

# Kalp Yetersizliği Tedavisinde Yeni Umutlar: Hücresel Kardiyomiyoplasti, Gen Tedavisi ve Nükleer Transfer

Y. Doç. Dr. Mehmet TOKAÇ, Y. Doç. Dr. Murad AKTAN\*, Y. Doç. Dr. Ahmet AK\*\*, Prof. Dr. Selçuk DUMAN\*, Prof. Dr. Lale TOKGÖZOĞLU\*\*\*, Prof. Dr. Hasan GÖK

Selçuk Üniversitesi, Meram Tıp Fakültesi, Kardiyoloji, \*Histoloji-Embriyoloji, \*\*İlk ve Acil Yardım Anabilim Dalı, Konya  
\*\*\*Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyoloji Anabilim Dalı, Ankara

## ÖZET

Kalp yetersizliği giderek artan majör bir halk sağlığı problemidir ve gelecek yüzyılın en yaygın kalp hastalığı olması beklenmektedir. Hastaların büyük bir bölümünde kalp yetersizliği koroner ateroskleroz ve miyokard infarktüsüne bağlı gelişmektedir. Kalp yetersizliği için güncel tedavi yöntemleri, kanıtlanmış fakat kısıtlı yararlılığı olan medikal tedavi ve hem uygulanabilirliği kısıtlı hem de bazılarının güvenilirliği kanıtlanmamış cerrahi yöntemlerdir. Kardiyomiyosit nekrozu ve bunu izleyen fibröz skar oluşumu temelde dönüşümsüz bir olaydır. Yetişkin insan kardiyomiyositleri çok sınırlı bir çoğalma yeteneğine sahiptir ve miyokard kayıp olan kardiyomiyositleri yerine koyabilecek kök hücrelerden yoksundur. Zedelenmiş miyokardın onarımı için hücre transplantasyonu gen tedavisi ve nükleer transfer kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yeni yaklaşımlardır. *Türk Kardiyol Dern Arş 2002; 30: 773-782*

**Anahtar kelimeler:** Hücresel kardiyomiyoplasti, gen tedavisi, kalp yetersizliği

Kalp yetersizliği (KY): kalbin metabolik dokuların gereksinimi oranındaki kanı pompalamada yetersiz kaldığı veya doluş basıncını yükselterek gereksinimleri karşılayabildiği fizyopatolojik bir durumdur. Gelişmesinden başta koroner arter hastalığı olmak üzere, çeşitli kardiyak ve kardiyak olmayan nedenler sorumludur. Sağlık koşullarındaki iyileşmeler sonucu ömür uzunluğunun artmasıyla, insidansı giderek artmaktadır. Gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda en sık görülen ölüm nedeni olan kardiyovasküler hastalıklar içinde önemli bir yer tutmaktadır. Kalp yetersizliği aynı zamanda önemli bir morbidite nedenidir. Aslında KY, beş yılda %50 mortalite ile pek çok malign hastalıktan daha kötü bir prognoza sahiptir. Klinik olarak aşikar KY gelişen hastalar toplumlara önemli bir ekonomik yük de getirmektedirler (1).

Kardiyomiyositler dönüşümsüz olarak zedelendikleri zaman rejenere olamazlar. Çünkü miyokard, kayıp olan hücreleri yerine koyabilecek yetenekteki miyogenik kök hücrelerden yoksundur. İnfarktüse bağlı nekroza uğrayan kardiyomiyositlerin yerini kasılma yeteneği olmayan fibroblast'lar ve kollagen doldurur. Bunun sonucu olarak değişik derecelerde (hipokinezi, akinezi, diskinezi vs.) bölgesel kasılma bozuklukları ortaya çıkar. Ejeksiyon fraksiyonundaki azalmayı gidermeye yönelik olarak sağlam bölgelerde gelişen hipertrofi kalp geometrisini bozarak, sağlam kalan miyositlerin etkin çalışmalarını kısıtlayan kısır bir döngü oluşturur. Sol ventrikül diastol sonu basıncı yükselir ve kardiyak dilatasyon gelişir. Sonuç olarak miyosit kaybı klinik olarak kendisini KY şeklinde ifade eder. Eğer kayıp olan miyositleri yerine koyabilirsek bu problemi önemli ölçüde çözebiliriz (1,2).

## KALP YETERSİZLİĞİ TEDAVİSİ

Günümüzde, KY'nin etkin tedavisi için yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Çeşitli ilaçların etkinlik ve yararları hem laboratuvar koşullarında, hem de çok uluslu, çok merkezli klinik çalışmalarla incelenmektedir. Bugüne kadar kalp yetersizliği tedavisinde hem yaşam kalitesi hem de prognoza olumlu etkileri gösterilmiş ilaç gruplarının sayısı halen çok azdır. Kalp transplantasyonu, dinamik kardiyomiyoplasti, Batista ve Dor operasyonları, total implante edilebilir yapay kalp, biventriküler "pacing" ve ultrafiltrasyon gibi yöntemler klinikte kullanılan diğer tedavi yöntemlerini oluşturmaktadır. Kalp yetersizliği tedavisinin sonuçlarının iyileştirilmesine yönelik yoğun çabalara rağmen henüz tatminkar bir sonuç elde edilememiştir. Kalp yetersizliği tedavisinde yoğun şekilde yeni yaklaşımlara ihtiyaç vardır (3).

## KALP YETERSİZLİĞİ TEDAVİSİNDE YENİ GELİŞMELER

Kalp yetersizliği çoğunlukla çeşitli nedenlere bağlı miyosit kaybından kaynaklandığına göre, kaybolan miyositleri yerine koyabilirsek kalp kasının fonksiyonlarını düzeltebilir ve sonuçta KY gelişmesini önleyebiliriz. Bu amaçla; 1) kardiyomiyosit mitozunu reaktifte edilmesi, miyokardiyal skar içindeki fibroblastların miyosite dönüşmesinin sağlanması veya hiberne kardiyomiyositlerin kontraktıl fonksiyonlarını düzeltmek için anjiogenezisi uyararak endojen miyositlerin sayı veya fonksiyonlarının artırılması, 2) miyokardiyal skar dokusu içine ekzojen miyosit verilmesi düşünülmüştür. Gen ve genom tedavisi de gereksinim duyulan birtakım hücrelerin ve faktörlerin doğal yoldan yerine konmasını amaçlayan diğer bir tedavi seçeneğidir.

### HÜCRESEL KARDİYOMİYOPLASTİ

#### A. ENDOJEN MİYOSİT SAYISININ ARTTIRILMASI

##### 1. Kardiyomiyosit mitozunun aktivasyonu

Kardiyak miyositler tüm fetal ve erken postnatal gelişim sürecinde çoğalabilirler. İnsanlarda muhtemelen doğumdan sonraki birkaç ay içinde miyosit bölünmesi kesilir. Miyosit hiperplazisinin kesilmesinden sonra, kardiyak büyüme miyosit hipertrofisi ve kas dışı hücrelerin çoğalması ile olur. Hücre siklusunda iki major olay, S fazı (DNA sentez dönemi) ve M fazı (mitoz dönemi) vardır. Hücre siklusunun düzenlenmesinde iki anahtar nokta önemlidir; hücre siklusuna giriş ve hücre siklusundan çıkış. İstirahat dönemi olan G<sub>0</sub>'den çıkıp G<sub>1</sub> fazına girmek genel büyüme koşulları, hormonlar, büyüme faktörleri, basınç ve gerilme gibi mekanik faktörlerin oluşturduğu çevresel uyarılara cevap olarak gerçekleşir. Büyüme faktörlerinin önemli bir grubu proto-onkojenlerdir. Bu grubun örneklerini oluşturan platelet-derived growth faktör (PDGF), epidermal growth faktör (EGF) ve transforming growth faktör beta (TGF $\beta$ ) hücre siklusunu başlatırken, p53, p107 gibi tümör baskılayıcı genleri hücre siklusunu durdururlar. Önceden kardiyomiyositlerin postmitotik dönemde fiks olmuş, in vivo çoğalma yeteneği olmayan terminal diferansiye olmuş hücreler olduğuna inanılmasının aksine son zamanlarda elde edilen kanıtlar, bazı fizyolojik ve patolojik koşullarda kardiyomiyositlerle

rin mitotik döngüye girebileceğini düşündürmektedir. Ancak bu çok sınırlı mitoz ile yara iyileşmesi döneminde yoğun fibrozisin üstesinden gelmesi zordur. Bu konudaki çalışmalar devam etmektedir (4,5).

#### 2. Kardiyomiyosit proliferasyonunun büyüme faktörleri ile uyarılması

Memeli hücrelerinde büyüme ve farklılaşma arasındaki dengeyi düzenleyen hücresel mekanizmalar genel olarak henüz anlaşılammıştır. Bu can alıcı olay somatik hücre tedavisinde oldukça önemlidir. Terminal olarak farklılaşmış hücrelerin, hücre ölümü ve infarktüsü takiben miyokardiyal yıkımın tamiri gibi klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için birincil noktayı oluşturmaktadır. Büyüme faktörleri genel olarak hücre farklılaşmasını baskılayıp hücre bölünmesini uyarırlar. Kardiyomiyositler üzerine olan etkileri de benzerdir. Fötal ve erken neonatal dönemde fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin-benzeri büyüme faktörü (IL-GF) I ve II, TGF $\beta$  ve PDGF gibi büyüme faktörleri kardiyomiyosit çoğalmasına etkilidirler (5,6). Neonatal dönemden sonra miyokardiyal büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri dramatik olarak azalır. Bazı patolojik koşullarda büyüme faktörü ekspresyonu "up-regule" olabilir ve kardiyomiyositlerdeki DNA sentezini artırabilir. Ancak bu hücreler mitozis veya hücre bölünmesi gibi daha ileri basamaklara geçemezler. Büyüme faktörleri kontraktıl protein sentezini artırır ve hücre hipertrofisini uyarırlar (5).

#### 3. Onkojen proteinler

Kardiyomiyosit çoğalması ve farklılaşması ile ilgili olabilen diğer bir makromolekül grubudur. İn vitro çalışmalarda ras, myc ve myb'nin fetal ve neonatal kardiyomiyosit içeren kültüre ilave edildiğinde çoğalmayı uyarabilecekleri gösterilmiştir (4,7). V-myc'de kardiyak hücre çoğalmasını uyarabilir. Kardiyomiyosit hiperplazisini ve hipertrofisini uyarmak için onkogenlerin kullanılmasının en önemli problemi tümorogenezistir. Bu konudaki çalışmalar devam etmektedir (6).

#### 4. Kardiyomiyosit rejenerasyon siklusunu başlatan faktörler

Bu konuda son yıllarda önemli gelişmeler olmasına rağmen, kardiyomiyosit döngüsünün düzenlenmesi



hala tam olarak anlaşılammıştır. Hücre siklusunu kontrol eden mitojenik faktörler kısmen siklin-bağımlı protein kinazlardır ve bunlar paket proteinlerinin ekspresyon ve fosforilasyonunu değiştirirler. Hipofosforilasyon veya bu proteinlerin down-regulasyonu DNA sentezi için gerekli olan E2F gibi transkripsiyon faktörlerini serbestleştirebilir. Adenovirus E1A proteini paket proteinlerine etki ederek DNA sentezini uyarabilir (8,9). Üzerinde çalışılan bir diğer faktör bHLH proteinidir. Bu protein myoglobin geninin transkripsiyonel promotörünü dolaylı olarak aktive eder.

### 5. Fibroblastların miyosite dönüştürülmesi

Normal miyokartta interstisyel fibroblastlar kollojen sentezinden sorumludurlar. Nekroz yüzünden miyosit kaybına neden olan AMI'yı takiben ventriküllerin yapısal bütünlüğünü sağlamak ve infarkt alanını yeniden düzenlemek için hızlı bir tamir olayı başlar. Başlangıçta infarkt alanına inflamatuvar hücreler gelir, düzenleyici peptidler aktive olurlar ve yeni damar oluşumu başlar. Bu dönemde infarkt alanında miyofibroblast diye isimlendirilen fenotipik olarak transforme olmuş fibroblastlar ortaya çıkarlar ve çoğalırlar. Normal miyokartta bulunmayan bu hücreler infarktüs sonrası dokunun yeniden düzenlenmesinde önemli rol oynarlar (10). En önemli özellikleri  $\alpha$ -SMA (smooth muscle actin) ekspresyonudur. Fibromiyositi ortaya çıkaran uyarı tam olarak anlaşılmasına rağmen *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar TGF- $\beta$ 1,  $\beta$ 2 ve GM-CSF'nin fibroblastların miyofibroblastlara farklılaştırdığını göstermiştir (11,12). MyoD, myogenin, MRF4 ve myf5 kasa özel transkripsiyon faktörlerini kodlayan gen ailesi üyeleridir ve bu miyojenik düzenleyici faktörler miyogenezisi aktive ederek düz kas hücre farklılaşmasını kontrol ederler. Fibroblastlarda bu genin ekspresyonunun sağlanmasıyla fibroblastlar kas hücrelerine benzer hücrelere dönüştürülebilmiştir. MyoD geni taşıyan vektörler miyokard skar dokusu içine enjekte edilerek kontraktıl proteinlerin oluştuğu gösterilmiştir. Bu çalışmaların kısıtlamaları kullanılan vektörlerin immünojenite ve tümör yapabilecek potansiyelleridir (13).

### 6. Periinfarktüs bölgesindeki kardiyomiyositlerin aktivasyonu için anjiyogenezisin uyarılması

Anjiyogenez, doku tamirinde en önemli olaydır. İskemik hastalıklardaki gibi hücrenin oksijenasyonu-

nun bozulması hipoksi inducible factor-1'i (HIF-1) aktive eder. Oksijen dengesinin düzenleyen HIF-1'in aktivasyonu nitrik oksit sentetaz-1,3, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi faktörleri kodlayan genlerin uyarır. NO iskemik dokularda vazodilatasyon oluştururken, VEGF (vascular permeability factor olarak ta bilinir) ödem oluşturur. Ödem anjiyojenik cevabın kuvvetli bir belirleyicisidir. VEGF aynı zamanda endotel hücre çoğalmasını uyarır ve sonuçta yeni kapiller ağ oluşur (14). İnfarktüsü takiben anjiyogenez üçüncü günde başlar ve iki hafta sonra çok belirgin hale gelir. Yeni damar gelişimi veya varolan kollaterallerin remodelling'i tıkalı koroner arterleri kompanse ederek doğal bypass'lar oluşturabilirler. VEGF, IL-GF ve FGF gibi çok sayıda anjiyojenik büyüme faktörü iskemik miyokarttaki kan akımını arttırmak için kullanılmıştır (15,16,17). Bunlar bölgesel kan akımını arttırmış, infarkt alanını küçültmüş ve hemodinamik durumu iyileştirmiştir. Yöntemin problemi anjiyojenik faktörlerin sistemik etkiyle beyin ve retinada da anjiyogenezis oluşturabilmeleri ve sessiz tümörlerin büyümesini hızlandırabilmeleridir. Periferik arter hastalığı ve koroner arter hastalığı olan hastalarda yapılan kontrolsüz küçük çalışmalardan ümit verici sonuçlar alınmasına rağmen, bu sonuçlar daha sonra yapılan çok merkezli plasebo kontrollü çalışmalarla doğrulanmamıştır.

## B. EKZOJEN OLARAK MİYOSİT SAYISININ ARTIRILMASI

### 1. Miyokardiyal doku transplantasyonu

Miyokard etkili elektriksel ve mekanik coupling'ten oluşan bir bileşimdir. Kalbe yapılacak doku greftinin etkin olabilmesi için, hem uygun mimari yerleşim, hem de fonksiyonel birlikteliğin sağlanması gerekir (4). Hayvan modellerinde miyokardiyal doku transplantasyonu yapılmış ve transplante edilen dokunun sarkomer oluşturduğu ve kasıldığı gösterilmiştir (18,19). Miyokardiyal doku içine fetal veya neonatal doku nakli canlı kardiyomiyosit sayısını arttırabilir ve bölgesel kalp fonksiyonlarını düzeltebilir. Bu tekniğin sınırlaması konakçı miyokard ile transplante dokunun senkron kasılabilmesi için transplant dokunun uygun şekilde yerleştirilmesinin zor olmasıdır. Allograft veya ksenograft dokunun reddi ve immun-supresyon zorunluluğu diğer sakıncalarıdır.

## 2. Hücre transplantasyonları

### a. Allotransplantasyon

Fötal kardiyomiyositler miyokardiyal skar içine transplante edildiklerinde burada yaşayabilirler, çoğalabilirler ve normal konakçı miyokard ile iletişim kurabilirler. Transplante edilen fötal kardiyomiyositler, sarkomerleri, desmozomları ve fasia adherens içeren bağlantıları ile histolojik olarak kalp kası görünümündedirler (20). Skar dokusunun yayılmasını kısıtlatlar ve kalp fonksiyonlarını iyileştirirler (21,22). Bu ümit verici gelişmelere rağmen fötal kardiyomiyosit transplantasyonu allojenik ve ksenojenik olmak zorundadır. Bu da ömür boyu immüsupresyonu gerektirmektedir. Yöntemin bir diğer problemi de etik sorunlardır (6,11).

### b. Kardiyak hücre çizgileri (line'leri)

Fare P19 embriyonal karsinoma hücreleri pluripotent kök hücrelerdir ve kültürde farklılaşmadan kalabilirler veya in vitro uyarı ile çalışan (beating) miyositlerde dahil olmak üzere, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler. P19 hücreleri kültür ortamında dimetil-sülfoksit ile uyarılıp ve uygun şekilde pasajları yapıldığında kardiyak miyositlere dönüşürler. Miyosite dönüşebilme yetenekleri serumdaki henüz bilinmeyen faktörlere bağlıdır. P19 hücrelerinden farklılaşan kardiyak hücreler, kendi embriyonik eşdeğerlerinin biyokimyasal ve fizyolojik özelliklerini gösterirler. Bu hücreler tek çekirdeklidirler ve embriyonik dokuya benzer şekilde atriyal natriüretik faktör, tip-B natriüretik faktör, endotelin A reseptörü, adenilsiklaz 5, sarkomerik protein izoformları, adenoreseptörler ve L-tipi kalsiyum kanal proteinlerini sentezlerler. Dahası miyojenik düzenleyici faktörlerle uyarıldıkları zaman kardiyak  $\alpha$ -aktin sentezleyebilirler (23).

Kemik iliği stromal hücrelerinden de kardiyomiyojenik bir hücre çizgisi (line) izole edilmiştir. Bu hücrelerde kültür ortamında 5-azacytidine ile önce spontan daha sonra senkronize kasılan ve morfolojik olarak kardiyomiyosit benzeri yapı gösteren hücrelere dönüştürülmüştür. Bu hücrelerde atriyal natriüretik peptid, beyin natriüretik peptid salgılamışlar ve anti-miyozin, anti-desmin, anti-aktin antikoları ile boyanmışlardır. Elektron mikroskopisinde kardiyak miyositlere benzer şekilde merkezi yerleşmiş çekirdek ve atriyal granüller gözlenmiş, yine bu hücrelerde sinüs düğüm hücreleri ve ventriküler hücrelere

benzer aksiyon potansiyelleri tespit edilmiştir (24). Tüm bu gelişmelere rağmen kardiyak hücre çizgileri (line) ile ilgili çalışmalar henüz araştırma aşamasındadır.

### c. Ototransplantasyon

**1. İskelet kası ve Satellit hücre transplantasyonu:** Transforme iskelet miyoblastları iskelet kas hücrelerinin öncüleridir. Çoğalabilme ve farklılaşabilme yeteneklerini uzun süre koruyabilirler. Ancak tüm transforme hücrelerde olduğu gibi tümorogenezis riski taşır. Buna karşın satellit hücreler aynı riski taşımazlar. Bu hücreler iskelet kas miyofibrillerinin bazal laminasına yakın yerleşen miyojenik kök hücrelerdir. Zedelenmeden sonra iskelet kasının regenerasyonunu sağlarlar. Aynı zamanda bu hücreler iskeleme karşı kardiyak miyositlerden daha dirençlidirler (25). Bu hücrelerin ototransplant olarak kullanılması immüsupresyon zorunluluğunu kaldırır. Transplante edilen satellit hücrelerin canlı kaldıkları, çoğalabildikleri ve farklılaşabildikleri deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (26). Otolog iskelet miyoblastları koroner infüzyon şeklinde verildiğinde tüm miyokardiyal tabakalara yerleşebilirler (27). Ancak, greft hücreleri arasında ve greft hücreleri ile konakçı doku arasında hücreler arası elektriksel coupling için gerekli olan gap junction belirleyicileri (interkalar diskler ve connexin) gösterilememiştir (25,28,29,30). Yine de bu hücreler hasta miyokardın elastik özelliklerini iyileştirerek, skar genişlemesini ve progressif ventrikül genişlemesini sınırlayarak yararlı olabilirler (31,32,33). Sistolik ve diastolik fonksiyonları iyileştirirler (34). Ayrıca transplante hücreler anjiyojenik faktörler salgılayarak yeni damar oluşturup infarkt bölgesinin genişlemesini ve ventrikülün "remodelling"ini sınırlayabilirler. Satellit hücreler zedelenmiş konakçı miyokardın fibroatrofisini önleyebilirler (35).

**2. Düz kas hücresi transplantasyonu:** Bu hücrelerin satellit hücrelere göre en önemli avantajları kolay elde edilmeleri ve kültürlerinin kolay yapılabilmesidir. Yetişkin düz kas hücreleri çoğalabilme yeteneklerini kaybetmemişlerdir ve VEGF gibi bazı anjiyojenik faktörleri salgılayabilirler. Transplante hücreler ile anjiyogenezisin uyarılması, hem transplante hücreleri destekleyerek, hem de nativ miyokardın perfüzyonunu sağlayarak yararlı olabilirler. Bu hücrele-



rin sol ventrikül dilatasyonunu sınırladığı ve kardiyak fonksiyonları iyileştirdiği saptanmıştır. Ancak henüz konakçı miyokard ile gap junction oluşturdıkları gösterilememiştir (36). Sol ventrikül fonksiyonlarını iyileştirmek için düz kas kasılması yavaş olabilir ve yararlı etkileri skar alanında kontraksiyonu iyileştirmekten çok ventrikül dilatasyonunu önleyerek ortaya çıkar.

**3. Kemik iliği hücresi transplantasyonu:** Kemik iliğinde multipotansiyel ön hücreler olan mezenşimal kök hücreler (mesenchymal stem cells) bulunmaktadır. Farklılaşmamış durumdaki bu hücreler yüksek çoğalma yeteneğine sahiptirler. Pluripotent kemik iliği kök hücreleri invitro kimyasal uyarımla, kemik, kas, yağ, tendon ve kıkırdak gibi çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler. Çok kompleks bir kültür işleminde, bu hücreler 5-azacytidine'le muamele edildiklerinde, %30 civarında miyotübülleri ve interkalar diskleri olan kardiyomiyosit benzeri hücrelere dönüşürler. Bazı çalışmalarda kemik iliği stromal kök hücrelerinin, in vitro farklılaşmaya sokulmadan, normal miyokarda transplante edildiği zaman ortama bağlı olarak kardiyojenik fenotipe farklılaştığı gösterilmiştir (24,33). Kemik iliği kök hücresi transplantasyonu anjiyogenezisi de uyarabilmektedir (37,38,39). Miyokardiyal viyabilitenin düzeltilmesinde bu ilginç ve heyecan verici gelişmelere rağmen, kemik iliği kök hücresi kullanımında halen önemli bazı sorunlar aşılabilmiş değildir. Birincisi çoğalma yeteneğine sahip yeterli sayıda farklılaşmış hücre in vitro olarak henüz gösterilebilmiş değildir. İkincisi özellikle farklılaşmamış kök hücre kullanıldığında, kemik, kıkırdak gibi kas dışı dokuların gelişebilmesi riskidir. (40).

**4. Kalp hücresi transplantasyonu:** Yetişkin kalp hücresi transplantasyonu senkron kasılmayı sağlamada nonkardiyak hücre transplantasyonundan daha büyük bir potansiyele sahiptir. Hayvan çalışmalarında atriyal ve ventriküler septum hücrelerinin ventriküler skar dokusu içine verildiğinde burada yaşadıkları, skar genişlemesini engelledikleri ve ventrikül fonksiyonlarını iyileştirdikleri gösterilmiştir (41). Hücresel transplantasyon için kardiyomiyositler ideal gibi görünürler de kullanım için bazı önemli kısıtlamaları vardır. Birincisi bu hücrelerin elde edilebilmesi zordur. İkincisi çoğalma yetenekleri çok azdır. Son olarak da iskemik alanda yaşayabilmeleri miyositlere göre çok azdır (42).

**5. Periferik kan transplantasyonu:** Deney hayvanlarında yapılan çeşitli çalışmalarda periferik kandan endotelial progenitör (öncü) hücreler başarılı bir şekilde izole edilebilmiştir (43,44). İnsanda da periferik kandan endotelial öncü hücreler izole edilip kültürü yapılmış ve kültür ortamında çoğaltılabilmektedir (44). Bu hücrelerin hayvanlarda kritik ekstremitelerde tedavi edici noevaskülarizasyon için kullanıldıklarında damarlanmayı arttırdıkları, ekstremitelerde nekrozunu azalttıkları ve otoamputasyonu önledikleri gösterilmiştir. Ex vivo olarak çoğaltılmış insan endotelial öncü hücrelerinin intravenöz verildiğinde miyokarddaki iskemik dokuya girerek ventrikül fonksiyonlarını düzelttikleri saptanmıştır (45).

**6. Umbilikal kord kanı transplantasyonu:** İnsan umbilikal kord kanının çok sayıda hemopoietic colony-forming hücre içerdiği ve bunların periferik kandan elde edilen hücrelerden çok daha fazla proliferatif aktiviteye sahip oldukları gösterilmiştir. İnsan umbilikal kord hücrelerinin ekstremitelerde iskemisini düzelttikleri tespit edilmiştir (46,47,48).

## HÜCRESEL KARDİOMYOPLASTİ YÖNTEMLERİ VE KLİNİK DENEYİMLER

**1. Cerrahi hücresel kardiyomyoplasti (Epikardiyal yaklaşım):** Teorik olarak hücrelerin miyokard içine doğrudan enjeksiyonunun bazı avantajları vardır. En doğru ve en iyi hücre dağıtımı torakotomi esnasında doğrudan görülerek yapılabilir. Hayvan çalışmalarının çoğunda bu yaklaşım kullanılmaktadır. Hastalara uygulama genelde koroner arter baypas sırasında cerrahi işlem ile birlikte yapılmaktadır. Bu yaklaşımın kullanıldığı on hastalık bir seride, bir hasta işlem sonrası mezenterik infarktüs ve bir hastada işlemden bir yıl sonra serebro-vasküler olay nedeniyle kaybedilmiştir. Dört hastada işlem sonrası 2-4 hafta içinde ventriküler taşikardi gelişmiş ve bu hastalardan ikisine implantabl kardiyoverter defibrilatör takılmış. Tüm hastaların takibinde global ve bölgesel ventrikül fonksiyonlarında belirgin iyileşme gözlenmiştir. Yine bu yöntemle transplantasyona aday iki hastaya ventriküler assist device implantasyonu esnasında otolog miyoblast implantasyonu yapılmış, ancak bu hastalardan biri işlem sonrası takip sırasında sepsisten ölmüş, diğer hastaya ise daha sonra ortotopik kalp transplantasyonu yapılmıştır. Koroner bypass ile kombine hücresel kardiyomyoplasti uygu-

laması çok merkezli bir çalışma ile denenmeye başlanmıştır (21,45,49).

**2. Transkatater endokardiyal yaklaşım (Femoral arter yoluyla):** Transtorasik yaklaşıma göre bu yöntem daha az invazifdir. Yöntem için özel üretilmiş kateterlerle femoral arter yolu ile floroskopi altında uygulama mümkündür. NOGA sistemi de uygulamada kullanılmaktadır. Yöntemin kullanıldığı beş hastalık bir seride işleme bağlı bir komplikasyon gelişmemiştir. Bir hastaya işlemden üç ay sonra implantabl kardiyoverter defibrilatör takılmış, hastalar işlemden bir gün sonra taburcu edilmiştir. Çalışmaya alınan hastaların işlem öncesi ejeksiyon fraksiyonları %39 (MUGA); %45 (ventrikülografi)'den işlem sonrası kontrolde %56 (MUGA), %54 (ventrikülografi)'ye yükselmiş. Avrupa'da bu yöntemin kullanıldığı çok merkezli bir çalışma yürütülmektedir. Yine Amerika da çok merkezli bir çalışma planlanmıştır (45,49).

**3. Transkatater intramiyokardiyal yaklaşım (Koronar ven yoluyla):** Bu yöntem için düzenlemiş kateter henüz yeni olup araştırmaları devam etmektedir. Kateterin ucuna bir İVUS probu eklenmiştir. Floroskopi altında femoral ven yolu ile kalbe ulaşıp koroner sinüsten kardiyak venlere girilerek enjeksiyon yapılmaktadır. Bu yöntemde, arterin venle beraber seyretmesi nedeniyle infarkt bölgesine ulaşmak nispeten kolaydır. Uzaysal oryantasyon kateter ucundaki İVUS probu ile sağlanmaktadır. Bu yöntemin kullanıldığı on olguluk bir seri için çalışma başlatılmıştır (45).

**4. İntrakoronar yaklaşım:** Miyokardın infarkt bölgesine hücre verilmesi teorik olarak mümkün ve teknik olarak kolaydır. Bu PTCA ile birlikte yapılabilir. Bu konuda çeşitli araştırmacılar tarafından yapılmış hayvan çalışmaları vardır. Bu çalışmalarda intrakoronar verilen miyoblastların kardiyak dokuya geçtikleri ve burada konakçı doku ile füzyon oluşturdukları gösterilmiştir (27,45).

**5. İntravenöz yaklaşım:** Bu uygulama çok daha basit ve çok daha az invazif bir yoldur. Yöntem çok az morbidite ile uygulanabilir. Gerektiğinde işlemin tekrarı kolaydır. Ashara ve ark. kemik iliği ve periferik kandan elde edilen endotelial öncü hücreleri bu yöntemle uygulamışlar ve bu hücrelerin iskemik bölgeye yüzeyel olarak inkorpore olduklarını, olgun en-

dotelial hücrelere dönüşerek ventrikül fonksiyonlarını arttırdıklarını göstermişlerdir (45).

## 2. GEN TEDAVİSİ

Gen tedavisi, hastalığın tedavisi veya önlenmesi için doku içine rekombinant DNA verilmesi şeklinde tanımlanabilir. Genel olarak iki tane gen tedavi yöntemi vardır. Birincisi in vivo gen tedavisidir. Bu yöntemde genetik materyal (genellikle viral vektör kullanılarak) hastaya doğrudan verilir. Doğrudan hedeflenen dokuya da verilebilir. Örneğin anjiyojenik molekül genlerinin koroner yoldan infarkt alanına verilmesi. İkinci yöntem eks-vivo gen tedavisidir. Bu yöntemde ise, hastadan alınan hücrelere vücut dışında yine viral vektörler kullanılarak amaçlanan gen sokulduktan sonra hücreler tekrar vücuda verilir. Hücresel kardiyomiyoplastide kullanılan hücreler genetik olarak modifiye edilerek infarkt alanına verilmesi eks-vivo gen tedavisi örneğidir. Eks-vivo gen tedavisinin, in vivo gen tedavisine göre en önemli avantajı kullanılan DNA veya genetik materyalin vücuda dağılmaması ve buna bağlı beklenmedik etkilerin ortaya çıkmamasıdır. Her iki gen tedavi yöntemi de miyokard infarktüsü ve ardından gelişen KY tedavisinde kullanılabilir. Gen tedavisinde viral olmayan DNA'da kullanılabilir. İlginç olarak iskelet kası ve kalp kası doğrudan intramusküler enjeksiyondan sonra ekstrasellüler alandan yabancı DNA'yı alma ve ekspresye etme yeteneğine sahiptir (50). Hücresel kardiyomiyoplasti aynı zamanda bir gen dağıtım sistemi olarak da kullanılabilir (51,52, 53,54). Bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmış ve sonuçta genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin doğal hücrelere göre miyokard fonksiyonlarını daha fazla düzelttiği gösterilmiştir.

## GEN TEDAVİSİ UYGULAMALARI

Nonviral plazmid DNA'sı veya adenoviral vektörler aracılığı ile sağlanabilen uzun dönem gen tedavisi belki bazı kalıtsal genetik defektler için uygun olabilir. Ancak edinsel miyokardiyal zedelenmeler için uzun dönem gen tedavisi uygun gibi görülmemektedir. Gen transferi çalışmalarında edinsel zedelenmeler için kısa dönem veya geçici ekspresyonun güvenlik profili doğrulanmıştır. Yalın vasküler VEGF geninin kullanıldığı dört çalışmaya katılan 84 hastanın sadece üçü kaybedilmiştir. Yine 97 hastanın katıldığı



adenovirusa kodlanmış FGF ve 121 hastanın katıldığı VEGF'in kullanıldığı ve işlem sonrası bir-üç yıllık takipleri olan iki çalışmada sadece beş hasta kaybedilmiştir (55). Bu sonuçlar lazer miyokardiyal revaskülarizasyon uygulanan hastalarla karşılaştırıldığında işlem güvenliği açısından daha iyidir. şu anda kardiyovasküler alanda devam eden otuz kadar gen tedavisi çalışması vardır (56).

**1. Hücresel kalsiyum metabolizmasının düzeltilmesi (sarkoplazmik retikulum ATPaz (SERCA) geni transferi):** Kalsiyumun düzenlenmesi miyositin kontraktil aparatının kontrolünde temel biyokimyasal olaydır. İnositol trifosfat endoplazmik retikulumdan salınan kalsiyumu uyarırken, SERCA endoplazmik retikulum kalsiyum depolarını korumaya çalışır (4,55). SERCA proteinleri SERCA 1, SERCA 2 ve SERCA 3 diye adlandırılan üç ayrı genin ürünleridirler. SERCA 1 yetişkinlerde başlıca SERCA 1a ve yeni doğanda SERCA 1b olarak iskelet kasından eksprese edilir. SERCA 2a kalp kasından, SERCA 2b ise tüm hücrelerden eksprese edilmektedir. SERCA 3'ler halen araştırılmaktadırlar (56). SERCA 2a'nın adenoviral overekspresyonunun sıçan KY modelinde hem sistolik hem de diyastolik fonksiyonları düzelttiği gösterilmiştir (57). Benzer bulgular transgenik fare modellerinde de elde edilmiştir (58). Son zamanlarda, bir endojen sarkoplazmik retikulum kalsiyum pompası inhibitörü olan fosfolambanın antisense geninin overekspresyonunun SERCA 2a aktivitesini düzelttiği ortaya konmuştur (59).

## 2. Adrenerjik reseptörlerin düzenlenmesi

Sempatik sinir sistemi kalp hızı ve kontraktiliteyi arttırarak kalp fonksiyonlarını güçlendirir. Sempatik sistemin mediyatörleri olan adrenalin ve noradrenalin reseptörle çalışan kalsiyum kanallarını etkileyerek kontraktiliteyi arttırır (4). KY'de  $\beta$ -adrenerjik uyarı anormallikleri iyi bir şekilde tanımlanmıştır. Bu anormallikler  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin "down-regülasyon"u, ikincil mesajcı sistemin "uncoupling"ini ve  $\beta$ -adrenerjik reseptör kinazın "upregülasyon"unu içerir (55). Murice ve ark. (60) viral partiküllere kodlanmış  $\beta$ -adrenerjik reseptör genlerini normal tavşanlara intrakoroner verdikten sonra, üçüncü haftaya kadar gen ekspresyonunun arttığını ve üç haftadan sonrada artmış düzeyin devam ettiğini göz-

lemişler. Bu çalışmada izoproterenol ile uyarılan kontraktilite belirgin derecede artmıştır. Bir başka çalışmada, önceden böbreklerde adenilat siklaz aktivitesini düzelttiği gösterilmiş olan adenoviral vazopressin V<sub>2</sub> geni verilerek tavşan ve fare miyokardında fraksiyonel kısalmanın arttığı gösterilmiştir. G-proteini ile eşleşmiş reseptör kinaz ailesinin bir üyesi olan  $\beta$ -adrenerjik reseptör kinaz 1,  $\beta$ -adrenerjik reseptörler gibi agonistle işgal edilen reseptörleri fosforlayarak maladaptif reseptör desensitizasyonuna neden olur (61). Shah ve ark. (62) oluşturdukları tavşan kalp yetersizliği modelinde  $\beta$ -adrenerjik reseptör kinaz 1'in peptid inhibitörlerinin kodlandığı viral partikülleri kullanarak sol ventrikül sistolik fonksiyonlarında iyileşme olduğunu gözlemlemişlerdir.

## 3. Apoptozisin önlenmesi

Çeşitli gruplar KY'de kardiyomiyosit apoptozisinin olduğunu göstermişlerdir. Gen transfer teknikleri miyosit ömrünü uzatarak yararlı olabilirler (63). Ancak henüz P53 ve hipoksi tarafından uyarılan apoptozisi durdurmak için Bcl-2 ve Akt genlerinin adenoviruslar ile transferinin in vitro deneysel çalışmalar-da yararlı olduğunu destekleyen veri yoktur (64,65).

## 4. Tedavi edici anjiyogenezis:

İlk deneysel veriler, kısa dönem gen ekspresyonu kullanılarak yapılan teröpatik anjiyogenezin KY'de fonksiyonel iyileşme sağlayabileceğini desteklemiştir. Dilate kardiyomiopati de interstisyel fibrozis tipik bir bulgudur. Bu hastalarda kapiller yoğunluk belirgin olarak azalmış, şiddetli reaktif interstisyel fibrozis bölgesinde oksijen diffüzyon mesafesi artmıştır. İnterstisyel fibrozis kardiyak miyositlerin komşu kapillerlerden perfüzyonunda bariyer oluşturmaktadır. VEGF gen defekti oluşturulan hayvanlarda dilate kardiyomiyopatinin tipik bulguları ortaya çıkmıştır (66). KY'nin en önemli nedeni olan iskemik kalp hastalıklarında da anjiyogenezis önemli bir tedavi hedefidir.

**a. Vasküler endotelial büyüme faktörü:** Tedavi edici anjiyogenezis için en çok kullanılan faktördür. VEGF ailesinin A, B, C, D, E, plasental büyüme faktörü gibi çok sayıda üyesi vardır. Etkisini biyolojik etkinliğini düzenleyen çeşitli membran tirozin kinaz reseptörleri aracılığı ile gösterir. Diğer anjiyojenik büyüme faktörlerinden çeşitli yönleriyle farklı-

dır. Birincisi endotel hücrelerine yüksek bağlanma aktivitesi nedeniyle endotel spesifiktir. İkincisi geni sekretuar bir uyarı uzantısına sahiptir ve sağlam hücrelerden doğal olarak salınır. Üçüncüsü hem molekülün kendisinin hem de reseptörünün ekspresyonu hipoksi tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. Geni hipoksiyi algılayan bir promotor bölgeye sahiptir. Hipoksi durumlarında mRNA stabilitesi (posttranskripsiyon düzenleme ile) artar ve reseptörleri up-regüle olur. Dördüncüsü kemik iliği kökenli endotelial öncü hücrelerin hareketlenme, göç ve çoğalmasını sağlar (67). VEGF geninin kullanıldığı çok sayıda hayvan ve insan çalışmaları olup sonuçları ümit vericidir (52,54,55,56,68,69).

**b. Fibroblast büyüme faktörü:** FGF ailesi in vivo endotel ve düz kas hücreleri için mitojeniktir ve deneysel modellerde hem anjiyogenezisi hem de arteriyogenezisi uyarır. Değişik hücre tiplerinde çeşitli FGF'lerle yapılmış çalışmalar vardır. Bunların endotelial hücrelerde, makrofajlarda ve monositlerde reseptörleri vardır. Bu faktör geni ile ilgili çok sayıda hayvan ve insan çalışmaları yapılmış ve yapılmaktadır (14,17,67,70).

**c. Hepatosit büyüme faktörü:** Anjiyogenezisi uyara-bilen bir diğer büyüme faktörüdür. Bununla ilgili çalışmalar devam etmektedir (56).

**d. Diğerleri:** Üzerinde çalışılan diğer faktörler monosit kemotaktik protein ve PDGF'dir. Bunlar muhtemelen VEGF üretimini arttırarak dolaylı yoldan anjiogenezisi uyarırlar (56).

## 5. Nükleer transfer ve genom tedavisi

Miyoblast transfer tedavisi, normal genomu olmayan hücrelerin tedavisinde alternatif bir yaklaşımdır. Miyogenezis ve kas rejenerasyonu sırasında doğal hücre füzyonu olağandır. Verici miyoblastları hasta dokuya verilip çok çekirdekli heterokaryon oluşturularak defektif genlerin ürünleri verilen genom sayesinde yerine konabilir. Sadece normal çekirdek transferi hem genomik "software" hem de kromozomal "hardware" taşır. Ayrıca genlerin düzenlenmesi ve ekspresyonu için gerekli ko-faktörler de bu yöntemle sağlanmış olmaktadır. Miyoblast transfer tedavisini takiben verici çekirdeği içindeki normal genomun doğal transkripsiyonu tek gen bozukluğu nedeniyle veya tehlikeli poligenik ilişkiler nedeniyle oluşan herhangi bir protein eksikliğini güvenli şekilde yeri-

ne koyabilir. Miyoblast transfer tedavisi, şu anda insan genom tedavisi için kullanılabilen tek yöntemdir. Miyoblast doğal hücre füzyonu yeteneğine sahip tek somatik hücredir. Teknik 12 yıldan beri Duchenne ve Becker tipi musküler distrofi 230 hastada uygulanmıştır. Bu uygulamalara bağlı ölüm olayı veya ciddi organ yetersizliği gözlenmemiştir. 1990 yılından beri çeşitli laboratuvarlarda infarkt yapılmış hayvanlara otolog miyoblast enjeksiyonunun etkinliği ve güvenilirliği gösterilmiştir. Kalp hücre tedavisinin güvenilirliğini ve fizibilitesini saptamak için mayıs 2000'de insan miyoblastları perkutanöz ve endovasküler enjeksiyon ile domuz kalbine intramiyokardiyal olarak verilmiştir. Deneysel aşamada kateter enjeksiyonuna bağlı ölüm oranı %5'den az bulunmuş, miyokardiyal perforasyon gözlenmemiştir.

Sonuç olarak KY tedavisinde olumlu ön sonuçları alınmış ve insan uygulamasına geçilmiş bu yeni yöntemler tek başlarına veya birlikte faz 1 ve faz 2 aşamasında denenmektedirler. Yakın bir gelecekte günlük tedavi pratiğine girmeleri beklenmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Givertz MM, Colucci WS, Braunwald E: Clinical aspects of heart failure: High output heart failure; Pulmonary edema. Heart Disease (6th ed.). Braunwald, Zipes, Libby (eds). WB Saunders Company. London. 2001; p534-35
2. Williams RS: Cell cycle control in the terminally differentiated myocytes. Cardiol Clin 1998; 16:739-54
3. Li RK, Yau TM, Sakai T: Cell therapy to repair broken heart. Can J Cardiol 1998; 14:735-44
4. Mayer NJ, Stanley PD, Rubin A: Molecular and cellular prospects for repair, augmentation, and replacement of the failing heart. Am Heart J 1997; 134:577-86
5. Anversa P, Kajstura J: Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. Circ Res 1998; 83:1-14
6. Slack JMW: Role of fibroblast growth factors as inducing agents in early embryonic development. Mol Reprpd Dev 1994; 39:118-24
7. Jacson T, Allart MF, Sreenan, et al: Transgenic animals as a tool for studying the effect of the c-myc proto-oncogene on cardiac development. Mol Cell Bioch 199; 104:15-9
8. Soonpaa MH, Koh GY, Pajak L, et al: Cyclin D1 overexpression promotes cardiomyocyte DNA synthesis and multinucleation in transgenic mice. J Clin Invest 1997; 99:2644-54
9. King RW, Jackson PK, Kirschner MW: Mitosis in transition. Cell 1994; 79:563-71



10. Sun Y, Weber KT: Infarct scar: a dynamic tissue. *Cardiovasc Res.* 2000; 46:250-6
11. Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G: Transform growth factor- $\beta$ 1 induces  $\alpha$ -smooth muscle actin expression granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* 1993;122:103-11
12. Gabbiani G: Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res* 1998; 38:545-48
14. van Royen N, Piek JJ, Buschmann I, et al: Stimulation of angiogenesis; a new concept for the treatment of the arterial occlusive disease. *Cardiovasc Res* 2001; 49:543-53
15. Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, et al: Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: First clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998; 97:645-50
16. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, et al: Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348:370-4
17. Gonçalves LM: Angiogenic growth factor: potential new treatment for acute myocardial infarction? *Cardiovasc Res* 2000; 45:294-302
18. Bishop SP, Anderson PG, Tucker DC: Morphological development of the rat heart growing in oculo in the absence of hemodynamic work load. *Circulation Research.* 1990; 66:84-102
19. Jockusch H, Fuchtbauer E, Fuchtbauer A, et al: Long-term expression of isomyosins and myoendocrine function in ectopic grafts of atrial tissue. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 83:7325-9
20. Soonpaa MH, Koh GY, Klug MG, et al: Formation of nascent intercalated disc between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium. *Science* 1994; 264:98-101
21. Li RK, Jia ZQ, Weisal RD, et al: Cardiomyocyte transplantation improves heart function. *Ann Thorac Surg* 1996; 62:654-61
22. Reinecke H, Zhang M, Bartosek T, Murry CE: Survival, integration and differential of cardiomyocyte grafts. *Circulation* 1999; 100:193-202
23. Skerjanc IL: Cardiac and skeletal muscle development in P19 embryonal carcinoma cell. *Trends Cardiovasc Med* 1999; 9:139-43
24. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103:697-705
25. Reinecke H, Mac Donald GH, Hauschka D, Murry CE: Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle: Implication for infarct repair. *J Cell Biol* 2000; 149:731-39
26. Atkins BZ, Lewis CW, Kraus WE, et al: Intracardiac transplantation of skeletal myoblast yield two populations of striated cell in situ. *Ann Thorac Surg* 1999; 67:124-29
27. Taylor DA, Silvestry SC, Bishop SP, et al: Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: a potential approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Physicians.* 1997;109:245-53
28. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al: Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature Medicine.* 1998; 4:929-33
29. Chiu RCJ, Zibaitis A, Kao RL: Cellular cardiomyoplasty: Myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:12-18
30. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT, et al: Comparison of benefit on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblast and fibroblast. *Cell Transplant* 2000; 9:359-68.
31. Atkins BZ, Hueman MT, Meuchel J, et al: Cellular cardiomyoplasty improves diastolic properties of injured heart. *J Surg Res* 1999; 85:234-42
32. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM, Hauschka D: Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98:2512-23
33. Atkins BZ, Emani S, Hutcheson K, et al: Transplanted autologous skeletal myoblast improve myocardial performance after coronary artery ligation. *Cardiac and Vascular Regeneration* 2000; 1:76-84
34. Scorsin M, Souza LCG: Cellular transplantation for the treatment of heart failure. State of the art. *Arq Bras Cardiol* 2001; 77:103-6
35. Hongchao W, Gaofeng Z, Chenhui Q, et al: Inhibition of myocardial fibroatrophy by autologous satellite cells implantation after permanent coronary occlusion in a canine model. *Chin Med J* 2001; 114:200-7
36. Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, Mickle DAG: Smooth muscle cell transplantation into myocardial scar tissue improves heart function. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31:513-22
37. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al: Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100: 247-56
38. Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cell. *J Clin Invest* 2001; 107:1395-1402
39. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al: Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105:93-8
40. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143-47
41. Li RK, Weisel RD, Mickle DAG, et al: Autologous porcine heart cell transplantation improved heart function after a myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119:62-8

42. Taylor DA: Cellular cardiomyoplasty with autologous skeletal myoblast for ischemic heart disease and heart failure. *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 2001; 2:208-10
43. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 965-67
44. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, et al: Transplantation of ex-vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:3422-27
45. Smits PC, Lee RC, van der Giessen W, et al: Cell transplantation for myocardial repair. In: *The Paris Course on Revascularisation*. Eds: Marco J, Serruys P, Biamino G, et al. Paris May 2002: 258-59
46. Murohara T, Ikeda H, Duan J, et al: Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augmented postnatal neovascularization. *J Clin Invest* 2000; 105:1527-36
47. Kalka C, Iwaguro H, Masuda H: Generation of differentiated endothelial cells from mononuclear cells of human umbilical cord blood. *Circulation* 1999; 100:I-749
48. Murohara T: Therapeutic vasculogenesis using human cord blood derived endothelial progenitors. *Trends Cardiovasc Med* 2001; 11:303-7
49. Sherman W: Myocardial regeneration-the next frontier for ventricular dysfunction? *Cardiology International* 2002; 3:53-9
50. Taylor DA, Aleem SA: Treating cardiovascular disease in the 21st century: A brief review of potential targets for cardiac gene therapy. *Egypt Heart J* 1997; 49:391-97
51. Murry CE, Kay MA, Bartosek T, Hauschka D, Schwartz SM: Muscle differentiation during repair of myocardial necrosis in rats via gene transfer with myoD. *J Clin Invest* 1996; 10:2209-17
52. Yau TM, Fung K, Weisel RD, et al: Enhanced myocardial angiogenesis by gene transfer with transplanted cells. *Circulation* 2001; 104: 218-22
53. Nabel EG: Stem cells combined with gene transfer for therapeutic vasculogenesis. *Circulation* 2002; 105:672-74
54. Suzuki K, Murtuza B, Smolenski R, et al: Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor-expressing skeletal myoblasts. *Circulation* 2001; 104:207-13
55. Isner JM: Myocardial gene therapy. *Nature* 2002; 415:234-39
56. Seppo YH, John M: Cardiovascular gene therapy. *Lancet* 2000; 355:213-24
57. Miyamoto M, del Monte F, Schmidt U, et al: Adenoviral gene transfer of SERCA 2a improves left ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:793-97
58. He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R et al: Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 1997; 100:380-89
59. He H, Meyer M, Martin JL, et al: Effect of mutant and antisense RNA of phospholamban on SR Ca<sup>2+</sup> ATPase activity and cardiac myocyte contractility. *Circulation* 1999; 100:974-80
60. Maurice JP, Hata JA, Shah AS, et al: Enhanced of cardiac function adenoviral mediated in-vivo intracoronary  $\beta_2$ -adrenergic gene delivery. *J Clin Invest* 1999; 104:21-29
61. Weig H-J, Laugwitz KI, Moretti A, et al: Enhanced cardiac contractility after gene transfer of V2 vasopressin receptor in-vivo by ultrasound guided injection of transcoronary delivery. *Circulation* 2000; 101:1578-85
62. Shah AS, White DC, Emami S, et al: In vivo ventricular gene delivery of a  $\beta$ -adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. *Circulation* 2001; 103:1311-6
63. Haunsettinger A, Izumo S: Toward antiapoptosis is a new treatment modality. *Circ Res* 2000; 86:371-76
64. Matsui T, del Monte F, Fukui Y, et al: Adenoviral gene transfer of activated PI3-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in-vitro. *Circulation* 1999; 275:661-65
65. Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K: Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischaemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circulation* 2000; 101:6660-67
66. Weber KT, Pick R, Silver MA, et al: Fibrillar collagen and remodelling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 1990; 82:1387-401
67. Baumgartner I, Isner JM: Gene therapy. Willerson JT, Conh JN (eds). *Cardiovascular Medicine*. New York, Churchill Livingstone. 2000 p 1417-25
68. Nabel EG: Stem cell combined with gene transfer for therapeutic vasculogenesis. *Circulation* 2002; 105:672-74
69. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al: Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002; 105:2012-18
70. Lederman RJ, Tenaglia AN, Anderson RD, et al: Design of the therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (TRAFFIC) trial. *Am J Cardiol* 2001; 15:192-95