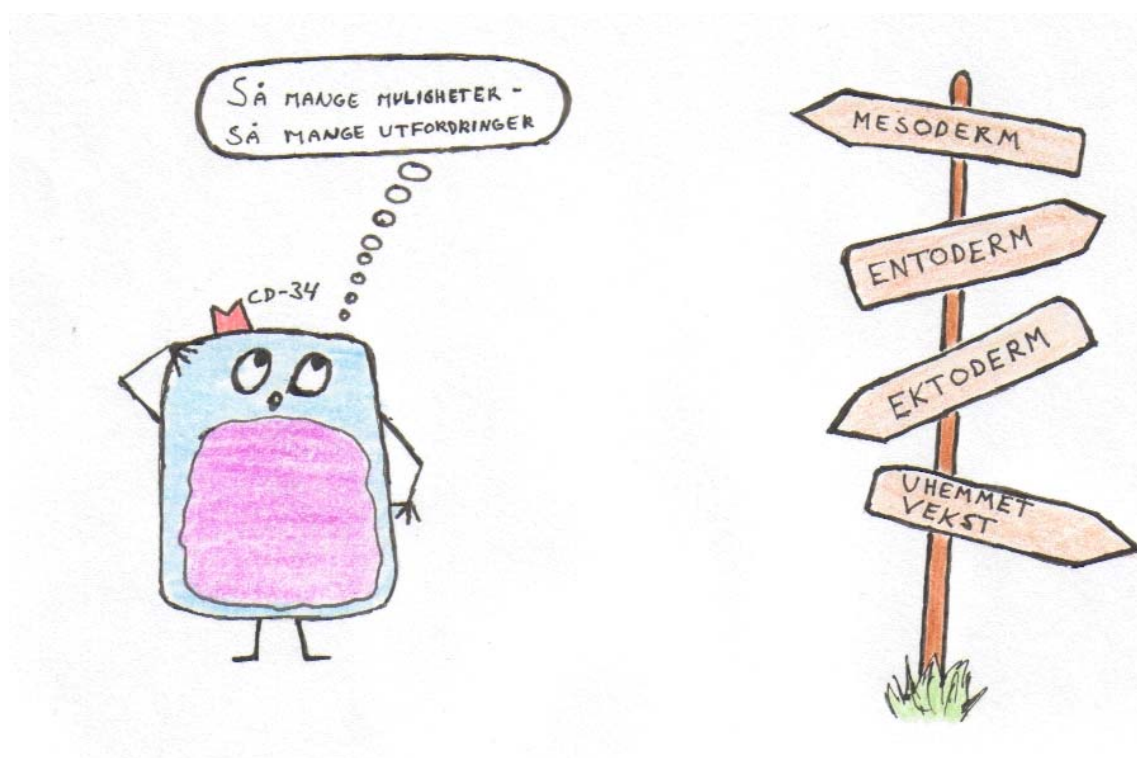


STAMCELLETHERAPI I KARDIOLOGIEN



Obligatorisk skriftlig oppgave i det medisinske
embetsstudiet

Student: Kim Øivind Larsen, kull H01

Fullført høsten 2006

FORORD

Jeg vil benytte anledningen til å takke min hovedveileder professor dr.med. Arnfinn Ilebekk for meget god og tålmodig veiledning. Han har vært en uvurderlig støtte faglig, og han har gitt mange gode råd og tips underveis i oppgaven.

BAKGRUNN FOR VALG AV TEMA

Våren 2004 hadde jeg et engasjement som forskerlinjestudent ved Institutt for Eksperimentell Medisinsk Forskning. Målet for forskningsperioden var å finne frem til den eller de faktorene eller prosedyren som best mobiliserte hensiktsmessige stamceller til perifer sirkulasjon etter et hjerteinfarkt, og om disse stamcellene kunne differensiere til fungerende kardiomyocytter. Det var en eksperimentell studie på gris som blant annet innebar kirurgiske inngrep med innlegging av vaskulær aksess port (VAP).

Engasjementet ble avsluttet etter eget ønske etter kun seks måneder, hovedsakelig på grunn av metodiske problemer med å få til en god telling av hematopoietiske stamceller hos gris ved hjelp av flowcytometri. Disse metodiske problemene førte til langsommere progresjon enn forventet, og av hensyn til studiene fant jeg det mest forsvarlig å avslutte forsøksserien.

Selv om mangelen på progresjon var frustrerende, fikk jeg gradvis en økende kunnskap om og interesse for stamceller. Det er et meget spennende felt som, etter mitt skjønn, har potensiale til å revolusjonere medisinsk behandling. I tillegg har stamcelleterapi etiske og filosofiske implikasjoner som bare gjør det mer spennende. På bakgrunn av dette var valget av oppgave for meg innlysende, og det er et tema jeg kommer til å følge interessert med på også i fremtiden.

DEFINISJONER

Allogen: Brukes om celler som er fra samme art, men som er ulike antegenetisk. Jfr. Autolog.

Apoptose: Programmert celledød.

Autolog: Brukes om celler som stammer fra samme individ

Dedifferensiering: Brukes om cellers eventuelle evne til å differensiere bakover i cellerekken, dvs i *mindre* spesialisert retning.

Ektoderm: Ytre kimblad, ofte kalt blastulalaget i embryonalstadiet som utvikler seg til kroppens ytre vev, hud, negler, hår, nervesystem og de viktigste delene av sanseorganene.

Entoderm: Indre kimblad, som gir opphav til epitelet i farynx, og resten av respirasjonsorganene, med unntak av nesene. I tillegg stammer fordøyelsesorganene og blæren fra dette kimlaget. Synonymt med endoderm, endoblastlaget og hypoblastlaget.

Hematopoietisk stamcelle (HSC): Tradisjonelt forstått som en progenitorcelle som gir opphav til cellene som normalt finnes i blod, dvs. de lymfoide og myeloide celler.

Kardiale chimerismer: Brukes i denne oppgaven om hjerter som inneholder både celler med Y – kromosom i kjernen, og celler som ikke har Y – kromosom. En chimer er en organisme med vev som stammer fra to eller flere ulike zygoter.

Mesenchymale celler: Celler som stammer fra det mesodermale cellelaget.

Mesoderm: Det midtre av de tre kimlag. Gir opphav til bindevev, ben, brusk, muskler (bl.a. hjertet), blod, blodårer, lymfatisk vev, pleura, pericard, peritoneum, nyrer og gonadene.

Nekrose: Lokal celle- og/eller vevsdød som kan ha mange forskjellige årsaker.

Progenitorcelle: Når en stamcelle deler seg danner den én eksakt kopi av seg selv og én mer differensiert celle som kan utøve en mer spesialisert funksjon. Den sistnevnte betegnes progenitorcelle.

Stamcelle: Se utførlig forklaring på side 7.

SPECT: Forkortelse for “Single photon emission computed tomography”.

Totipotent celle: Brukes i praksis om celler som har evnen til å utvikle seg til hvilken som helst celletype.

Transdifferensiering: Beskriver evnen til å differensiere i en annen celleretning enn først predikert. For eksempel hematopoietiske stamcellers mulige evne til å differensiere i ikke – hematopoietisk retning.

Zygote: Befruktet eggcelle.

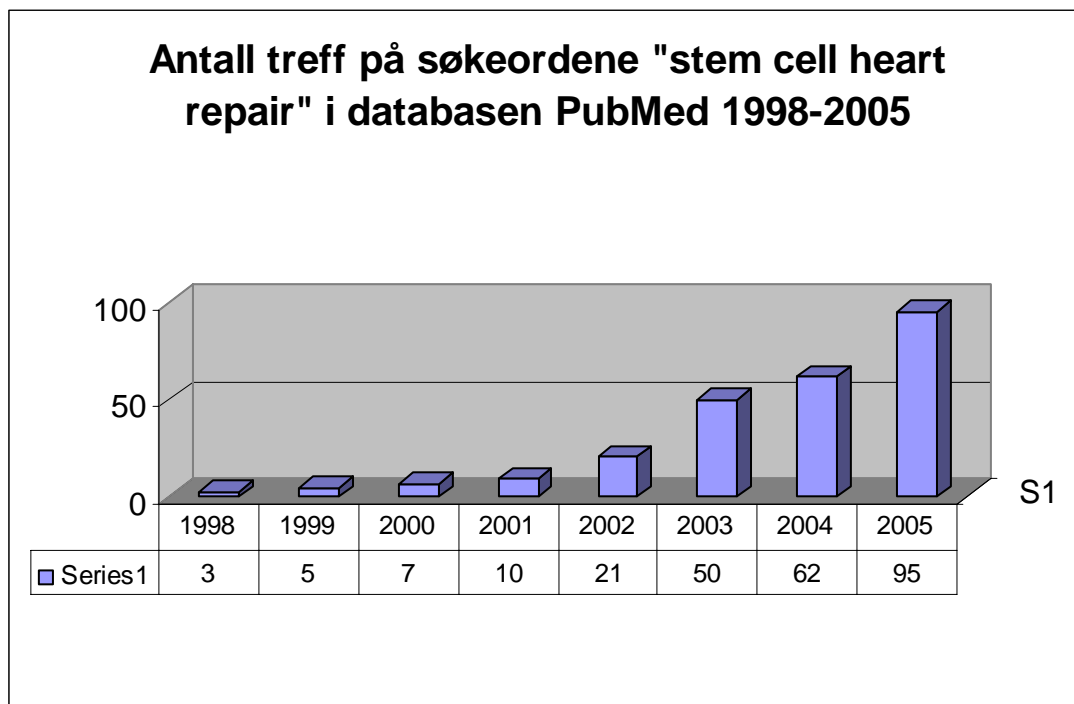
INNLEDNING

Sykdomstilstander som medfører nedbrytning av celler og vev omtales ofte som degenerative lidelser. Vi har i dag begrensede muligheter til å behandle disse lidelsene, og de kardiologiske degenerative lidelser er i så måte intet unntak. Patologiske tilstander som et gjennomgått akutt hjerteinfarkt, hjertesvikt og kardiomyopati er alle tilstander som innebærer tap eller redusert funksjon av hjertemuskelceller, og som akutt eller over tid fører til nedsatt funksjon av hjertet. Dagens behandling av de ovennevnte lidelser går i hovedsak ut på å begrense skaden, og det er få eller ingen muligheter for kurativ behandling. Stamcelleterapi har, i motsetning til dagens behandling, potensial til regenerasjon av tapt vev, og kan, i hvert fall i teorien, tenkes å gjenopprette normal funksjon etter patologi eller skade.

Stamcelleterapi er, i motsetning til hva man kan få inntrykk av i den offentlige debatten, ingen ny medisinsk behandlingsmetode. Det har i cirka 50 år blitt brukt allogene benmargsderiverte stamceller i forbindelse med benmargstransplantasjon, og er i dag etablert behandling ved flere maligne blodsykdommer. Videre er stamcelleterapi nå utprøvende behandling ved forskjellige alvorlige immunologiske lidelser som for eksempel multipel sklerose og amyotrofisk lateral sklerose, og eksperimentell behandling ved forskjellige degenerative lidelser i hjerne og hjerte.

Stamcelleterapi innen kardiologien er et relativt nytt forskningsområde, og det har vært en rivende utvikling de senere år (figur 1).

I det følgende vil jeg prøve å redegjøre for hvor langt forskningen på dette fagfeltet har kommet i dag. I tillegg vil mulige bivirkninger, forskjellige typer stamceller, basalbiologiske utfordringer og virkningsmekanismer for mulig effekt bli kort omtalt. Avslutningsvis vil mulige fremtidige implikasjoner av stamcelleterapi innen kardiologien og generelt i medisinen bli kort diskutert.



Figur 1

METODE

Dette er først og fremst en litteraturstudie, som i hovedsak er basert på søk i databasene Medline og Pubmed. Seleksjon av relevante artikler ble gjort i samråd med veileder.

I tillegg har veileders kunnskap, tips og sammendrag fra nylig avholdte forskningsfora innen fagfeltet vært en viktig del av kunnskapsgrunnlaget. Egen kjennskap til fagfeltet har også hatt betydning.

PARADIGMESKIFTER OG HÅP OM NYE BEHANDLINGSMETODER

Hjertet har evne til regenerering av celler

Hjertet ble inntil rundt tusenårsskiftet allment oppfattet som et post – mitotisk organ. Det vil si uten evne til nydannelse av celler (1-3). En konsekvens av denne tidligere forståelsen skulle da være at hjertet hos et nitti år gammelt menneske utelukkende består av hjertemuskelceller som er minst nitti år gamle. Denne oppfattelsen har blitt endret de senere år, og sett i etterpåklokskapens lys kan man si at det er bemerkelsesverdig at hjertets evne til regenerering ikke ble oppdaget og anerkjent på et tidligere tidspunkt. Det har nemlig vært kjent i relativt lang tid at det forekommer mitoser og tap av muskelceller i et friskt hjerte, men dette ble ikke tatt alvorlig nok, eller så innså man ikke konsekvensene. Det er i dag ingen tvil om at mange hjertemuskelceller tapes ved apoptose og nekrose gjennom et langt liv. Det er antydning at dette tapet av kardiomyocytter i det normale hjerte skjer i et tempo som, uten regenerering av nye celler, ville medført at hjertet i sin helhet ville forsvunnet i løpet av et par tiår. Videre er det blitt hevdet at tap og regenerering av celler i hjertet er viktig, og forklarer endring av struktur og funksjon, både normalt og ved patologi (4).

Beltramis publisasjon i 2001 ”Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction” bidro i stor grad til at det ble allment akseptert å forstå hjertet som et organ med evne til regenerering. Forfatterne av denne studien fant i randsonen av et hjerteinfarkt hos mennesker et stort antall mitoser, og at celledelingen var så betydelig at gitt samme delingshastighet over tid, ville de nydannede cellene i teorien kunne erstatte det infarserte området i løpet av tre uker (5).

En nylig publisert artikkel av Anversa og medarbeidere oppsummerer i stor grad status av dagens forståelse med hensyn på hjertets fysiologiske evne til nydannelse, og forfatterne av denne artikkelen hevder at celledelingen i randsonen av et infarkt i akutfasen er 70 ganger høyere enn celledelingen ved normal turnover (6). Denne celledelingen, hvis opprettholdt, ville erstattet celledøden ved et normalt stort infarkt i løpet av 10 dager. Dessverre opprettholdes ikke en slik celledeling, og det er ikke nok å erstatte de tapte cellene, man er også avhengig at de inkorporeres i et fungerende syncytium med de overlevende celler. Videre hevder forfatterne at den fysiologiske erstatningen av normal celledød i hjertet i all hovedsak medieres av lokale øyer av stamceller i hjertet, og at disse stamcellenes evne til regenerering av noe særlig mer enn fysiologisk turnover er begrenset. Trolig skyldes denne begrensningen en forkortelse og dysfunksjon av stamcellenes telomerer. Følgelig kan kronisk hjertesvikt og aldring av hjertet, ifølge forfatterne, sees som stamcellesykdom.

Sirkulerende stamceller gir opphav til nye celler i vev, og disse cellene viser evne til transdifferensiering

Det har inntil nylig vært en allmenn oppfatning innen medisinen at nydannelse av celler i vev i hovedsak skjer ved at celler som allerede finnes i det aktuelle organ gjennomgår en mitose. Denne forståelsen av hvordan de fleste organer opprettholder sitt celleantall har de siste årene

blitt mer nyansert, også innen kardiologien. Nyere data tyder på at sirkulerende celler med stamcelleegenskaper kan spille en viktig rolle for hjertets regenerering av celler. Quaini og medarbeidere fant at så mye som 18 % av kardiomyocytene i et kvinnehjerte transplantert til en mann hadde Y – kromosom i kjernen kun en måned etter transplantasjon (7). Videre er det påvist celler med Y – kromosom i hjertet hos kvinner som har fått transplantert benmarg fra en mann (8). Kvinnene i denne studien har altså normalt hjerte og likevel celler med Y – kromosom i kjernen.

Laflamme og medarbeidere publiserte også i 2002 en studie som kvantifiserte kardiale chimerismer, men de fant, i motsetning til Quaini og medarbeidere, kun 0,04 % kardiomyocytter med Y – kromosom i kjernen (9). Årsakene til denne diskrepans kan være flere, men mest sannsynlig dreier det seg om forskjellig preparering av histologiske snitt, prosessering av prøver og ulik tolking under mikroskopering. Det er uansett ikke kvantiteten av disse cellene som er det mest oppsiktsvekkende, men at det faktisk gir grunn til å tro at det finnes sirkulerende celler som slår seg ned i hjertet og differensierer til hjertemuskelceller og celler i karvegg. Flere studier er gjort på dette fenomenet i transplanterte hjerter, og disse studiene gir grunn til å anta at det reelle tallet på celler som må stamme fra verten og som differensierer til kardiomyocytter kan være i størrelsesorden 0,01 – 1 % (10,11). Det virker rimelig å anta at dette tallet vil kunne variere en del avhengig av hvor lenge etter transplantasjonen tellingen utføres.

Det bør dog nevnes at det finnes flere forskere som ikke er overbevist om de ovennevnte funnene representerer nydannelse av kardiomyocytter fra sirkulerende stamceller. De mener at cellene kan være betennesceller fra verten, som på grunn av metodiske problemer kan være vanskelig å skille fra kardiomyocytter (12). Dette kan forklare Quainis relativt store funn av hjertemuskelceller med Y – kromosom i kjernen. I tillegg bør det nevnes at markørene brukt for å identifisere disse cellene også har vist seg å kunne bli uttrykt på betennesceller, og da spesielt på T – celler (12-14). Videre var Quainis funn faktisk størst i perioden 4 -28 dager, med fallende antall fra 28 dager til ett år etter transplantasjonen. Perioden 4 - 28 dager sammenfaller med den tiden da det er størst risiko for tidlig akutt organavstøtning, og det følgelig er størst antall betennesceller.

Det faktum at bevisbyrden for at det skal komme til et paradigmeskifte innen medisinen skal og bør være betydelig, samt at funnene så langt ikke er helt entydige, taler for en fortsatt sunn skepsis til om og i hvilken grad sirkulerende celler differensierer til kardiomyocytter i et voksent og ikke - transplantert hjerte. Det er likevel, etter min tolking av litteraturen, ikke urimelig å anta at dette faktisk skjer, om enn i liten grad. Videre ser jeg for meg at man, ved hjelp av mer moderne molekylærbiologiske metoder, i løpet av relativt kort tid vil enes om at det skjer og at man vil komme til enighet om størrelsen på dette fenomenet. Det store spørsmålet er nå, etter mitt syn, om denne prosessen kan utnyttes klinisk.

Det er holdepunkter for at disse sirkulerende stamcellene ikke bare er viktige i den fysiologiske regenerering av nye kardiomyocytter, men at de også er en del av en naturlig respons ved tap av hjertemuskelceller som nekrotiserer i forbindelse med patologi, og at dette systemet med selvreparering blir utilstrekkelig ved betydelig skade, som for eksempel et hjerteinfarkt (15,16). Dette gir håp om at man i terapeutisk øyemed kan potensere en mekanisme som kroppen allerede bruker.

Det er viktig å presisere at det her antagelig er snakk om en generell mekanisme i kroppen, og at det ovennevnte ikke er begrenset til hjertet. Det virker som om sirkulerende stamceller ikke er begrenset til å differensiere til mesodermale celler, men at de også kan utvikle seg til å bli både ento- og ektodermale celler (8,17-19).

Ny biologisk kunnskap fører til forsøk på og håp om nye behandlingsmetoder

De ovennevnte paradigmeskifter har ført til en rekke forsøk på å finne nye og mer effektive måter å behandle myokardskade. Viktige bidrag i denne forbindelse er Orlics publikasjoner i 2001. Den første var "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium.". I denne studien på mus fant Orlic og medarbeidere at stamceller fra benmargen differensierte til kardiomyocytter når de ble injisert lokalt i randsonen til det iskemiske området etter at et infarkt var induisert (20).

Den samme gruppen publiserte bare noen måneder senere samme år artikkelen "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.". Også denne studien var på mus, og den viste at stamceller, mobilisert fra benmargen ved hjelp av cytokiner, reduserer dødelighet og induserer reparasjon av myokardskade etter et hjerteinfarkt (21).

De to ovennevnte studier førte til at det ble startet kliniske forsøk på mennesker hvor man bruker stamceller i behandlingen av hjerteinfarkt. Hvorvidt dette kunnskapsgrunnlaget er godt nok, og om dagens humane forsøk er premature, vil diskuteres senere i oppgaven, men før dette vil jeg gjøre kort rede for stamceller generelt, og hvilke celletyper som er aktuelle i kardiologisk terapi per dags dato.

HVA ER EN STAMCELLE?

Generelt

Stamceller er lite differensierte celler som har muligheten til å utvikle seg til flere forskjellige celletyper. Et absolutt krav for å bli definert som en stamcelle er egenskapen til asymmetrisk celledeling (22-24). Dette vil si at hver gjennomgått mitose danner en eksakt kopi og en progenitorcelle som kan utøve en mer spesialisert funksjon. En slik måte å gjennomgå mitose på sikrer at reservoaret av stamceller ikke blir redusert ved celledeling.

Hierarki av potensial

Øverst i hierarkiet er den totipotente cellen. Dette er foruten den befruktete eggcellen også etterkommerne av de to første celledelingene. Disse cellene har kapasitet til å bli både embryo og placenta. De pluripotente cellene derimot, har potensial til å utvikle seg til celler fra alle tre kimlag, men ikke embryo da de ikke kan danne placenta med tilhørende støttevev.

Neste trinn er den multipotente cellen som finnes i de fleste vev og som kan differensiere til et begrenset antall cellelinjer nødvendig for det aktuelle organ (25). Flere nivåer og begreper eksisterer, for eksempel unipotent, bipotent, linjespesifikk progenitorcelle med flere, men disse begrepene brukes ikke entydig og vil ikke bli nærmere omtalt.

Rigid og kunstig inndeling

Det er, etter min mening, grunn til å være kritisk til en slik inndeling. Stamceller er antagelig langt mer plastiske og påvirkelig av ytre faktorer enn man tidligere har trodd, og den rigide oppfattelsen av hvilke celler som kan bli hva, vil etter mine antakelser måtte skrives om i kommende medisinske lærebøker. Det er for eksempel tvilsomt om multipotente stamceller er begrenset til bare å kunne utvikle seg til cellelinjer i det aktuelle organ der de påvirkes.

Det virker sannsynlig at hver type stamcelle har sitt mikromiljø som i all hovedsak bestemmer aktiviteten, og hvis man flytter en stamcelle til et nytt miljø er det holdepunkter for at den vil utvikle seg i retning av det nye miljøets fenotype (26-29). Effektorene i dette mikromiljøet er antagelig utskilte løselige faktorer (vekstfaktorer), membranproteiner som krever celle til celle kontakt og celleadhesjonsmolekyler (25,30).

Det er endog vist at endoteliale progenitorceller via trans- eller de-differensiering kan utvikle seg til funksjonelt aktive kardiomyocytter under påvirkning av hjertemuskelceller, noe som ifølge tidligere forståelse ikke var mulig (31,32).

AKTUELLE STAMCELLER I KARDIOLOGISK TERAPI

”Hematopoietiske” stamceller (HSC)

HSC er kanskje de best karakteriserte og undersøkte stamcellene i dag (33). Det er også disse cellene som, med unntak av embryonale stamceller, så langt har vært mest lovende når det gjelder evne til transdifferensiering (34,35). Det er, som tidligere nevnt, holdepunkter for at HSC kan differensiere ikke bare til forskjellige mesodermale celler, men også til ento- og ektodermale celler. Dette gjør at det er rimelig å stille spørsmål om nomenklaturen på disse stamcellene er misvisende.

Åpenbare fordeler med HSC er at de er velkjente celler som man har lang erfaring med fra behandling av pasienter med blodsykdommer. Følgelig er det utviklet gode prosedyrer og betydelig kjennskap til disse cellene over tid. Andre fordeler er at de, hvis gitt til samme individ, er autologe, og derfor ikke gir avstøtningsreaksjon. Videre har HSC en enorm evne til proliferasjon, og det er anslått at det hos mennesker er omtrent 50 millioner HSC, som igjen kan generere opp til 10^{13} modne blodceller over et livsløp (36). Det er vist hos mus at en enkelt HSC kan regenerere og vedlikeholde hele det lymfohematopoietiske system etter transplantasjon til en bestrålt vert (37-39). I tillegg er det data som indikerer at disse cellene mobiliseres fra benmarg til perifer sirkulasjon i forbindelse med akutt hjerteinfarkt (40). Dette gir, etter min mening, grunn til å tro at disse cellene er en del av kroppens naturlige, men utilstrekkelige forsøk på å begrense eller reparere myokardskaden. Wojakowski og medarbeidere fant at antallet CD34+ celler (èn av flere markører for HSC) i perifer sirkulasjon var signifikant høyere hos pasienter med akutte hjerteinfarkt enn de med kronisk hjertesykdom. Videre fant de at det var flest HSC i sirkulasjonen på innkomstdagen, uten ytterlig økning etter ett og syv døgn. Hvis disse dataene viser seg å være riktige, kan de gi en indikasjon på når det er mest hensiktsmessig å tilføre stamceller til pasienter med akutt hjerteinfarkt.

De ovennevnte egenskaper vedrørende hematopoietiske stamcellers evne til å differensiere til kardiomyocytter, samt deres mobilisering til perifer sirkulasjon ved AMI har vært og er omstridt. Nygren og medarbeidere publiserte i 2003 en eksperimentell studie på mus, og konkluderte med at HSC *ikke* transdifferensierer til hjertemuskelceller når de blir injisert i skadet myokard, men at et relativt lite antall av dem fusjonerer med stasjonære kardiomyocytter i randsonen av infarkt. Videre indikerte studien at HSC *ikke* frigjøres fra benmarg til perifer sirkulasjon i forbindelse med et akutt hjerteinfarkt (41). En mulig forklaring på dette kan være at Nygren og medarbeidere kun målte mobilisering av hematopoietiske progenitorceller, noe som betyr at frigjøring av stamceller av ikke hematopoietisk opphav, samt hematopoietiske stamceller som ikke lenger uttrykker de hematopoietiske overflatemolekylene som forfatterne brukte, ikke ble oppdaget. Det er likevel grunn til å ta denne studien alvorlig. Det er totalt sett en god studie, og det ble brukt avanserte metoder og arbeidet er publisert i et meget anerkjent tidsskrift, og understreker det faktum at vår kunnskap om mobilisering og differensiering av disse cellene fortsatt er meget mangelfull.

En av ulempene med HSC er at de bare kan høstes i et begrenset antall. Ved høsting fra blodbanen må man i tillegg til isolering og rensing amplifisere dem *ex vivo*. Alle disse prosedyrene kan medføre en uhenktsmessig påvirkning av cellene og differensiering i feil retning og skade cellenes evne til homing i det skadde vevet (42). Ekstraksjon av celler

direkte fra benmargen gir kvantitativt flest HSC, og kan gjøres i lokalanestesi, men det er et større inngrep enn en intravenøs prosedyre. Alternativt kan man mobilisere HSC fra benmargen ved bruk av cytokiner (slik det gjøres på donor i forbindelse med benmargstransplantasjoner) og høste dem fra blodbanen. En av ulempene ved denne prosedyren er at det er en prosess som tar noen dager, og det er derfor mulig at antallet stamceller i blodbanen ikke har nådd maksimalt antall på det mest optimal tidspunkt. I tillegg er den basalbiologiske kunnskapen ennå for mangelfull til at vi kan si noe om hvordan en slik cytokinmobilisering påvirker stamcellene og sykdomsutviklingen i infarkt. Det er for eksempel mulig at feil kombinasjon, type eller dosering av cytokiner kan påvirke evnen til homing i skadet vev slik at diapedesen ikke skjer riktig sted. Videre vet vi ennå lite om hvordan de aktuelle cytokinene påvirker differensieringen av cellene.

Mesenchymale stamceller fra benmargen

Det finnes flere cellepopulasjoner enn HSC med progenitoregenskaper i benmargen. En av disse er mesenchymale stamceller (MSC). Disse relativt store cellene ble i utgangspunktet oppfattet som støtteceller for de ovennevnte HSC, men de har den senere tid fått mer oppmerksomhet som selvstendige celler. Dette har blant annet medført at deres sannsynligvis store potensial til å differensiere til forskjellige mesenchymale celletyper er blitt bedre kjent (43-46).

De åpenbare fordeler med MSC er at de, som HSC, er pluripotente og kan høstes både fra benmarg og fra perifert blod. Videre har de meget gunstige immunologiske egenskaper som gjør at de trolig ikke medfører en avstøtningsreaksjon hos verten, selv når de høstes fra allogen donor. Denne gunstige egenskapen er sannsynligvis knyttet til et komplekst samspill med vertens T – celler. En slik interaksjon, som trolig skjer via løselige faktorer og direkte celle til celle kontakt, fører til at T – cellen ikke proliferer slik den normalt gjør når den kommer i kontakt med celler med fremmed antigenetisk materiale i cellemembranen. Den hemmende effekten på T- cellenes proliferasjon er sannsynligvis en viktig forklaring på hvorfor MSC har slike gunstige immunmodulerende egenskaper (47). Det har riktignok blitt hevdet at evne til å unngå avstøtning er begrenset, og at vertens T – celler vil angripe disse cellene etter hvert som de differensierer til mer spesialiserte celler, fordi de da i økende grad vil uttrykke fremmede MHC II molekyler i den ytre fosfolipidmembranen, og med det gjøre det mer sannsynlig at vertens immunceller avstøter dem. Denne påstanden har på vesentlige punkter blitt tilbakevist av Le Blanc og medarbeidere, som i 2003 publiserte en studie som konkluderte med at hverken differensierte eller udifferensierte MSC fremkalte en alloreaktiv proliferativ lymfocytrespons. Dette støtter antagelsen om at MSC er egnede celler også ved transplantasjon mellom HLA inkompatible individer (48).

Det er gjort en eksperimentell studie på gris, hvor man har injisert allogene mesenchymale stamceller direkte i et infisert område, samt i randsonen. Stamcellene ble injisert 30 dager etter det induserte infarkt, og sammenlignet med grisene som ikke fikk stamcelleinjeksjon var det signifikant bedre hjertefunksjon bedømt ved EF i stamcellegruppen etter 90 dager. Videre var det ingen observerte immunologiske reaksjoner mot de allogene stamcellene (49). Studien er interessant av flere årsaker. For det første indikerer den at stamceller høstet fra et annet individ kan regenerere hjertevev eller på annen måte redusere funksjonstapet etter myokardskade. Videre tyder dataene i studien på at det er god effekt av stamcelleinjeksjon også etter 30 dager, altså i den subakutte fase. I tillegg uttrykte også de injiserte MSC etter 90 dager overflatemarkører som er spesifikke for kardiomyocytter og endotelceller, noe som kan tyde på at allogene mesenchymale stamceller differensierer til fungerende hjertemuskelceller og til celler som bidrar til vaskularisering.

Den ovennevnte modulerende virkning MSC har på vertens immunrespons kan, i kombinasjon med andre gunstige egenskaper disse cellene har, gjøre at de er spesielt godt

egnet i behandlingen av et akutt infarkt, fordi det optimale tidspunkt for infusjon av stamceller etter et infarkt *kan* være så kort tid etter den iskemiske skaden at det i praksis er vanskelig eller umulig å få høstet og dyrket autologe stamceller i stort nok antall. Ved å bruke MSC omgår man dette problemet fordi en på forhånd kan bygge opp en biobank med allogene celler i stort nok antall, likt ordningen man har ved benmargstransplantasjon. Man vil da ha tilstrekkelig antall stamceller som er tilgjengelig for infusjon på kort tid, uten å måtte høste eller dyrke pasientens egne celler.

Det er viktig å understreke at de ovennevnte forsøk med MSC er gjort i dyr, og at det så langt bare er utført én stor randomisert klinisk studie med injeksjon av mesenchymale stamceller i skadet myokard (50). Denne studien vil bli utførlig omtalt senere i oppgaven.

Ulempene med MSC er blant annet de ukjente effektene av isolering, rensing og amplifisering *ex vivo*. Vi vet ikke i detalj hvordan disse prosessene påvirker cellene på lang sikt. I tillegg er det publisert en studie på hunder som indikerer at MSC gitt intrakoronart kan gi mikroinfarkter, trolig på grunn av deres relativ store størrelse (51). Dette er alvorlige funn, men det er viktig å understreke at man så langt ikke har observert bivirkninger av denne type hos mennesker.

Mononukleære celler fra benmargen (mBMC)

mBMC er en fellesbetegnelse på flere celler med stamcelleegenskaper som finnes i benmargen. Eksempler på mBMC er mesenchymale stamceller, hematopoietiske stamceller og endoteliale progenitorceller. Ikke-fraksjonert mBMC er av pragmatiske grunner en av de hyppigst brukte cellegruppene i eksperimentelle og kliniske studier av skadet myokard (52).

Den åpenbare ulempen ved en slik bruk av flere cellyper er at det er svært vanskelig å si hvilke celler som gjør hva, samt om de interagerer på en måte som påvirker resultatet. Videre kan man ikke utelukke at det kun er en liten subpopulasjon av disse cellene som fører til en eventuell klinisk bedring, noe som igjen kan føre til at man tillegger en gruppe celler egenskaper de ikke har.

Endoteliale progenitorceller fra benmargen (EPC)

Dette er som nevnt en cellype som i likhet med mBMC har blitt brukt i flere eksperimentelle forsøk. De har vist seg å kunne transdifferensiere til både endotelceller og til kardiomyocytter, og således bidra til regenerering av skadet hjertevev. Videre har man i forsøk vist at de frigjøres til perifer sirkulasjon fra benmargen i forbindelse med akutt hjerteinfarkt (31,32,53-55).

EPC finnes også i perifer sirkulasjon, men i for lite antall til at man kan høste det nødvendige antall celler. Man er derfor avhengig av å høste dem fra benmargen og amplifisere dem *ex vivo* slik man gjør med HSC og MSC. Følgelig er de utsatt for de samme mulige uforutsette negative påvirkningene som kan redusere deres evne til homing i skadet myokard (42,56).

Det er verdt å nevne at det er utført studier som indikerer at antall EPC, samt deres evne til å indusere angiogenese, er nedsatt hos pasienter med perifer atherosklerotisk sykdom, eller risikofaktorer for dette. Da mange av pasientene som er aktuelle for kardiologisk stamcellebehandling har generell atherosklerose, kan disse funnene, hvis de beskriver et reelt fenomen, bety at EPC er mindre egnet til kardiologisk bruk enn andre stamceller (57,58).

Stamceller i hjertet (CSC)

Lokale stamceller i hjertet, oftest forkortet CSC (cardiac stem cells), er kanskje de mest spennende stamcellene innen kardiologien. De finnes i øyer eller grupper av celler som finnes i voksne hjerter, og de har i forsøk vist evne til å differensiere både til hjertemuskelceller og til endoteliale celler (59-62). Det er også rapportert om forsøk på mus hvor kardial injeksjon

av CSC etter akutt hjerteinfarkt, fremmer dannelsen av kardiomyocytter og endoteliale celler, samt fører til bedret systolisk funksjon (63).

Det er en åpenbar begrensning med hensyn på å benytte CSC i behandlingen av akutt hjerteinfarkt at de må hentes ved et operativt inngrep, isoleres og amplifiseres ex vivo. Videre er det overveiende sannsynlig at stamceller fra benmargen besitter omtrent de samme positive egenskapene som CSC (64).

Skjelettmyoblaster

Skjelettmyoblaster, også omtalt som satelittceller, finnes i skjelettmuskelvev. Satelittceller kan ha en mulig plass i fremtidig behandling av myokardskade eller sykdom, men de kan også forårsake bivirkninger, spesielt rytmeforstyrrelser. Dette har trolig sammenheng med at de *ikke* transdifferensierer til kardiomyocytter. Følgelig uttrykker de andre typer ionekanaler enn de lokale hjertemuskelcellene, noe som antas å være en direkte årsak til ventrikulære arytmier (65-68).

De åpenbare fordelene med satelittceller er at de er lett tilgjengelige, da de kan høstes ved en ordinær muskelbiopsi, og deretter amplifiseres ex vivo. Videre er de, sammenlignet med kardiomyocytter, svært resistente mot ischemi, noe som gjør at de, sammenlignet med andre stamceller, i større grad kan overleve og etablere seg i skadet myokard (56).

Embryonale stamceller og føtale kardiomyocytter

Dette er celler med et udiskutabelt potensial, men de vil på grunn av etiske problemstillinger og politiske og juridiske begrensninger ikke omtales nærmere i denne oppgaven.

Hvilke celler er da best egnet?

Det er, etter min tolkning av litteraturen, ikke holdepunkter for å hevde at noen av de ovennevnte stamcellene skiller seg ut som spesielt mer egnet enn andre. Stamcelleforskning i kardiologien er i sin spede begynnelse, og på tross av at det den senere tid er generert mye kunnskap om disse cellene, er det fortsatt bemerkelsesverdig hvor lite vi faktisk vet om deres funksjon i skadet vev. Videre er det så langt gjort få sammenliknende studier der man ser på effekten av en populasjon stamceller sammenlignet med en annen, og de fleste kliniske studier, med noen unntak, har benyttet ikke-fraksjonerte mBMC, noe som ytterligere vanskeliggjør en sammenligning.

Det vil, etter min mening, i tiden fremover være viktigere å lære mer om hvordan de forskjellige stamcellene påvirkes av vår manipulering, samt hvordan de endrer fenotype og funksjon i sitt nye mikromiljø, enn det er å gjøre sammenliknende studier av effekten av ulike stamceller på for eksempel EF etter et infarkt. Genererer man nok basalbiologisk kunnskap, vil det kanskje være mindre viktig hvilken stamcellepopulasjon man velger å bruke, men i tillegg er man selvfølgelig avhengig av at det utvikles metoder til å påvirke cellenes utvikling i ønsket retning.

KLINISKE FORSØK

De første studiene med bruk av stamceller i behandling av myokardskade på mennesker
Som nevnt danner Orlic og medarbeideres forsøk i 2001 mye av bakgrunnen for påfølgende og pågående kliniske forsøk med stamceller gitt som utprøvende behandling av myokardskade på mennesker.

Strauer og medarbeidere publiserte i 2002 en ikke - randomisert klinisk kontrollert studie som inkluderte 20 pasienter i akutfasen av et hjerteinfarkt. Ti pasienter ble gitt standard behandling, og ti ble gitt standard behandling og autologe mBMC, som, ved hjelp av PCI teknikk, ble tilført intrakoronar i det infarserte området. Etter tre måneder hadde pasientene som fikk stamcellebehandling signifikant mindre infarkt område enn kontrollgruppen ($p < 0,05$), og de hadde også signifikant bedret funksjon i infarkt området ($p = 0,028$). Funksjonen ble bestemt ved hjelp av måling av bevegelsehastigheten i det skadde hjertevevet, og det ble ikke funnet signifikant bedret funksjon i kontrollgruppen (69).

Assmus og medarbeidere publiserte senere samme år en randomisert klinisk studie med 20 pasienter i akutfasen av et hjerteinfarkt. Pasientene ble randomisert i to grupper, hvor en gruppe på ni pasienter fikk intrakoronar infusjon av autologe mBMC, og den andre gruppen på elleve pasienter fikk intrakoronar infusjon av autologe progenitorceller isolert fra sirkulasjonen. Alle pasientene hadde før infusjon av stamceller gjennomgått vellykket reperfusjonsbehandling med innsetting av stent. Resultater fire måneder etter intervensjonen viste at begge gruppene hadde bedring på cirka 9 % i ejeksjonsfraksjon (EF) ($p \leq 0,003$), og bedret regional veggbevegelse i infarktsonen ($P < 0,001$). Resultatene ble sammenlignet med en ikke-randomisert kontrollgruppe på 11 pasienter. Denne kontrollgruppen hadde til sammenligning en bedring i EF på bare ca. 2,5 %. I denne studien er det to grupper pasienter som har fått forskjellige typer stamceller, noe som gjør det mulig å sammenligne effekten av forskjellige stamceller. I denne studien fant man imidlertid ingen signifikant forskjell mellom de forskjellige stamcellepopulasjonene på EF (70).

Disse to ovennevnte studiene var blant de første som indikerte at prosedyren med intrakoronar infusjon av autologe stamceller hos pasienter i akutfasen av et hjerteinfarkt var gjennomførbar og sikker. I tillegg indikerte studiene at det var en mulig positiv klinisk effekt av behandlingen, muligens mediert av regenerering av kardiomyocytter og neovaskularisering, samt en mulig positiv effekt på remodelleringen av hjertet etter et infarkt.

Påfølgende studier

Etter de to ovennevnte studier, som var blant de første kliniske forsøk med stamcelleterapi i behandlingen av hjertesykdom, er det blitt publisert flere andre studier. Fernandez-Aviles *et al.* publiserte i 2004 en middels stor ikke - randomisert studie, med 20 pasienter i intervensjonsgruppen, og 13 pasienter i kontrollgruppen. Det ble gitt mBMC, og disse ble administrert intrakoronar cirka 14 dager etter akutt hjerteinfarkt. Det ble ikke observert noen alvorlige bivirkninger under selve administreringen, og seks måneder etter fant man hos intervensjonsgruppen, bedømt med MR, en signifikant reduksjon av endesystolisk volum og økt ejeksjonsfraksjon, i tillegg fant man økt veggtykkelse av infarkt. Det er ikke publisert resultater fra kontrollgruppen, annet enn at det ikke ble funnet noen signifikant bedring av de ovenfor nevnte parametere (71).

Senere samme år ble det publisert en studie som, i motsetning til de fleste andre studier publisert så langt, ikke fant noen bedring av hjerterfunksjon bedømt tre måneder etter intrakoronar infusjon av mBMC. Dette er en liten studie med kun fem pasienter med gjennomgått akutt hjerteinfarkt, og uten noen kontrollgruppe. Følgelig kan ikke resultatene tillegges like stor vekt som større studier. Like fullt er det, etter min mening, ingen dårlig studie. Man kan derfor ikke overse disse negative resultatene selv om studien er liten. Man fant etter tolv måneder heller ingen bedring av hjerterfunksjon (72).

En annen klinisk studie med lite oppløftende resultater ble publisert i 2005. Studien hadde 19 pasienter i intervensjonsgruppen og 16 i kontrollgruppen. Det ble administrert CD 133+ (en stamcellepopulasjon i benmargen) celler intrakoronar cirka 11 dager etter akutt hjerteinfarkt. Fire måneder etter intervensjon hadde over 47 % av pasientene i stamcellegruppen utviklet restenose eller total okklusjon av den aktuelle arterie. I

kontrollgruppen var det til sammenligning kun 25 % av pasientene som utviklet restenose. To av pasientene i intervensjonsgruppen fikk også en lesjon i den aktuelle arterie. Forfatterne fant 7 % økning av EF i intervensjonsgruppen, mens det i kontrollgruppen var en økning på 4 %. Videre var det økt vevsperfusjon i stamcellegruppen sammenlignet med kontrollgruppen. De ovennevnte funn med hensyn på restenose er urovekkende, men det er viktig å understreke at dette dreier seg om en liten studie (73). Kunnskapsgrunnlaget er for dårlig til å si om dette er et generelt fenomen ved denne typen celler.

Det er også publisert oppfølgingsstudier av den tidligere nevnte artikkel av Assmus *et al.* Studien er utvidet fra opprinnelig 20 pasienter i intervensjonsgruppen til 59, og ett år etter intervensjon er det fortsatt ikke rapportert om bivirkninger som gir grunn til bekymring. En pasient fikk distal embolisering i forbindelse med intervensjon med stamceller, og to pasienter gjennomgikk et nytt hjerteinfarkt i løpet av året, men slike hendelser er ikke unormalt det første året etter gjennomgått akutt hjerteinfarkt. Spesielt oppløftende er det at det ikke ble rapportert om alvorlige arytmier, inflammatoriske prosesser, cancerutvikling eller annen type myokardskade. Hjertets funksjon bedømt ved EF var omtrent uendret fra fire måneders resultatet, altså en konsolidering av en bedring i EF på omtrent 9 %. Som ved fire måneder fant man ved tolv måneder heller ingen forskjell mellom gruppen som fikk autologe progenitorceller og gruppen som fikk autologe mBMC (74). Det er for undertegnede overraskende at det ikke presenteres resultater fra kontrollgruppen, og jeg synes det er vanskelig å vurdere nytten av denne oppfølgingsstudien med hensyn på hjertets funksjon når man ikke får sammenlignet resultatene med pasientene som ikke fikk stamceller initialt. Studien er likevel nyttig fordi den gir en indikasjon om at denne typen og dette antall stamceller gitt intrakoronart noen dager etter infarkt sannsynligvis ikke fører til alvorlige bivirkninger ett år etter intervensjon.

Det er publisert flere kliniske studier som tar for seg stamcellebehandling i forbindelse med et hjerteinfarkt enn de som er nevnt her, og de ovennevnte artikler representerer et selektert utvalg. Imidlertid er de valgt ut etter beste skjønn for å gi et så fullstendig bilde av situasjonen som mulig.

Store randomiserte prospektive studier

I 2003 ble den første prospektive, randomiserte klinisk kontrollerte, studien av noe størrelse presentert (n=60) på American Heart Association kongressen. Selve studien ble publisert i Lancet juni 2004 og besto av to grupper med 30 pasienter i hver gruppe (75). Kontrollgruppen fikk standard infarktbehandling, mens de som ble randomisert til stamcellegruppen fikk intrakoronar infusjon av autologe mBMC i tillegg til standard infarktbehandling. Stamcellene ble injisert cirka fem dager etter symptomdebut. Alle pasientene i begge gruppene hadde først gjennomgått vellykket intervensjon med PCI. Resultatet ble bedømt etter seks måneder ved hjelp av MRI - teknikk av to uavhengige personer som ikke hadde kjennskap til hvilken type behandling pasienten hadde fått, og målingene viste en bedring av EF på cirka 7 % i gruppen som fikk stamceller og under 1 % i gruppen som kun fikk standard behandling (p=0.0026). Studien viste ingen økt risiko for in-stent restenose eller arytmier blant de pasientene som fikk infundert stamceller. Oppfølgingsdata etter 18 måneder viste at bedringen i EF var redusert fra cirka 7 % til cirka 6 % i stamcellegruppen, mens kontrollgruppen viste en bedring i EF fra under 1 % til cirka 3 % etter 18 måneder (76). Følgelig var det etter 18 måneder ikke lenger signifikant forskjell i EF mellom de to gruppene. Dette er, etter min oppfatning, nedslående resultater, men strengt tatt indikerer de ikke noe annet enn at én enkelt dose med ufraksjonerte benmargsderiverte stamceller gitt intrakoronart fem dager etter symptomdebut ikke førte til signifikant bedret funksjon av venstre ventrikkel bedømt ved EF 18 måneder etter intervensjon sammenlignet med en kontrollgruppe. Det er likevel verdt å merke seg at stamcellegruppen hadde ca 3 % bedre EF etter 18 måneder enn i kontrollgruppen. Videre

virker det, med basis i ovennevnte data, rimelig å anta at denne typen stamceller gitt intrakoronart i dette antallet én gang noen dager etter AMI, kan *fremskynde* en bedring i ejeksjonsfraksjon. På den annen side er det antagelig korrekt å si at den observerte differansen i EF mellom stamcellegruppen og placebogruppen de første seks måneder i hovedsak skyldes manglende bedring i kontrollgruppen. Man kan derfor ikke utelukke at de signifikante forskjellene i EF etter seks måneder skyldes en tilfeldig lav bedring av EF i kontrollgruppen, og at det således ikke er snakk om noen fremskyndet bedring på grunn av tilførte stamceller.

Den andre store prospektive randomiserte kliniske studien ble publisert i oktober 2004 (50). Denne studien besto av 69 pasienter med akutt hjerteinfarkt, som etter PCI behandling ble randomisert i to grupper. Den ene gruppen (n=34) fikk intrakoronar infusjon av mesenchymale stamceller fra benmargen (MSC), og den andre gruppen (n=35) fikk intrakoronar infusjon av saltvann. Begge gruppene fikk infusjonen ca 17 dager etter AMI, altså cirka 12 dager senere enn i ovennevnte studie av Wollert og medarbeidere. Etter tre måneder var størrelsen på området av hjertet med funksjonell defekt (estimert ved hjelp av måling av bevegelsehastigheten til hjerteveggen) redusert signifikant i stamcellegruppen ($p<0.05$), men ikke i gruppen som fikk saltvann. Videre var det signifikant økt funksjon i det infarserte området blant pasientene som fikk stamcelleterapi, men ikke i kontrollgruppen. I tillegg var det signifikant økt EF og signifikant bedring av perfusjonen i infarktområdet i stamcellegruppen sammenlignet med saltvanngruppen. Det var ingen rapporterte dødsfall blant pasientene i noen av gruppene, og ingen av pasientene fikk maligne arytmier. Det er beklagelig at denne studien ikke har noen data på eventuelle iskemiske skader på myokard i forbindelse med infusjon av stamceller, da det, som tidligere nevnt, er mulig at MSC kan forårsake mikroinfarkter under og umiddelbart etter intrakoronar administrering av MSC (51).

Janssens *et al.* publiserte 2006 en randomisert dobbeltblind studie med 67 pasienter som hadde akutt hjerteinfarkt med ST-elevasjon (77). Alle pasientene gjennomgikk vellykket PCI-behandling, og alle fikk standard medikamentell behandling. Pasientene ble deretter tilfeldig fordelt i to grupper der én gruppe (n=34) fikk intrakoronar infusjon av saltvann, mens den andre gruppen pasienter (n=33) ble gitt autologe ikke – fraksjonerte benmargsderiverte stamceller intrakoronart. Begge gruppene gjennomgikk prosedyren med ekstraksjon av benmarg. Man fant, hverken etter fire dager eller etter fire måneder, noen signifikant forskjell mellom de to gruppene med hensyn på venstre ventrikkels funksjon (begge gruppene hadde cirka 3 % bedring i EF etter fire måneder). Dog fant man at infarktets størrelse var signifikant redusert i stamcellegruppen sammenlignet med kontrollgruppen. Alle endepunkt ble bedømt med MRI. Det ble ikke funnet noen signifikant forskjell mellom gruppene med hensyn på myokards perfusjon og metabolisme. Det ble ikke rapportert om bekymringsverdige bivirkninger. Dette er, etter min vurdering, en god studie, det er derfor nedslående at man ikke finner noen særlig effekt på venstre ventrikkels funksjon i stamcellegruppen. På den annen side er det, ut fra denne studien, rimelig å anta at stamceller gitt intrakoronart kan bidra til en gunstig påvirkning av hjertets remodelering etter infarkt.

Forskere og klinikere ved Ullevål Universitetssykehus og Rikshospitalet har samarbeidet om en randomisert og klinisk kontrollert studie, der man har inkludert 100 pasienter med akutt hjerteinfarkt (78). Kontrollgruppen (n=50) fikk standard infarktbehandling, og stamcellegruppen (n=47) fikk autologe mBMC intrakoronart cirka seks dager etter symptomdebut. Begge grupper gjennomgikk vellykket PCI behandling ved ankomst sykehuset. Studiens endepunkt var venstre ventrikkels ejeksjonsfraksjon, endediastolisk volum og infarktstørrelse, og disse parametere ble bedømt ved hjelp av MRI, SPECT og ekkokardiografi etter seks måneder. Sammenlignet med utgangsverdier fra dag 4-7 og 2-3 uker, fant man etter seks måneder ingen signifikant effekt på noen av endepunktene sammenlignet med kontrollgruppen. I motsetning til Janssens og medarbeideres studie, gjennomgikk *ikke* kontrollgruppen prosedyren med benmargsekstraksjon og injeksjon av

NaCl. En slik differensiering av gruppene kan tenkes å påvirke resultatet, men det virker rimelig å anta at det i dette tilfellet skulle *favorisere* stamcellegruppen. ASTAMI – studien er en stor og god studie som benytter avanserte metoder for å evaluere resultatene. Videre er det, så vidt meg bekjent, den tredje randomiserte klinisk kontrollerte studien av noen størrelse som bruker uselekterte benmargsderiverte stamceller. I tillegg er det også den eneste store studien som kun har inkludert fremre-veggs infarkt, disse infarktene er de mest alvorlige, og de som lettest lar seg bedømme med funksjonsmåling. Det er derfor bedrøvelig at resultatene i stor grad sammenfaller med Janssens og medarbeideres funn med hensyn på EF, samt oppfølgingsdata på Wollert og medarbeideres studie som antyder at det er liten eller ingen effekt på EF på sikt. Følgelig virker det ikke overilet å anta at funnene i ASTAMI – studien representerer en faktisk manglende effekt av denne typen stamceller gitt intrakoronart i dette antall og til denne pasientgruppen på venstre ventrikkels funksjon.

Studier gjort på kronisk hjertesykdom

Det ble på European Society of Cardiology (ESC) kongressen i Munchen august 2004, presentert resultater fra en studie av Perin *et al.* der de hadde injisert mononukleære benmargsderiverte celler (mBMC) fra lumen av venstre ventrikkel og inn i ischemisk, men viabelt myokard. Studien var en ikke - randomisert prospektiv studie og hadde 9 personer i kontrollgruppen, og elleve personer i terapigruppen. Alle pasientene hadde kronisk ischemisk hjertesvikt og venstre ventrikkel ejeksjonsfraksjon (LVEF) lavere enn 40 %. Etter tolv måneder var det i terapigruppen bedring av NYHA klasse fra 2,2 til 1,4, videre hadde samme gruppen en bedring av Vo₂ maks fra 17,3 til 25,1 ml/kg/min. Kontrollgruppen hadde ingen signifikante endringer på disse parameterne. På tross av de positive resultatene i terapigruppen på NYHA klasse og Vo₂ maks, fant man, som i kontrollgruppen, ingen endring i LVEF målt med ekkokardiografi (79).

Det er viktig å understreke at Perin og medarbeidere i denne studien brukte pasienter med hibernerende myokard. De fleste humane studier hvor man har gitt stamceller til kardiologiske pasienter har vært forsøk med tilførsel av stamceller i den akutte eller subakutte fase etter et infarkt. Teoretisk har dette virket mest fornuftig da man ser for seg at man med en tidlig tilførsel kan begrense dannelsen av et fibrøst arrvev, og i stedet regenerere funksjonelle kardiomyocytter. Kanskje er det svært vanskelig for tilførte stamceller å først fjerne et dannet arrvev, for så å danne fungerende hjertemuskelceller som samarbeider godt med allerede eksisterende celler. Videre er det rimelig å anta at mikromiljøet ved kronisk hjertesykdom påvirker differensieringen av stamceller på en helt annen måte enn ved akutt sykdom. Det er etter min oppfatning ikke en mekanisme med utskiftning av arrvev som ligger til grunn for Perin og medarbeideres resultater på NYHA klasse og Vo₂ maks. Cellene ble injisert i *viabelt* myokard, og det virker rimelig å anta at den kliniske bedringen hos disse pasientene først og fremst skyldes bedret funksjon av hibernerende kardiomyocytter, eller at stamcellene har bidratt til bedre vaskularisering.

Flere studier er gjort med kardial injeksjon av benmargsderiverte stamceller hos pasienter med kronisk hjertesykdom. Blant annet har Fuchs *et al.* og Tse *et al.* publisert kliniske studier hvor effekten av denne typen eksperimentell behandling vurderes (80,81). Kort fortalt fant Fuchs og medarbeidere etter tre måneder en signifikant bedring av pasientenes angina symptomer, samt signifikant bedret utholdenhet på tredemølle. Bedringen av begge disse parametere besto også ved oppfølging etter tolv måneder. I studien deltok 27 pasienter med kronisk hjertesykdom, men dessverre ingen i en kontrollgruppe. Tse og medarbeidere injiserte mBMC kardialt på åtte pasienter med alvorlig kronisk ischemisk hjertesykdom, og de fant etter tre måneder bedring av subjektive symptomer og økt lokal myokardperfusjon, samt bedret funksjon av det ischemiske området bedømt ved MRI. Det ble ikke observert alvorlige bivirkninger i noen av de to studiene.

Assmus *et al.* har også gjort en studie på kronisk hjertesykdom og stamcellebehandling (82). Studien talte 86 pasienter i intervensjonsgruppen og 16 i kontrollgruppen. Intervensjonsgruppen ble delt i to, og 51 pasienter mottok autologe mononukleære celler fra benmargen, og 35 pasienter ble gitt progenitorceller fra perifer sirkulasjon. Cellene ble administrert intrakoronart i begge gruppene. Det ble ikke observert noen alvorlige bivirkninger, og etter tre måneder fant man 3 % bedring av EF hos gruppen som ble behandlet med mononukleære celler fra benmargen. Det var ingen signifikant endring av EF i kontrollgruppen eller hos pasientene som hadde fått progenitorceller.

Det er også gjort flere kliniske studier med transepikardial og transendokardiell injeksjon av satelittceller i kronisk skadet myokard (83-86). Man fant i disse studiene en bedring av EF, samt bedret regional bevegelse av hjerteveggen. Cellene ble injisert fra tre måneder til opptil ni år etter AMI. Følgelig er det i disse fire studiene en veldig heterogen gruppe pasienter totalt sett når en ser på tid for injeksjon av satelittcellene etter hjerteinfarkt. På den annen side er det rimelig å anta at det skadede vevet er ganske sammenliknbart anatomisk og fysiologisk, såfremt man er godt inn i den kroniske fasen etter et infarkt og har fått dannet fibrøst arrvev. Studienes resultater er totalt sett oppløftende. På den annen side kan man ikke utelate å nevne at ventrikulære arytmier er rapportert i flere av studiene. Selv om de ovennevnte studienes resultater virker lovende, er det av flere årsaker for tidlig å konkludere om effekt. Totalt sett er det ikke mer enn 36 pasienter i de refererte studiene, og det eksisterer ikke kontrollgrupper. I tillegg er det mulig at resultatene er påvirket av koronar bypass operasjon, en operasjon 31 av de 36 pasientene gjennomgikk. Følgelig er det, på bakgrunn av de nevnte studier, ikke grunnlag for å konkludere om effekt av satelittceller. Det er derfor behov for store randomiserte kontrollerte studier, men da må man først forsikre seg om at inngrepet ikke induserer maligne arytmier.

Det er publisert flere kliniske studier som tar for seg stamcelleterapi ved kronisk hjertesykdom, og de ovennevnte studier representerer et utvalg. To relativt hyppig siterte artikler om dette temaet er bevisst utelatt av to årsaker. Den ene studien oppgir ikke tidspunkt for administrasjon av stamceller (87), og den andre studien administrerer cellene fra 3 – 12 uker, noe som gjør det vanskelig å definere den som en klar akutt eller kronisk studie (88).

Status kliniske studier

De ovennevnte store randomiserte prospektive studiene har vel dessverre, totalt sett, vist mindre effekt av stamceller enn man hadde håpet etter de innledende kliniske studier av Strauer og medarbeidere og Assmus og medarbeidere. På den annen side har man nå generert både kunnskap og erfaring med praktiske prosedyrer ved denne behandlingen, og man har behandlet flere hundre pasienter med stamceller intrakoronart uten at man til nå har oppdaget alvorlige bivirkninger.

Etter en totalvurdering av de store randomiserte studiene med stamcellebehandling av akutt hjerteinfarkt virker det rimelig å konkludere at resultatene så langt tyder på liten effekt når det gjelder hjertets funksjon bedømt ved EF. Videre er det så langt ingen studier som har vist noen signifikant effekt av mBMC på venstre ventrikkels endediastoliske volum, noe som kan tyde på at uselekterte benmargsderiverte stamceller har liten effekt på remodellering etter AMI.

Det er per dags dato ikke vitenskapelig grunnlag for å implementere stamcelleterapi ved akutt hjerteinfarkt. Like fullt er det oppløftende at det virker å være en viss respons på behandlingen, selv om mekanismene for eventuell effekt er fortsatt meget uklare. Følgelig er det behov for flere og bedre studier, og sist, men ikke minst er det nødvendig med betydelig basalbiologisk forskning. Kanskje må vi på dette stadium gå ett skritt tilbake for senere å kunne gå to skritt frem.

Fremtidige studier bør, etter mitt skjønn, søke å finne svar på hvilken cellepopulasjon som er best egnet, hvor mange celler som bør injiseres, samt om injeksjonen bør repeteres flere ganger. Videre er det trolig viktig å finne ut hva som er det mest optimale tidspunkt for injeksjon, da tidspunkt for administrering av stamceller har variert ganske betydelig i de ulike studiene.

MEKANISMER FOR EVENTUELL EFFEKT

Det er nå altså flere hundre pasienter som har gjennomgått stamcellebehandling av hjertesykdom. Følgelig er det et paradoks at man per dags dato ennå vet svært lite om mekanismer for eventuell effekt. Dette kan synes mindre viktig da det kliniske utbyttet av en behandling, bedømt ved morbiditet, mortalitet og alvorlige bivirkninger, alltid bør stå som det sentrale. For en forsker derimot, bør kunnskap om mekanismer være essensielt. Hvis man har kunnskap om hvorfor en behandling fungerer, vil man, blant annet, lettere kunne gjennomføre målrettede studier, og man vil i større grad kunne forutsi og registrere mulige bivirkninger. Videre vil man i mye større grad kunne optimalisere terapien, samt ha et bedre grunnlag for å kunne anslå om resultatet, som jo ennå er svært usikkert, har klinisk relevans eller ikke. Følgelig er det svært ønskelig at man i fremtidige studier søker å kartlegge mekanismer for en eventuell effekt.

Som nevnt tidligere synes det å være en viss effekt av stamcelleterapi både ved akutt og kronisk myokardskade. Flere teorier er lansert som mulige forklaringer på dette. I starten av de kliniske studier var det, som tidligere referert, forhåpninger om at stamcellene *transdifferensierer til fungerende kardiomyocytter*, og således erstatter skadet vev. Dette er, etter min tolkning av litteraturen, fortsatt en plausibel forklaring. Det er senere publisert flere studier som sår tvil om en slik differensiering forekommer, og som lanserer alternative forklaringer (41,89-91). Nygren og medarbeidere fant i sin studie at det ikke er noen transdifferensiering av betydning, men at et lite antall av stamcellene *fusjonerer med ordinære hjertemuskelceller*. Det er mulig at en slik fusjon kan ha betydning for den antatte effekt av stamcelleterapien. *Bedret neovaskularisering* er også lansert som en mulig forklaringsmodell (92). Videre er det mulig at stamcellene utøver en *parakrin effekt* i hjertet ved å skille ut forskjellige vekstfaktorer som stimulerer den lokale angiogenesen, og det er mulig at endoteliale progenitorceller skiller ut vekstfaktorer som fører til økt overlevelse, proliferasjon og hypertrofi av kardiomyocytter (93,94).

MULIGE BIVIRKNINGER

Det er selvfølgelig oppløftende at det så langt er rapportert få alvorlige bivirkninger, men det utelukker dessverre ikke at man i fremtiden kan utvikle negative sen-effekter av dagens behandling. Kun langtidsstudier kan påvise eventuelle sene bivirkninger, det er derfor viktig å være føre var, og fortsatt ha en sunn skepsis til dagens lovende resultater med hensyn på alvorlige bivirkninger. Mangelfull kunnskap om virkningsmekanismer kan bidra til at potensielle bivirkninger overses.

Det er flere mulige bivirkninger, og en av de mest alvorlige er muligens *utvikling av kreft*. Vi vet lite om hvordan manipuleringen av stamcellene påvirker celledeling og apoptose på lang sikt. Videre vet vi lite om hvordan administrerte stamceller påvirker lokale celler. Det

kan derfor ikke utelukkes at pasienter som har fått stamcelleterapi i fremtiden kan ha en større sannsynlighet for å utvikle cancer, følgelig må man overvåke dette nøye.

En annen mulig bivirkning er, som tidligere nevnt, *mikroinfarkter* sekundært til administreringen av stamcellene. Som nevnt er dette observert hos hunder etter intrakoronar administrering av mesenchymale stamceller, men man har så langt ikke oppdaget denne typen bivirkning med denne typen celler hos mennesker. På den annen side ble det ikke observert spesielt etter tegn til mikroinfarkter i Chen og medarbeideres studie med intrakoronar infusjon av mesenchymale stamceller, noe som gjør at man ikke med sikkerhet kan utelukke at dette også kan forekomme i menneskehjarter (50,51).

Som tidligere omtalt er det i flere studier observert *alvorlige arytmier* etter injeksjon av satelittceller i myokard (83-86). Mer forskning er nødvendig før en kan si med sikkerhet hva disse rytmeforstyrrelsene skyldes. Videre kan man ikke utelukke at pasienter som har blitt behandlet med andre typer stamceller enn skjelettmyoblaster også kan utvikle arytmier som skyldes stamcelleterapi på et senere tidspunkt.

Det er også rapportert om økt forekomst av *restenoser* hos pasienter etter intrakoronar infusjon av stamceller (73). På den annen side er det, så langt, ikke økt forekomst av restenoser blant pasientene som fikk infundert stamceller i de store randomiserte studiene.

De nevnte bivirkninger representerer på ingen måte noen fullstendig liste. Fremtidige negative effekter av dagens stamcellebehandling kan med den nåværende kunnskap ikke forutsies, følgelig må man gjøre grundige oppfølgingsstudier av pasientene som har blitt behandlet med stamceller for å avdekke mulige fremtidige bivirkninger.

AVSLUTNING

Går man for fort frem?

Personlig tror jeg stamcellebehandling vil bli et meget viktig behandlingstilbud i fremtiden, og jeg mener at det kan være lov å håpe på en terapeutisk revolusjon når det gjelder regenerering av tapt eller dårlig fungerende vev. På den annen side er det fortsatt store basalbiologiske utfordringer som må løses. Det er stor risiko for at forventningene til stamcelleterapi har blitt for store for tidlig, med den konsekvens at kliniske forsøk er startet på sviktende kunnskapsgrunnlag og at allmennheten og helsepolitikere har fått et urealistisk bilde av hva helsepersonell kan utrette i den nærmeste fremtid.

En konsekvens av premature behandlingsopplegg kan være negative resultater på kort sikt, med påfølgende sviktende interesse for fagfeltet blant forskere, journalister og bevilgende myndigheter. Selv om resultatene så langt kan tolkes som positive, de rapporterte bivirkningene få, og ønsket om å kunne tilby god behandling fortest mulig påtrengende, er det fortsatt viktig å skynde seg langsomt. Ved å gå for fort frem med kliniske studier risikerer man alvorlige bivirkninger som med mer basalkunnskap kunne vært unngått. Disse bivirkningene vil, i tillegg til den lidelse det medfører for pasienten, kunne føre til mindre tro på, bevilgninger til, og satsing på stamcellebehandling av myokardskade. Hvis noe slikt skulle skje, vil det mest sannsynlig bremse progresjonen innen fagfeltet betraktelig, med det til følge at et lovende terapeutisk alternativ med stort potensial ikke blir etablert så hurtig som det ellers kunne blitt. Da vil man, paradoksalt nok, ha bremset fremgangen ved å gå for fort frem i begynnelsen.

Det er imidlertid lett å forstå at behandlende helsepersonell ønsker å prøve ut nye behandlingsmetoder på pasienter med plager og reduserte leveutsikter. Videre er det jo faktisk

slik at mange av de kliniske forsøkene med stamcelleterapi i behandlingen av akutt hjerteinfarkt så langt har vist oppløftende resultater, og det er rapportert få alvorlige bivirkninger.

Stamcelleterapi i et større perspektiv – potensial og prioritering

Stamceller har i teorien, som tidligere nevnt, et enormt potensial som kausal behandling av en rekke alvorlige tilstander som i dag ikke lar seg kurere, for eksempel de nevrodegenerative lidelser som Parkinsonisme, Alzheimers sykdom, amyotrofisk lateral sklerose med flere. Men det begrenser seg ikke til *behandling* av alvorlig patologi. Det er, etter min mening, ikke usannsynlig, i et lengre perspektiv, at stamceller kan brukes profylaktisk med god effekt til å forsinke nedbrytning av vev som følge av aldring eller skadelig livsstil. Teoretisk sett kan man gjøre dette med høsting, dyrking og innsetting av stamceller i et gitt intervall, eller mobilisere stamceller fra benmargen ved hjelp av cytokiner. Det er selvfølgelig langt fra sikkert at effekten er betydelig når det gjelder forsinkelse av aldring, men det ligger vel dypt i menneskets natur å søke etter alt som kan ligne på en ungdomskilde. Og kanskje kan stamceller være nettopp det for noen år!

En slik tenkt utvikling er selvfølgelig oppmuntrende medisinsk sett, men det reiser både etiske og filosofiske spørsmål som det vil være for ambisiøst å forsøke å gi noen utfyllende svar på her, men selv om man ikke kan gi svarene, kan det likevel være hensiktsmessig å stille spørsmål. For eksempel - hvor etisk er det å bruke store ressurser på avansert stamcelleterapi når millioner av mennesker hvert år dør fordi de mangler relativt billige vaksiner? Det er sannsynligvis urealistisk og naivt å kjempe mot markedskreftene og menneskers sterke ønske om god helse og flere leveår, men det er viktig å påpeke at dette er et *valg* bevilgende myndigheter må ta. Videre vil stamcelleterapi, hvis de mest optimistiske antagelser blir gjeldende, faktisk ha store demografiske konsekvenser. Dette er selvfølgelig ikke noe man kan bruke som argument mot forskning på effektive behandlingsalternativer, men det er viktig å påpeke en slik konsekvens, slik at den kan brukes i prognoser og samfunnsplanlegning forøvrig.

REFERANSER

1. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res.* 1998;83:15-26.
2. MacLellan WR, Schneider MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:289-319.
3. Chien KR, Olson EN. Converging pathways and principles in heart development and disease. *Cell.* 2002;110:153-62.
4. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A *et al.* Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 2003;92:139-50.
5. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J *et al.* Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2001;344:1750-7.
6. Anversa P, Kajstura J, Annarosa L *et al.* Life and death of cardiac stem cells. *Circulation.* 2006;113:1451-1463.
7. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP *et al.* Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med.* 2002;346:5-15.
8. Deb A, Wang S, Skelding KA *et al.* Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation.* 2003;107:1247-9.
9. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE *et al.* Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res.* 2002;90:634-40.
10. Glaser R, Lu MM, Narula N *et al.* Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts. *Circulation.* 2002;106:17-9.
11. Muller P, Pfeiffer P, Koglin J *et al.* Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation.* 2002;106:31-5.
12. Taylor DA, Hruban R, Rodriguez ER *et al.* Cardiac chimerism as a mechanism for self-repair: does it happen and if so to what degree? *Circulation.* 2002;106:2-4.
13. Swanson BJ, Jack HM, Lyons GE. Characterization of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) expression in B and T cells: MEF2C is a B cell-restricted transcription factor in lymphocytes. *Mol Immunol.* 1998;35:445-58.
14. Esau C, Boes M, Youn HD *et al.* Deletion of calcineurin and myocyte enhancer factor 2 (MEF2) binding domain of Cabin1 results in enhanced cytokine gene expression in T cells. *J Exp Med.* 2001;194:1449-59.
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;107:1395-402.
16. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Adult stem cells and their cardiac potential. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2004;276:103-12.
17. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD *et al.* Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science.* 1999;284:1168-70.
18. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI *et al.* From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science.* 2000;290:1775-9.

19. Korbiling M, Katz RL, Khanna A *et al.* Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med.* 2002;346:738-46.
20. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S *et al.* Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701-5.
21. 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;98:10344-9.
22. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100:157-68.
23. Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001;17:387-403.
24. Weissman IL, Baltimore D. Disappearing stem cells, disappearing science. *Science.* 2001;292:601.
25. Alison MR, Poulson R, Forbes S *et al.* An introduction to stem cells. *J Pathol.* 2002;197:419-423.
26. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science.* 2000;287:1427-30.
27. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature.* 2001;414:98-104.
28. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* 2002;12:502-8.
29. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol.* 2002;3:323-8.
30. Karanu FN, Murdoch B, Gallacher L *et al.* The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2000;192:1365-72.
31. Condorelli G, Borello U, De Angelis *et al.* Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiacmuscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10733-8.
32. Badorff C, Brandes RP, Popp R *et al.* Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation.* 2003 Feb;107:1024-32.
33. Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. *Arch Surg.* 2004;139:93-9.
34. Almeida-Porada G, Porada C, Zanjani ED. Adult stem cell plasticity and methods of detection. *Rev Clin Exp Hematol.* 2001;5:26-41.
35. Goodell MA. Stem cells: is there a future in plastics? *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13:662-5.
36. Szilvassy SJ. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res.* 2003;34:446-60.
37. Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35-71.
38. Osawa M, Hanada K, Hamada H *et al.* Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science.* 1996;273:242-5.
39. Krause DS, Theise ND, Collector MI *et al.* Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell.* 2001;105:369-77.
40. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A *et al.* Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2004;110:3213-20.

41. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M *et al.* Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med.* 2004;10:494-501.
42. Szilvassy SJ, Bass MJ, Van Zant G *et al.* Organ-selective homing defines engraftment kinetics of murine hematopoietic stem cells and is compromised by Ex vivo expansion. *Blood.* 1999;93:1557-66.
43. Gerson SL. Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens. *Nat Med.* 1999;5:262-4.
44. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143-7.
45. Devine SM, Peter S, Martin BJ *et al.* Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer J.* 2001;Suppl 2:76-82.
46. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells.* 2001;19:180-92.
47. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res.* 2004;95:9-20.
48. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K *et al.* HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2003;31:890-6.
49. Makkar RR, Price MJ, Lill M *et al.* Intramyocardial injection of allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2005;10:225-33.
50. Chen SL, Fang WW, Qian J *et al.* Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl).* 2004;117:1443-8. Erratum in: *Chin Med J (Engl).* 2005;118:88.
51. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM *et al.* Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet.* 2004;363:783-4.
52. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res.* 2005;96:151-63.
53. Asahara T, Masuda H, Takahashi T *et al.* Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85:221-8.
54. 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;5:434-8.
55. Shintani S, Murohara T, Ikeda H *et al.* Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation.* 2001;103:2776-9.
56. Lee MS, Lill M, Makkar RR. Stem cell transplantation in myocardial infarction. *Rev Cardiovasc Med.* 2004;5:82-98.
57. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res.* 2001;89:E1-7.
58. Hill JM, Zalos G, Halcox JP *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003;348:593-600.
59. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG *et al.* The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett.* 2002;530:239-243.

60. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114:763-776.
61. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD *et al.* Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:12313-12318.
62. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM *et al.* Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol.* 2004;265:262-275.
63. Messina E, De Angelis L, Frati G *et al.* Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res.* 2004;9:911-921.
64. Beltrami AP, Cesselli D, Damiani D *et al.* In the adult human heart resides a population of non-blood-borne multipotent cardiac progenitor cells. *Circulation.* 2004;110 (suppl III):239.
65. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM *et al.* Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest.* 1996 ;98:2512-23.
66. Goldin AL. Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;868:38-50.
67. Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H *et al.* Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res.* 2001;88:333-9.
68. Menasche P. Myoblast transplantation: feasibility, safety and efficacy. *Ann Med.* 2002;34:314-5.
69. Strauer BE, Brehm M, Zeus T *et al.* Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation.* 2002;106:1913-8.
70. Assmus B, Schachinger V, Teupe C *et al.* Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. *Circulation.* 2002;106:3009-17.
71. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J *et al.* Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res.* 2004;95:742-8.
72. Kuethe F, Richartz BM, Sayer HG *et al.* Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions. *Int J Cardiol.* 2004;97:123-7.
73. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B *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.
74. Schachinger V, Assmus B, Britten MB *et al.* Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the topcare-ami trial. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1690-1699.
75. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J *et al.* Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet.* 2004;364:141-8.
76. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J *et al.* Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized controlled boost trial. *Circulation.* 2006;113:1287-1294.
77. Janssens S, Dubois C, Bogaert J *et al.* Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *Lancet.* 2006;367:113-21.

78. Lunde K, Solheim S, Aakhus S *et al.* Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* In press.
79. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R *et al.* Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 2004;110:II213-8.
80. Fuchs S, Kornowski R, Weisz G *et al.* Safety and feasibility of transendocardial autologous bone marrow cell transplantation in patients with advanced heart disease. *Am J Cardiol.* 2006;97:823-9.
81. Tse HF, Kwong YL, Chan JK *et al.* Angiogenesis in ischemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet.* 2003;361:47-9.
82. Assmus B, Honold J, Lehmann R *et al.* Transcoronary transplantation of progenitor cells and recovery of left ventricular function in patients with chronic ischemic heart disease: results of a randomized, controlled trial. *Circulation.* 2004;110:238.
83. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:1078-83.
84. Smits PC, van Geuns RJ, Poldermans D *et al.* Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol.* 2003;42:2063–2069.
85. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D *et al.* Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J.* 2004;148:531–537.
86. Herreros J, Prosper F, Perez A *et al.* Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2003;24:2012–2020.
87. Chachques JC, Herreros J, Trainini J *et al.* Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol.* 2004;95:29–33.
88. Stamm C, Kleine HD, Westphal B *et al.* CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;52:152–158.
89. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H *et al.* Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature.* 2004;428:664-8.
90. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL *et al.* Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature.* 2004;428:668-73.
91. Medvinsky A, Smith A. Stem cells: Fusion brings down barriers. *Nature.* 2003;422:823-5.
92. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ *et al.* Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001;7:430-6.
93. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T *et al.* Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation.* 2001;104:1046-52.
94. Honold J, Assmus B, Lehman R *et al.* Stem cell therapy of cardiac disease: an update. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19:1673-7.