

Kardiovaskulær regeneration med mesenkymale stamceller

Læge Anders Bruun Mathiasen, cand.scient. Mandana Haack Sørensen, overlæge Erik Jørgensen, cand.scient. Annette Ekblond & overlæge Jens Kastrup

Man har i registerstudier estimeret, at 150.000-200.000 danskere har iskæmisk hjertesygdom (IHS), og at sygdommen årligt fører til ca. 33.000 indlæggelser og ca. 10.000 dødsfald. Tidlig behandling med medicin og revaskularisering med ballonudvidelse eller bypassoperation har reduceret dødeligheden betydeligt. En større gruppe af patienterne responderer dog ikke tilfredsstillende på de nævnte terapiformer, og svær angina og postinfarkt hjertereinsufficiens er et stort klinisk problem. En relativ ny terapiform er behandling med stamceller, som har potentiale til at regenerere det syge væv [1]. Der har inden for kardiologien hidtil været fokus på at anvende den monokleære cellefraktion (MNC) fra knoglemarven, som ud over stamceller også indeholder lymfocytter og monocytter. Stamcellefraktionen består overvejende af hæmatopoietiske stamceller og et mindre antal mesenkymale stamceller.

Der er lavet adskillige kliniske studier med MNC til patienter med akut eller kronisk IHS. Resultaterne har været modstridende. Nogle, men ikke alle studier, har vist positiv effekt på myokardiefunktionen og på patienternes symptomer. De modstridende resultater har ændret fokus mod brugen af mere specifikke stamcelletyper som den multipotente mesenkymale stamcelle eller stromale celle (MSC) [1]. Vi vil her give et overblik over kliniske og prækliniske studier, der omhandler MSC som behandling ved IHS.

MESENKYMALE STROMALE CELLER

I de fleste studier har man anvendt MSC fra knoglemarven. MSC kan også isoleres fra fedtvæv, perifert blod og de fleste andre typer væv. I knoglemarven findes MSC i så små mængder, at det er nødvendigt at dyrke cellerne, før der er et tilstrækkeligt antal til at man kan foretage kliniske studier [2, 3]. MSC kan adskilles fra de øvrige celler i knoglemarven, idet de i modsætning til de øvrige celler adhærer til plastik. Det er muligt at dyrke MSC in vitro, og man kan stimulere cellerne med forskellige vækstfaktorer, hvorved cellerne kan differentieres til forskellige celletyper såsom endotelceller og kardiomyocytter med flere [2-4]. Uden stimulation vil mikromiljøet i det væv, cellerne injiceres i, bestemme differentieringen [5].

En alternativ kilde til MSC er fedtvævsderiverede stamceller (ADSC). ADSC ligner biologisk meget MSC, der er isoleret fra knoglemarv, og synes at kunne differentiere i samme celleretninger [6]. Antallet af ADSC i fedtvæv er ca. 1.000 gange større end antallet af MSC i knoglemarv, hvilket nedsætter den tid cellerne skal dyrkes, før der er nok til klinisk behandling. En vigtig egenskab ved MSC og ADSC er, at cellerne synes at være immuninkompetente, således at de ved allogen transplantation ikke udløser et immunologisk respons. Tværtimod har cellerne vist en hæmmende virkning på immunforsvaret. Dette udnyttes ved allogen knoglemarvstransplantation, hvor man ved at tilsætte MSC til de hæmatopoietiske stamceller har kunnet dæmpe det immunologiske respons og derved reducere graden af *graft versus host disease* [7].

DYREEKSPERIMENTELLE REGENERATIVE MESENKYMALE STAMCELLESTUDIER

Effekten af behandling med MSC fra knoglemarv er undersøgt i en række studier af bl.a. grise, hunde og rotter med induceret myokardieinfarkt. Man har i disse studier set forbedring af hjertets pumpekraft, reduktion i mængden af arvæv og dannelse af nye blodkar i hjertet [1].

Behandling af rotter med induceret bagbensiskæmi med MNC og MSC har vist, at MSC-behandlede dyr fik bedre blodgennemstrømning i bagbenet og havde flere kapillærer sammenlignet med både

STATUSARTIKEL

Rigshospitalet,
Kardiologisk
Laboratorium 2014,
Hjertecentret

! FAKTABOKS

Mesenkymale stamceller er multipotente celler, som kan isoleres fra bl.a. knoglemarv og fedtvæv.

Stamcellerne kan differentieres til forskellige celletyper, som bl.a. kan blive til nye blodkar og nye hjertemuskelceller.

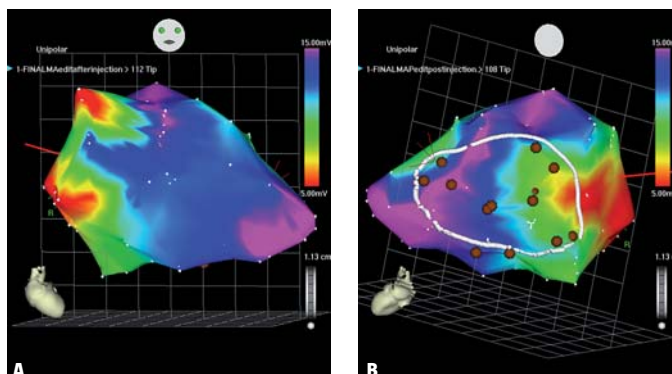
I flere dyreeksperimentelle studier har behandling med mesenkymale stamceller efter blodprop i hjertet vist forbedret pumpekraft af hjertet og reduceret arvæv.

I kliniske studier har behandling med mesenkymale stamceller ligeledes vist forbedret pumpekraft, reduceret arvæv samt bedring af symptomer.

Større placebokontrollerede studier vil afgøre, om stamcellebehandling er en fremtidig behandlingsmulighed til hjertepatienter.

FIGUR 1

A. Mapping af venstre ventrikel med NOGA XP-systemet (*Biologic Delivery System*, Cordis, US). B. Venstre ventrikel-NOGA XP-mappe med injektioner af mesenkymale stromale celler i iskæmisk myokardium markeret med brune punkter.



MNC- og placebobehandlede dyr. MSC overlevede bedre i det iskæmiske miljø og differentierede til både endotelceller og vaskulære glat muskel-celler [8]. I et lignende forsøg med rotter med induceret myokardieinfarkt, gav behandling med MSC en større forbedring af hjertets pumpekraft end behandling med MNC [9].

MSC fra fedtvæv og knoglemarv blev sammenlignet i et studie af grise med induceret myokardieinfarkt. Forsøget viste den samme gavnlige effekt for begge celletyper [10]. Et tilsvarende studie af mus med induceret bagbensiskæmi viste, at MSC fra fedtvæv var mere potente end MSC fra knoglemarv [11].

KLINISKE REGENERATIVE MESENKYMAL STAMCELLESTUDIER

I de fleste af de kliniske studier er der anvendt autologe MNC fra knoglemarv, som har den fordel, at der ikke skal bruges tid på isolation og dyrkning af en speciel population af celler [1]. På den anden side har det at indgive en blanding af forskellige celler den ulempe, at andelen af stamceller, som er potentielt terapeutisk gavnlige, er meget lille. Det debatteres dog stadig, om den potentielle effekt skyldes stamcellerne, eller om den skyldes de cytokiner, der secernerer fra MNC, idet kun ca. 2% af cellerne i en sådan MNC-opløsning vil være stamceller.



FORKORTELSER

ADSC = fedtvævsderiverede stamceller (*adipose tissue derived stem cells*)
 IHS = iskæmisk hjertesygdom
 LVEF = venstre ventrikels udrykningsfraktion (*left ventricle ejection fraction*)
 MNC = mononukleære celler
 MSC = mesenkymale stromale celler/mesenkymale stamceller
 STEMI = ST-elevations-myokardieinfarkt
 VEGF = *vascular endothelial growth factor*

De fleste af stamcellestudierne behandler patienter med ST-elevationsmyokardieinfarkt (STEMI). I disse studier er cellerne indgivet intrakoronar. For at cellerne skal kunne have en chance for at adhærere til og transmigrere igennem endotelet, stopper man ved denne metode blodtilførslen proksimalt for injektionen i ca. tre minutter ved hjælp af et ballonkateter [1].

I nogle af de nyere studier bruges intramyokardiel injektion ved NOGA XP-metoden. Ved denne metode danner man først en 3D-visualisering af venstre ventrikel. Denne visualisering gør det muligt nøjagtigt at se, hvor der er arvæv, og hvor der er normalt perfunderet væv (Figur 1A). Man injicerer herefter cellerne direkte ind i myokardiet via et specielt kateter (Figur 1B). Injektionerne gives oftest i den iskæmiske zone mellem normalt væv og arvæv. Resultaterne fra et sammenlignende studie har vist, at den intramyokardielle metode er både intrakoronar og intravenøs indgift overlegen [12].

I de fleste af MNC-studierne har man fundet en positiv effekt af behandlingen i form af forbedret venstre ventrikel udrykningsfraktion (LVEF), reduceret arvævsdannelse og færre symptomer. I det største af studierne, et dobbeltblindet studie af 204 STEMI-patienter, som modtog intrakoronar injektion, påviste man forbedret LVEF og reduceret mortalitet samt reduceret forekomst af reinfarkt og af hjertesvigt. Patienterne er indtil videre blevet fulgt i to år i dette studie, og resultaterne viser fortsat en gevinst ved stamcellebehandling [13].

Der foreligger kun få afsluttede kliniske fase I/II-studier med MSC-behandling af patienter med iskæmisk hjertesygdom (Tabel 1). I alle disse studier har man brugt MSC'er fra knoglemarv.

I et åbent randomiseret design blev MSC indsprøjet intrakoronar hos 34 STEMI-patienter. Behandlingen var sikker og viste forbedret LVEF efter

seks måneder [14]. Et lignende åbent studie med intrakoronar injektion af MSC hos 11 STEMI-patienter viste, at behandlingen var sikker, og at der var en forbedring i *wall motion index* og en reduktion af arvæv [15].

I et randomiseret studie blev 22 patienter med svært hjertesvigt og lukket koronararterie behandlet med intrakoronar injektion af MSC efter ballonudvidelse. Studiet viste forbedret LVEF, arbejdskapacitet og færre symptomer efter et år [16]. I et mindre studie blev otte patienter med hjertesvigt behandlet med intrakoronar injektion af MSC. Patienterne fik en forbedring af LVEF sammenlignet med kontrolpersoner [17]. Fem patienter, som alle havde implanterbar cardioverterdefibrillator-enhed pga. ventrikulær takykardi, fik i forbindelse med ballonudvidelse injiceret MSC intrakoronart. Der var i en 16-36 måneders opfølgning ingen tilfælde af hverken *sustained* eller *non-sustained* ventrikulær takykardi, hvorfor der ikke syntes at være nogen arytmi-effekt af MSC-behandling [18].

Allogene MSC blev i et dobbeltblindet studie givet intravenøst til 39 patienter med nylig STEMI. Studiet – som er det første kliniske studie med allogene MSC – viste, at allogen MSC-behandling var sikker, og at MSC-behandlede patienter efter seks måneder havde færre symptomer, bedre LVEF, færre ventrikulære takykardiepisoder, samt bedre lungefunktion end placebo-behandlede [19].

I et åbent pilotstudie på Rigshospitalet i København er 31 patienter med kronisk IHS behandlet med autologe MSC. Formålet var at teste, om det var sikkert og muligt at injicere MSC intramyokardielt i patienter med kronisk IHS og normal LVEF, hvor yderligere behandling med ballonudvidelse eller by-passoperation ikke var mulig, samt at undersøge den kliniske effekt af behandlingen. I studiet blev cellerne efter 6-8 ugers dyrkning injiceret direkte ind i myo-

kardiet med NOGA XP-metoden (Figur 1). Den sidste uge i dyrkningsperioden blev cellerne stimuleret med vaskulær endotelial vækstfaktor for at påvirke cellerne i endotel retning. Behandlingen var sikker og uden bivirkninger. Efter seks måneder så man forbedret arbejdskapacitet, LVEF og systolisk vægtykkelse. Endvidere så man færre anginaanfald, nedsat forbrug af antianginøs medicin, samt forbedring i alle parametre i *Seattle Angina Questionnaire*.

På Rigshospitalet pågår nu et dobbeltblindet og placebokontrolleret studie, i hvilket MSC-behandling udføres med NOGA XP-metoden. I studiet behandles patienter med kronisk IHS og hjertesvigt. Det er planlagt, at 60 patienter skal indgå i studiet. Et andet klinisk studie, som er opstartet på Rigshospitalet, er et dobbeltblindet og placebokontrolleret studie med MSC fra fedtvæv. I dette studie indgår der også patienter med kronisk IHS, men uden hjertesvigt.

DISKUSSION

Der er gennemført flere mindre kliniske studier, de fleste ublindede, på patienter med STEMI, hjertesvigt og kronisk IHS, med både allogene og autologe MSC, der var isoleret fra knoglemarv. Resultaterne har generelt være positive med forbedret LVEF og forbedring af symptomer, hvilket indikerer en regenerativ effekt af behandlingen [1]. Det fremgår af databasen ClinicalTrials, hvor alle kliniske studier skal registreres, at der på verdensplan i april 2010 pågår ti kliniske behandlingsstudier, i hvilke man anvender MSC fra knoglemarv på patienter med hjertesygdom. To af studierne foregår på Rigshospitalet i København.

Der er ikke detekteret alvorlige bivirkninger til behandlingerne med hverken MSC eller MNC [1]. Stamcellebehandling er således tilsyneladende sikker. Det totale antal behandlede er dog ikke stort, så sikkerheden vil forsat være en vigtig måleparameter i kommende studier.



TABEL 1

Kliniske behandlingsstudier med mesenkymale stromale celler fra knoglemarven af patienter med iskæmisk hjertesygdom.

Reference	Celletype	Studie-design	Randomisering, n, beh.: kontrol	Administration	Behandlingseffekt
Chen et al, 2004 [14]	MSC, autolog	I	34:35	i.c.	Bedre LVEF
Chen et al, 2006 [16]	MSC, autolog	I	22:62	i.c.	Bedre LVEF og arbejdskapacitet
Katritsis et al, 2005 [15]	MSC, autolog	II	11:11	i.c.	Bedre vægbevægelse i venstre ventrikel
Katritsis et al, 2007 [18]	MSC, autolog	II	5:0	i.c.	Ingen arytmier
Mohyeddin-Bonab et al, 2007 [17]	MSC, autolog	II	8:8	i.m.	Bedre LVEF
Hare et al, 2009 [19]	MSC, allogen	III	39:21	i.v.	Færre arytmier og symptomer Bedre lungefunktion og LVEF

I = åbent randomiseret studie; II = åbent ikke-randomiseret studie; III = randomiseret dobbeltblindet og placebokontrolleret studie; i.c. = intrakoronar; i.m. = intramyokardiel; i.v. = intravenøs; LVEF = venstre ventrikels udrykningsfraktion (*left ventricle ejection fraction*); MSC = mesenkymale stromale celler/stamceller; VEGF = *vascular endothelial growth factor*.

Stamcellebehandlingen inden for kardiologien er fortsat under afprøvning. Det er endnu uklart, hvilken type stamcelle og hvilken behandlingsmetode der er den optimale. For øjeblikket peger meget på, at injektion af stamceller direkte i myokardiet giver den bedste retention af cellerne, og at denne metode er sikker [20]. Der mangler fortsat resultater fra store kontrollerede kliniske studier, før det kan afgøres, om regenerativ behandling af hjertepatienter er en fremtidig behandlingsmulighed.

KORRESPONDANCE: Jens Kastrup, Rigshospitalet, Kardiologisk Laboratorium 2014, 2100 København Ø. E-mail: jens.kastrup@rh.regionh.dk

ANTAGET: 25. juni 2010

INTERESSEKONFLIKTER: Ingen

LITTERATUR

- Mathiasen AB, Haack-Sorensen M, Kastrup J. Mesenchymal stromal cells for cardiovascular repair: current status and future challenges. *Future Cardiol* 2009;5:605-17.
- Haack-Sorensen M, Bindslev L, Mortensen S et al. The influence of freezing and storage on the characteristics and functions of human mesenchymal stromal cells isolated for clinical use. *Cytotherapy* 2007;9:328-37.
- Haack-Sorensen M, Friis T, Bindslev L et al. Comparison of different culture conditions for human mesenchymal stromal cells for clinical stem cell therapy. *Scand J Clin Lab Invest* 2008;68:192-203.
- Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004;95:9-20.
- Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:999-1005.
- Murohara T, Shintani S, Kondo K. Autologous adipose-derived regenerative cells for therapeutic angiogenesis. *Curr Pharm Design* 2009;15:2784-90.
- Le BK, Samuelsson H, Gustafsson B et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2007;21:1733-8.
- Iwase T, Nagaya N, Fujii T et al. Comparison of angiogenic potency between mesenchymal stem cells and mononuclear cells in a rat model of hindlimb ischemia. *Cardiovasc Res* 2005;66:543-51.
- de Macedo Braga LM, Lacchini S, Schaap BD et al. In situ delivery of bone marrow cells and mesenchymal stem cells improves cardiovascular function in hypertensive rats submitted to myocardial infarction. *J Biomed Sci* 2008;15:365-74.
- Valina C, Pinkernell K, Song YH et al. Intracoronary administration of autologous adipose tissue-derived stem cells improves left ventricular function, perfusion, and remodeling after acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007;28:2667-77.
- Kim Y, Kim H, Cho H et al. Direct comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissues and bone marrow in mediating neovascularization in response to vascular ischemia. *Cell Physiol Biochem* 2007;20:867-76.
- Freyman T, Polin G, Osman H et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:1114-22.
- Assmus B, Rolf A, Erbs S et al. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010;3:89-96.
- Chen SL, Fang WW, Ye F et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004;94:92-5.
- Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E et al. Transcatheter transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005;65:321-9.
- Chen S, Liu Z, Tian N et al. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* 2006;18:552-6.
- Mohyeddin-Bonab M, Mohamad-Hassani MR, Alimoghaddam K et al. Autologous in vitro expanded mesenchymal stem cell therapy for human old myocardial infarction. *Arch Iran Med* 2007;10:467-73.
- Katritsis DG, Sotiropoulou P, Giazitoglou E et al. Electrophysiological effects of intracoronary transplantation of autologous mesenchymal and endothelial progenitor cells. *Europace* 2007;9:167-71.
- Hare JM, Traverse JH, Henry TD et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (Prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:2277-86.
- Baldazzi F, Ripa RS, Jørgensen E et al. Release of bio-markers of myocardial damage after direct intramyocardial injection of gene and stem cells via the percutaneous transluminal route. *Eur Heart J* 2008;29:1819-26.

Reparation af knogle og brusk med stamceller

Cand.scient. Kenneth H. Larsen, cand.scient. Tom E. Andersen & professor Moustapha Kassem

STATUSARTIKEL

Odense Universitets-hospital, Klinik for Molekylær Endokrinologi, Endokrinologisk Afdeling M

Brugen af stamceller i behandlingen af aldersrelaterede og degenerative sygdomme er et forskningsområde, der er i rivende udvikling. Stamceller har nemlig potentialet til at kunne regenerere en lang række forskellige væv lige fra knogle- til hjernevæv. Samtidigt skaber den stigende ældre befolkning – med deraf afledte aldersbetingede degenerative sygdomme – et stadigt større behov for behandlingsmuligheder inden for regenerativ medicin. Principielt kan behandling med stamceller ske ved enten at stimulere stamceller, som findes i de enkelte væv eller ved at oprense stamceller fra patienten selv, differentiere dem ex vivo (dvs. i laboratoriet) og transplantere dem tilbage i patienten. Sideløbende med forskningen i stamceller foregår der en udvikling af nye biomaterialer, som skal fungere som tredimensionale *scaffolds* for stamcellerne. Dette forskningsfelt, der

kaldes *tissue engineering*, skal klarlægge, hvorledes biomaterialer og stamceller i kombination kan anvendes til at give det nye væv den korrekte facon og optimere behandlingen. Til behandling af knogle- og bruskrelaterede lidelser er de mest interessante stamceller de såkaldte mesenkymale stamceller (MSC), som kan differentieres til bindevævsceller såsom osteoblaster, kondrocytter og adipocyter [1].

HVAD ER MESENKYMAL STAMCELLER?

Mesenkymale stamceller (MSC) kaldes også voksne stamceller og er tenformede, fibroblastlignende celler, der er karakteriseret ved et antal ikkеспецифikke *cluster of differentiation* (CD)-markører. Cellerne er negative for de hæmatopoietiske markører CD34, CD45 og CD14 og positive for CD29, CD73, CD90, CD105, CD166, CD146 og CD44. Desuden har cel-