shaw R, Ursell PC, Blau HM. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000; 102: 898-901.
12. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 109: 3154-7.
13. Uğurlucan M, Yerebakan C, Furlani D, Ma N, Steinhoff G. Cell sources for cardiovascular tissue regeneration and engineering. *Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 57: 63-73.
14. Akar AR, Durdu S, Çubukçuoğlu D G, Aslan A, Akçalı KC, Ozyurda Ü, et al. Failing heart; remodel, replace or repair? *Anadolu Kardiyol Derg* 2008; 8 Suppl 2: 148-57.
15. Özbaran M, Omay SB, Nalbantgil S, Kültürsay H, Kumanlıoğlu K, Nart D, et al. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 342-50.
16. Nişancı Y, Tayyareci Y, Sezer M, Umman B. An alternative approach of stem cell delivery to myocardium: combined usage of antegrade coronary arterial infusion and retrograde venous obstruction. *Anadolu Kardiyol Derg* 2008; 8: 391-2.
17. Garcia L, Baim DS, Post M, Simons M, Laham RJ. Therapeutic angiogenesis using endocardial approach to administration: techniques and results. *Curr Interv Cardiol Rep* 1999; 1: 222-7.
18. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC, Kormos R, et al. Surgical treatment of congestive heart failure with autologous stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 1631-8.
19. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease-A feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1721-4.
20. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
21. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167: 989-97.