

# KARDİAK REJENERATİF TIP UYGULAMALARI

**Prof. Dr. Serdar Bedii Omay**

**Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi**

**Hematoloji BD Trabzon**

## KARDİOVASKULER SİSTEMİN DİFERANSİYASYONU

İnsan embriyoner kök hücrelerinin diferansiyasyonu için en etkileyici göstergelerden biri, myokardial hücreleri içeren pulsatil embriyoner cisimciklerin (Embriyoner Body-EB) oluşumudur (Itskovitz-Eldor ve ark.2000). Farelerde, spontan olarak atan kardiyomyositlerin oluşumu, embriyonik kardiyomyositlerde ve sinus düğümü hücrelerinde tanımlanana benzeyen ritmik aksiyon potansiyellerinin oluşumu ile eş zamanlı bir şekilde olmuştur (Wobus ve ark.1991). EB'lerin oluşumu sırasında fare EKH'lerinden köken alan kardiyomyositler, adrenoseptörler ve kolinoseptörler aracılığıyla tipik sinyal transdüksiyon yolları sergilemişlerdir. EKH'lerinden köken alan kardiyomyositlerin embriyogenezisi özetlediği şeklindeki fonksiyonel kanıtlar, kültürde EKH diferansiyasyonu sırasında  $Ca^{+2}$ 'un kontraktıl sensitivite düzeyinin değişim gösterdiğinin gözlenmiş olmasıdır (Metzger ve ark.1994). Kardiyomyositlerin diferansiyasyonu boyunca, karakteristik iyon kanalları setleri ve sinus noduna, atriumlara veya ventriküllere ait özellikleri sergileyen kalp dokularını muhtemel bir şekilde temsil eden tipik aksiyon potansiyelleri sayesinde çeşitli farklı hücre popülasyonları ayırt edilebilmektedir (Maltsev ark.1994). Genelde, fare EKH'lerinin kardiyomyositlere doğru olan gelişimsel programı, *in-vivo* koşullardaki kardiogenezis esnasında gözlenen sürece kaba bir şekilde benzerlik göstermektedir (Klug ve arkadaşları 1995). Diferansiye fare EKH'lerinden alınan pür myosit kültürleri;  $\alpha$ -kardiyak myosin ağır zincir promotör'ünün kontrolü altında antibiyotik rezistansını kodlayan sekansları (gen dizilerini) taşıyan EKH'lerinin antibiyotik seçimiyle belirlenmiştir. Seçilen hücreler, erişkin distrofik farelerin kalplerinde stabil intrakardiyak greftler oluşturabilme özelliğine de sahiptirler (Klug ve ark.1996).

Erişkin memeli kalbinde kardiyomyosit kaybı irreversibl olabilir ve sıklıkla azalmış kardiyak fonksiyona yol açmaktadır. Hastalıklı bir kalpte fonksiyonel kardiyomyosit sayısının arttırılabilmesinin bariz bir terapötik potansiyele sahip olacağı düşüncesi ile yapılan en son çalışmalar kardiyak hastalık durumlarında myosit sayısının arttırılabilmesi için sellüler transplantasyonun uygulanabileceğini göstermiştir. Hayvanlarda çeşitli tiplerdeki myosit preparatlarının başarılı bir şekilde greftlenmiş olmasına karşın (Soonpaa ve ark.1995) insanlarda yeterli sayıda donör hücre temin etmek zor olmaktadır. EKH'leri donör myositlerin alternatif, yenilenebilir bir kaynağını teşkil edebilmektedir. Kistik insan EB'lerinde myositlerin ritmik pulsasyonları gözlenmiş ve embriyonik myokardial hücrelerin markırıyla yapılan *in situ* hibridizasyon pulsatil EB'nin santral kavitesinin gerçekten de kardiyomyositlerle çevrilmiş olduğunu göstermiştir (Itskovitz-Eldor ve ark.2000). Ayrıca, spontan olarak kontrakte olan alanlardan alınan hücreler, kardiogenezisde yer alan pek çok kardiyak-spesifik gen

ve transkripsiyon faktörü yönünden pozitif idi (Kehat ve ark.2001, Mummery ve ark.2002). Hücreler morfolojik olarak; erken evre kardiyomyositlere benzeyen değişik evrelerdeki myofibriler organizasyon sergilemişlerdir. Elektrofizyolojik testler, kardiyomyositler için karakteristik olan ve non-kardiak kas hücrelerinininkinden belirgin bir şekilde farklılık gösteren nispeten uzun aksiyon potansiyellerini göstermiştir (Kehat ve ark.2001). Üstelik, EKH'lerinin TGF- $\beta$  ile muamelesi ile (Schuldiner ve ark.2000) veya END-2 hücreleriyle (viseral endoderm benzeri hücreler, kalp gelişim bölgesine komşu olan alanlarda normalde görülene benzeyen hücreler) birlikte kültürlerinin yapılmasıyla kardiyomyositlere diferansiye olmaları indüklenebilmiştir (Mummery ve ark.2002). İnsan EKH sisteminde pek çok kardiak-spesifik moleküler markırın gösterilmiş olmasına ve kardiak fizyolojik çalışmaların başlatılmış olmasına karşın, fare sisteminde gösterilmiş olduğu gibi pek çok farklı kardiak-spesifik hücre tipinin varlığını ve bu hücre tiplerinin zaman içindeki indüksiyonlarını doğrulamak için büyük bir bilgi kitlesine hala ihtiyaç duyulmaktadır.

Kardiyomyositlerin sayısının artırılması, yeni vasküler yapıların indüksiyonunu gerektirmektedir. Vasküler gelişim ve vasküler oluşumların idamesi, endotel hücreleri ile mural hücreler arasında etkileşimi gerektirmektedir (Perisitler ve vasküler düz kas hücreleri gibi). Doku-mühendisliği yaklaşımları, düz kas ve endotel hücrelerinden elde edilmiş vasküler greftlerin üretimini başarabilmiş durumdadır (Niklason ve ark.1999). Endotelial progenitörlerin de myokardial iskemide bir potansiyele sahip oldukları gösterilmiştir (Kawamoto ve ark.2001). Fare EKH'leri endotel (Hirashima ve ark.1999, Vittet ve ark.1996) ve düz kas hücrelerine (Drab ve ark.1997, Wobus ve ark.2002) diferansiyasyon gösterebilmekte ve vasküler oluşumları meydana getirecek potansiyel bir kaynak olarak işlev yapmaktadır. Yamashita ve arkadaşları (2000) fare EKH'lerinden vasküler progenitörlerin (Flk1+ hücrelerin) indüksiyonunu ve pürifikasyonunu sağlayacak bir yöntem belirlemişlerdir. Vasküler endotelial growth faktör (VEGF) reseptörlerinden biri olan Flk1, lateral plak mezoderminin (Yamaguchi ve ark.1993) ve ayrıca endotel ve kan hücrelerinin en erken diferansiyasyon markırıdır (Eichmann ve ark.1997, Shalaby ve ark.1995). Gerçekten de, Flk1+ hücreler *in-vitro* (Hirashima ve ark.1999, Nishikawa ve ark.1998) ve *in-vivo* (Yamashita ve ark.2000) koşullarda 2 majör vasküler hücre tipine köken vermişlerdir.

Daha sonraları, endotel hücreleri insan EKH'lerinden de köken almıştır. Bu hücreler, platelet endotelial cell-adhesion molekülü-1 (PECAM-1) antikoları kullanılarak 13 – 15 günlük EB'lerden izole edilmişler ve *in-vitro* ve *in-vivo* olarak daha ileri düzeyde karakterize edilmişlerdir (Levenberg ve ark.2002). PECAM-1 fare embryonik endotel hücrelerinin bir markırıdır (Vecchi ve ark.1994) ve insan EB'lerinde vasküler endothelial-cadherin ile paralel bir şekilde eksprese edilmektedir (Lampugnani ve ark.1992, Levenberg ve ark.2002). Bu durum, PECAM-1'in insan embriyonik endotel hücreleri için de bir markır olarak iş görebileceğini düşündürmektedir. Bu EB'lerde endotel hücreleri; endotel hücrelerine ve kan damarlarına benzeyen oluşumlara spontan bir şekilde diferansiyasyon gösteren spesifik kanal benzeri yapılar içinde organize olmuş gruplar içinde bulunmuşlardır. *İn-vivo* olarak; PECAM-1 (+) hücreler immunosupresif farelere transplante edildiklerinde bu hücrelerin mikrodamarlar oluşturdukları gözlenmiştir. İnsan damarlarının bir kısmında lümen içinde fare kan hücreleri mevcuttur.

Bu durum, söz konusu hücrelerin fonksiyonel olduğunu düşündürmektedir (Levenberg ve ark.2002). Flk-1'in varlığı, farklılaşmamış insan EKH kültüründe daha önceden diferansiye olmuş hücrelerin varlığını yansıtabilir çünkü optimal koşullarda bile insan EKH'lerinin spontan bir şekilde diferansiye olabileme olasılıkları daha fazladır. İnsan ve fare EKH'lerinin pre-implante edilmiş blastosistlerden izole edilmiş olmalarına ve pek çok ortak özelliği paylaşımlarına rağmen, bu iki hücre grubu hücre yüzeyi markırları ve lösemi inhibitör faktörüne duyarlılık gibi çeşitli özellikler açısından hala farklılık göstermektedirler (Reubinoff ve ark.2000, Thomson ve ark.1998). Dolayısıyla bu hücrelerin, kardiovasküler sistem diferansiyasyonunun çeşitli yönleri açısından farklılık gösterebileceklerini söylemek mantıklı olacaktır .

## **KÖK HÜCRE ve KARDİYOLOJİ**

Kardiovasküler tıp alanında yaşanan pek çok dönüm noktasına rağmen, kalp krizinin komplikasyonları ve özellikle de progresif konjestif kalp yetmezliğinin gelişimi tüm dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil etmeyi sürdürmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde kronik kalp yetmezliği toplam olarak 4.8 milyon kişiyi etkilemekte olup her yıl 400.000 yeni vaka tespit edilmektedir. Farmakolojik tedavilerde, kardiovasküler cerrahi alanında, mekanik destek cihazlarında ve organ transplantasyonunda yaşanan gelişmelere karşın klinik olarak bariz kalp yetmezliği bulunan hastaların yarısı tanı konduktan sonraki 5 yıl içinde ölmektedir. Hasara uğramış olan myokardın fonksiyonel olarak restorasyonu önemli bir zorluk olarak kalmaya devam ettiği için, postinfarktüs döneminde kalp yetmezliğinin gelişmesini engellemeye yönelik stratejiler en önemli amaç olmuştur.

İskemik ve hipertansif kalp patolojileri gibi çeşitli kronik kalp hastalıkları kardiyomyositlerin irreversibl kaybı ile karakterizedirler. Terminal olarak diferansiye olmuş kardiyomyositlerin kalpte mitotik bölünmeye uğradıklarını gösteren bazı kanıtların bulunmasına karşın, çağdaş kardiolojide genel olarak kabul gören görüş erişkin kardiyomyositlerinin myokardı rejenere edebilme yeteneklerinin bulunmadığı çünkü bu hücrelerin sadece doğum öncesinde proliferasyon gösterdikleri şeklindedir. Bu, canlı kardiyomyositlerin sayısında kalıcı defisitlere yani eksikliklere yol açmakta ve kalp yetmezliğinin gelişip ilerlemesine neden olmaktadır.

Angiotensin converting enzim (ACE) inhibitörleri ve  $\beta$ -adrenerjik blokerler hasta sürveylerini arttırmışlardır ancak bu ilaçlar canlı, atmakta olan hücrelerin yerini tutmamaktadır. Ek olarak; mekanik asistans aletlerinden yapay kalplere kadar değişen çok çeşitli non-farmakolojik tedavilerin gelişmiş olması büyük bir umut vermektedir. Mortalite yine de yüksek kalmaya devam etmektedir ve hastaların uzun vadeli sonuçları henüz belli değildir. Dahası, kalp transplantasyonlarının mortaliteyi azaltmaya katkısı donör organ sayısının azlığı, immunosupresyona bağlı komplikasyonlar ve transplante edilen organ fonksiyonel yetmezliği gibi nedenlerden dolayı oldukça sınırlı düzeydedir.

Kök hücrelerin kullanılması, kalp yetmezliğinin hem önlenmesinde hem de tedavisinde umut vaat etmektedir. En son araştırmalar, embryonik kök hücrelerin kalp yetmezliğini önlemede ve tedavide, yaşayan kalp kası hücrelerine yeni kan damarları desteği sunarak ve hasara uğramış kalp kası hücrelerinin yerine kendileri geçerek faydalı stratejiler sunabildiklerini göstermektedir .

Hasara uğramış olan myositlerin iyileşmesi, kalp kası hücrelerinin rejenere olamaması ve infarktüsle uğramış bölgenin bozulmuş vasküler desteği gibi nedenlerle kısıtlanmaktadır. MI ile ilişkili kalp kası hasarı ortamında kök hücre tedavisinin potansiyel rolününün incelendiği iki çalışmadan birinde farelerde kemik iliği kök hücreleri koroner ligasyon ile indüklenmiş myokard infarktüsü bölgelerine verilmiştir. Sonraki 10 gün boyunca transplante edilen hücreler bölünerek çoğalmışlar ve kalp kası hücrelerine transforme olarak infarktüs alanına göç etmişler ve hasara uğrayan alanın yaklaşık olarak %70'ini kaplamışlardır. Toplam olarak 30 farenin 12'sinde (%40'ı) enjeksiyon sonrasında myokardial onarım görülmüştür. Diğer çalışmada ise insan kemik iliğinde bulunan ve embryonik anjioblast özellikleri olan hücreler, koroner ligasyonla indüklenmiş MI'ı bulunan 2 fareye enjekte edilmiştir. Bu seçilmiş insan kök hücreleri intravenöz yoldan verilmişlerdir. Enjekte edilen hücreler infarktüs bölgesine göç etmişler ve yeni kan damarlarına diferansiye olarak (1) peri-infarktüs bölgesinde hipertrofiye uğramış myositlerde apoptozisin azalmasına (2) canlılığını sürdüren myokardın uzun dönemde kurtarılmasına ve sağ kalımına (3) kollajen depozisyonunda (fibrozisde) azalmaya ve (4) kalp fonksiyonlarında sürdürülebilir bir iyileşmeye yol açmıştır. Bu iki çalışma, post-MI iyileşme ile ilgili iki önemli soruyu kök hücre tedavisinin ne şekilde cevaplandırabileceğini göstermektedir: “Myosit hasarı” ve “yetersiz kan akımı”. Dolayısı ile kemik iliği kök hücrelerinin sub-populasyonlarının spesifik bir şekilde izolasyonu şunlardan birinin özel olarak hedef alınması ile sonuçlanabilir: (1) kalp kası rejenerasyonu veya onarımı (2) neo-vaskülarizasyon. Bu çalışmaların altını çizdiği bir diğer nokta da, kök hücrelerin hastanın kendi kemik iliğinden izole edilebilme potansiyelinin bulunması ve bunun da potansiyel immünolojik etkilerin ortaya çıkması ve immunosupresyon riskinin ortadan kalkmasıdır. Üstelik, bu hücrelerin otolog doğada olması nedeniyle etik sorun da oluşmamaktadır.

### **Infarktüs Sonrası Ventriküler Re-Modeling**

Myokard infarktüsü (MI) sonrasında kalp yetmezliğinin en önemli nedeni sol ventrikül (LV) re-modelingidir. Bu süreç, başlangıçtaki infarktüs alanının progresif bir şekilde genişlemesi ve LV lümeninin dilatasyonu ve myokardiumun, ventrikül duvarında bulunan fibroz doku ile yer değiştirmesiyle karakterizedir. Re-modeling işleminin bir diğer önemli bileşeni ise myokardial infarktüs skarında neoanjiogenezis gelişimidir ki bu süreç, latent durumda bulunan kollajenaz ve diğer proteinazların aktivasyonunu içermektedir. Normal koşullarda, infarktüs yatağında meydana gelen neoanjiogenezisin katkısı, kontraktil kompanzasyonu sağlayacak doku büyümesi için yeterli değildir ve hipertrofiye uğramış ve canlılığını henüz sürdüren myokardın artan ihtiyaçlarını da karşılamaktan uzaktır. Hipertrofiye uğramış olan myositlerde oksijen ve nutrientlerin nisbi yokluğu, diğer açılardan canlı olan myokardın ölümünde önemli rol oynayan bir faktördür ve infarktüsün progresif bir şekilde genişlemesi ve fibröz replasman ile sonuçlanmaktadır. Hem hayvanlarda hem de insanlarda infarktüs vasküler yatağının geç re-perfüzyonu ventriküler re-modeling ve sağ-kalım açısından belirgin bir fayda sağlayabildiği için, vasküler yataktaki neo-anjiogenezisin kardiyak fonksiyonları, hipertrofiye uğramış ancak diğer açılardan canlılığını sürdüren kardiyak myositlerin kaybını engelleyerek arttırabileceği öne sürülmüştür .

Myokard infarktüsü, doğası gereği geri dönüşsüz bir hasardır. Myokardial perfüzyonun azalmasıyla bölgesel sistolik fonksiyon ve bölgesel metabolizma bir kaç kalp vuruşu süresi içinde ani olarak azalmaktadır. Bazı hastalarda, global sistolik anomalilerden önce bozulmuş diastolik relaksasyon görülebilmektedir. İrreversibl kardiomyosit hasarı, koroner arter oklüzyonundan 15-20 dakika sonra meydana gelmektedir. Subendokardiyal myokard yüksek metabolik bir gereksinime sahiptir ve bu nedenle iskeminin etkilerine karşı en duyarlı bölgeyi teşkil etmektedir. İnfarktüsün yaygınlığı, perfüzyon defektinin süresine ve şiddetine bağlı olarak değişmektedir. Ancak; infarktüsün yaygınlığını etkileyen başka faktörler de söz konusudur. Bunlar arasında kollateral kan dolaşımı, uygulanan ilaç tedavileri ve iskemik pre-conditioning gibi faktörler bulunmaktadır. Myokardial skarın kontraksiyonu ve fibrozisi dışında non-iskemik myokardın progresif ventriküler re-modeling'i de ilk olayın ardından kardiyak fonksiyonları günler-haftalar içinde daha da azaltmaktadır.

Bugün için klinisyenlerin elinde bulunan medikasyonların büyük bir bölümü, akut MI'lı hastaların prognozunu önemli ölçüde düzeltebilmektedir. Anjioplastinin ve trombolitik ajanların infarktüs nedenini büyük ölçüde ortadan kaldırılabilesine karşın, oklüzyonun başlangıcından re-perfüzyona kadar geçen süre irreversible myokard injurisinin yaygınlığını, derecesini belirlemektedir.

Klinik olarak uygulanan hiç bir yöntemin veya prosedürün, myokardial skarın fonksiyon gösteren kontraktıl doku ile yer değiştirmesini sağlayabildiği gösterilememiştir. Normal kardiomyositlerin rejenerasyonunu sağlayacak yeni tedavilere gerek duyulmaktadır. Deneysel olarak indüklenmiş akut MI'leri onarmak için yapılan son çabalar çok sayıda hayvan modelinde umut verici ancak sınırlı bir başarı oranını göstermektedir. En başarılı sonuçlar, kemik iliği hücrelerinin infarktüs alanına transplantasyonu ve mobilizasyonu sonrasında elde edilmiştir.

İskemik myokardın onarım ve rejenerasyonu sürecinin iki bağımsız sürece gerek duyduğu görülmektedir: (a) İskemik myokarda oksijen ve besin desteği sağlayabilecek kapiller ve daha büyük damarlardan oluşan bir damar ağının gelişimi (b) proliferasyon yapan, fonksiyonel kardiomyositler için yenilenebilir bir doku kaynağı. Bu son hedeflerin başarılabilmesi; kapillerlerin endotel tabakasını teşkil etmek ve oluşan endotel tabakasını destekleyerek kan damarı oluşumunu tamamlamak üzere hem endotelial hem de mezenkimal hücre serisine ait olan kök hücrelerin kullanılmasını gerektirmektedir.

### **İskelet Myoblastları**

İskelet kası, kalbin aksine prekürsör hücrelere sahiptir. Bu hücreler, lokalizasyonları nedeniyle Satellit (uydu) hücreler veya kendilerini yenileme ve diferansiyasyon özelliğine sahip olmalarından dolayı myoblast'lar olarak adlandırılmaktadır ve kas hasarı sonrasında bu hücreler aktive olmaktadır. İskelet kası myoblastlarının yaşam boyunca rejenerasyon olma özelliklerini sürdürme ve kardiomyositlerle karşılaştırıldığında iskeminin etkilerine daha az duyarlı olmaları nedeniyle, injuriye uğramış olan myokardiumu onarmak ve fonksiyonlarını arttırmak amacıyla bu hücrelerin kalbe verilmesi düşüncesi ortaya atılmıştır. İskelet kasına ait olan bu hücrelerin kalbin yaptığı işi yapabilme potansiyeline sahip oldukları, iskelet kasının elektriksel depolarizasyon ve kardiyak aşılama ile indüklenen biokimyasal ve fizyolojik plastisiteleri ile konfirme edilmiştir. Başarılı xenogenik ve allogeneik myoblast transplantasyonlarının bildirilmiş olmasına karşın iskelet kası myoblastlarının potansiyel olarak otolog

orijinli olmasının herhangi bir immunolojik veya etik problem oluşturma olasılığı düşüktür. Bu hücrelerin tanınip kültürlerinin yapılmasındaki ve *in-vitro* olarak çoğaltılmasındaki nisbi kolaylık, klinik kullanıma uygun olmalarına yol açan önemli bir özelliktir .

Chiu ve arkadaşları, köpeklerde myokardial infarktüsün cryo-injury modelinde myoblast transplantasyon çalışmaları gerçekleştirmişlerdir. İmplant yerlerindeki hücrelerin, interkale disklerin varlığı da dahil olmak üzere kalp kasını taklit ettiği görülmüştür . Murry ve arkadaşları cryo-injuriye uğramış olan sıçan kalplerine neonatal iskelet kası myoblastlarını aşılamışlardır. Ancak 3.cü ayın sonunda aşılınmış olan hücreler iskelet kası formasyonu göstermelerine karşın kardiyak-spesifik markırları eksprese etmemişlerdir. Bu durum, kardiyak diferansiyasyonun gerçekleşmediğini göstermektedir. Taylor ve arkadaşları, cryo-injury ile hasara uğratılmış olan tavşan kalbinde otolog iskelet kası myoblastlarının ve dermal fibroblastların transplantasyonunu yaparak fizyolojik düzelmeler sağlamışlardır. Sıçanlarda koroner arter ligasyonu ile indüklenen MI ile ilgili olarak yapılan bir çalışmada Scorsin ve arkadaşları, iskelet myoblastları transplantasyonunun etkilerini incelemişlerdir. Sol ventrikül fonksiyonunun düzelmesine karşın, iskelet hücrelerinin membranlarında gap junction'lar görülmemiş ve bu durum, elektriksel kenetlenmenin gerçekleşmediğini düşündürmüştür .

İskelet myoblastları şu anda zaten klinik olarak kullanılmaktadır. Menashe ve arkadaşları NYHA class III kalp yetmezliği bulunan 72 yaşında bir bayan hastada otolog iskelet myoblastlarının başarılı bir şekilde implante edildiğini bildirmişlerdir. Myokardial skar dokusu tedavi öncesinde; viabilitenin yokluğuyla beraber non-reversibl akinetizi ile karakterize idi. Myoblast aşılmasından sonra akinetik olan duvar kontraktıl ve metabolik açıdan aktif bir hale gelmiş, ejeksiyon fraksiyonu artmış ve hastanın klinik evresi, transplantasyondan sonraki 5.ayda NYHA class II sınıfına gerilemiştir .

Bu çalışmaların kısıtlamaları ve eksiklikleri ile ilgili tartışmalarda, bu hastada iskelet myoblastları transplantasyonunun koroner arter by-pass greftleme ile kombine edildiğini önemle belirtmek gerekir. Bu durum, kalpte sağlanan fonksiyonel iyileşmeyi bir anda başka bir boyuta çekmiştir çünkü kalbe uygulanan by-pass cerrahisi hastanın kliniği üzerinde çok önemli etkilere yol açmış olabilir. Bazı bulguların umut verici olmasına karşın, transplantasyon sonrasında myoblastların uzun dönemdeki sürveyleri ve terminal diferansiyasyonları hakkında çok az şey bilmekteyiz. Ancak myoblast transplantasyonunun kalp yapısı ve fonksiyonları üzerindeki uzun dönemli etkileri yakın bir zaman önce bir çalışmada bildirilmiştir. Bir diğer önemli sorun da transplante edilen myoblastların aritmojenisitesidir. Bu hücrelerin açıkça görünen bir şekilde kardiyomyositlere transdiferansiyasyon olamamaları ve kalptekine benzer bir şekilde komşu hücrelerle sinsisyum oluşturmamaları ventriküler re-entrant aritmiler için yeni bir substrat oluşturabilir çünkü transplante edilen hücrelerin uygun bir şekilde fonksiyon göstermeleri, impulsun yayılabilmesi için komşu konak myositlerle kenetlenmelerini gerektirmektedir. Bu durum, myoblast transplantasyonu ile tedavi edilmiş olan bütün kalp yetmezliği hastalarını implante edilebilir kardiyak defibrilatör için uygun bir aday haline getirebilir. Chiu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışma myoblastların kardiyomyogenik transdiferansiyasyonlarını demonstre etmektedir ancak transplante edilmiş olan myoblastların etiketlenmesinin hemen her zaman için zemindeki dokudan ayırt edilemez nitelikte olması nedeniyle transplante edilmiş hücreleri alıcı dokudan kesin, net

bir şekilde ayırt edebilmek imkansızdır. Reinecke ve arkadaşları tarafından gözlenmiş olduğu gibi, iskelet myoblastları kardiomyositler ile iskelet myotüpleri arasında elektromekanik bileşkeler oluşturarak fonksiyon gösterebilirler .

### **Endotelial Progenitör'ler ve "Terapötik Anjiyenezis"**

Asahara ve arkadaşları, erişkin insanlarda periferik kanın nadir rastlanan endotelial progenitör hücreleri (yani anjioblastları) içerdiğini ve bu hücrelerin, *in-vitro* olarak uygun koşullarda endotel hücrelerine diferansiye olabildiklerini demonstre etmişlerdir. Aynı yazarlar, daha da ileri giderek, çeşitli hayvan modellerinde kemik iliğinden köken alan elemanların *in-vivo* olarak uygulandığında, iskemik dokularda terapötik anjiyenezisi indükleyebildiklerini de göstermişlerdir .

Bu konuda yapılan denemelerde Murohara ve arkadaşları endotelial progenitor hücrelerini, post-natal neovaskularizasyon kapasitelerini test edebilmek amacıyla insan umbilikal kanından elde etmeyi başarmışlardır. Bir sıçan modelinde sol femoral arterin ve venin ligasyonundan sonra bu hücreleri direkt olarak hayvanın uyluğuna enjekte etmişlerdir. Laser Doppler ve immunohistokimyasal analizler; endotel prekürsör hücrelerinin iskemik bacak neo-vaskularizasyonunu ve kan akımını arttırdığını göstermiştir . Kemik iliğinden ve kord kanından alınan endotelial progenitörlerinin kesin niteliklerinin henüz tanımlanmamış olmasına karşın, bu kümülatif raporlar söz konusu yerlerin (kemik iliği ve umbilikal kord kanının) iskemik dokularda kollateral damar gelişiminin artırılması için kullanılacak endotelial progenitör hücrelerin önemli bir kaynağı olabileceğini göstermektedir .

### **Endotelial Progenitörlerin Myokardial Neovaskularizasyondaki Rolü**

Orlic ve ark.'nın yaptığı çalışmalar, erişkin insan kemik iliğinde bulunan ve iskemik dokularda neovaskularizasyonu indükleyen endotelial progenitör hücrelerin kesin doğasını açıklamaktadır. Bu hücrelerin, prenatal dönemdeki kan adacıklarında bulunan hemangioblast'larla aynı fenotipik ve fonksiyonel özelliklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu tür hücreler, gelişmekte olan insan ventral aortasından köken almaktadır ve hem vaskülogenezis'de hem de hematopoiezis'de yer alan hücrelere köken vermektedir. Bu insan endotelial progenitör hücrelerini, yani angioblastları, G-CSF ile kemik iliğinden periferik dolaşıma mobilize edilen elemanlar içinden izole ettikten sonra bu hücreleri, 48 saat önce LAD ligasyonu ve MI geçirmiş olan atimik çıplak sıçanların kuyruk venine enjekte etmişlerdir. İntravenöz enjeksiyonu izleyen 2 hafta içinde, pürifiye edilmiş insan anjioblastlarının uygulandığı sıçanlardan alınan kalplerin histolojik ve immunohistokimyasal incelemeleri infarktüs yatağında yeni damar formasyonunu ve önceden var olan vaskulatürün proliferasyonunu göstermiştir. Neovaskularizasyon; peri-infarktüs bölgesinde bulunan myositlerin apoptozise karşı korunması, canlı myokardın uzun-dönemli kurtarılması ve sürveyi, kollajen depozisyonunda çarpıcı bir azalma ve kalp fonksiyonlarında, kemik iliğinden ya da matür vaskuler endotel elemanlarından köken alan endotel elemanlarının intravenöz enjeksiyonunun uygulandığı diğer hayvanlarla karşılaştırıldığında %30-40 civarında daha fazla olan sürdürülebilir bir iyileşme ile sonuçlanmıştır .

Endotelial progenitör hücreleri konusunda Orlic ve ark.'nın elde ettiği sonuçları teyid eden benzer çalışmalar; yüksek derecede zenginleştirilmiş fare hematopoietik kök hücrelerini veya domuzlarda kemik iliğinden köken alan mononükleer hücre (Kİ-MNH) karışımlarını kullanan gruplar tarafından

fare veya domuz MI modellerinde bildirilmiştir. İlk örnekte, yüksek derecede zenginleştirilmiş ancak heterojen fare hematopoietik ve mezenkimal kök hücre populasyonları MI sonrasında sistematik bir şekilde, ölümcül derecede radyasyona tabi tutulmuş olan farelere enjekte edilmiştir. Bu hücreler iskemik kalp kasına göç etmişler, kardiyomyositlere ve endotel hücrelerine diferansiye olmuşlar ve fonksiyonel doku formasyonuna katkıda bulunmuşlardır. İkinci çalışmada ise; Kİ-MNH, bir domuz iskemik kalp modelinde kollateral perfuzyonu ve bölgesel myokardial fonksiyonu, hem angioblast desteği hem de hücre-kökenli angiogenik ligandların (bFGF, VEGF, Ang-1 gibi) ve sitokinlerin (IL-1, TNF- $\alpha$  gibi) bir karışımını sağlayarak arttırmıştır. Yazarların, Kİ-MNH'nin fibroblastlarda, myoblastlarda veya osteoblastlarda uzun süreli sürvey ve büyüme ile sonuçlanmadığını öne sürmüş olmalarına karşın bu yöntemin güvenliğini desteklemek için uzun dönemli hayvan sürveyanslarına ihtiyaç duyulmaktadır. Açıkcası; regülatuar ve tekrarlayıcı bakış açısından bakıldığında, bu modelde kullanılan hücre ve faktör karışımlarının yerine izole edilmiş sellüler populasyonların ve rekombinant, yüksek derecede purifiye edilmiş proanjiojenik faktörlerin kullanılması, klinik protokollerin dizayn edilmesi gereken durumlarda tercih edilecektir .

### **Myokardial rejenerasyon**

Kalbe transplante edilecek kök hücrelerin kaynağı olarak yakın zamanlarda kemik iliği üzerinde durulmaya başlanmıştır. Bu hücreler proliferasyon özelliklerini sürdürmektedir ve kardiyomyositler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerine diferansiye olabilme özelliğindedirler. Farklı kimyasal maddelerin, kemik iliği hücrelerinin myositlere diferansiyasyonunu indükledikleri bildirilmiştir. Kemik iliği, ES hücreleriyle olanın aksine erişkinlerden kolaylıkla toplanabilmekte ve etik sorunlar olmadan ya da cross-match (çapraz eşleştirme) ve rejeksiyon problemleri olmadan transplantasyon için kullanılabilirler.

Makino ve arkadaşları erişkin bir stromal kemik iliği hücre serisi geliştirmişlerdir. Bu hücreler, 5-azacytidin uygulanmasından 2 hafta sonra myositlere dönüşmüşler ve komşu hücrelerle birleşmişlerdir. Hücreler spontan olarak artmaya ve myotüp benzeri oluşumlar meydana getirmeye başlamışlardır. Diferansiye olmuş hücreler kardiyomyosit-benzeri bir morfoloji ve kardiyomyosit-spesifik immuno-boyanma özelliği sergilemişlerdir. Erişkin sıçan kemik iliği hücreleri de troponin I ve myozin ağır zincir ekspres eden myogenik hücrelere diferansiye olmaları için 5-azacytidine ile indüklenmiş ve ardından isogenik bir konağın cryo-injuriye uğramış myokardiumuna enjekte edilmiştir. Görünürde skar dokusunun içinde kas benzeri hücreler meydana gelmiş, transmural skar dokusu azalmış, söz konusu hücreler troponin I ile pozitif boyanmış ve ventriküler fonksiyonda önemli düzelmeleri indüklemişlerdir . Wang ve arkadaşları donör kemik iliği stromal hücrelerinin, sağlıklı myokard içine implantasyon sonrasında kardiyomyositlere diferansiye olduklarını bildirmiştir. Bu hücreler sarkomerik myosin ağır zincirini ekspres etmişler ve konak dokusu ile gap junction'lar oluşturmuşlardır. Jackson ve arkadaşları, lethal olarak irradyasyona tabi tutulmuş olan erişkin fare populasyonundan alınan yüksek derecede zenginleştirilmiş kök hücre populasyonunu, MI indüksiyonu sonrasında farelere transplante etmişlerdir. Koroner okluzyondan 2 hafta sonra transplante edilen hücreler, kardiyak myofibrilleri oluşturmuşlar, myokardial skar dokusuna yuvalanmışlar ve neovaskularizasyonda önemli



bir rol oynamışlardır . Hücre yuvalanması; dolaşımdaki hücrelerin alıcı dokulardaki spesifik yerlere yerleşmesine yol açan çeşitli hücre-adhezyon molekülleri tarafından düzenlenen hücre-matriks ve hücre-hücre etkileşimleri sürecidir.

MI ile ilgili erişkin bir fare modelindeki rejenerasyon verileri HKH'lerin kardiyak myositlere, endotel hücrelerine ve vasküler düz kas hücrelerine diferansiyel olabilmeye özelliği bulunduğunu ortaya koymuştur. LV myokardiumundaki iskemik hasar; sol koroner arterin (LCA) desendan dalının reperfüzyonsuz bir şekilde bağlanmasıyla oluşturulmuştur. İnfarktüs, myositlerin ve koroner damarların kaybıyla birlikte LV serbest duvarının %70 gibi yüksek orandaki bir kısmını kaplamıştır. Zenginleştirilmiş yeşil floresan proteinini kodlayan geni taşıyan transgenik erkek farelerin erişkin kemik iliklerinden izole edilen Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup> hücreler koroner ligasyonundan sonraki 3-5 saat içinde infarktüs bölgesine komşu olan sağlıklı myokarda 2.5µl hacimde ve 0.15-1x10<sup>5</sup> hücre enjekte edilmiştir. Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup> olan bu subpopulasyon hem kısa süreli repopule edici progenitör hücreleri hem de uzun süreli repopule edici hematopoietik kök hücreleri içermektedir. Transplantasyon sonrasındaki 9. günde kalpler formalin fiksatif ile perfüze edilmiş, parafine gömülmüş ve immunohistokimya, confocal (çift-odaklı) mikroskopi ve FISH analizleri için preparatlar hazırlanmıştır. İnfarktüse uğramış olan kalplerin %40'ı, hasara uğramış myokard dokusunda donör kökenli, eGFP ve Y kromozomu pozitif olan bir band göstermişlerdir. Yeni myokard bandı, infarktüse uğrayan alanın %68'ini kaplamış ve infarkt dokusunun tümü boyunca sağlıklı myokarda doğru yayılmıştır. Bu bandlarda gelişmekte olan myositler küçüktü ve fetal/neonatal kardiyomyositlere benzemektedir. Bu eGFP pozitif kardiyomyositlerin ileri analizleri, bu hücrelerin kardiyak spesifik myosin için ve kalp kasında hem de iskelet myositlerinde bulunan sarkomerik α-aktin açısından pozitif olduğunu göstermiştir. Ayrıca; GATA-4, MEF2 ve Csx/Nkx2.5 gibi myositlere spesifik olan transkripsiyon faktörleri ve connexin 43 gibi yine myositlere spesifik olan diğer proteinleri ve intersellüler komunikasyonun göstergesi olan gap junction/interkale disk oluşumu açısından da pozitifler .

Hücre proliferasyonunun zaman içindeki geçmişi hakkında bilgi veren bir hücre proliferasyon assayinde (testinde), 4 gün süreyle BrdU enjekte edilmiştir. Transplantasyondan 9 gün sonra eGFP pozitif myositlerin yaklaşık olarak %36'sı BrdU pozitif idi. Ayrıca, myositlerin %19'u; sadece aktif olarak döngüde bulunan (hücre siklusunun aktif döneminde bulunan) hücrelerde eksprese edilen bir protein olan Ki67 için pozitifler. Bu bulgular, yüksek düzeyde bir hücre proliferasyonunu göstermektedir.

İnfarktüse uğramış olan myocardda bulunan kan damarlarındaki endotel hücreleri ve düz kas hücreleri eGFP ve Y kromozomu açısından pozitifler ve bu durum, söz konusu hücrelerin donör erkek kemik iliği hücrelerinden gelen kökenini belirlemektedir. Bu hücreler sırasıyla faktör VIII ve düz kas α-aktini açısından pozitifler ve ayrıca BrdU ve Ki67 için de pozitifler. Bu durum, rejenere olan myokardial dokuda neo-vaskularizasyonu göstermektedir.

Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>-</sup> hücre populasyonunun fare kemik iliğini yeniden yapılandıramadığı ve bu yüzden de HKH içermediği daha önceden bildirilmiştir. Bu çalışmada, Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>+</sup> hücrelerin kullanılmasının aksine, 5 x 10<sup>5</sup> hücre gibi yüksek miktarlarda Lin<sup>-</sup>/c-kit<sup>-</sup> hücre transplante edildiği zamanlarda bile myokardial

onarım ile ilgili kanıtlar saptanamamıştır. Bu, kemik iliğinde bulunan HKH'lerin yeni myokardın formasyonundan sorumlu olan hücreler olduğu görüşümüzü desteklemektedir.

Gelişmekte olan myokardın, infarktüse uğramış sol ventrikülün fonksiyonlarını iyileştirip iyileştirmediğini belirlemek için, farelerin öldürüldüğü sırada çeşitli hemodinamik testler gerçekleştirilmiştir. Bu, kanüle edilmiş sağ karotid arteri aracılığıyla sol ventriküle bir basınç-volüm kateterinin yerleştirilmesini de içermektedir. Ortalama LV diastolik basıncı ve gelişmiş LV basıncı, Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>-</sup> kemik iliği hücreleri kullanılarak transplantasyon yapılan kalplerle karşılaştırıldığı zaman %30-40 oranında iyileşme göstermiştir. Buradan; infarktüs alanının yakınında bulunan sağlıklı myokarda enjekte edilen Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> kemik iliği hücrelerinin hasarlı bölgeye göç ettikleri ve myokardı yeniden yapılandırmaya başladıkları sonucuna varılmıştır.

SCF ve G-CSF sitokinlerinin multipl enjeksiyonları dolaşımdaki HKH düzeylerini, tedavi edilmemiş kontrollerle karşılaştırıldığında 250 kata kadar arttırmaktadır. Bu deney dizisinde, sitokinlerin 8 günlük enjeksiyonundan sonra HKH'lerin mobilize olduğunu ve akut şekilde infarktüse uğramış olan myokarda doğru yönelerek burada onarımı arttırdıklarını Orlic ve ark. saptamışlardır. Koroner arter oklüzyonu ile infarktüsün indüksiyonundan 27 gün sonra, mobilize olan stem cell'ler yeni bir myokard bandı rejenere etmişler ve bu yeni band sol ventrikül infarktüsünün %76'sını kaplamıştır. Tedavi edilmemiş olan farelerde iyileşme, tüm infarktüs alanını kaplamıştır. Rejenere olan myositlerin nükleusları Csx/Nkx2.5, GATA-4 ve MEF2 transkripsiyon faktörleri yönünden pozitif idi. Yine myositlere spesifik bir protein olan Connexin 43 ve intermediate filamentler olan desmin ve nestin de yeni myositlerde tespit edilmiştir. Myositler, cerrahiden sonraki 7. günde ortalama olarak 500  $\mu\text{m}^3$ 'e yakın bir volüm sergilemişlerdir. Oysa matür kardiyomyositlerin oranı 1500  $\mu\text{m}^3$  civarında bulunmuştur .

Rejenere olan kapillerler ve arterioller gözlenmiştir. Endotel hücreleri flk-1 ve vasküler endothelium-cadherin pozitif idi. Yeni arterioller, Ki67 ve flk-1 pozitif olan kalın düz kas hücreleri tabakasından meydana gelmekteydi. Rejenere olan myokarddaki bu arteriollerin lümeninde oklüzyondan sonraki 27. günde TER119<sup>+</sup> kırmızı kan hücreleri gözlenmiştir. Bu hücreler, infarktüsden etkilenmemiş olan koroner damarlarla bütünlüğü göstermektedir.

İnfarktüse uğramış olan myokardiumun sitokinlerle mobilize olmuş kök hücrelerle onarımı kalp fonksiyonunda ve sağ kalımda artış ile sonuçlanmıştır. Cerrahiden sonraki 27. günde, sitokin ile tedavi edilen 15 farenin 11'i hayatta kalırken tedavi edilmemiş 52 farenin sadece 9'u hayatta kalmıştır (p < 0.05). Sitokinlerle tedavi edilen farelerde sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu, cerrahi sonrası dönemde zaman içinde progresif bir şekilde artış göstermiştir. Bu artış, sitokin ile tedavi edilmemiş olan farelerde koroner arter oklüzyonundan sonraki 9, 16 ve 24.cü günlerde sırasıyla %48, %62 ve %114 oranında daha yüksek bulunmuş. LV-end diastolik basıncı, LV sistolik basıncı, LV gelişmiş basıncı (LV developed pressure) ve LV(+) ve (-) dP/dt parametrelerinin tümü, tedavi edilmemiş farelerle karşılaştırıldığında sitokinle-tedavi edilmiş farelerde artış göstermiştir . Bu hemodinamik fonksiyonlar infarktüse uğramış olan alanda yeni myositlerin, kapillerlerin ve arteriollerin gelişmesinin bir sonucu olarak meydana gelmiştir. Bu bulgular, transplante edilen kemik iliği hücrelerinin kullanıldığı myokard

onarımı ile ilgili görüşlerimizi daha da genişletmiştir. Bu bulgular; bu non-invaziv tedavi protokolünün fareler tarafından iyi bir şekilde tolere edildiğini ve ayrıca dolaşımdaki otolog kök hücrelerin iskemik kalplerdeki injury yerine yöneldiklerini ve kardiyomyositlerle kan damarlarına köken verdiğini göstermektedir.

Myokard rejenerasyonu ayrıca, erişkin farelerde kimerik kemik iliği oluşturmak amacıyla  $\beta$ -galaktozidaz ile işaretli HKH'lerin kullanıldığı bir fare modelinde de incelenmiştir . Daha sonra, Orlic ve ark. çalışmalarında olduğu gibi LCA ligasyonu ile myokardial infarktüsler indüklenmiştir.  $\beta$ -galaktozidaz pozitif HKH'lerin injury yerine migrasyon yaptıkları ve yeni kardiyomyositlerle endotel hücreleri oluşturdukları gözlenmiştir.  $\beta$ -galaktozidaz pozitif hücrelerin oranının total myokard hücrelerine oranının %0.02 gibi oldukça düşük düzeylerde olmasına karşın bu çalışma, HKH'lerin hasara uğramış myokardiyumu onarmak için doğal ancak çok etkisiz bir yanıt sergilediklerini göstermiştir.

Sitokinle mobilize edilmiş otolog HKH'lerin kullanıldığı fare MI modelinde yaygın rejenerasyon gösterilmiştir. Rekombinant sıçan SCF'sinin ve rekombinant insan G-CSF'sinin 5 günlük enjeksiyonundan sonra dolaşımdaki HKH'ler pik yapmıştır. LCA ligasyonu ile oluşturulmuş olan myokard infarktüsleri yeni bir myokard bandı göstermişlerdir. Yeni myositler, büyüklük ve gen ekspresyonu yönünden fetal myositlere benzemişlerdir. Ancak bu hücrelerin matüre olamamaları ve sürekli proliferasyon olmaları çözümlenmemiş meseleler olarak kalmıştır. Gelişmekte olan çok sayıda kapiller ve arteriol gözlenmiştir ve bunların bazılarının lümeninde kırmızı kan hücreleri görülmüştür. Bu, korunmuş durumdaki koroner arterlerle anastomozların gerçekleştiğini düşündürmüştür. Sitokin tedavisi ile ejeksiyon fraksiyonu, sol ventrikül end-diastolik basıncı ve LV end-sistolik basıncı da dahil olmak üzere çeşitli hemodinamik fonksiyonlarda düzelme sağlanmıştır. Sitokin tedavisi ayrıca, 27.ci günde sürveyin belirgin bir şekilde artış göstermesini de sağlamıştır .

Özet olarak; lokal olarak transplante edilen Lin<sup>-</sup>c-kit<sup>+</sup> kemik iliği kök hücreleri, infarktüse uğramış olan myokardda myositleri ve kan damarlarını geliştirmişlerdir. Benzer şekilde, sitokin ile mobilize edilmiş kemik iliği kökenli kök hücreler de infarktüse uğramış olan myokardı rejenere etmektedir. İnfarktüse uğramış olan myokardın onarımı amacıyla kemik iliği kökenli kök hücrelerinin kullanıldığı bu protokoller erişkin hücrelerde hem kalp fonksiyonlarını hem de sağ kalımı arttırmıştır. Sonuç olarak; kemik iliği kökenli kök hücrelerinin iskemi ile indüklenmiş hasar sonrasında myokardial dokuda ve böbrek ve beyin dokularında rejenerasyon oluşturabilme kapasitesine sahip oldukları söylenebilir.

## **Klinik Çalışmalar**

Klinik olarak yapılan çalışmalardan biri Strauer ve ark.'na aittir. Bu çalışmada kemik iliği hücreleri intrakoronar enjekte edilerek infarkt sahasında küçülme, ventriküler fonksiyonlarda ve myokardiyal perfüzyonda düzelme saptanmıştır. Bu çalışmada kök hücre infüzyonundan önce balon anjioplasti ve stent uygulaması ve koroner arter by-pass operasyonu yapılmıştır .

İngiliz çalışma grubu tarafından yapılan bir diğer çalışmada; myokard infarktüsü geçirmiş ejeksiyon fraksiyonları düşük, 14 hastaya koroner arter by-pass operasyonu sırasında kendi sternumlarından alınan kemik iliği hücreleri myokardın skar alanına enjekte edilmiştir. Operasyon öncesi, operasyondan 6 hafta sonra ve 10.ayda dobutaminli stres EKO uygulanarak hücrel kardiyomyoplastinin bölgesel ve global olarak sol ventrikül fonksiyonları üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda da hem bölgesel hem de global duvar hareketlerinde iyileşme ile kardiyak fonksiyonlarda artış sağlanmıştır. Ayrıca 10 aylık takip süresi boyunca hiçbir hastada ventriküler aritmi gözlenmemiştir .

20 hasta üzerinde otolog progenitör hücrelerin intrakoroner infüzyonu ile yapılan bir çalışmanın (TOPCARE-AMI) ilk sonuçları yayınlanmıştır. Bu çalışma dahilinde ST segment elevasyonlu infarktüs geçiren ve akut koroner reperfüzyonlu stent uygulanan hastaların 9'una kemik iliği kaynaklı, 11'ine ise periferik kan kaynaklı progenitör hücrelerin intrakoroner infüzyonu yapılmıştır. Global sol ventrikül EF'sinde belirgin artış, infarkt alanında duvar hareketlerinde belirgin iyileşme, sol ventrikül end-diastolik volümünde azalma ve remodeling üzerine yararlı etkiler gözlenmiştir. Bunların yanısıra pozitron emisyon tomografisi (PET) ile değerlendirilen infarktli segmentlerde myokardiyal canlılığın belirgin olarak arttığı saptanmıştır .

Almanya'dan Stamm ve ark. 12 hastada 10 gün önce geçirilen MI sonrası CABG ile birlikte kemik iliğinden AC133 pozitif hücreleri ayırarak by-pass sırasında transplante ettiler ve olumlu sonuçlar bildirdiler.

Kore'den Kang ve ark. MAGIC çalışmasında diğer çalışmalarda gözlenmeyen G-CSF ile ilişkili restenoz rapor ettiler ve periferik kök hücre desteğinin kardiyak parametleri iyileştirdiğini rapor ettiler. G-CSF'in bu olası etkisi bizim ve diğer grupların çalışmalarında teyid edilmedi.

Çin'den Ruan ve ark. 20 AMI hastasında kontrol grubu ile karşılaştırmalı kemik iliği kökenli kök hücre transplantasyonu uyguladılar ve 6.ayda kardiyak parametrelerde kontrole göre anlamlı iyileşmeler bildirdiler.

Belçika'dan Bartunek ve ark. 35 AMI hastasında stent takılırken CD133+ hücreleri kemik iliğinden ayırarak verdiler . Myokarda olumlu etkileri olduğunu ama intrakoroner olayları artırdığını rapor ettiler.

Meksika'dan Archundia ve ark. 2005'te G-CSF ile mobilize edilmiş CD34+'den zengin hücreleri 1 yıldan daha eski MI'lı 5 hastaya intramyokardial transplante ettiler ve güvenli, olumlu iyileşmeler bildirdiler.

Zohlhofer ve ark. çok merak edilen bir konuya açıklık getirdiler. 56 AMI'lı hastaya kontrole karşılaştırmalı olarak G-CSF verdiler ve kardiyak parametleri değerlendirdiler. Kontrol grubuyla anlamlı bir fark bulmadılar.

## **Ege Üniversitesi Deneyimi**

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı ve Hematoloji Bilim Dalından Özbaran, Omay ve ark ile kalp nakli bekleyen 'no-hope patient' hasta grubunda 2002-2004'te 6

hastada uyguladığımız otolog hematopoietik kök hücre transplantasyon sonuçları bu alandaki konjestif kalp yetmezliğindeki ilk insan çalışması olup birçok çalışmaya öncülük yaparak yeni bir pencerenin açılmasına neden olmuştur. Bu çalışmaya 35-65 yaş arasında, sistemik hastalığı olmayan EF<%25 , NYHA Class 3-4 olan hastalar alınmıştır. Hastalar çalışmaya alınmadan önce Talyum sintigrafisi, Dobutamin stres EKO ve PET ile değerlendirilmeleri yapılmış ve myokardiyal viabilitenin olmadığı gösterilmiştir. Hastalar 5 gün süreyle 5µg/kg/gün G-SCF ile mobilize edilerek aferez yöntemi ile periferik kök hücre ürünü toplanmıştır. Kök hücre içeriğinde CD34, CD45 ve HLA-DR oranları flowsitometrik olarak değerlendirilmiştir. Kök hücre ürünü elde edilen hastalar operasyona alınarak açık kalp cerrahisi ile infarkt alanına multipl enjeksiyonlar yapılmıştır. Hastaların izlemi; klinik, EKO, Talyum sintigrafisi ve PET ile yapılmıştır. Çalışmada yer alan hastalardan 1'i operasyon dışı nedenle 6.haftada kaybedilmiş, diğer 5 hastada ise 6. ve 12.ay değerlendirmesinde belirgin klinik iyileşme saptanmıştır. Bu hastaların sol ventrikül EF ile NYHA sınıfları operasyon öncesi değerlerine göre belirgin düzelmiştir . Elde edilen sonuçlara bakıldığında, MI sonrası erken dönemde çalışmaya dahil edilen hastalarda gerek klinik, gerekse EKO ve PET sonuçlarının çok daha iyi olduğu gözlenmiştir. Örneğin; çalışmaya dahil edilen 6. hasta, 3 ay önce MI geçirmiş, NYHA Sınıf III, EF %20 iken post-op 12. ayında NYHA Sınıf I , EF %45 olmuştur. Hastanın PET görüntülerinde de anlamlı bir gelişme izlenmiştir . İlk 6 hastanın sonuçları Eur J Cardiothoracic Surgery'de 2004'de yayınlanmış ve 15 hastaya ulaşıp ilk güvenlik çalışması olan bu araştırma sonlandırılmıştır. 15 hastanın verileri değerlendirildiğinde erken dönemde MI geçirmiş hastalardaki transplantasyonun belirgin klinik ve laboratuvar yarar sağladığı görülmüş ayrıca prosedürün güvenli olduğu kanaatine varılmıştır (Transplantasyon 2006 kongresi, gönderilmiş poster).

**İbni Sina Hastanesinden** Akar, Arat, İlhan ve ark. EBMT 2005 'te sundukları çalışmada konjestif kalp yetmezliği olan hastalara kemik iliğinden ayırdıkları mononükleer hücre süspansiyonunu 10 hastaya epikardial transplante ettiler ve kontrol grubu ile karşılaştırarak kardiak parametlerde olumlu sonuçlar rapor ettiler.

## SONUÇ

Erişkin kök hücre plastisitesinin klinikte büyük ölçüde faydalı olabilmesi için, iyi şekilde karakterize edilmiş erişkin pluripotent kök hücrelerin kolay elde edilebilir bir kaynağına gerek duyulmaktadır. Eğer pluripotens özelliği, de-diferansiyasyona neden olan *ex-vivo* manüplasyonlar sonucunda kazanılıyorsa, bu olayların meydana gelme sıklığının ve doğruluğunun arttırılabilmesi için hücre serisi değişiminin altında yatan moleküler mekanizma(lar)ın tanımlanması gerekecektir. Açıklanması gereken tehlikeli bir nokta, de- ve re-diferansiyasyon süreçlerinin her zaman için, aberan diferansiyasyona yol açabilecek ve hatta onkogenik olabilecek istenmeyen genetik değişiklikler olmadan gerçekleşip gerçekleşmeyeceğidir. Pluripotent kök hücreler gerçekten de *in-vivo* olarak mevcutlarsa, bunların doğal ortamı ve proliferasyonları ve/veya diferansiyasyon davranışları ve hasar yerinde toplanma yetenekleri klinik kullanılabilirlikleri açısından önemli olacaktır. Bu ayrıca, klinisyenleri ve bilim adamlarını, var sayılan sakin pluripotent kök hücrelerin *ex vivo* kültürlerdeki

aktivasyon veya *in-vivo* manüplasyon yoluyla re-aktivasyonunun; embriyonal kök hücreleri *in-vivo* olarak transplante edildiklerinde görülen teratomlara benzer bir şekilde kontrol edilemeyen proliferasyonlara ve/veya diferansiyasyon sürecine yol açıp açmayacağını incelemeye itmelidir.

Erişkin kök hücrelerin en önemli avantajlarından birinin, hastadan toplanabilmeleri ve bu nedenle istenmeyen immun yanıtlara yol açmaması olduğu söylenebilir. Ancak, pek çok dejeneratif hastalığın altında yatan mekanizmaların tam olarak bilinmemesi nedeniyle, benzer defektlerin kök hücrelerde de veya onlardan gelişen diğer hücre serilerinde de bulunup bulunmadığı bilinmemektedir.

Çeşitli klinik çalışmaların dünya çapında pek çok merkezde sürdürülmesine rağmen, büyük ölçekli bir klinik çalışmanın rasyonel bir şekilde dizayn edilmesinden önce cevaplandırılması gereken çok sayıda pratik ve bilimsel soru bulunmaktadır. İlk olarak; kardiyak fonksiyonlarda belirgin bir artış elde edilebilmesi için iskemik zonda veya peri-infarktüs bölgesinde yeni kan damarlarının ve yeni kardiyomyositlerin yeterli bir dansiteye ulaşabilmesi için gerekli olacak minimum hücre sayısını belirlemek çok önemlidir. Dolayısıyla akla şu sorular gelmektedir: kalbi onarmak için kaç tane kök hücreye ihtiyacınız olacak? Replasman amacıyla verilen hücreler ne kadar süreyle fonksiyon göstermeye devam edecek? İkinci olarak; iskemik myokardiumdan, kemik iliği kökenli kök hücreleri olay yerine çekmek üzere açığa çıkan kemoatraktan maddelerin tanımlanması da kritik bir önem taşımaktadır. Son olarak; myokard fonksiyonlarında daha fazla artış olması, kök hücre tedavilerinin halen kullanılmakta olan ACE inhibitörleri, kollajen sekresyonunu ve fibroblast proliferasyonunu önlemeye yönelik ilaçlar gibi güncel farmakolojik tedavilerle kombine edilmesi yoluyla başarılabilecektir.

Kök hücrelerin biyolojisinin anlaşılması ve insanlarda kök hücre tedavisinde ortaya çıkan soruları cevaplandırabilmek için çok daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Cevaplanmayı bekleyen tüm sorulara rağmen, kök hücrelerin hastanın kendisinden toplanması, çoğaltılarak hastaya tekrar implante edilmesi yaklaşımı organ transplantasyonu ve immunosüpresif tedavinin yol açacağı sorunlara göre çok daha büyük avantajlar taşımaktadır.

## REFERANSLAR

1. van der Heyden MA, Hescheler J, Mummery CL. Spotlight on stem cells--makes old hearts fresh.*Cardiovasc Res.* 2003 May 1;58(2):241-5.
2. Shablott MJ, Axelman J, Wang S, Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells.*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13726-31.
3. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
4. Semsarian C. Stem cells in cardiovascular disease: from cell biology to clinical therapy. *Int Med J* 2002;32:259-265.

5. Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001 May 4;105(3):369-77.
6. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal kök hücre. *Science*. 1999;284:143-147.
7. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generate from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103:697-705.
8. Liechty KW, MacKenzie TC, Shaaban AF, et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med*. 2000;6:1282-1286.
9. Reyes M, Lund T, Lenvik T, et al. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98:2615-2625.
10. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41-9.
11. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988 Jul 1;241(4861):58-62.
12. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996 Jul 12;273(5272):242-5.
13. Zanjani ED, Almeida-Porada G, Livingston AG, Flake AW, Ogawa M. Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. *Exp Hematol*. 1998 Apr;26(4):353-60.
14. Beltrami AP, Urbaneck K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001 Jun 7;344(23):1750-7.
15. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*. 2001 Jun;107(11):1395-402.
16. Weissman LL. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287,1442-1446.
17. Wulf GG, Jackson KA, Goodell MA. Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol*. 2001 Dec;29(12):1361-70.
18. Grant MB, May WS, Caballero S, et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002 Jun;8(6):607-12.
19. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *TRENDS in Cell Biology*. Vol.12 No.11 November 2002. 502-508.
20. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res*. 2002 Dec 13;91(12):1092-102.
21. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, et al. Cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci*. 2001 Jun;938:208-18.
22. Ferrari G, Cusella-De Angelis G. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998;279:1528-30.
23. Heissig B, Hattori K, Dias S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002 May 31;109(5):625-37.
24. Deten A, Volz HC, Briest W, Zimmer HG. Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res*. 2002 Aug 1;55(2):329-40.
25. Peled A, Petit I, Kollet O. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science*. 1999 Feb 5;283(5403):845-8.
26. Shih CC, Weng Y, Mamelak A, LeBon T, et al. Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population. *Blood*. 2001 Oct 15;98(8):2412-22.
27. Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D. Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med*. 2002 Mar;8(3):268-73.

28. Lavon N, Benvenisty N. Differentiation and genetic manipulation of human embryonic stem cells and the analysis of the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med*. 2003 Feb;13(2):47-52.
29. American Heart Association. 2001 Heart and Stroke Statistical Update, Dallas, Texas.
30. Hassink RJ, Brutel de la Riviere A, Mummery CL, Doevendans PA. Transplantation of cells for cardiac repair. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Mar 5;41(5):711-7.
31. US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health: Stem cells: Scientific Progress and Future Research Directions, Bethesda, Maryland, 2001.
32. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr 5;410(6829):701-5.
33. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med*. 2001 Apr;7(4):430-6.
34. Kocher AA, Schuster MD, Bonaros N, Itescu S. Use of stem cells for treatment of cardiovascular disorders. *Eur Surg*. 2002; Vol 34(2), 111-113.
35. Pfeffer MA. Left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Annu Rev Med*. 1995;46:455-66.
36. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hume MT, et al. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant*. 2000 May-Jun;9(3):359-68.
37. Van Meter CH Jr, Claycomb WC, Delcarpio JB. Myoblast transplantation in the porcine model: a potential technique for myocardial repair. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995 Nov;110(5):1442-8.
38. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg*. 1995 Jul;60(1):12-8.
39. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest*. 1996 Dec 1;98(11):2512-23.
40. Taylor DA, Atkins BZ, Hunspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*. 1998 Aug;4(8):929-33.
41. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT. 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.
42. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001 Jan 27;357(9252):279-80.
43. Ghostine S, Carrion C, Souza LC, et al. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I131-6.
44. Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol*. 2000 May 1;149(3):731-40.
45. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3422-7.
46. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434-438.
47. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and



- survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10344-9.
48. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone Marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplantation*. 2003;7(3):86-8.
  49. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Med Klin*. 2003 Dec 15;98 Suppl 2:14-8.
  50. Dib N, McCarthy P, Campbell A, et al. Safety and efficacy of transplantation of autologous bone marrow into scarred myocardium for the enhancement of cardiac function in man. *Circulation* 2002; 106(Suppl 2):19;462.
  51. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17.
  52. Ozbaran M, Omay SB, Nalbantgil S, et al. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004 Mar;25(3):342-50.
  53. Omay SB, Şahin F. Kök Hücre Plastisitesi ve Kardiyoloji. *Kardiyoloji*. Editör: J Cordan. Uludağ Üniversitesi. Bursa 2005. Sayfa 541-558
  54. Stamm et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Torac Cardiovasc Surg*. 2004 52(3):152-8
  55. Akar et al. Transepical implantation of autologous bone marrow mononuclear cells to ungraftable coronary territories for patients with ischemic cardiomyopathy: safety, efficacy and outcome. *BMT* 35,supp.2, s76,2005
  56. Ruan et al. Assessment of left ventricular segmental function after autologous bone marrow stem cells transplantation in patients with acute myocardial infarction by tissue tracking and strain imaging. *Chin Med J* 118:1175,2005
  57. Bartunek et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 2005, 112:1178-83
  58. Archundia et al. Direct cardiac injection of G-CSF mobilized bone-marrow stem cells improves ventricular function in old myocardial infarction. *Life Sci*. 2005, 78:279-83
  59. Zohlnhofer et al. REVIVAL-2 Stem cell mobilisation by G-CSF in patients with AMI. randomized controlled trial. *JAMA*, 2006, 295:1003-10