

Stamceller ved hjertepatologi

Iskemisk hjertesykdom

Joachim Eikeseth og Andreas Ek Dyrberg



Litteraturstudie ved det medisinske fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

28/3-12

© Forfatter

År 2012

Tittel: Stamceller ved hjertepatologi – Iskemisk hjertesykdom

Forfatter Joachim Eikeseth og Andreas Ek Dyrberg

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

Abstract

The field of stem cell therapy has gone through a revolution the last decade. In the cardiovascular field scientists try to accomplish true regeneration through myogenesis. Other strategies include reducing cell death and promoting angiogenesis. In this report we will go through a selection of the most important cell types used for stem cell research, their phenotypes, the techniques of harvesting, and their pros and cons within the cardiovascular field. The focus today is changing to a new generation of cell types for cardiac therapy. The term “first generation” of cell selection has been introduced, ranging from the year 2000-2008, and includes skeletal myoblast and bone marrow-derived stem cells. The “second generation” ranges from 2009 and until today, and includes mesenchymal stem cells and cardiac progenitor cells. The latter are receiving a lot of attention through today’s clinical trials. In the future we sense a new generation of stem cells arising: The pluripotent stem cells, which include embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. The scientists are still debating which cell is superior, and further research is needed in order to address this question. For comparing the effects of different cell types, the most commonly used measurement is still left ventricular ejection fraction. Too few patients have so far been included in clinical trials in order to evaluate mortality rates. The field of stem cells for cardiac repair may have been rushed to clinical trials, even before the scientists fully understood the true mechanisms of action underlying cell therapy. Today the scientists are retreating back to their labs as more basic research is needed before stem cell therapy in full can be offered cardiovascular patients.

Innholdsfortegnelse

1	Iskemisk hjertesykdom og stamceller	6
1.1	Iskemisk hjertesykdom	6
1.2	Hva er en stamcelle?	7
1.3	Hva er virkningsmekanismen?	8
2	Pluripotente stamceller	10
2.1	Embryonale stamceller	10
2.1.1	Beskrivelse av embryonale stamceller	10
2.1.2	Isolering og differensiering	10
2.1.3	Sikkerhet og utfordringer	11
2.1.4	Etiske overveielser og lovverk	13
2.2	Induserte pluripotente stamceller	14
2.2.1	Beskrivelse av induserte pluripotente stamceller	14
2.2.2	Isolering og differensiering	14
2.2.3	Fordeler, ulemper og sikkerhet	14
3	Voksne stamceller	16
3.1	Stamceller fra benmarg	16
3.1.1	Beskrivelse av stamceller fra benmarg	16
3.1.2	Isolering av celler	16
3.1.3	Fordeler, ulemper og sikkerhet	17
3.2	Mesenchymale stamceller	17
3.2.1	Beskrivelse av mesenchymale stamceller	17
3.2.2	Isolering av mesenchymale stamceller	18
3.2.3	Differensiering av mesenchymale stamceller	19
3.2.4	Fordeler, ulemper og sikkerhet	19
3.3	Stamceller fra tverrstripet muskulatur	20
3.3.1	Beskrivelse av stamceller fra tverrstripet muskulatur	20
3.3.2	Isolering av celler	20
3.3.3	Fordeler, ulemper og sikkerhet	21
3.4	Hjerte progenitor celler	21
3.4.1	Beskrivelse av hjerte progenitor celler	21
3.4.2	Isolering av celler	22

3.4.3	Fordeler, ulemper og sikkerhet.....	22
4	Hvilke utfordringer står vi ovenfor?.....	24
4.1	Hvilken celletype er optimal?.....	24
4.2	Hva med dose-respons?.....	25
4.3	Hvordan administrere cellene?.....	26
4.4	Når skal man injisere cellene etter et akutt hjerteinfarkt?.....	28
4.5	Hvordan preparere cellene i forkant?.....	28
4.6	Hvordan måle effekt?.....	29
4.7	Hvilke ”døende celler” skal vi rette fokuset mot?.....	30
5	Behandling med stamceller etter hjerteinfarkt – Et historisk perspektiv.....	31
6	Hva er gjort klinisk?.....	35
6.1	Stamceller fra benmarg – Hva viser kliniske forsøk?.....	35
6.2	Stamceller fra tverrstripet muskulatur – Hva viser kliniske forsøk?.....	37
6.3	Mesenchymale stamceller – Hvor langt er man kommet innen klinisk forskning? ..	38
6.4	Hjerte progenitor celle – Hvor langt er man kommet innen klinisk forskning?.....	40
6.5	Embryonale stamceller – Hvor langt er man kommet innen klinisk forskning?.....	42
6.6	Induserte pluripotente stamceller – Hvor langt er man kommet innen klinisk forskning?.....	43
7	Hva vil fremtiden bringe?.....	44
	Litteraturliste.....	45

1 Iskemisk hjertesykdom og stamceller

1.1 Iskemisk hjertesykdom

Hjerte- og karsykdom er dødsårsak til en tredjedel av alle dødsfall i Norge i 2010. Av dødsfall totalt utgjør gruppen iskemisk hjertesykdom ca. 10 %, tilsvarende 2800 menn og rundt 2400 kvinner. Dvs at ca 5200 menneskser i Norge døde i 2010 av iskemisk hjertesykdom, definert som hjerteinfarkt, angina pectoris og atherosklerose i hjertet(1). Dette gjør at fremskritt innen feltet iskemisk hjertesykdom vil kunne redde mange liv årlig. Hittil eksisterer det ingen kur, og all behandling er rettet mot å eliminere risikofaktorer, bremse patogenesen eller å lindre symptomer. Håpet er at i fremtiden vil en kunne reversere iskemisk hjertesykdom ved hjelp av stamcelleterapi. Det ultimate ville vært og regenerert syke organer, for eksempel et nytt hjerte til pasienten som har fått hjerteinfarkt. Dette er foreløpig bare ønsketenkning. Allikevel omtales stamceller stadig vekk som fremtidens kur. Senest i 3. utgave 2012 i Illustrert Vitenskap er det et stort forsideoppslag om stamceller ved hjertesykdom. Stamcellene blir her omtalt som reservedeler til hjerte som kan dyrkes i laboratoriet. Dette forteller litt om forhåpningene en har til stamceller i fremtiden.

Vi vil i denne oppgaven prøve å gi et vitenskapelig innblikk i hvor langt man har kommet med stamcelleterapi innen iskemisk hjertesykdom. I vår litteraturstudie har vi i hovedsak søkt på pubmed med ”stem cells ischemic heart”. Som utgangspunkt og hovedkilde har vi startet med metaanalyser og oversiktsartikler, og videre en rekke enkeltstudier for å hente ut interessante detaljer som belyser helheten. Feltet er stort og vi har sett oss nødt til å begrense oppgaven. Vi har i hovedsak fokusert på stamceller med myogenesepotensiale, og dermed valgt og ikke omtale endotel progenitor celler. Dette innebærer også at forskningsområder som angiogenese og reduksjon av autofagi er nevnt i mindre grad, selv om disse områdene har et potensiale innen iskemisk hjertesykdom.

1.2 Hva er en stamcelle?

En stamcelle er en celle som kan gi opphav til forskjellige spesialiserte vevsceller, men også som ved deling gir opphav til en dattercelle med samme egenskaper som seg selv. I kroppen har vi forskjellige typer stamceller og noen er mer umodne enn andre. En vanlig inndeling i litteraturen er å dele stamcellene inn i pluripotente stamceller og ”adulte” stamceller, heretter kalt voksne stamceller.

De pluripotente stamcellene kan igjen deles inn i embryonale stamcellene og induerte pluripotente stamceller. De embryonale stamcellene kan igjen deles inn i to typer: De totipotente og de pluripotente. De totipotente stamcellene vil være de aller første cellene etter befruktningsen av en eggcelle og vil i prinsippet kunne lage et nytt individ, med placenta og fosterhinner. Et befruktet egg vil etter 5-6 dager danne én blastocyst, hvor man kan hente pluripotente celler fra. Det var slik man skaffet embryonale pluripotente stamceller, for første gang i 1998. De induerte pluripotente stamcellene blir ofte forkortet til iPS. Dette er vanlige celler, som blir omprogrammert til å inneha egenskapene til pluripotente stamceller. Pluripotente stamceller vil kunne gi opphav til alle kimplagene og har potensiale til å danne alle vev i kroppen, men kan ikke gi opphav til placenta og fosterhinne.

De voksne stamcellene er celler forskerne har oppdaget at finnes i små mengder i forskjellige vev i kroppen. Disse cellene er viktige for fornying og vedlikehold av organer. Disse voksne stamcellene kan deles i multipotente stamceller og unipotente stamceller. I oppgaven vår vil vi kun være interessert i voksne stamceller fra det mesodermale kimplaget, fordi det er disse cellene som innehar potensialet til å bli hjerteceller. Senere i oppgaven vil vi benytte begrepet mesenchymal stamcelle, og dette er da multipotente stamceller i det mesodermale kimplaget. Multipotent indikerer at cellen kan differensiere til mange ulike vev innen det mesodermale kimplaget (eksempel: fettvev, benvev, brusk, hjertevev og skjelettmuskulatur). Hjerte progenitor cellene er derimot unipotente stamceller med mulighet til å differensiere til kun én vevstype, nemlig hjertevev.

En av de voksne stamcellene som det har blitt forsket mye på er stamceller fra benmarg. Om disse cellene i det hele tatt er ekte stamceller og om de har noen effekt på iskemisk hjertesykdom kommer vi tilbake til senere i oppgaven.

De ulike stamcellene og deres egenskaper, isoleringsteknikker, samt fordeler og ulemper vil bli diskutert i større detalj senere i oppgaven. For å forstå noe av potensialet til cellene, og samtidig kunne lese forskningsartikler med et kritisk blikk, er det viktig å ha en ide om hva som kan være virkningsmekanismen.

1.3 Hva er virkningsmekanismen?

Tidlige studier på stamceller fra benmarg har vist en moderat effekt på venstre ventrikkels ejsjonsfraksjon(2;3). Men hva er det som er virkningsmekanismen? Målet fra starten var jo myogenese, men etter hvert har det blitt stilt spørsmålsteget ved om disse cellene faktisk transdifferensierer til kardiomyocytter(4). Man har som sagt sett en moderat funksjonell effekt, men ikke funnet igjen nok celler til å kunne forklare denne effekten. Det er også vist at der man finner igjen cellene i vevet skyldes dette cellefusjonering og ikke transdifferensiering(5). Samtidig har det vært rapportert at denne effekten starter innen 72 timer, noe man antar er for tidlig dersom effekten skal skyldes myogenese(6). Ved et visuelt stilig forsøk gjort på en 57 år gammel mann med hjerteinfarkt hadde man merket stamcellene med radioaktive isotoper, og kunne dermed følge deres skjebne etter intrakoronar injisering. Dette forsøket viste at de fleste stamcellene endte opp i milten og i urinblæra(7), og altså ikke inne i hjerteveggen slik forskerne ønsker.

Med slike villedende funn var det derfor behov for en alternativ forklaringsmodell, nemlig at det var parakrine faktorer som var forklaringen bak den målte effekten(8). Det er blant annet gjort et forsøk in vivo der man har injisert supernatanten etter sentrifugering (altså ingen celler ble injisert), og sett at dette alene reduserer infarktstørrelsen(6). Noe tilsvarende ble gjort på griser der man intrakoronart injiserte kun faktorer frigjort fra mesenchymale stamceller, og også her oppnådde man bedring av hjertets funksjon(9). Man tenker seg dermed at de parakrine faktorene har en beskyttende virkning på kardiomyocytene som er

utsatt for hypoksi. Innen feltet for mesenchymale stamceller mener man at denne beskyttende effekten skyldes bedre perfusjon av myokard ved at parakrine faktorer frigjort av de mesenchymale stamcellene rekrutterer og aktiverer stamceller fra hjerteveggen og endotelprogenitor celler(10;11). Det finns en meget lang liste over mulige parakrine faktorer som kan spille inn, og det blir for detaljert å gå nærmere inn på disse. Kanskje vil man i fremtiden komme et steg videre innen celleterapi ved å identifisere flere faktorer og forstå deres virkningsmekanismer?

Et siste elegant forsøk som må nevnes her ble gjort på hamstre og publisert i 2009(12). I stedet for å injisere cellene intrakoronart eller direkte i hjerteveggen valgte forskerne å injisere mesenchymale stamceller inn i tverrstripet muskulatur, altså i hamstrenes ekstremiteter. Ved PCR teknikk kunne forskerne vise at de deponerte cellene var innelåst i den tverrstripete muskulaturen, altså at de ikke migrerte ut i sirkulasjonen. Det interessante funnet er at selv dette bedret hjertets funksjon, og forskerne konkluderte med at det måtte foreligge en kryss-kommunikasjon mellom de injiserte mesenchymale stamcellene, benmargen og det skadede hjertet. Dette kalte de for trofiske faktorer, og de mente at noe av forklaringen var at disse trofiske faktorene rekrutterte celler fra benmargen som var med på å bygge opp igjen det skadede hjertet.

2 Pluripotente stamceller

En pluripotent stamcelle har evnen til å danne alle vev i kroppen. Cellene vil i teorien kunne brukes til å reparere eller til og med danne et helt nytt organ. Dette gir store muligheter, men også store utfordringer. Vi vil i teksten som følger se nærmere på embryonale stamceller og induuerte pluripotente stamceller.

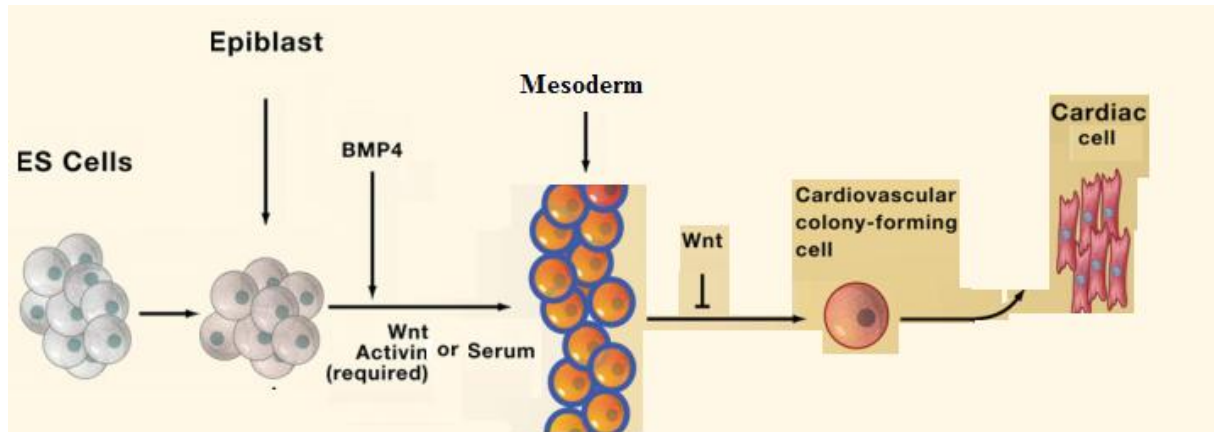
2.1 Embryonale stamceller

2.1.1 Beskrivelse av embryonale stamceller

Embryonale stamceller er totipotente eller pluripotente stamceller og kan isoleres fra fostre, aborterte fostre eller ved in vitro fertilisering. De kan i prinsippet danne alle vev i kroppen, samt at de totipotente cellene kan også danne et nytt individ. Det er mange fordeler og ulemper knyttet til embryonale stamceller. Fordelene går i retning av å kurere eller bedre mange sykdommer av ulik patologi. I forhold til vår oppgave vil disse cellene kunne regenerere et nytt hjerte, eller reparere et skadet hjerte.

2.1.2 Isolering og differensiering

For å isolere de pluripotente embryonale stamcellene tar man celler fra den indre massen av en 5-6 dager gammel blastocyst av et humant embryo. Utfordringene videre er hvordan å styre deres differensiering. Siden cellene kan bli til alle vev i kroppen er det viktig å være sikker på at cellene en har i skålen differensierer til ønsket celletype. Hvis denne kontrollen er for dårlig risikerer man dannelse av uønsket vev eller enda verre teratomer. For å illustrere hvordan differensieringen kan foregå har vi modifisert og hentet en figur fra "Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development" av Murry,C.E.; Keller,G(13). Denne figuren viser hvordan en kan differensiere embryonale stamceller i kultur hos mus. Her gis det en god oversikt over de ulike differensieringsveiene og hvordan vi kan få dannet hjerteprogenitorceller. Beskrivelse av figuren kommer under.



Første steg i å kontrollere de embryonale stamcellene er å få dem til å danne riktig kimlag. Dannelsen av kimlagene er regnet som en irreversibel differensieringsprosess. For hjertet er det ønskelig å danne det mesodermale kimlaget. Embryonale stamceller stimuleres med signalstoffene wnt og activin A, dette gjør at reseptorer på overflaten av cellen induserer intracellulære kaskader, som starter differensiering mot det mesodermale kimlaget. I tillegg trenger en stimulering med signalstoffet bone morphogenetic protein 4, også kalt BMP4, som er et protein som også bidrar i regulering og differensiering av cellen. Etter at mesoderm er dannet vil en fortsatt stimulering med signalstoffet wnt hemme utviklingen av hjerteceller og gi opphav til andre mesodermale strukturer. Derfor må wnt signalet nå hemmes(14;15). Denne prosessen gir ikke bare hjerteprogenitor celler, men ved hjelp av sentrifugering kan man konsentrere opp disse cellene og bli kvitt andre typer celler.

2.1.3 Sikkerhet og utfordringer

Det er flere utfordringer knyttet til embryonale stamceller. Ved hjertepatologi er det enkelte individet avhengig av eksterne embryonale stamceller. Disse kan hentes fra allogene kilder, noe som fører med seg risiko for immunreaksjoner. Det er observert at stamceller uttrykker lav mengde av HLA-2 molekyler, men betennelse eller skade rundt stamcellene vil kunne få cellene til å oppregulere uttrykket av HLA-2 molekyler. Derfor vil behandling med embryonale stamceller kreve at en må benytte cytostatika for å unngå immunreaksjoner. I fremtiden kan en tenke seg at det opprettes biobanker med embryonale stamceller for alle HLA typer, men kostnaden for dette vil være høy og ikke realistisk med det første. For fremtidige generasjoner kunne en tenke seg at man isolerte embryonale stamceller fra alle

fødte individer og fryser dem ned for å kunne ha en biobank med egne embryonale stamceller. På denne måten ville en ha egne stamceller til disposisjon ved patologiske tilstander og dermed unngå immunreaksjoner.

Etter å ha høstet humane embryonale stamceller er det første problemet man støter på at disse cellene ikke spontant differensierer til nok kardiomyocytter, og at de blir mindre villige til å dele seg når cellene blir mer differensierte. Dette gjelder også for induerte pluripotente stamceller. Derfor har forskningen eksplodert innen dette feltet, og i dag finns det en rekke teknikker for å styre differensieringen i ønsket retning. Ved å tilføre activin A og BMP-4 til de pluripotente cellene oppnår man at 30-60 % av cellene differensierer til kardiomyocytter(16). For en full oversikt henvises leseren til en oversiktsartikkel av Wong et al. fra 2010(17). Et annet problem ved humane embryonale stamceller, og også ved induerte pluripotente stamceller, er at de dannede kardiomyocytene viser umodne trekk både strukturelt og funksjonelt(18). Det vil si at de altså ikke likner helt på de modne kardiomyocytene vi finner i et voksent hjerte. Det er også uklart om de embryonale stamcellene vil integreres med hjertevevet og danne en funksjonell enhet.

Bruk av stamceller gir også en fare for utvikling av teratomer eller mer differensierte tumores. Disse farene gjør at en må ha gode metoder for å identifisere de riktige cellene og sikre at man sitter med én homogen cellemasse. Når det gjelder de udifferensierte humane og murine embryonale stamcellene er ikke disse så attraktive å benytte fordi de har vist dårlig differensieringskontroll, og gitt teratomer når de har blitt injisert i immunsupprimerte mus/rotter(19;20). Derimot har man mer lovende resultater ved injisering av kardiomyocytter derivert fra humane embryonale stamceller. Her har man altså oppnådd noe bedre kontroll ved først å differensiere cellene i en kardiomyogen retning før man injiserer dem til rotter(21).

Noe av det nyeste innen dette feltet er at man har klart å differensiere humane embryonale stamceller til en mesenchymal stamcelle. Resultater publisert i januar 2012 viser at ved sammenlikning har disse mesenchymale stamcellene like lovende resultater som de voksne mesenchymale stamcellene(22).

2.1.4 Etske overveielser og lovverk

Bruk av embryonale stamceller er strengt regulert i lovverket og er etisk utfordrende. Før 2007 var forskning på embryonale stamceller i Norge forbudt, men ved lov 15. juni 2007 nr. 31 ble det gjort endringer i bioteknologiloven som blant annet innebærer at forskning på embryonale stamceller tillates på bestemte vilkår(23). Allikevel er forskningsmulighetene begrenset med tanke på isolering og kliniske forsøk. I bioteknologiloven heter det:

”Forskning som nevnt i § 3-1 er kun tillatt på befruktete egg som har blitt overtallige etter befruktning utenfor kroppen med sikte på fertilitetsbehandling eller preimplantasjonsdiagnostikk. Det er ikke tillatt å befrukte egg for forskningsformål alene”(24).

I bioteknologilovens § 3-3 heter det: ”Forskning, herunder klinisk forskning, som medfører bruk av overtallige befruktete egg og celler som stammer fra overtallige befruktete egg, skal godkjennes av regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk”(24).

”Behandlingsformer som forutsetter bruk av celler fra overtallige befruktete egg, skal godkjennes av departementet. Departementet kan i godkjenningsvedtaket stille nærmere vilkår. Før departementet avgjør om godkjenning, skal søknaden forelegges Bioteknologinemnda”(24).

Embryonale stamceller er så udifferensierte at de i prinsippet kan danne grunnlaget for et nytt individ. Dette reiser etiske spørsmål om det er riktig å ta liv for å redde liv. Dette er en debatt som i stor grad har formet forskningen på embryonale stamceller. Vi innser at å drøfte de etiske problemstillingene rundt de embryonale stamcellene kunne vært en prosjektoppgave i seg selv. Derfor vil vi heller referere til forskningsetisk bibliotek og anbefale en tekst skrevet av Bjørn Solberg om ”Embryo, stamcelle og foster”(25).

2.2 Induserte pluripotente stamceller

2.2.1 Beskrivelse av induserte pluripotente stamceller

Induserte pluripotente stamceller har mange av de samme egenskapene som embryonale stamceller. Forskerne har store forhåpninger til disse cellene, og mener de kan gi et gjennombrudd i stamcelleforskningen(26). De kan isoleres fra pasienten selv, og er lett tilgjengelige. I tillegg unngår man mange etiske problemstillinger, som oppstår når man bruker embryonale stamceller.

2.2.2 Isolering og differensiering

Induserte pluripotente stamceller kan dannes ved at fibroblaster reprogrammeres ved hjelp av retrovirus. Retroviruset er modifisert på fire områder, og induserer transkripsjonsfaktorer som Oct-3/4 og Sox2. Disse transkripsjonsfaktorene er viktige for celledeling og selvfornyelse. Retroviruset øker aktiviteten til c-myc, et viktig regulatorgen for celledeling. Tilslutt påvirker det også en transkripsjonsaktivator som heter Klf4(27). Når en har fått dannet induserte pluripotente stamceller likner cellene på embryonale stamceller når det gjelder genuttrykk, morfologi, metyleringsmønster og evnen til å danne teratomer(28). I februar 2009 ble det publisert at de induserte pluripotente stamcellene kunne differensiere til kardiomyocytter(29). De dannede kardiomyocytene har både i dette forsøket og senere(30) blitt sammenliknet med kardiomyocytter fra embryonale stamceller, og forskerne har konkludert med at disse cellene er svært like, selv om de som nevnt har umodne trekk både strukturelt og funksjonelt(18). Prosessen ved å danne hjerteceller fra induserte pluripotente stamceller blir hovedsakelig mye av det samme som i beskrivelsen av embryonale stamceller(31). Vi henviser derfor til avsnittet over om embryonale stamceller.

2.2.3 Fordeler, ulemper og sikkerhet

Fordelene ved induserte pluripotente stamceller er mange, og det aller lekreste er selvfølgelig at en pluripotent celle kan høstes fra individet selv slik at man samtidig unngår

immunreaksjoner. Forskerne håper at den induerte pluripotente stamcellen skal være identisk med den embryonale stamcellen, og så langt ser dette ut til å være tilfellet. Derfor er det også slik at mange av fordelene og ulempene som gjelder for embryonale stamceller, også gjelder for induerte pluripotente stamceller. Sistnevnte celletype har et problem i forhold til reprogrammeringen ved at c-myc er et onkogen, og er derfor risikabelt med tanke på kreft. Det har vært ønskelig å oppnå pluripotente celler uten å benytte dette onkogenet. I 2010 ble det vist at man kan oppnå fullverdige kardiomyocytter uten å benytte c-myc(32). Riktignok ble denne celleveksten kun fulgt i fem dager, men resultatet er likevel lovende for fremtiden. Ulempen med disse alternative metodene er at det blir færre induerte pluripotente stamceller, fordi metoden er mindre effektiv(31). En gruppe forskere har lagd induerte pluripotente stamceller hos mus ved hjelp av l-myc, istedenfor c-myc. Dette skal ha økt utbyttet, men skal ikke ha gitt forhøyet kreftrisiko(33). I fremtiden håper en at sikkerheten kan bedres slik at en kan få utnyttet cellenes potensiale i behandlingsøyemed.

I forhold til sikkerheten er det et forhold til som bør belyses. Cellene har blitt tilført retrovirus uten at man har kontroll på hvor de virale sekvensene blir integrert i genomet. Dette gjør at enkelte genområder kan bli oppregulert eller nedregulert, noe som igjen kan øke risikoen for kreft(34). Ved klinisk bruk må en ha gode rutiner for å skille ut celler som kan være ustabile og kanskje kan vi klare å produsere induerte pluripotente stamceller uten integrering av retrovirus. Dette ville vært gunstig i forhold til pasientsikkerhet.

3 Voksne stamceller

Voksne stamceller finnes naturlig i kroppen og bidrar med å fornye organene. De voksne stamcellene har allerede gjennomgått en del differensiering, men allikevel innehar de egenskapene til en stamcelle: Evnen til å fornye seg selv, men også differensiere til mer modne celler. De kan isoleres fra ulike vev i kroppen, og man unngår dermed immunreaksjoner ved å hente cellene fra pasienten selv.

For å prøve å gjøre området om voksne stamceller litt mer oversiktlig har vi valgt å dele dem inn i forskjellige grupper. De gruppene vi har funnet aktuelle i denne oppgaven er mononukleære stamceller fra benmarg, mesenchymale stamceller, hjerteprogenitor celler og stamceller fra tverrstripet muskulatur. Vi vil beskrive hvordan de kan isoleres, men dette varierer mellom de ulike forskningsgruppene.

3.1 Stamceller fra benmarg

3.1.1 Beskrivelse av stamceller fra benmarg

Den vanligste metoden for å isolere stamceller til forskning på iskemisk hjertesykdom har vært å hente stamceller fra nettopp benmargen. Cellene er en heterogen gruppe med stamceller og mononukleære hematopoetiske celler.

3.1.2 Isolering av celler

Stamceller fra benmarg skaffes ved aspirasjon fra hoftekammen eller sternum. Andre rørknokler kan også benyttes, men mengden benmarg her vil variere. Benmargsaspiratet må renses for erytrocytter og leukocytter før stamcellene kan isoleres. Isoleringen av stamcellene gjøres ved hjelp av sentrifugering hvor det dannes en mononukleær sone som inneholder stamceller, men også andre umodne hematopoetiske celler(35). Når de i mange kliniske

forsøk refererer til ufraksjonert benmarg, refererer de til celler hentet fra den mononukleære sonen.

3.1.3 Fordeler, ulemper og sikkerhet

Fordelene med stamceller fra benmarg er at det er relativt enkelt å få frivillige til å donere benmarg til forskning. Det er også relativt mange stamceller per milliliter med benmarg. Benmargen kan hentes fra pasienten selv og en unngår immunologiske reaksjoner. Prosedyren tar relativt kort tid og trenger ingen dyrkning, hvilket gjør den egnet som en del av akuttbehandling. Den teoretiske virkningen av cellene er litt usikker. De kan ha effekt gjennom myogenese, på celleoverlevelse eller fremme angiogenese. Senere i oppgaven vil vi komme tilbake til hva som er gjort av kliniske forsøk på disse cellene.

3.2 Mesenchymale stamceller

3.2.1 Beskrivelse av mesenchymale stamceller

Mesenchymale stamceller stammer fra det mesodermale kimlaget. En voksen mesenchymal stamcelle har gjennomgått irreversibel differensiering, som vil hindre den fra å danne vev eller strukturer fra de andre kimlagene. Til sammen danner de mesenchymale stamcellene en heterogen gruppe. De kan ekstraheres fra en rekke ulike vev. I dag har en isolert mesenchymale stamceller fra lymfoide organer, som thymus og milt, subkutant fettvev, periodontalt ligament, endometrium, menstruasjonsblod, benmarg, perifert blod, navlestrengsblod, Wharton's jelly og vev fra foster(36). Man har ikke kommet frem til en unik fellesmarkør for disse stamcellene, og til nå har man støttet seg på flere ulike markører. Ulempen med dette er at disse markørene varierer også i forhold til vevet cellene er isolert ifra. Dette har gjort at det har vært problematisk å sammenlikne litteratur og en har hatt behov for en felles definisjon på hva som er en stamcelle. Først i 2006 kom The International Society for Cellular Therapy, ISCT, opp med tre definisjonskriterier på mesenchymale stamceller. Cellene må adherere til plastikk i standard kulturer, og de må uttrykke/ikke uttrykke gitte overflateantigener. De skal være positive for overflatemarkørene CD105, CD73

og CD90 og være negative for CD45, CD34, CD14 eller CD11b, CD79 α eller CD19 og HLA-DR. Tilslutt må cellene kunne demonstrere differensiering av tre forskjellige mesenchymale vevsgrener. Da gjennom in vitro differensiering til osteoblaster, adipocytter og chondroblaster(37).

3.2.2 Isolering av mesenchymale stamceller

For å illustrere hvordan en kan isolere og dyrke frem mesenchymale stamceller har vi valgt å beskrive måten mesenchymale stamceller isoleres fra benmarg. Dette vil være en fortsettelse fra der isoleringen av mononukleære celler fra benmarg stopper. Cellene fra den ufraksjonerte benmargen er en heterogen cellegruppe. Utfordringen på dette tidspunktet er å skille den mesenchymale stamcellen fra andre umodne hematopoetiske celler. For å gjøre dette og samtidig få en mer homogen cellekultur må cellene dyrkes og selekteres. Cellene blir dyrket på et vekstmedium i en plastflaske. Etter 72 timer vaskes flasken med fosfatbufret saltvann, forkortet PBS, og blir deretter tilsatt et annet vekstmedium. Etter 7-10 dager vil en kunne se små grupper med adherente celler nederst i plastflasken. Av disse koloniene er det fortsatt stor heterogenisitet og en regner med at bare 0,01 % av de adhererte cellene er ekte mesenchymale stamceller(38). Derfor må ytterligere 2-3 uker med vekst til for å oppnå relativt homogene stamcelle kulturer(36), før man tilslutt identifiserer hvilke cellegrupper som innehar de definerte egenskapene for en mesenchymal stamcelle. Identifiseringen gjøres ved hjelp av overflatemolekyler. Stamcellene kan i starten uttrykke overflatemolekyler som gjør at de ikke er i samsvar med The International Society for Cellular Therapy sin definisjon av en mesenchymal stamcelle. Ved videre vekst ser en at disse overflatemolekylene blir nedregulert og at cellen etter hvert kommer inn under definisjonen.

Vi har nå beskrevet hvordan man isolerer mesenchymale stamceller fra benmarg. I teorien vil alle vev derivert fra mesoderm kunne gi opphav til mesenchymale stamceller. Dette gjør at det er flere teoretiske mulige kilder for mesenchymale stamceller. Noen av disse kildene er allerede beskrevet i innledningen. Selv om kilden for celler kan være ulikt, er prinsippene for isolering likt: En sikrer en bit av vevet en har tilgjengelig, før bindevevet blir brutt ned ved hjelp av enzymer, for så å lysere de røde blodcellene. Deretter vil en filtrere prøven igjennom

et filter for å skille ut celler og unngå å få med vevsbiter. Cellene blir deretter dyrket i plastflaske etter prinsippet beskrevet under benmarg. Når en dyrker cellene vil tettheten variere med vevet de er isolert fra(36). I tillegg ser man i starten at overflatemolekylene er påvirket av vevet de er hentet ifra, blant annet kan de i tidlige stadier uttrykke overflatemarkør CD34 som gjør at de ikke kommer inn under definisjonen til The International Society for Cellular Therapy. Disse overflatemolekylene blir etter hvert nedregulert og cellen kommer etter noe tid inn under definisjonen.

3.2.3 Differensiering av mesenchymale stamceller

For å danne hjerteprogenitor celler av mesenchymale stamceller kan en utsette kulturen i 24 timer med eksponering for 5-azacytidine, som er et uspesifikt demetylerende stoff. To uker etter vil man se den første indikasjon på at en har hjerteceller. Dette kan bekreftes med visualiseringsteknikker av sarkomerene. Det kan gjøres ved immunhistokjemi og PCR. En analyserer etter transkripsjonsfaktorer som Nkx2,5, GATA-4, MEF-2 eller hjertemuskelmarkører som a-sarcomeric, actinin, a-sarcomeric actin og b-myosin tungkjede(39). Disse faktorene er vanligvis uttrykket av hjertemuskelceller. Det finnes flere måter og få de mesenchymale stamcellene til å bli hjertestamceller. Et alternativ til eksponeringsstoffer er å la de mesenchymale stamcellene vokse sammen med andre voksne hjerteceller. Da vil de i økende grad konverteres til hjerteceller(40). Mesenchymale stamceller vil også spontant uten noen påvirkning utenifra eller i nærmiljøet danne hjerteceller. Dette er mer tilfeldig og skjer i liten grad(41).

3.2.4 Fordeler, ulemper og sikkerhet

Det er flere mulige teoretiske effekter av mesenchymale stamceller. De kan hjelpe til med myogenese, angiogenese og de har også vist immunmodulerende effekter(42;43). Cellene har som skissert stort potensiale og bruksområde. Mesenchymale stamceller kan brukes direkte i forbindelse med iskemisk hjertesykdom eller differensieres på forhånd til hjerteprogenitor celler eller endotelprogenitor celler.

Allikevel er det en del utfordringer. Utfordringene er knyttet opp mot differensiering, hindre tumor dannelse og at riktig vev dannes på riktig sted. I nettopp definisjonen av mesenchymale stamceller fra 2006 står det at cellene skal vise egenskaper til å kunne differensiere til osteoblaster, adipocytter og chondrocytter. Derfor er utfordringen å styre cellenes differensiering, og det er ikke nok å satse på parakrine effekter fra det lokale vevet. I en studie har man sprøytet inn mesenchymale stamceller i arrområdet på mus med hjerteinfarkt. De fant etterpå kalknedslag og bendannelse i arrområdet(44). En annen studie som gav mesenchymale stamceller til grisehjerter ble komplisert av en benign hjertetumor, hvor histologi viste differensiert mesenchymalt vev uten kalknedslag(45). Samtidig hvis en prøver å differensiere mesenchymale stamceller in vitro et det ikke sikkert at eksponeringsproduktene i seg selv er sikre. Det må derfor jobbes med sikkerheten i forhold til disse cellene i fremtiden.

3.3 Stamceller fra tverrstripet muskulatur

3.3.1 Beskrivelse av stamceller fra tverrstripet muskulatur

Stamceller fra tverrstripet muskulatur, også kalt skjelettmyoblaster, er en umoden skjelettmuskelcelle med egenskaper til å dele seg og gi opphav til en ny stamcelle, men også differensiere til muskelvev. Cellene finnes i tverrstripet muskulatur i hele kroppen.

3.3.2 Isolering av celler

Stamceller fra tverrstripet muskulatur er relativt lett tilgjengelig, og kan skaffes for eksempel ved en muskelbiopsi. Deretter må cellene isoleres og skilles fra de øvrige muskelcellene. Stamcellene i tverrstripet muskulatur finner en mellom lamina propria og sarkomerene, her er 2-5 % av kjernene stamceller. Myoblastene skilles fra myocytterne ved bruk av ulike overflatemarkører(46). Etter å ha isolert stamcellene, dyrkes de til passende mengde for kliniske forsøk.

3.3.3 Fordeler, ulemper og sikkerhet

Stamceller fra tverrstripet muskulatur kan bidra med økt kontraktilitet og nettopp dette vil være gunstig i forhold til iskemisk hjertesykdom. Økt kontraktilitet vil kunne redusere hypertrofien, som igjen kan gi mindre symptomer for pasienten. Andre fordeler med cellene er at de kan høstes fra pasienten selv, og de er relativt enkle å dyrke in vitro. De er allerede differensiert til muskulaturlinjen slik at sjansen for tumor er mindre. Stamceller fra tverrstripet muskulatur tåler også iskemi, noe som er viktig for å kunne fungere i et iskemisk hjerte(47).

Selv om det er mange positive og gunstige effekter med disse stamcellene, er det allikevel en del ulemper og sikkerhetsmessige utfordringer. Det er fundamentale forskjeller mellom en tverrstripet muskelcelle og en hjertemuskelcelle. Stamcellene fra tverrstripet muskulatur viser etter 8-16 uker uttrykk av connexin-43 som er viktig for interkommunikasjon mellom cellene(48). Allikevel har studier vist at disse stamcellene ikke kobles fysisk til hjertecellene, og at det vil være varierende strømlledning gjennom stamcellene. Dette vil gi økt sjanse for at dødelig arytmi kan oppstå i kjølevannet av behandlingen(49). Sikkerheten ved bruken av disse cellene er derfor et viktig usikkerhetsmoment. For å unngå dødelige arytmiepisoder har en i kliniske forsøk benyttet seg av hjertestarter for å kunne sjokke dødelig arytmi og dermed bedre sikkerheten(50). De kliniske forsøkene kommer vi tilbake til senere i oppgaven.

3.4 Hjerte progenitor celler

3.4.1 Beskrivelse av hjerte progenitor celler

Hjerte progenitor celler er spennende celler innen stamcelleforskningen. Dette er voksne autologe celler som man finner i pasientens hjertevegg, og som har anledning til å utvikle seg til alle de nødvendige typene av hjertevev.

3.4.2 Isolering av celler

Disse cellene kan skaffes ved en biopsi av hjertet. Dette har vært gjort med kateterteknikk, hvor en har hentet stamcellene fra venstre ventrikkel(51). Andre metoder som har vært benyttet er direkte biopsi ved operasjon. Stamceller i hjertet er en heterogen gruppe og det er kanskje derfor bedre å kalle denne gruppen for stamceller fra hjertet. Av cellene som isoleres fra mus regner en med at ca 1-2 % av cellene fra hjertet har stamcelleegenskaper(52). Metoden en har brukt for å identifisere disse cellene er ulike overflateantigener og evnen til å binde spesifikke fargestoffer (53). En subpopulasjon av disse cellene har endotelegenskaper, vist ved at de uttrykker overflatemarkøren CD31. Noen studier har derfor fokusert på om stamcellene fra hjertet er CD31 positive eller negative. Én studie viste at de cellene som var negative for overflatemarkøren CD31, omtrent 10 % av stamcellene, hadde egenskaper til å kunne lage hjertevev. Derimot de som var positive for CD31 kunne ikke differensiere til hjertevev(54). Andre overflatemarkører og metoder har også vært benyttet og har hittil bare vist at cellene viser stor heterogenisitet. Det er dermed usikkert om en har identifisert hjerte progenitor cellen ennå, og cellene bør derfor beskrives som stamceller fra hjertet(55).

3.4.3 Fordeler, ulemper og sikkerhet

De teoretiske fordelene med stamceller fra hjerteveggen er mye av det samme som de andre stamcellene. En kan tenke seg at de vil kunne bidra i myogenese, i angiogenese og hindre celledød i et iskemisk hjerte. De vil kunne isoleres fra pasienten selv og unngår immunreaksjoner. Forskere håper også at cellene skal kunne bidra til å øke overlevelsen på allerede transplanterte hjarter ved å sammensmelte med donorhjertet. Dette kan gi mindre immunreaksjoner mot donorhjertet og dermed øke overlevelsen ved transplantasjon(56). En annen fordel med disse cellene er at de ikke er tilført retrovirus, eller andre stoffer som potensielt kan danne grunnlag for kreftceller.

Det er imidlertid også store ulemper med stamceller fra hjerteveggen. De er vanskelige å isolere, og har blitt isolert av enkelte forskningsgrupper med mye ressurser. Andre forskningsgrupper har store problemer med å isolere disse cellene. De har vært vanskelige å ekspandere in vitro. Det kan ha noe med differensieringen stamcellene allerede har

gjennomgått, noe som gjør cellene mindre villige til å dele seg. Problematisk ekspansjon av cellene gjør at det er vanskelig å dyrke frem mange nok celler til at det teoretisk kunne vært nyttig innen behandlingen av iskemisk hjertesykdom. Stamcellene fra hjerteveggen danner også en heterogen gruppe. Vi vet ikke om de ulike stamcelletypene er forskjellige forstadier av myokard, ledningssystemet eller andre deler i hjertet. Dette krever mer forskning for å øke sikkerheten. I verste fall kan en tenke seg teoretisk at en bruker en celle som er forstadiet til ledningssystemet. Ved ukontrollert bruk av en slik celle vil man kunne skape overledninger og kilder til arytmier. Metoden for å hente ut stamceller fra en hjertebiopsi er relativt invasiv. En vet heller ikke om celler som blir administrert til hjertet, vil ekspandere på stedet og integreres med det syke hjertet.

4 Hvilke utfordringer står vi ovenfor?

Det er flere forskjellige aspekter ved stamcellebehandling som er interessante og diskutere, og nødvendig å forstå før vi ser på resultater fra de studiene som er gjennomført. I dag er det stor debatt rundt virkningsmekanismen bak de effektene som er funnet. Vi skal se nærmere på om man kan si noe om hvilken celletype som er optimal, hvordan cellene bør injiseres, når bør de injiseres og hvor mange celler bør injiseres? Vil det være mulig å preparere cellene i forkant for å oppnå bedre effekt, og hvordan skal man måle effekt? Alle disse spørsmålene er svært omfattende og vil bli besvart på enklest mulig vis.

4.1 Hvilken celletype er optimal?

Per oktober 2010 er det kun to celletyper som har fullført fase 3 innen kliniske forsøk, nemlig stamceller fra tverrstripet muskulatur og stamceller fra benmarg(57) (her menes de mononukleære stamcellene fra benmarg, siden man i litteraturen ikke begynte å skille mellom de mononukleære- og de mesenchymale stamcellene fra benmarg før etter 2006). Stamcellene fra tverrstripet muskulatur fikk tidlig et stempel som mulig syndebukk for hjertearytmiene som man observerte ved kliniske forsøk. Nådestøtet for disse stamcellene kom i 2008 da MAGIC-studien viste at det var en dobbelt risiko for hjertearytmier sammenliknet med placebogruppen(58). Dette hadde forskerne tatt høyde for, så samtlige pasienter fikk operert inn en defibrillator før forsøket startet. Selv om forfatterne konkluderte med at denne forskjellen ikke var signifikant, har interessen for stamceller fra tverrstripet muskulatur vært dalende.

Stamcellene fra benmarg har som sagt vist noe effekt, men forklaringen er i dag rettet mot parakrine faktorer, altså ingen transdifferensiering, og dermed heller ikke noe fokus på myogenese. Celler som derimot har et større potensiale innen myogenese er embryonale stamceller og induserte pluripotente stamceller. Men også her har vi noen utfordringer. Håpet er jo at disse cellene skal være pluripotente, men med god differensieringskontroll. Cao. et al. publiserte i 2006 at de embryonale stamcellene dannet teratomer (celler fra alle de tre kimplagene) både i og utenfor hjertet(20). Det sier seg selv at ingen pasienter ønsker å få

knokler og hår i hjertet. Et annet problem er graftfunksjonen, fordi man er ikke garantert at de kardiomyocyttiliknende cellene som man dyrker frem innehar den samme kontraksjonskraften som modne kardiomyocytter. Det siste problemet er produksjonskapasiteten: Når man dyrker frem cellene er man, ved de metoder som er utviklet til nå, avhengig av at næringsstoffene som er tilsatt kulturen diffunderer inn i cellen. Men cellene dør når de blir så store at diffusjon av næring ikke er nok. Altså går det ikke an å utelukkende fokusere på myogenese og glemme angiogenesen.

En celletype som har vist lovende resultater innen angiogenese er endotel progenitor celler. ACT34-CMI studien viste at hos pasienter med angina hvor konvensjonell medikamentell terapi ikke hadde ført frem, og som fikk injisert stamceller fra endotel intramyokardialt, oppnådde mindre anginaanfall og bedret arbeidskapasitet(59). I fremtiden kan det kanskje være en mulighet å kombinere ulike celletyper, si induerte pluripotente stamceller og endotel progenitor celler, hvorpå man tenker seg at man ivaretar både myogenese og angiogenese.

Når det gjelder stamceller fra hjerteveggen har man lurt på om disse faktisk innehar regenererende egenskaper. For å komme nærmere et svar kappet man av en liten skalp nederst på rottehjerter like etter fødsel, og fulgte med på om regenerering fant sted. Det viste seg at dersom skalpen ble kuttet av innen ett døgn så ble hjertet regenerert, men allerede innen syv døgn var denne egenskapen borte, hvorpå hjertene ikke regenererte(60). Det er riktignok usikkert hvilke kliniske perspektiver man kan trekke fra forsøk på neonatale dyr.

4.2 Hva med dose-respons?

Ved et moderat stort hjerteinfarkt mister man 10 milliarder kardiomyocytter. I de forsøkene som er gjort med mononukleære stamceller fra benmarg er det stort sett injisert mellom 50-300 millioner celler. Når vi samtidig vet at kun under 2 % av mononukleære celler fra benmarg uttrykker stamcellemarkører kan man jo lure på om vi injiserer nok celler? Finns det et tak på hvor mange celler man skal injisere, eller får man bedre effekt uansett hvor mange man injiserer? Til nå tyder forskningen på mononukleære stamceller fra benmarg at jo flere

celler man injiserer, jo bedre effekt(61). Med mesenchymale stamceller derimot tyder forskningen på at det finns et tak, altså at et lavt/moderat antall stamceller gir best resultat. Det er blitt spekulert i om den lave dosen i dette forsøket ble tolerert bedre av mottagerens immunsystem, og at dette kan forklare den bedre effekten enn for høye doser mesenchymale stamceller(43). Men kan disse erfaringene uten videre overføres til den kommende forskningen på pluripotente stamceller?

4.3 Hvordan administrere cellene?

Det er egentlig kun fantasien som setter begrensninger på hvor mange forskjellige måter det går an å administrere stamcellene. Vi starter derfor med å belyse fordeler og ulemper ved de tre vanligste administrasjonsformene: Intrakoronart (sprøytes inn i en koronararterie), transendokardielt (ved hjelp av et kateter under PCI-teknikk) og transepikardialt (injeksjon direkte gjennom hjerteveggen under samtidig koronar-bypass-operasjon).

Intrakoronar injisering ble benyttet i de tidligste forsøkene, der man etter et akutt hjerteinfarkt hadde oppnådd revaskularisering. Den er tryggere og mindre invasiv, men ved denne metoden har man ikke god kontroll på hvor cellene blir av. De kan tenkes å skylles av gårde i blodbanen til friske områder, til arrvev eller faktisk rett gjennom og ut i venene. Sistnevnte ble som sagt bevist av Penicka et al. i 2005(7). Denne metoden har også en begrensning med tanke på cellestørrelse, fordi hvis cellene er for store møter de for mye motstand i de små kapillærene og reduserer flow til et område som sårt trenger all den næringen den kan få. Dermed ender vi med at denne metoden egner seg best ved injisering av et stort antall små celler, slik som mononukleære stamceller fra benmarg, embryonale stamceller og små stamceller fra hjerteveggen(62).

Transendokardiell injeksjon krever en øvet operatør og er et kostbart inngrep. Risikoen for hjertetamponade er alltid til stede ettersom man stikker blindt i et arrområde. Man risikerer at nålen går for dypt, og dermed penetrerer gjennom hele hjerteveggen. Men denne metoden egner seg for større celler, slik som stamceller fra tverrstripet muskulatur og mesenchymale

stamceller, og man trenger ikke åpen hjertekirurgi slik man gjør ved transepikardiell injeksjon.

Ved transepikardiell injeksjon har man en klar fordel sammenliknet med intrakoronar injeksjon, ettersom man har bedre kontroll på hvor cellene blir av. Men studier har også her vist at det er kun få celler som faktisk blir værende i hjerteveggen, så lavt som 10-15 % (63;64). En annen utfordring er at man kun har få studier der man har sammenliknet med en placebogruppe, noe som er viktig ettersom en koronar bypass-operasjon i seg selv vil kunne forbedre venstre ventrikkelfunksjon med 3-4 % (65). Likevel er transepikardiell injeksjon sammen med koronar-bypass-operasjon ofte ansett som gullstandarden innen administrasjonsform(62).

Andre mulige administreringsformer er retrograd administrering (går inn via venene til hjertet, blåser opp et kateter i sinus coronarius, og injiserer cellene inn bakveien gjennom venesystemet). Man kan også benytte seg av en vanlig intravenøs tilgang, men et dyreforsøk viste at de mesenchymale stamcellene da ble sittende fast i lungene(66), mens et annet forsøk på rotter viste at intravenøs injisering likevel bedret hjertets funksjon(67).

Tilslutt vil vi igjen trekke frem forsøket på hamstre fra 2009 der de mesenchymale stamcellene ble injisert til tverrstripet muskulatur(12), fordi dette forsøket åpner opp for muligheten for ikke-invasiv terapi. Tenk om man i fremtiden kan tilby en behandling som kun innebærer et nålestikk i overarmen. Det vil jo være like enkelt som en standard vaksine. Det skal riktignok påpekes at dette hamster-forsøket er litt på siden av vår oppgave ettersom disse hjertene hadde dilaterende kardiomyopati, og ikke iskemisk hjertesykdom, men det er likevel en besnærende tanke å deponere cellene vekk fra den hissige inflammasjonen.

4.4 Når skal man injisere cellene etter et akutt hjerteinfarkt?

Når cellene injiseres like etter et hjerteinfarkt tenker man seg at det er svært ugjestmilde omgivelser, med en høy grad av betennelse til stede. For å få optimal effekt, kan det tenkes at det hele handler om timing. Dyrestudier har vist at dersom man injiserer cellene innen 1-3 dager etter infarkt oppnår man lavere overlevelse, og at den optimale timingen er én uke etter infarkt(68). Men hva med hos mennesker? Vi skal senere se på en metaanalyse av mononukleære stamceller fra benmarg(3), og her varierer oppstarttidspunktet fra ett til ni døgn etter infarkt. Forfatterne konkluderte med at de ikke kunne si noe nærmere om hvilket tidspunkt som var best egnet. Nok en gang kan man stille spørsmålsteget ved om disse erfaringene uten videre kan overføres til kommende forskning på induerte pluripotente stamceller og embryonale stamceller.

Hva om man venter til den akutte inflammasjonen er dempet, og injiserer cellene i god tid etter dette? Problemet er at da har arrdannelsen allerede funnet sted, og man anser det som en vanskeligere oppgave å tilhele et arrdannet hjerte. Samtidig er det også vist at ved kronisk hjertesvikt etter et infarkt foreligger det en viss grad av betennelse, selv om den er noe mer dempet enn like etter et akutt hjerteinfarkt(69).

4.5 Hvordan preparere cellene i forkant?

Det er flere forskere som har undersøkt om det er mulig å modifisere cellene før de injiseres for på den måten å oppnå bedre effekt. En type modifisering kalles for prekondisjonering der man lar cellene vokse sammen med spesifikke vekstfaktorer, slik som insulin-like growth factor-I (IGF-1) og fibroblast growth factor-2 (FGF-2), i håp om at dette bedrer blant annet overlevelsen(10). Dette refereres til i litteraturen som ”pro-survival factors”, eller styrkedrikk på godt norsk.

Man kan også forsøke å stimulere til økt transkripsjon av visse gener, som dermed medfører økt produksjon av ønskede proteiner. Også her er målet at disse proteinene skal bedre cellenes overlevelse og evne til transdifferensiering. Disse cellene får gjerne egne navn, i tråd med hvilket gen som er overtranskribert, slik som for eksempel Akt-mesenchymale stamceller der genet Akt hører inn under gruppen av anti-apoptotiske signalveier(70).

En annen mulighet som overlapper litt i forhold til administrasjonsmåte er at cellene kan tenkes og bakes inn i en optimal matrix, som deretter injiseres i hjerteveggen. Ved et forsøk der humane stamceller fra hjerteveggen ble injisert i lårmuskulaturen til rotter viste dette å øke antallet celler som slår seg ned og blir værende i skjelettmuskulaturen(71).

4.6 Hvordan måle effekt?

Det finnes flere forskjellige måter å måle effekt i humane studier. Man kan ta utgangspunkt i de rent myke effektene, som venstre ventrikkels ejsjonsfraksjon eller veggfortykkelse målt ved ekkokardiografi. Eller man kan rette seg mot å måle effekter som har direkte innvirkning på pasientens hverdag: Hyppigheten av anginaanfallet, arbeidskapasitet eller mortalitet (som jo er den optimale effekten). Sistnevnte effekter er ikke like lett å sammenlikne på tvers av studier, mens myke effekter oppgis i standardiserte tall og gjør en sammenlikning fruktbart. Venstre ventrikkels ejsjonsfraksjon er det mest brukte effektmålet, og dette målet lar seg lett sammenlikne.

Det finnes en lang rekke av bildeteknikker som kan si noe om effekten, alt fra ekkokardiografi, kvantitativ venstre ventrikkel angiografi, kardiell MR eller SPECT. I den norske ASTAMI studien(72;73) benyttet de blant annet et interessant mål, nemlig ”twist” målt ved kardiell MR. Det er nemlig sånn at et friskt hjerte, til forskjell fra et sviktende hjerte, kontraherer med en viss grad av vridning/rotasjon, ved at øvre og nedre del av hjertet roterer motsatt vei under kontraksjonen. Ved å måle denne vridningsgraden kan man si noe om hjertets evne til å kontrahere optimalt, men forfatterne konkluderer med at denne metoden må evalueres nærmere i kommende studier(73). Forfatterne skriver også at den ikke-invasive

gullstandarden for å måle hjertets funksjon er kardiell belastning målt ved MR, men grunnet lav kapasitet og høyt tidsbruk er denne metoden ikke særlig benyttet.

4.7 Hvilke "døende celler" skal vi rette fokuset mot?

Ved et hjerteinfarkt, og ved alle typer celledød, er det snakk om tre måter en celle kan dø på: Nekrose, autofagi og apoptose. Celledød ble først sett på som en ikke-regulerbar prosess, men nyere forskning har vist at i hvert fall en viss andel av celledød skyldes regulerte mekanismer. Selv nekrose, som tradisjonelt har vært sett på som en ikke-regulerbar prosess, er i visse tilfeller et eksempel på regulert celledød. Derfor er det interessant å forske videre på hvilke av disse dødsmechanismene som kan påvirkes, for på den måten å redde celler som man tidligere anså som tapt. Mechanismene bak autofagi er foreløpig uklare, men bak denne forståelsen kan det ligge et stort potensiale innen behandlingen av iskemisk hjertesykdom(74). Det var i starten stor tro på at en høy andel av cellene ved et hjerteinfarkt døde ved apoptose, men i dag er det få bevis på at dette er dødsmechanismen(75).

5 Behandling med stamceller etter hjerteinfarkt – Et historisk perspektiv

Det var faktisk frykten for en atomkrig etter andre verdenskrig og den påfølgende dødelige stråleskaden som var drivkraften bak forskningen på stamceller. I 1963 klarte forskere i Toronto å vise at en mus som hadde blitt utsatt for en dødelig stråledose likevel kunne reddes, ved å høste celler fra benmarg hos mus og enkelt injisere disse i musens blodomløp(76). Celleterapi for behandling av hjerteinfarkt er et felt som brukte lengre tid før det kom i gang, men har hatt en rivende utvikling fra slutten av 90-tallet, og særlig utover 2000-tallet. Noen av de grunnleggende forskningsteknikkene ble utviklet så tidlig som på begynnelsen av 1980-tallet(77). For å forstå hvordan vi er endt opp der vi er i dag i klinisk forskning er det både interessant og nødvendig å ta en titt bakover i historien for å se på noen av de banebrytende forsøkene.

Vi kan starte i 1996 da forskere hentet neonatale kardiomyocytter fra fosteret til rotter som var 20 dager ut i svangerskapet. Disse cellene kunne senere kolonisere randsonen rundt infarkt i et dyr av samme art(78). Riktignok fant de igjen disse cellene i kun 50 % av de infarserte områdene. Et noe mer imponerende resultat kom i 1997 da Asahara et al. viste at celler høstet fra perifert blod kunne slå seg ned i iskemiområder og bedre angiogenesen(79). Dette funnet støttet opp under at celleterapi kunne ha en plass i behandlingen etter hjerteinfarkt, her som terapeutisk angiogenese. De påfølgende studiene på rotter fra omkring år 2000-2004 viste at injisering av stamceller fra tverrstripet muskulatur, hematopoetiske stamceller eller stamceller fra benmarg, kunne slå seg ned, overleve i måneder og forbedre hjertets funksjon etter et infarkt(80-84). Forsøk ble også gjort på større dyr, nemlig sauer, hvor man fant at stamceller fra tverrstripet muskulatur gitt etter et infarkt minket den forventede reduksjonen i ejectivesfraksjon (fra 50 % til 48 % i intervensjonsgruppen, sammenliknet med fra 43 % til 33 % i kontrollgruppen)(85). Men gjengangeren var at disse dyrestudiene ikke var randomiserte og heller ikke blindede. Altså gjenstod det å vise til de samme effekter i randomiserte dobbeltblindede studier.

Resultatene fra disse første dyrestudiene var ikke så overbevisende som de kanskje høres ut som: Man fant for eksempel ved bruk av hematopoetiske stamceller at kun 0,02 % av cellene i randsonen av infarktstammet fra de donerte cellene(80). Et viktig poeng fra celleterapiens barndom var likevel at stamcellene fra tverrstripet muskulatur kunne tenkes å høstes fra pasienten selv, og dermed ville man sikre seg enkel tilgang på mange celler(81). Den samme fordelene med enkel tilgjengelighet gjaldt også for stamceller fra benmarg da man i denne perioden klarte å vise at de kunne oppnå kardiomyogene fenotyper etter å ha blitt injisert i uskadet myokard(82). Med stadig flere lovende dyrestudier var optimismen innen fagfeltet stor, og vi tillatter oss å sitere følgende konklusjon for å vise nivået av entusiasme: ”Implanted skeletal myoblasts form viable grafts in infarcted myocardium, resulting in enhanced post-myocardial infarction exercise capacity and contractile function and attenuated ventricular dilation”(83). Det var altså ikke måte på hvor lovende disse stamcellene fra tverrstripet muskulatur var. Det var kanskje derfor ikke så rart at nettopp disse cellene fikk æren av å være den aller første celletypen som deltok i et klinisk forsøk på hjertepasienter. Dette hadde riktignok skjedd allerede i år 2000 da de ble injisert transepikardialt i forbindelse med en koronar bypass-operasjon(86). Dette forsøket føyde seg inn i rekken av lovende resultater, men allerede etter dette første forsøket tok forskerne et forbehold om at stamcellene fra tverrstripet muskulatur kunne inneha et arytmiopotensiale. Det elektrofysiologiske spørsmålet ble derfor hvorvidt disse cellene var ikke-integrerte, og dermed ga opphav til ventrikkelarytmier. Første gang stamceller fra benmarg ble benyttet i et klinisk forsøk var i Tyskland året etter, altså i 2001(87). Dette var riktignok kun en liten pilotstudie på 10 pasienter, men allerede da konkluderte forskerne med at det så ut som om cellene bedret hjertets funksjon og reduserte infarktstørrelsen.

Etter dyrestudiene er vårt inntrykk at man håpet at stamcellene fra benmarg skulle inneha mer plastisitet enn stamceller fra tverrstripet muskulatur, samtidig med at stamceller fra tverrstripet muskulatur viste tegn til å gi ventrikkelarytmier. Dermed ble de store kliniske studiene fra årene 2004-2008 rettet mer mot nettopp stamceller fra benmarg (eksempel: ASTAMI(72), REPAIR-AMI(88) og BOOST-studien(89)), enn mot stamceller fra tverrstripet muskulatur (eksempel: MAGIC-studien(58)). Resultatene fra disse studiene skal vi komme tilbake til senere i oppgaven.

To celletyper som kan bli særdeles interessante i fremtiden er embryonale stamceller og induerte pluripotente stamceller. Ingen av disse to celletypene har til nå vært benyttet i kliniske forsøk, så all erfaring vi har med disse cellene er gjennom eksperimentelle studier. Det var så tidlig som i 1981 at man første gang oppnådde å danne én embryonal stamcelle fra hver blastocyst hos mus(77). Dette forsøket viste at disse cellene fra embryoets indre cellemasse var pluripotente ved at én celle ga opphav til et vidt spekter av celler. Senere i 1998 oppnådde man det samme med én human blastocyst(90). Selv etter proliferering in vitro i 4-5 måneder beholdt disse cellene sine pluripotente egenskaper og kunne danne celler fra alle de tre kimlagene (endoderm, mesoderm og ektoderm). Dette viser at sett med en forskers øyne har det vært mulig å gjøre prekliniske forsøk med humane embryonale stamceller i over et tiår, men i Norge har det som sagt vært forbudt å forske på disse cellene frem til 2007.

Det var en japansk forskergruppe som i 2006 første gang viste at man kunne reprogrammere allerede differensierte celler tilbake til et mer umodent stadium ved å smitte dem med et manipulert HIV-virus. Disse cellene kalte de for induerte pluripotente stamceller. I 2006 oppnådde de dette med embryonale celler- og modne fibroblaster fra mus(91), men allerede året etter hadde den samme forskergruppen vist at de klarte å indusere pluripotente stamceller fra modne humane fibroblaster fra hud(92). Disse cellene liknet på embryonale stamceller, og kunne også in vitro gi opphav til celler fra de tre kimlagene. Med andre ord: Det var tenkelig at man kunne høste fibroblaster fra huden til et menneske, reprogrammere cellene, og ende opp med kontraherende kardiomyocytter!

En annen side ved stamcellebehandling ble belyst i 2002 da det i The New England Journal of Medicine ble publisert en artikkel som viste at vi må tenke nytt hva gjelder vår forståelse for hjertets evne til regenerasjon(93). Her hadde åtte mannlige mottakere fått hvert sitt kvinnelige donorhjerte. Vevsprøver fra det kvinnelige donorhertet viste imidlertid at det var kolonisert med mannlige primitive celler (verifisert ved påvisning av et Y-kromosom). Men cellene var ikke kun primitive, de viste også differensiering til myocytter og endotelceller. Altså hadde mannlige celler migrert og kolonisert det kvinnelige hjertet. Hvorvidt de mannlige cellene

faktisk hadde kolonisert hjertet for så å proliferere på egenhånd, eller smeltet sammen med de hjertecellene som allerede var der (cellefusjon), forblir uvisst.

Året etter, altså i 2003, ble det publisert en artikkel i *Circulation*(94) som viste noe av det samme, men med en elegant vri: Her var fire kvinnehjarter tatt ut ved obduksjon, alle fra kvinner som tidligere i sitt liv hadde fått donert benmarg fra en mannlig donor. Ved nærmere undersøkelse fant man at 23 % av kardiomyocytene hadde et Y-kromosom, noe som tydet på at cellene fra den mannlige benmargen hadde migrert og kolonisert det kvinnelige hjertet. Forskerne konkluderte med at dette var første gangen det var vist at human benmarg var å anse som en ressurs for ekstrakardiale stamceller som kan differensiere til kardiomyocytter. Men det er viktig å påpeke, slik også Colucci et al. påpeker i sin oversiktsartikkel om celleterapi(95), at disse to forsøkene ikke er å anse som bevis for at det faktisk har foregått en transdifferensiering. Det er nemlig mange tekniske utfordringer hva gjelder å gi nøyaktige tolkninger av slike transplantasjonsforsøk.

6 Hva er gjort klinisk?

Feltet innen stamcelleterapi ved iskemisk hjertesykdom preges i dag av et generasjonsskifte. Det er blitt introdusert begrepet ”first generation” som i tid strekker seg fra 2000-2008, og som inkluderer forsøk med stamceller fra benmarg, fra skjelettmuskulatur og endotelprogenitorceller(62). Når det gjelder disse celletypene er man kommet langt innen klinisk forskning, og har i dag pålitelige resultater. Begrepet ”second generation” strekker seg fra 2009 og frem til i dag, og inkluderer mesenchymale stamceller fra benmargen og stamceller fra hjerteveggen. Her har man de siste par-tre årene startet opp med noen få kliniske forsøk, noen av dem er allerede publisert, men resultatene er ikke konklusive og det gjenstår mer forskning før man kan si noe sikkert om effekten. Det er altså dette generasjonsskiftet vi i dag er midt oppi, hvor vi venter på resultatene fra ”second generation”. I fremtiden tenker man seg at induerte pluripotente stamceller og embryonale stamceller skal vies mer oppmerksomhet, og at selv om de per dags dato ikke er inkludert i noen kliniske forsøk, håper man at dette blir en realitet snart.

6.1 Stamceller fra benmarg – Hva viser kliniske forsøk?

Det er gjort mange hundre forsøk med stamceller fra benmarg som behandling etter hjerteinfarkt, noen med et bedre studiedesign enn andre. Disse cellene er det forsket mye på, nettopp fordi de er lett tilgjengelige og fordi man i starten trodde at de skulle inneha høy plastisitet. I en metaanalyse av Kang et al. publisert i 2008(3), har de med utgangspunkt i 863 potensielt relevante forsøk endt opp med kun seks randomiserte kontrollerte studier som de tok med i sin metaanalyse, svarende til 517 pasienter. Når man skal vurdere kliniske forsøk der det er benyttet stamceller kan vi ende opp i det uendelige med å diskutere hvordan cellene er håndtert i forkant, hvordan de ble injisert til mottakeren og hvordan man har valgt å måle effekten. For enkelthets skyld tar vi derfor utgangspunkt i metaanalysen fra Kang et al. når vi nå skal presentere en oversikt over hva man har oppnådd/ikke oppnådd innen behandlingen med stamceller fra benmarg. De fokuserte på nettopp autologe stamceller fra benmarg, injisert

intrakoronart etter akutt hjerteinfarkt. De seks ulike studiene valgte å måle effekten på litt forskjellig måte, alt fra ekkokardiografi, kvantitativ venstre ventrikkel angiografi, kardiell MR eller SPECT. Alle seks forsøkene hadde det til felles at bildene ble vurdert blindet av erfarne teknikere/kardiologer.

Metaanalysen har valgt å sammenlikne effekten ved å se på endring av venstre ventrikkels ejeksjonsfraksjon, og de seks studiene har noe ulik oppfølginstid fra 3-6 måneder.

Konklusjonen er at intrakoronar injeksjon av stamceller fra benmarg i pasienter med akutt hjerteinfarkt virker trygt og er assosiert med en lett økning av ejeksjonsfraksjon målt ved oppfølgingstidspunktet. Ejeksjonsfraksjonen ved oppfølgingstidspunktet var 2,53 prosentpoeng bedre [95 % konfidensintervall 1,69-4,08] i intervensjonsgruppen enn i kontrollgruppen. Fra et norsk perspektiv er det interessant å merke seg at den nest største studien innen dette feltet er gjort på Rikshospitalet av Lunde et al. og publisert i 2006, den såkalte ASTAMI-studien(72). Den skiller seg ut ved at den konkluderte med ingen effekt på venstre ventrikkels ejeksjonsfraksjon etter behandling med stamceller fra benmarg. Den største studien av de seks er den såkalte REPAIR-AMI fra Tyskland, også den publisert i 2006, som inkluderte hele 204 pasienter(88). Denne studien konkluderte derimot med enda litt bedre effekt på venstre ventrikkels ejeksjonsfraksjon enn hva metaanalysen kom frem til. Som forklart tidligere i oppgaven er begrepet stamceller fra benmarg svært heterogent, og denne heterogeniteten kan forklare hvorfor tilsynelatende like studier kommer frem til forskjellige resultater. Det er også interessant å se at i Tsjekia har Meluzin et al. sett nærmere på dose-effekt forholdet ved at de delte sin studie i to intervensjonsgrupper, en som mottok 1×10^7 celler (lavdose), og en gruppe som mottok 1×10^8 celler (høydose)(61). Dersom det foreligger en reell effekt, vil man også forvente en dose-effekt korrelasjon, og det var nettopp det de fant. I denne studien benyttet de mononukleære stamceller fra benmarg, og deres resultat tyder på at jo flere celler jo bedre effekt.

Som forklart er det altså sprikende resultater hva gjelder effekten av stamceller fra benmarg, men likevel er vårt inntrykk at forskerne har falt ned på at stamceller fra benmarg bedrer hjertets funksjon gjennom angiogenese, men ikke gjennom myogenese. Det er også verdt å merke seg hvilken effekt vi snakker om. Venstre ventrikkels ejeksjonsfraksjon er kun en myk

effekt, det ultimate ville selvfølgelig være å påvise redusert mortalitet etter behandling, såkalt hard effekt. Den nevnte metaanalysen har for kort oppfølgingstid til å kunne si noe om langtidseffektene, men i de studiene hvor det initialt ble vist effekt har man senere sett at denne effekten vedvarer i over tre år(96). I dag er det 6-8 år siden disse studiene første gang ble publisert, og mange av disse pasientene er fulgt opp i årene som har gått. Men det er likevel ikke mange nok pasienter for å si noe sikkert om mortalitet. Som tommelfingerregel bør man ha minst 5000 pasienter fulgt over en 5-års periode for å kunne si noe om mortalitet, mens den nevnte metaanalysen inkluderte kun 517 pasienter. Det finnes likevel studier som har konkludert med at 5-års overlevelse viser signifikant redusert mortalitet(96), men vår mening er at dette må man ta med en klype salt. Et annet vesentlig poeng er at den effekten det refereres til er en lett økning i venstre ventrikkels ejsjonsfraksjon. Man må derfor spørre seg selv om det er klinisk viktig å ha litt bedre venstre ventrikkel ejsjonsfraksjon, eller om dette ikke merkes i pasientenes hverdag?

6.2 Stamceller fra tverrstripet muskulatur – Hva viser kliniske forsøk?

Stamceller fra tverrstripet muskulatur fikk æren av å være de første cellene som deltok i et klinisk forsøk på hjertepasienter i år 2000(86). Den store studien innen dette feltet var derimot MAGIC-studien (Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy) fra Frankrike, Tyskland, Belgia, Storbritannia og Italia(58). Dette var en randomisert, dobbeltblindet studie hvor man inkluderte pasienter med venstre ventrikkel ejsjonsfraksjon på under 35%, gjennomgått infarkt og aktuelle for koronar bypass-operasjon. 97 pasienter fikk enten placebo (n=33), lavdose stamceller fra tverrstripet muskulatur (n=33) eller høydose stamceller fra tverrstripet muskulatur (n=34) injisert transepikardielt i forbindelse med åpen hjertekirurgi. Studien konkluderer med at den ikke klarte å vise noen forskjell i venstre ventrikkels ejsjonsfraksjon, målt ved ekkokardiografi, mellom intervensjonsgruppene og placebogruppen. Selv om studiedesignet var laget godt nok for å finne en eventuell effekt har det dukket opp en oppfølger, den såkalte MARVEL-studien(97). Denne studien er pågående og innebærer at Myocell, et farmasøytisk preparat bestående av stamceller fra tverrstripet muskulatur under tilnavnet ”cell-medicin”, gis til 170 pasienter med hjertesvikt. Studien regner med å være ferdig i februar 2012, men er altså svært lik den allerede gjennomførte

MAGIC-studien. MARVEL-studien skiller seg riktignok ut ved at cellene her skal injiseres transendokardielt, i stedet for transepikardielt, men det er blitt antydnet at det er farmasøytiske interesser som står bak denne studien(62).

En annen interessant studie, riktignok preklinisk, publisert i 2010 kombinerer stamceller fra tverrstripet muskulatur med såkalt ”tissue-engineering”. Her har Miyagawa et al. testet ut stamceller fra tverrstripet muskulatur dyrket som et encellet lag(98). Denne cellefilmen (engelsk: cell sheet) ble implantert til et infarsert grisehjerte ved å gjøre en sternumsplitt, lokalisere infarkt og deretter legge 10 slike cellefilmer over infarkt. Dette er riktignok kun en pilotstudie, med totalt 10 griser fordelt likt mellom intervensjon- og kontrollgruppen. Skal vi tro forfatterne er resultatene veldig lovende, men målene de har benyttet i studien (”fractional area shortening” og ”color kinesis index”) er basert på kompliserte matematiske formler og ikke primære endepunkter. Fordelen med denne dyrestudien er at den nettopp er gjort på et stort dyr, og særlig gris som egner seg godt ettersom både gris- og menneskehjerner er sårbare for arytmier. I dette forsøket målte de arytmier ved å EKG-overvåke tre av de behandlede grisene, riktignok i kun 24 timer. I løpet av dette døgnet kunne de ikke registrere noen ventrikulære ekstrasystoler. At denne overvåkningen kun varte i 24 timer kan selvfølgelig kritiseres, men det er alltid en etisk avbalansering i forhold til hvor lenge man kan holde disse eksperimentelle dyrestudiene gående.

6.3 Mesenchymale stamceller – Hvor langt er man kommet innen klinisk forskning?

Begrepet mesenchymal stamcelle er ikke helt entydig. Den klassiske oppfatningen går ut på at mesenchymale stamceller kommer fra benmarg og innehar evnen til selvfornyelse, samtidig som cellen gir opphav til det mesodermale kimlaget. Men man har vist at mesenchymale stamceller også kan gi opphav til nervevev (altså ikke-mesodermalt vev)(99;100). Dette indikerer at enten er begrepet mesenchymale stamceller ikke dekkende, eller så er dagens isoleringsteknikker ikke så gode at vi kun ender opp med mesenchymale stamceller.

De fleste studier på mesenchymale stamceller har valgt å isolere stamcellene fra benmarg, og høste dem etter hvert som de adhererer til plastoverflate (som tidligere beskrevet under avsnittet om mesenchymale stamceller)(101). Når det kommer til mus er situasjonen en annen. Dersom man kun belager seg på å høste de mesenchymale stamcellene etter hvert som de adhererer til plastoverflaten, vil man ende opp med heterogene celler forurenset av hematopoetiske stamceller. Som løsning på dette problemet ble det i 2010 publisert en isoleringsteknikk der man ender opp med rene mesenchymale stamceller(102).

Fra dyreforsøk har man vist at injisering av mesenchymale stamceller kan bedre hjertets funksjon(103-105), men langtidseffektene etter seks måneder er fraværende(105). Som nevnt under ”Hva er virkningsmekanismen?” overgår disse positive effektene mesenchymale stamcellers evne til å differensiere til kardiomyocytter. Altså må det være noe i tillegg som står bak effekten, for eksempel parakrine faktorer. En fordel ved bruk av mesenchymale stamceller sammenliknet med stamceller fra hjerteveggen og embryonale stamceller er at de ikke trigger, men faktisk demper, immunresponser(106). Mesenchymale stamceller er i tillegg enkle å ekspandere. Ulempene er også her muligheten for tumores. Det å dyrke mesenchymale stamceller i under åtte uker er ansett som trygt, men dersom dyrkingstiden overskrider åtte uker begynner cellene å likne mer og mer på cancerceller. Etter å ha injisert slike langtidstyrkede celler i immunsupprimerte mus oppstod det tumores i nesten alle organer(107). Man har også sett deponering av kalsium etter injisering med mesenchymale stamceller hos mus, som tegn på begynnende bendannelse(108). Som for stamceller fra tverrstripet muskulatur er det også her blitt stilt spørsmål rundt arytmi-faren. Resultatene er sprikende, men et forsøk gjort på 30 mennesker viste blant annet ingen økt arytmi-fare(109). Det er nok på sin plass å gjennomføre flere studier for å avklare sikkerhetsprofilen til disse cellene. To pågående studier med mesenchymale stamceller er designet for nettopp å kunne gi svar på dette, de såkalte PROMETHEUS-(110) og TAC-HAT(111) studiene. Disse to studiene benytter henholdsvis transepikardiell injisering og transendotelial injisering, men studiene er for små til å gi oss annet enn en pekepinn på hvilken av de to administrasjonsformene som er best egnet.

For å få en fullstendig oversikt over mesenchymale stamcellers anvendelse i kliniske forsøk refererer vi til en oversiktartikkel av Choi et al. fra 2011(112). Denne artikkelen har den fordelen at den forholder seg til den nevnte definisjonen av mesenchymale stamceller fra 2006, hvilket gjør det oversiktlig og ryddig å sammenlikne resultater. Her nevnes seks publiserte studier med til sammen 211 pasienter, samt totalt 14 pågående studier hentet fra ClinicalTrials.gov. De foreløpige publiserte resultatene er alle lovende og peker i retning av bedret hjertefunksjon målt ved venstre ventrikkels ejeksjonsfraksjon. Forfatterne avslutter med å påpeke en interessant ting: I Østen benyttes celleterapi i stor skala utenfor kliniske studier, av ren medlidenhet eller som vanlig klinisk praksis. Derfor er antallet pasienter som behandles med mesenchymale stamceller faktisk langt større enn hva vi har her i Vesten med våre strengt regulerte kliniske studier. Men dessverre vil ikke vitenskapen nyte godt av denne kunnskapen da det antageligvis ikke lar seg gjøre å systematisk samle inn og analysere disse dataene.

6.4 Hjerte progenitor celle – Hvor langt er man kommet innen klinisk forskning?

Før trodde man at hjertet var et endestadie-organ uten evne til å regenerere, men i dag tror man at regenerering skjer i et meget lavt tempo, og at igjennom et langt liv skiftes ut omtrent 50 % av hjertecellene. Man har nemlig klart å isolere celler fra hjerteveggen, som viser seg å inneha stamcelleegenskaper: De er selvfornyende og multipotente, ved at de gir opphav til både myocytter, endotelceller og glatte muskelceller. Første gang vi fikk en pekepinn på at det kan finnes stamceller i hjertet var i 2003, da Oh et al. klarte å isolere en umoden celle fra hjerteveggen som hadde bevart sin evne til å differensiere til kardiomyocytter(113). I de påfølgende årene fra 2004 til 2007 ble det i hjertet til gnagere identifisert flere typer av stamceller, med litt ulike overflatemarkører og litt ulikt differensieringspotensiale(62). Som nevnt tidligere er det usikkert om hjerte progenitor cellen faktisk er identifisert ettersom stamcellene fra hjerteveggen viser stor heterogenitet, og vi velger derfor videre å benevne dem stamceller fra hjerteveggen. Det er et forskningsmessig problem at disse cellene selv ikke i dag er entydig definert med tanke på egenskaper og overflatemarkører.

De aller nyeste data fra desember 2011 tyder likevel på at det er to hovedsubtyper av stamceller fra hjertet hos voksne mennesker, de myogene som er c-kit positive og som finnes blant myocytterne omringet av modne myocytter, og de vaskulære som både er c-kit og KDR positive og som finnes i åreveggen (KDR er en reseptor for en vaskulær endotelial vekstfaktor)(114). De har fått sine navn fordi de respektivt foretrekker å differensiere i retning av myocytter, eller til den vaskulære linjen i retning endotelceller og glatte muskelceller. C-kit er reseptoren for stem cell factor (SCF), hvilket er et potent cytokin som kan aktivere stamceller(10). I starten ble stamceller fra hjerteveggen ansett som meget lovende nettopp fordi man mente at de var bundet til de kardielle cellelinjene, og man slapp dermed risikoen for teratomer eller andre uønskede celletyper ved behandling. Men det er vist at selv humane stamceller fra hjerteveggen (c-kit negative) kan differensiere i mesodermal retning til adipocytter, osteblaster og kondroblaster(115). Sistnevnte celler var riktignok c-kit negative, mens de fleste stamceller fra hjerteveggen er c-kit positive(62). Dette påpeker igjen at det er viktig å skille mellom hvilke subtyper man snakker om, for det er tenkelig at ulike subtyper kan gi ulike resultater.

Det er i dag liten tvil om at det faktisk finnes stamceller i hjerteveggen hos friske mennesker, men hva med hos syke mennesker som lider av kronisk iskemisk hjertesykdom? Kan vi uten videre regne med at disse stamcellene er bevart hos denne populasjonen? Dette spørsmålet er reist av Pouly et al. i 2008, hvorpå de høstet hjertevev fra en slik syk populasjon og kom frem til at det er langt færre stamceller hos denne pasientgruppen(116). Dette kan sette sine begrensninger fordi det er jo nettopp denne pasientgruppen som kan tenkes å være målgruppen for behandling. Som motsvar har D'Amario et al, som kan betegnes som den mest entusiastiske forskergruppen innen dette feltet, publisert at det lar seg gjøre å høste funksjonelt oppegående stamceller selv fra pasienter med langtkommen hjertesvikt(117).

Allerede i 2007, mulig enda tidligere, hadde forskerne klart å etablere isolering- og ekspanderingsregimer fra selv små vevsbiter hentet endokardielt(118). Derimot er det slik at om man velger å rense celleprøven med tanke på c-kit positive celler trengs det en større vevsbit, som da fjernes kirurgisk ved åpen hjertekirurgi(62;119). Det er i dag minst tre pågående kliniske studier med stamceller fra hjerteveggen: CADUCEUS studien(120) og

SCIPIO-studien(121) begge fra USA, og ALCADIA studien(122) fra Japan (se tabell). Dette er små studier som først og fremst skal si noe om sikkerheten, og selv om CADUCEUS studien var forventet ferdig i fjor kan vi ikke finne noen publiserte resultater fra denne studien på PubMed. Fra SCIPIO studien er det publisert lovende resultater etter ett år(123), hvor forskerne konkluderer med at dette åpner opp for større fase 2 kliniske studier i nær fremtid. Som vist i tabellen under benyttes celler med litt ulike egenskaper, og dette kan være greit å merke seg når de endelige resultatene blir publisert.

Studie	Antall deltagere	Påbegynt	Forventet ferdig	Høster cellene	Cellenes egenskaper	Injiserer cellene
CADUCEUS	30 pasienter	Mai 2009	Des. 2011	Transendokardielt	20% er c-kit positive	Intrakoronart
ALCADIA	6 pasienter	April 2010	Mars 2013	Transendokardielt	Ingen c-kit positive	Transepikardielt
SCIPIO	40 pasienter	Feb. 2009	Sep. 2013	Ved åpen hjertekirurgi	c-kit positive	Intrakoronart

6.5 Embryonale stamceller – Hvor langt er man kommet innen klinisk forskning?

Selv om det nå i 2012 er 14 år siden man isolerte en human blastocyst og viste at denne kunne differensiere til alle tre kimlagene(90), er det ennå ikke gjennomført noen forsøk på mennesker med bruk av embryonale stamceller, blant annet fordi tilgangen på humane embryonale stamceller fortsatt er begrenset, både av praktiske og etiske grunner. Vi blir nødt til å vente og se hva fremtiden kan by på av kliniske resultater.

6.6 Induserte pluripotente stamceller – Hvor langt er man kommet innen klinisk forskning?

Dette feltet kan sies å være i spebarns-alderen, ettersom den første induserte pluripotente stamcellen ble dannet i 2006(91). Men dette feltet har særdeles spennende muligheter, selv om det per dags dato ikke er gjennomført noen kliniske studier med disse cellene, verken innen iskemisk hjertesykdom eller andre kliniske settinger. Cellene har blitt prøvd ut på gnagere innen et fåtall av kliniske problemstillinger, her kan nevnes sigdcelleanemi(124) og Hemofili A(125), og det er samlet sett gjort langt flere forsøk rettet mot andre sykdommer enn iskemisk hjertesykdom. Derfor er den kunnskapen vi har i dag innen behandlingen av hjerteinfarkt med induserte pluripotente stamceller svært begrenset, selv fra eksperimentelle dyreforsøk(126).

7 Hva vil fremtiden bringe?

I dag er trenden at man ønsker å gå tilbake til laboratoriet, og tilbake til de eksperimentelle studiene slik at man bedre skjønner hva som skjer med cellene. Feltet har nok vært preget av at man litt vel raskt gikk fra eksperimentelle studier og over på kliniske studier uten at man hadde forstått virkningsmekanismene. Som eksempel på dette ble kliniske forsøk satt i gang mens man ennå trodde at de mononukleære stamcellene fra benmarg faktisk transdifferensierte til kardiomyocytter. På den annen side kan man ikke uten videre kritisere forskerne for å ha igangsatt kliniske studier for tidlig. Det var rapportert at transplanterte hjerter inneholdt myocytter som kom fra et annet sted enn hjertet(93), og at disse cellene kunne jo komme fra nettopp benmarg. Det var derfor plausibelt at stamceller fra benmarg faktisk transdifferensierte til kardiomyocytter. Når man nå går tilbake til laboratoriet bør man ha i mente hva som var det opprinnelige ønsket, nemlig fullstendig tilheling av et skadet hjerte gjennom myogenese. Av nettopp denne grunn ligger nok fremtidens fokus på induserte pluripotente stamceller og embryonale stamceller som innehar en bedre evne til myogenese.

Når cellene er injisert er det både ønskelig at de skal bli boende i hjerteveggen, men også at de fortsetter å proliferere. Dette er selvfølgelig et must dersom man skal klare å regenerere de 10 milliardene kardiomyocytter som går tapt ved et moderat stort hjerteinfarkt. Det er også viktig at man i fremtiden retter flere forsøk mot større dyr enn små gnagere, fordi større hjerter har en noe ulik elektrofysiologi enn små hjerter(127). Det er derfor plausibelt at for eksempel et grisehjerte oppfører seg mer likt et menneskehjerte ettersom at de likner mer i størrelse. Derfor vil det være aktuelt å gjøre flere studier på gris, sauer og hunder, enn for eksempel små gnagere. Gris er i så måte et egnet dyr fordi deres hjerte er mer sårbare for arytmier, slik menneskehjerter er. Å gjøre studier på større dyr er selvfølgelig svært kostbart sammenliknet med små gnagere, men da vil man oppnå en tilfredstillende kartlegging av arytmirisikoen før fremtidens celler slippes løs i kliniske studier på mennesker.

Litteraturliste

- (1) Statistisk sentralbyrå. Dødsårsaker, 2010. <http://www.ssb.no/dodsarsak/> 2012 [cited 2012 Feb 28]; Available from: URL: <http://www.ssb.no/dodsarsak/>
- (2) 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 May 28;167(10):989-97.
- (3) Kang S, Yang YJ, Li CJ, Gao RL. Effects of intracoronary autologous bone marrow cells on left ventricular function in acute myocardial infarction: a systematic review and meta-analysis for randomized controlled trials. *Coron Artery Dis* 2008 Aug;19(5):327-35.
- (4) Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004 Apr 8;428(6983):664-8.
- (5) Nygren JM, Jovinge S, Breitbart M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004 May;10(5):494-501.
- (6) Gnechchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, et al. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J* 2006 Apr;20(6):661-9.
- (7) Penicka M, Widimsky P, Kobylka P, Kozak T, Lang O. Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation* 2005 Jul 26;112(4):e63-e65.
- (8) Gnechchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008 Nov 21;103(11):1204-19.
- (9) Nguyen BK, Maltais S, Perrault LP, Tanguay JF, Tardif JC, Stevens LM, et al. Improved function and myocardial repair of infarcted heart by intracoronary injection of mesenchymal stem cell-derived growth factors. *J Cardiovasc Transl Res* 2010 Oct;3(5):547-58.
- (10) Kuraitis D, Ruel M, Suuronen EJ. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011 Aug;25(4):349-62.
- (11) Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskouei BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res* 2010 Oct 1;107(7):913-22.
- (12) Shabbir A, Zisa D, Suzuki G, Lee T. Heart failure therapy mediated by the trophic activities of bone marrow mesenchymal stem cells: a noninvasive therapeutic regimen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009 Jun;296(6):H1888-H1897.
- (13) Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008 Feb 22;132(4):661-80.
- (14) Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, et al. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Dec 26;103(52):19812-7.
- (15) Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, et al. Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Jun 5;104(23):9685-90.
- (16) Zhu WZ, Van BB, Laflamme MA. Methods for the derivation and use of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol* 2011;767:419-31.
- (17) Wong SS, Bernstein HS. Cardiac regeneration using human embryonic stem cells: producing cells for future therapy. *Regen Med* 2010 Sep;5(5):763-75.
- (18) Kong CW, Akar FG, Li RA. Translational potential of human embryonic and induced pluripotent stem cells for myocardial repair: insights from experimental models. *Thromb Haemost* 2010 Jul;104(1):30-8.
- (19) Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol* 2007 Nov 6;50(19):1884-93.

- (20) Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Zhang X, et al. In vivo visualization of embryonic stem cell survival, proliferation, and migration after cardiac delivery. *Circulation* 2006 Feb 21;113(7):1005-14.
- (21) Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, Muskheli V, Fugate JA, Dupras SK, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol* 2007 Sep;25(9):1015-24.
- (22) Simpson DL, Boyd NL, Kaushal S, Stice SL, Dudley SC, Jr. Use of human embryonic stem cell derived-mesenchymal cells for cardiac repair. *Biotechnol Bioeng* 2012 Jan;109(1):274-83.
- (23) Helse og omsorgsdepartementet. Stamcelleforskning. <http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/tema/bioteknologi/stamcelleforskning.html?id=439187> 2007 [cited 2012 Feb 6]; Available from: URL: <http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/tema/bioteknologi/stamcelleforskning.html?id=439187>
- (24) LOV 2003-12-05 nr 100: Lov om humanmedisinsk bruk av bioteknologi m.m. (bioteknologiloven), LOV 2003-12-05 nr 100: Lov om humanmedisinsk bruk av bioteknologi m.m. (bioteknologiloven), (2003).
- (25) Solberg B. Embryo, stamcelle og foster. web document 2009 March 13 [cited 2010 Sep 1]; Available from: URL: <http://www.etikkom.no/no/FBIB/Temaer/Forskning-pa-menneskelig-materiale/Embryo-stamcelle-og-foster/>
- (26) Sussman MA, Murry CE. Bones of contention: marrow-derived cells in myocardial regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2008 Jun;44(6):950-3.
- (27) Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif* 2008 Feb;41 Suppl 1:51-6.
- (28) Gonzales C, Pedrazzini T. Progenitor cell therapy for heart disease. *Exp Cell Res* 2009 Nov 1;315(18):3077-85.
- (29) Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2009 Feb 27;104(4):e30-e41.
- (30) Gupta MK, Illich DJ, Gaarz A, Matzkies M, Nguemo F, Pfannkuche K, et al. Global transcriptional profiles of beating clusters derived from human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are highly similar. *BMC Dev Biol* 2010;10:98.
- (31) Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: a source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2011 Feb;50(2):327-32.
- (32) Martinez-Fernandez A, Nelson TJ, Ikeda Y, Terzic A. c-MYC independent nuclear reprogramming favors cardiogenic potential of induced pluripotent stem cells. *J Cardiovasc Transl Res* 2010 Feb;3(1):13-23.
- (33) Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Aug 10;107(32):14152-7.
- (34) Hanley J, Rastegarlarlari G, Nathwani AC. An introduction to induced pluripotent stem cells. *Br J Haematol* 2010 Oct;151(1):16-24.
- (35) Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2006 Nov;34(11):1604-5.
- (36) Mosna F, Sensebe L, Krampera M. Human Bone-Marrow And Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells: A User's Guide. *Stem Cells Dev* 2010 May 20.
- (37) Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
- (38) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- (39) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999 Mar;103(5):697-705.
- (40) Wang T, Xu Z, Jiang W, Ma A. Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell. *Int J Cardiol* 2006 Apr 28;109(1):74-81.
- (41) Planat-Benard V, Menard C, Andre M, Puceat M, Perez A, Garcia-Verdugo JM, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004 Feb 6;94(2):223-9.
- (42) Kuraitis D, Ruel M, Suuronen EJ. Mesenchymal stem cells for cardiovascular regeneration. *Cardiovasc Drugs Ther* 2011 Aug;25(4):349-62.
- (43) Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Hum Gene Ther* 2011 Jan;22(1):3-17.

- (44) Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007 Aug 15;110(4):1362-9.
- (45) Wolf D, Reinhard A, Seckinger A, Gross L, Katus HA, Hansen A. Regenerative capacity of intravenous autologous, allogeneic and human mesenchymal stem cells in the infarcted pig myocardium-complicated by myocardial tumor formation. *Scand Cardiovasc J* 2009 Feb;43(1):39-45.
- (46) Durrani S, Konoplyannikov M, Ashraf M, Haider KH. Skeletal myoblasts for cardiac repair. *Regen Med* 2010 Nov;5(6):919-32.
- (47) Menasche P. Skeletal myoblasts as a therapeutic agent. *Prog Cardiovasc Dis* 2007 Jul;50(1):7-17.
- (48) Gulbins H, Pritisanac A, Anderson I, Uhlig A, Goldemund A, Daebritz S, et al. Myoblasts for survive 16 weeks after intracardiac transfer and start differentiation. *Thorac Cardiovasc Surg* 2003 Dec;51(6):295-300.
- (49) Sherman W. Myocyte replacement therapy: skeletal myoblasts. *Cell Transplant* 2007;16(9):971-5.
- (50) Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008 Mar 4;117(9):1189-200.
- (51) Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007 Feb 20;115(7):896-908.
- (52) Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 2002 Oct 23;530(1-3):239-43.
- (53) Evans SM, Mummery C, Doevendans PA. Progenitor cells for cardiac repair. *Semin Cell Dev Biol* 2007 Feb;18(1):153-60.
- (54) Pfister O, Mouquet F, Jain M, Summer R, Helmes M, Fine A, et al. CD31⁻ but Not CD31⁺ Cardiac Side Population Cells Exhibit Functional Cardiomyogenic Differentiation. *Circ Res* 2005 Jul 8;97(1):52-61.
- (55) Di NP, Forte G, Ahluwalia A, Minieri M. Cardiac progenitor cells: potency and control. *J Cell Physiol* 2010 Sep;224(3):590-600.
- (56) D'Alessandro DA, Michler RE. Current and future status of stem cell therapy in heart failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 2010 Dec;12(6):614-27.
- (57) Mosna F, Annunziato F, Pizzolo G, Krampera M. Cell therapy for cardiac regeneration after myocardial infarct: which cell is the best? *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2010 Oct 1;8(4):227-43.
- (58) Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008 Mar 4;117(9):1189-200.
- (59) Losordo DW, Henry TD, Davidson C, Sup LJ, Costa MA, Bass T, et al. Intramyocardial, autologous CD34⁺ cell therapy for refractory angina. *Circ Res* 2011 Aug 5;109(4):428-36.
- (60) Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 2011 Feb 25;331(6020):1078-80.
- (61) Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornacek I, Hlinomaz O, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006 Nov;152(5):975-15.
- (62) Takehara N, Matsubara H. Cardiac regeneration therapy: connections to cardiac physiology. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011 Dec;301(6):H2169-H2180.
- (63) He G, Zhang H, Wei H, Wang Y, Zhang X, Tang Y, et al. In vivo imaging of bone marrow mesenchymal stem cells transplanted into myocardium using magnetic resonance imaging: a novel method to trace the transplanted cells. *Int J Cardiol* 2007 Jan 2;114(1):4-10.
- (64) Kraitchman DL, Heldman AW, Atalar E, Amado LC, Martin BJ, Pittenger MF, et al. In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Circulation* 2003 May 13;107(18):2290-3.
- (65) Jones RH, Velazquez EJ, Michler RE, Sopko G, Oh JK, O'Connor CM, et al. Coronary bypass surgery with or without surgical ventricular reconstruction. *N Engl J Med* 2009 Apr 23;360(17):1705-17.
- (66) Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 2003 Aug 19;108(7):863-8.

- (67) Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004 Dec;287(6):H2670-H2676.
- (68) Hu X, Wang J, Chen J, Luo R, He A, Xie X, et al. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007 Mar;31(3):438-43.
- (69) Limbourg A, Limbourg F, Drexler H. Cell-based therapies for ischemic heart disease--"trick and treat". *Circ J* 2009 Dec;73(12):2179-82.
- (70) Noiseux N, Gnechchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* 2006 Dec;14(6):840-50.
- (71) Zhang Y, Thorn S, DaSilva JN, Lamoureux M, DeKemp RA, Beanlands RS, et al. Collagen-based matrices improve the delivery of transplanted circulating progenitor cells: development and demonstration by ex vivo radionuclide cell labeling and in vivo tracking with positron-emission tomography. *Circ Cardiovasc Imaging* 2008 Nov;1(3):197-204.
- (72) Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006 Sep 21;355(12):1199-209.
- (73) Hopp E, Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Forfang K, et al. Regional myocardial function after intracoronary bone marrow cell injection in reperfused anterior wall infarction - a cardiovascular magnetic resonance tagging study. *J Cardiovasc Magn Reson* 2011;13:22.
- (74) Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010 Mar 17;72:19-44.
- (75) Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction. *Pharmacol Ther* 2004 Oct;104(1):1-16.
- (76) BECKER AJ, McCULLOCH EA, TILL JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963 Feb 2;197:452-4.
- (77) Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Dec;78(12):7634-8.
- (78) Scorsin M, Marotte F, Sabri A, Le DO, Demirag M, Samuel JL, et al. Can grafted cardiomyocytes colonize peri-infarct myocardial areas? *Circulation* 1996 Nov 1;94(9 Suppl):II337-II340.
- (79) Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997 Feb 14;275(5302):964-7.
- (80) Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001 Jun;107(11):1395-402.
- (81) Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000 Jun;119(6):1169-75.
- (82) 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 Nov;120(5):999-1005.
- (83) Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, Ngoy S, Teller P, Edge AS, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001 Apr 10;103(14):1920-7.
- (84) Agbulut O, Vandervelde S, Al AN, Larghero J, Ghostine S, Leobon B, et al. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004 Jul 21;44(2):458-63.
- (85) Ghostine S, Carrion C, Souza LC, Richard P, Bruneval P, Vilquin JT, et al. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I131-I136.
- (86) 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 Apr 2;41(7):1078-83.

- (87) Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002 Oct 8;106(15):1913-8.
- (88) Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006 Sep 21;355(12):1210-21.
- (89) Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004 Jul 10;364(9429):141-8.
- (90) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
- (91) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 Aug 25;126(4):663-76.
- (92) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- (93) Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002 Jan 3;346(1):5-15.
- (94) Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003 Mar 11;107(9):1247-9.
- (95) Colucci WS, Simons M, Gottlieb SS, Raby BA, Yeon SB. Genetic and cellular therapy in heart failure and myocardial infarction. http://www.uptodate.com/contents/genetic-and-cellular-therapy-in-heart-failure-and-myocardial-infarction?source=search_result&search=genetic+and+cellular+therapy+in+heart+failure+and+myocardial+infarction&selectedTitle=1%7E150 2009 August 26 [cited 2012 Mar 1]; Available from: URL: http://www.uptodate.com/contents/genetic-and-cellular-therapy-in-heart-failure-and-myocardial-infarction?source=search_result&search=genetic+and+cellular+therapy+in+heart+failure+and+myocardial+infarction&selectedTitle=1%7E150
- (96) Strauer BE, Steinhoff G. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice. *J Am Coll Cardiol* 2011 Sep 6;58(11):1095-104.
- (97) A Multicenter Study to Assess the Safety and Cardiovascular Effects of Myocell™ Implantation by a Catheter Delivery System in Congestive Heart Failure Patients Post Myocardial Infarction(s). <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00526253> 2012 [cited 2012 Mar 1]; Available from: URL: <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00526253>
- (98) Miyagawa S, Saito A, Sakaguchi T, Yoshikawa Y, Yamauchi T, Imanishi Y, et al. Impaired myocardium regeneration with skeletal cell sheets--a preclinical trial for tissue-engineered regeneration therapy. *Transplantation* 2010 Aug 27;90(4):364-72.
- (99) Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000 Aug 15;61(4):364-70.
- (100) Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000 Aug;164(2):247-56.
- (101) Alhadlaq A, Mao JJ. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem Cells Dev* 2004 Aug;13(4):436-48.
- (102) Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, Li H, Wang XY, Yao HY, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc* 2010;5(3):550-60.
- (103) Miyahara Y, Nagaya N, Kataoka M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H, et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006 Apr;12(4):459-65.
- (104) Noiseux N, Gnecci M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, et al. Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther* 2006 Dec;14(6):840-50.
- (105) Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation* 2005 Jul 12;112(2):214-23.

- (106) Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, St JM, Xie JS, Cattaneo S, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Aug 9;102(32):11474-9.
- (107) Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005 Apr 15;65(8):3035-9.
- (108) Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood* 2007 Aug 15;110(4):1362-9.
- (109) Viswanathan C, Davidson Y, Cooper K, Tipnis S, Pujari G, Kurian VM. Transplantation of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cells trans-epicardially in patients undergoing coronary bypass surgery. *Indian Heart J* 2010 Jan;62(1):43-8.
- (110) PROMETHEUS: A Phase I/II, Randomized, Double-Blinded, Placebo-Controlled Study of the Safety and Efficacy of Intramyocardial Injection of Autologous Human Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Patients With Chronic Ischemic Left Ventricular Dysfunction Secondary to Myocardial Infarction (MI) Undergoing Cardiac Surgery for Coronary Artery Bypass Grafting (CABG). <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00587990> 2012 [cited 2012 Mar 1]; Available from: URL: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00587990>
- (111) Trachtenberg B, Velazquez DL, Williams AR, McNiece I, Fishman J, Nguyen K, et al. Rationale and design of the Transendocardial Injection of Autologous Human Cells (bone marrow or mesenchymal) in Chronic Ischemic Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure Secondary to Myocardial Infarction (TAC-HFT) trial: A randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy. *Am Heart J* 2011 Mar;161(3):487-93.
- (112) Choi YH, Kurtz A, Stamm C. Mesenchymal stem cells for cardiac cell therapy. *Hum Gene Ther* 2011 Jan;22(1):3-17.
- (113) Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Oct 14;100(21):12313-8.
- (114) Hosoda T. C-kit-positive cardiac stem cells and myocardial regeneration. *Am J Cardiovasc Dis* 2012;2(1):58-67.
- (115) Takehara N, Tsutsumi Y, Tateishi K, Ogata T, Tanaka H, Ueyama T, et al. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere-derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2008 Dec 2;52(23):1858-65.
- (116) Pouly J, Bruneval P, Mandet C, Proksch S, Peyrard S, Amrein C, et al. Cardiac stem cells in the real world. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008 Mar;135(3):673-8.
- (117) D'Amario D, Fiorini C, Campbell PM, Goichberg P, Sanada F, Zheng H, et al. Functionally competent cardiac stem cells can be isolated from endomyocardial biopsies of patients with advanced cardiomyopathies. *Circ Res* 2011 Apr 1;108(7):857-61.
- (118) Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007 Feb 20;115(7):896-908.
- (119) Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De AA, et al. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007 Aug 28;104(35):14068-73.
- (120) Cedars-Sinai Medical Center. CADUCEUS: A Phase I Randomized, Dose Escalation Study of the Safety and Efficacy of Intracoronary Delivery of Cardiosphere-Derived Stem Cells in Patients With Ischemic Left Ventricular Dysfunction and a Recent Myocardial Infarction. <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00893360> 2012 [cited 2012 Mar 1]; Available from: URL: <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00893360>
- (121) University of Louisville. SCIPIO: Myocardial Regeneration Using Cardiac Stem Cells Harvested From Right Atrial Appendages in Patients With Ischemic Cardiomyopathy. <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00474461> 2012 [cited 2012 Mar 1]; Available from: URL: <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00474461>
- (122) Kyoto Prefectural University of Medicine. ALCADIA: Hybrid Biotherapy Involving Autologous Human Cardiac Stem Cell Transplantation Combined With the Controlled Release of bFGF Using a Gelatin Hydrogel Sheet to Treat Severe Refractory Heart Failure With Chronic Ischemic Cardiomyopathy. <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00981006> 2012 [cited 2012 Mar 1]; Available from: URL: <http://www.clinicaltrials.gov/show/NCT00981006>

- (123) Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011 Nov 26;378(9806):1847-57.
- (124) Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007 Dec 21;318(5858):1920-3.
- (125) Xu D, Alipio Z, Fink LM, Adcock DM, Yang J, Ward DC, et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 Jan 20;106(3):808-13.
- (126) Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S, Perez-Terzic C, Ikeda Y, Terzic A. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2009 Aug 4;120(5):408-16.
- (127) London B. Cardiac arrhythmias: from (transgenic) mice to men. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2001 Sep;12(9):1089-91.