

10-06-2009



rijksuniversiteit
 groningen

Naam: Linde Woudstra

Begeleider: Marco Harmsen



[BACHELORSCRIPTIE]

Mesenchymale stamcellen voor de behandeling van hartinfarcten



Inhoudsopgave

Inhoudsopgave	2
Samenvatting	3
1. Inleiding	3
2. Stamcellen en het voordeel van MSCs	4
3. Differentiatie van MSCs	5
4. Hoe verbeteren MSCs de hartfunctie?	5
4.1 Ontstekingsremmende werking	5
4.2 Minder collageen	8
4.2.1 Collageen-GAG voor gecontroleerde afbraak.....	8
4.3 MSC rol in angiogenese en reperfusie	8
4.4 Immune modulatie	9
4.5 MSCs induceren nieuwe vascularisatie door VEGF	10
5. Wijze van toedienen	11
6. Optimale tijdstip om MSCs toe te dienen	11
7. Het effect van de leeftijd van de MSCs	12
8. Geen verschil van gedifferentieerde en ongedifferentieerde MSCs op de werking ..	12
9. MSCs verbeteren met atorvastatine behandeling	13
10. G-CSF kan de myocardiële regeneratie verbeteren	13
11. Het elektrofysiologisch remodeleren van hartspiercellen	13
12. Conclusie	14
Referenties	14



Samenvatting

Hartfalen is een veelvoorkomende ziekte waarbij hartcellen afsterven, welke gepaard gaat met ontsteking, littekenvorming en remodelling. Naast harttransplantaties zijn er tegenwoordig ook nieuwe behandelingsmethoden, waaronder de transplantatie van beenmerg verkregen mesenchymale stamcellen (MSC). MSCs kunnen zowel constructief zijn en differentiëren naar weefselcellen of ze kunnen instructief zijn door allerlei stoffen uit te scheiden. Ze hebben unieke voordelen, waaronder zelfreplicatie, differentiatie, immuunprivilege, immuunsuppressie en mogelijkheid om zich te nestelen. Zo kunnen ze de immuunreactie ontduiken doordat ze geen MHC II hebben en de T-cel proliferatie remmen en kunnen ze de ontsteking remmen door cytokines (TNF- α , IL-1 β en IL-6) uit te scheiden. Verder zorgen MSCs door onder andere collageen en vascular endothelial growth factor voor nieuwe vascularisatie, welke op zijn beurt zorgt voor angiogenese en myogenese. Deze effecten zorgen uiteindelijk voor een betere hartstructuur en -functie. Het resultaat van het gebruik van MSCs kan ook beïnvloed worden door het tijdstip waarop deze worden toegediend. Het optimale tijdstip ligt namelijk 1-2 weken na een hartinfarct. Verder kan een voorbehandeling van MSCs, zoals atorvastatine, zorgen voor een betere werking van MSCs. Samen genomen kunnen MSCs een veelbelovende optie zijn voor hart regeneratie.

1. Inleiding

Ischemische hartziekten zijn de primaire oorzaak van sterfte over de wereld. Een obstructie in de coronaire arteriën kan leiden tot een myocard infarct, welke geassocieerd is met een onomkeerbaar verlies van hartspiercellen en littekenformatie.¹ Dit zorgt voor extra last op het overleefde myocardium en kan zelfs leiden tot hartfalen. Doordat veel mensen last hebben van hartfalen is er meer aandacht naar een nieuwe benadering voor de preventie en behandeling van hartfalen. De enige standaard therapie voor hartfalen tot nu toe, voor het verliezen van hartspiercellen, is transplantatie van het hart.² Dit heeft het doel om het werk van het hart te verzachten door de hemodynamic load te verminderen. Echter wordt deze oplossing beperkt door de beschikbaarheid van donororganen. Verder is de ontwikkeling van een immuunreactie een obstakel, deze heeft een levenslange immuunsuppressie therapie nodig.³

Tot voor kort werd gedacht dat hartspiercellen definitief gedifferentieerde cellen waren. Wat suggereert dat hypertrofie alleen beschikbare methode was voor groei. Dit concept was uitgedaagd vanwege zowel experimentele als klinische studies, welke hebben laten zien dat sommige volwassen cellen weer terug kunnen keren in de mitose cyclus.³ Echter is de omvang van

dit zelfreparatie mechanisme veel te beperkt om te compenseren voor het enorme verlies van hartspiercellen onder invloed van het infarct. Het idee is dat zulke patiënten behandeld kunnen worden door een exogene toevoeging van nieuwe contracterende cellen, die de functie herstellen in necrotische gebieden en helpen bij het herwinnen van het hart om effectiever en efficiënter te kunnen contracteren, ook wel hart regeneratie genoemd. Dit lijkt een logische, aantrekkelijke en vooral spannende invalshoek. Alleen moeten exogene cellen voldoen aan een aantal criteria³: eenvoudig te verzamelen en te vermenigvuldigen zijn, stabiele intramyocard transplantaties vormen, moeten op het gebied van membraan potentiaal kunnen koppelen aan de gastheer hartspiercellen en gelijktijdig kunnen contracteren met deze, en moeten geen van ritmestoornissen en oncologische effecten hebben.

Door problemen na een hartinfarct, zoals ontsteking, zijn klinische manifestaties buitengewoon groot. De schade aan het linker ventrikel (LV) moet deze zorgen voor verbeterde remodelling en kamerverwijding. Tegelijkertijd moet er hartspiercellen ontsporing en fibroblast deling plaatsvinden.⁴ Deze gebeurtenissen laten duidelijk een gebrek aan effectieve intrinsieke



mechanismes zien voor myocard reparatie en regeneratie. Behalve als er grote veranderingen geïntroduceerd worden in het gebied van de schade die voor de deling van de overgebleven hart stamcellen zorgen, moeten alle herstellende therapieën het gebruik overwegen van exogene multi-potente stamcellen. Deze moeten tenminste in staat zijn zichzelf te delen en te differentiëren in hartspiercellen. Vanuit dit oogpunt gezien zijn bone marrow-located stemcells (BMDS) de beste optie om de biologische eigenschappen te laten zien voor celtherapie van patiënten met een hartinfarct.⁴ Het doel van deze review is de stand van zaken te behandelen over de transplantatie van beenmerg verkregen mesenchymale stamcellen (MSC) om de hartfunctie te verbeteren naar een hartinfarct.

2. Stamcellen en het voordeel van MSCs

Vroeger werd gedacht dat alle cellen in het hart definitief gedifferentieerd waren. Een verlies dat een onomkeerbaar fenomeen was. In 2001 is echter aangetoond dat als beenmerg verkregen cellen geïnjecteerd werden in het geïnfecteerde myocardium dit voor weefsel regeneratie zorgde.⁵ Dit werd in eerste instantie gedaan door de cellen direct te injecteren in het myocardium en was later opnieuw gedaan met cytokine cocktails die ontworpen waren om de MSCs te stimuleren om ze zo te mobiliseren en differentiëren.⁶ Het idee dat MSCs zouden kunnen migreren naar het verwonde myocardium en voor weefselherstel konden zorgen werd later ook bevestigd. Daarnaast is ontdekt dat monsters, die genomen zijn uit de autopsie van patiënten die overleden waren aan een hartinfarct, myocyten bevatten met een cel cyclus marker.⁷ Dit ondersteunt het idee dat hartspiercellen kunnen toenemen als gevolgen van schade. Tevens is aangetoond dat de aanwezigheid van hartspiercellen in het hart van zoogdieren, die gekloond waren, de capaciteit hadden om hartspiercellen, endotheelcellen, en gladde spier cellen te vormen.⁷ Deze observaties garanderen een spannende mogelijkheid om regeneratieve strategieën in het gareel te houden om structurele hartziekten te behandelen. Tevens hebben ze voor veel nieuwe inzichten en actiemechanismes

gezorgd om op basis van cellen therapeutische invalshoeken te overwegen.

Hoewel MSCs slechts aanwezig zijn als zeldzame populatie van cellen in het beenmerg en misschien 0,001% tot 0,01% van de cellen met een celkern vertegenwoordigen⁸, kunnen ze geïsoleerd worden door gebruik te maken van centrifugering van een dichtheid gradiënt en kunnen, *in vitro*, behoorlijk toenemen.⁷ Daarom zijn MSCs tegenwoordig te onderzoeken als een aantrekkelijke kandidaat om te gebruiken bij myocard regeneratie.

Deze bevindingen hebben Amando et al.⁹ er toe geleid een onderzoek te doen met intramyocard injectie van allogene MSCs in varkens na een hartinfarct. Hierbij werden cellen geïnjecteerd in het LV via katheter op dag drie na het infarct en werd de hartfunctie na acht weken beoordeeld. De behandelde dieren lieten een significante verbetering zien in zowel systolische als diastolische functie vergeleken met de controles. Daarnaast was de grootte van het necrotische myocardium behoorlijk verminderd. Later zijn deze resultaten nagedaan door Makkar et al. volgens een soortgelijk protocol.¹⁰ Het interessante van beide studies was dat ze allebei allogene MSCs gebruikten zonder een immuun respons op te wekken. Dit bevestigt eerdere informatie dat MSCs geen MHC II (Major Histocompatibility Complex) co-stimulatie B-7 molecuul tot expressie brengen en daardoor dus geen immunologische response veroorzaken. Bovendien is nu laten zien dat deze cellen daadwerkelijk zorgen voor remming van T-cel deling bij antigeen presentatie.⁷ Deze eigenschappen zijn extreem belangrijk bij klinische toepassingen. Doordat MSCs minder immunogeen zijn dan andere stamcellen kunnen ze misschien gebruikt worden bij allogene celtherapie.

Naast myocard regeneratie is er een hypothese dat getransplanteerde stamcellen oplosbare mediators (paracrines) uitscheiden die de ischemische weefselschade tegenhouden. Tang et al.¹¹ heeft in een rat model MSCs getransplanteerd en heeft hoge weefsel concentraties van vascular endothelial growth factor (VEGF) gevonden en dit geassocieerde met



nieuwe myocard vaatformatie. Tevens observeerde Gnecci et al.¹² dat het herstel van de hartfunctie op zijn vroegst 72 uur na de cel transplantatie optrad. Tijd waarin cel regeneratie nog niet te verwachten is. Deze onverwachte ontdekking was toe te schrijven aan de handhaving van de integriteit van de hartspiercellen. In overeenstemming met deze hypothese zijn hoge niveaus van groeifactoren ontdekt in ischemische MSC getransplanteerde herten, welke begeleid waren met downregulatie van de pro-apoptotic eiwit Bax.⁷ Samen genomen kunnen deze observaties suggereren dat getransplanteerde MSCs een paracrine effect hebben. De paracrine hypothese wordt nu ondersteund door research, welke het sterke effect van exogene groeifactoren in overleving, deling en differentiatie van circulerende stamcellen bemoedigd.

Verder hebben MSCs de mogelijkheid om zich te nestelen in gebieden van een weefsel met beschadiging of ontsteking. Ondanks dat cytostatische factoren verantwoordelijk zijn voor specifieke MSC migratie en de fysiologische gevolgen nog niet volledig verklaard zijn, wordt er verondersteld dat MSC migreren om deel te nemen aan het herstel van de schade.⁸

3. Differentiatie van MSCs

Verschillende onderzoeken hebben laten zien dat MSCs kunnen differentiëren in cellen die verschillende eigenschappen laten zien van hartspiercellen als ze zijn blootgesteld aan een variëteit van fysiologische of niet fysiologische stimulaties.⁴ (Tabel 1) Onder deze condities kunnen *ex vivo* gedifferentieerde MSCs min of meer een myotube achtige en een gelijktijdige hartslag vertonen. De cellen vertonen meerdere functionele eigenschappen om zich te ontwikkelen tot hartspiercellen. Hierbij kan gedacht worden aan celkernen, maar ook de productie van peptiden en expressie van meerdere structurele en contractuele eiwitten. Verder laten ze ook tenminste een sinus knoop- en ventriculairachtige actiepotentialen zien.⁴

Naast specifieke fysiologische of niet fysiologische stimulaties is direct cel-cel contact nodig voor de differentiatie van de MSCs in hartspiercellen. Uit

onderzoek blijkt dat voor direct cel-cel contact het nodig is dat er in de omgeving signalen zijn voor de MSC differentiatie van meerdere hartcel afstammelingen.¹³

Onderzoek heeft aangetoond dat MSCs niet alleen differentiëren in hartspiercellen, maar ook in vasculaire gladde spiercellen en endotheelcellen. Deze celtypen zijn betrokken in de ontwikkeling van vasculaire systemen, inclusief angiogenese en vaatverwijding. Eerdere gegevens hebben laten zien dat *de novo* formatie van vasculaire gladde spiercellen na differentiatie van perivasculaire MSCs gebeurt via een 'platelet-derived growth factor B-dependent process'.¹⁴ Na een intramyocard infarct van MSCs lieten histopathologie en immunohistochemie analyses zien dat de MSCs differentieerden in hartspiercellen, vasculaire gladde spiercellen en endotheelcellen.⁴ Onder andere laat deze data zien dat MSCs een ideale bron is voor een groot repertoire van cardiovasculaire cellen voor patiënten na een hartaanval. De mechanismes die ten grondslag liggen voor MSC differentiatie en de verbetering in nieuwe vascularisatie en hartfunctie, betrekken paracrine secretie van groeifactoren van MSCs erbij.

4. Hoe verbeteren MSCs de hartfunctie?

Bij een hartinfarct ontstaan problemen, zoals ontsteking, littekenweefselformatie en remodelling. MSCs hebben verscheidende mechanismes die kunnen leiden tot het verbeteren van de hartfunctie na een hartinfarct. Zo hebben MSC unieke voordelen, zoals differentiatie, zelfrepletie, nesteling, uitscheiding van cytokines en paracrines, immuunprivilege en immuunsuppressie. (Figuur 1) Deze en andere mechanismes zullen behandeld worden.

4.1 Ontstekingsremmende werking

Er zijn verscheidende onderzoeken gedaan om te bestuderen wat nu precies de rol is van MSC transplantatie om de ontsteking tegen gaan. Er is namelijk gezien dat het beschermende effect van MSCs voor het hart misschien niet alleen bemiddeld wordt door hun differentiatie in



MSC bron/soort studie	Stimulus	Differentiatie kenmerken
Rat/ <i>in vitro</i>	5-Azacytidine, amphotericin b	Multinucleated myotubes, spontaneous beating
Murine/ <i>in vitro</i>	5-Azacytidine	Myotube-like, spontaneous beating, desmin, myosin, actinin, natriuretic peptides, others
Rat/ <i>in vivo</i>	Intramyocardial Tx 5-azacytidine-treated MSC	Myotube-like, troponin I-C
Mens/ <i>in vivo</i> (muis)	Intramyocardial Tx with fetal cardiomyocytes	Cardiac alpha-myosin heavy chain, troponin I
Mens/ <i>in vivo</i> (mice)	Intramyocardial Tx	Desmin, beta-MHC, alpha-actinin, troponin T, phospholamban, sarcomeric organization
Mens, cord blood/ <i>in vitro</i>	5-Azacytidine	Cardiomyocyte-like, troponin T
Mens, cord blood/ <i>in vivo</i> (mice)	Intravenous Tx	Human DNA (PCR human beta-globin) in cardiac muscle
Murine/ <i>in vitro</i>	5-Azacytidine	Cardiomyocyte-like, isoproterenol-dependent beating, action potentials, alpha1A, 1B, 1D; beta1 and beta2 adrenergic and M1 and M2 muscarinic receptors
Murine/ <i>in vitro</i>	Co-culture with neonatal cardiomyocytes	Beta-MHC, troponin I, atrial natriuretic peptide, connexin 43
Rat/ <i>in vivo</i>	Intramyocardial Tx, MSC encoding prosurvival protein	Stop remodeling, reduced intramyocardial inflammation, collagen deposition and hypertrophy; normalized myocardial volume and cardiac function
Mens/ <i>in vitro</i>	Co-culture with human cardiomyocytes	Beta MHC, beta-actin, troponin
varken/ <i>in vivo</i>	Intramyocardial Tx MSC inside fibrin matrix patches	X-galβ-myocyte-like, vWFβ angioblasts/capillaries
Rat/ <i>in vivo</i>	Intravenous Tx	Desmin, troponin T, connexin 43; cells in vascular structures are vWFβ; increase in capillary density, cardiac function; decrease infarct size
Mens/ <i>in vivo</i> (hond)	Subepicardial Tx MSC transfected with pacemaker gene	Spontaneous rhythms left-sided origin; MSCs form gap junctions with adjacent myocytes
Mens/ <i>in vitro</i>	Insulin, dexamethasone, ascorbic acid	Troponin I, sarcomeric tropomyosin, titin, alpha actinin-positive Z bands
Mens, navelstrenbloed/ <i>in vitro</i>	Fibronectin, laminin, ECM-like peptides	Titin, myosin H/L chains, transcriptional activators (Nkx 2.5, GATA-4, E-HAND, D-HAND, MEF-2A)
Mens/ <i>in vitro</i>	5-Azacytidine	Beta-MHC, desmin, alpha cardiac actin, myofilament-like, troponin T

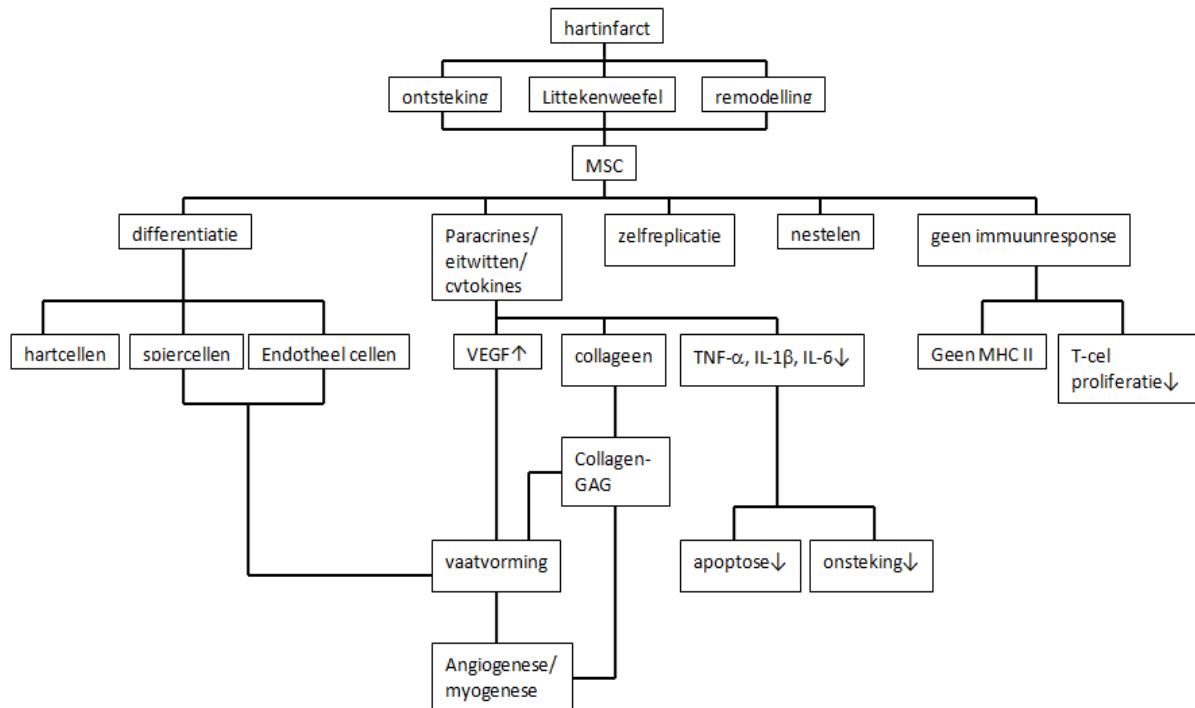
^a Deze data is slecht een selectie van onderzoeken die gedaan zijn.
^b Weefsel bron is beenmerg, tenzij anders aangegeven.

Tabel 1. Differentiatie van MSC in soort hartspierachtige cellen^a

hartspiercellen en vasculaire cellen, maar ook door hun mogelijkheid om te zorgen voor grote hoeveelheden angiogenese, apoptotische remming en mitogene factoren.¹⁵ De specifieke mechanismen blijven controversieel en moeten worden onderzocht. MSCs hebben dus twee methodes om de hartfunctie te verbeteren. Ze kunnen constructief zijn en differentiëren naar

weefselcellen of ze kunnen instructief zijn door allerlei stoffen uit te scheiden.

Ontsteking in het hart wordt geassocieerd met LV remodellering en hartfunctie na een hartinfarct. Hierna is onder andere onderzoek gedaan door Guo et al.¹⁵ Zij hebben onderzoek gedaan naar de ontstekingsremmende rol van getransplanteerde MSCs bij ratten. Er is gekeken naar wat het effect



Figuur 1. Illustratie over de manier waarom MSCs het hart kunnen herstellen na een hartinfarct.

is van MSCs toedienen na een hartinfarct. (Figuur 2) Na vier weken bleek dat de MSC getransplanteerde groep verhoogde ejectie fractie, fractionele reductie, LV systolische druk en verlaagde LV eind diastolische diameter, LV eind diastolische volumes en LV eind diastolische druk lieten zien. Tevens was de hart wand dikker en was het geïnfarceerde gebied kleiner.¹⁵

De groep die MSCs kregen hadden verder een verlaagde eiwitproductie en genexpressie na vier weken in het niet geïnfarceerde gebied van de ontstekings cytokines Tumor Necrosis Factor (TNF) - α , Interleukine (IL)-1 β en IL-6. Ontstekings cytokines, zoals TNF- α , IL-1 β en IL-6, veroorzaken bovendien pathofysiologische veranderingen in eigenschappen van hart remodellering, zoals vervanging van het geïnfarceerde gebied door litteken, myocyte hypertrofie, myocyte verlies door apoptose, veranderingen in de extracellulaire matrix en endotheel disfunctie.¹⁶ Vandaar dat remming van de ontsteking een nieuwe therapie kan zijn tegen hart remodellering. Verder kan ontsteking in het hart geassocieerd worden met LV remodellering en hartfunctie na een hartinfarct. Het onderzoek van Guo et al. laat dus zien dat MSC transplantatie voordelig uitpakt tegen ontsteking.

Naast myogenese en angiogenese, kan de ontstekingsremmende rol van MSCs transplantatie deels het beschermde effect verklaren na een hartinfarct.

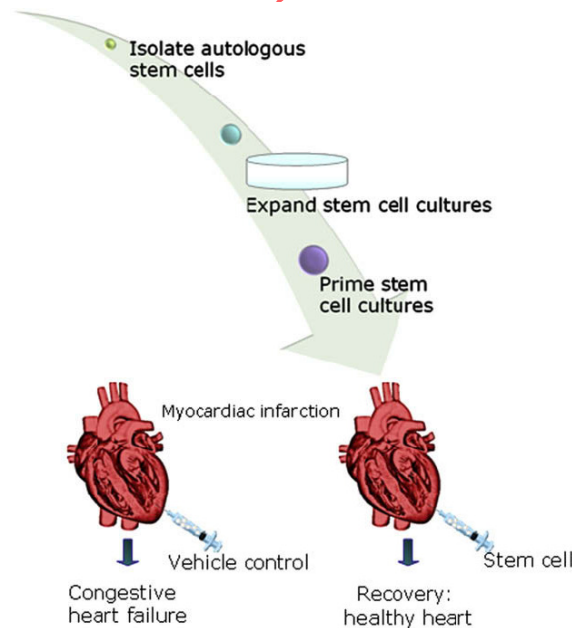
Een vergelijkend onderzoek is gedaan door Bao et al.¹⁷ waarbij naar het beschermde effect werd gekeken van TNF receptor (TNFR) gen gemodificeerde MSCs, tegen ontsteking en hart disfunctie na een acuut hartinfarct. Hierbij werden ratten getransfecteerd met recombinant adeno-associated viral (rAAV) die enhanced green fluorescent protein (EGFP) van TNFR tot uiting bracht. Door een EGFP meting bleek twee weken naar het hartinfarct dat de MSC-TNFR transplantaties verzwakte eiwit en gen expressie vertoonde van de ontstekings cytokines TNF- α , IL-1 β en IL-6. Tevens bleek deze groep geremde apoptose te hebben in de hartspiercellen en bleken ze een verbeterde functie te hebben in de LV. Transplantatie met rAAV-TNFR getransfecteerde MSCs verbeteren dus de functie van het LV na een hartinfarct door de apoptotische en ontstekingsmechanismen tegen te gaan.¹⁷

4.2 Minder collageen

In de MSCs getransplanteerde groep bij het onderzoek van Guo et al.¹⁵ was ook een verlaagde dichtheid te zien van het collageen volume.¹⁵ Zowel de productie als genexpressie van collageen type I en III productie waren significant verlaagd in het niet geïnfarceerde gebied in deze groep. Daarnaast hadden ze een afgenomen eiwit productie en genexpressie van matrix metalloproteïnase-1 (MMP-1) en tissue inhibitor of matrix metalloproteïnase-1 (TIMP-1).¹⁵ De op regulatie van MMP gen expressie zorgt voor degradatie van myocard matrix, wat geassocieerd is met zowel hartinfarct als hartaandoening.¹⁵ MMP-1 en TIMP-1 spelen een belangrijke rol in de afbraak van collageen type I en III en de extracellulaire activiteit van MMP-1 kan gedeeltelijk gereguleerd worden door TIMP-1. Collageen type I en II zijn belangrijke componenten van de extracellulaire matrix van het hart. Er is ontdekt dat de verhoging van de expressie van collageen type I en II in het geïnfarceerde gebied kan zorgen voor een bescherming in de remodelering van het hart en verwijding, terwijl verhoging van collageen zelf in het normale myocardium kan resulteren in de verhoging van stijfheid en disfunctie in het hart.¹⁸

4.2.1 Collageen-GAG voor gecontroleerde afbraak

Er zijn verschillende methoden onderzocht van celtransplantatie om hartinfarcten te behandelen. Xiang et al.¹⁹ heeft gekeken naar een type I-collageen-glycosaminoglycan (GAG) stellige voor de transplantatie van MSCs in het geïnfarceerde gebied van het hart in ratten. Eén week na het infarct werden de collageen-GAG stellingen gecrosslinkt met een dehydrothermale behandeling (DHT) of werden collageen-GAG stellige gecrosslinkt met DHT gevolgd met carbodiimide behandeling (EDAC) of werden DHT gecrosslinkt met collageen-GAG stellige bezaaid met bromodeoxyuridine (brdU) gelabelde allogene MSCs. Na drie weken was het meeste van de DHT gecrosslinkte collageen-GAG stellige afgebroken, terwijl dit in de EDAC groep nog intact was. Vele nieuwe vascularisatie was gezien in het geïnfarceerde gebied in de MSC groep en in de stellingen zelf. De nieuw gevormde bloedvaten kunnen zijn ontstaan door cytokines die zijn



Figuur 2. Basis opstelling over de werking van MSCs

uitgescheiden macrofagen als reactie op de afbraak van de collageen-GAG matrix. Deze nieuwe vascularisatie was ook gezien bij implantatie van oplosbaar collageen in eerdere studies.²⁰ Dit onderzoek laat dus zien dat type I-collageen-GAG gebruikt kunnen worden als drager van MSCs en dat ze een weefsel stellige kunnen maken van verschillende gecrosslinkte dichtheden om te zorgen voor een gecontroleerde afbraak, als ze getransplanteerd worden op de wand van een hartinfarct. Tevens zorgen ze voor nieuwe vascularisatie, wat een belangrijk proces kan zijn bij het herstel van het hart.¹⁹

4.3 MSC rol in angiogenese en reperfusie

Aangezien de hartfunctie afhankelijk is van myocard perfusie moet het herstel van de hartfunctie na een hartinfarct niet alleen zorgen voor vervangingen van de verloren hartspiercellen, maar ook voor revascularisatie van het gewonde gebied. Bovendien is er gezien dat circulerende MSCs in nieuwe gevormde bloedvaten moeten blijven en zorgen voor een verhoogde capillaire dichtheid en versterkte weefsel perfusie.⁸ Verder moeten MSCs de potentie hebben om te zorgen voor nieuwe vascularisatie en de regeneratie van het



geïnfarceerde hart. Hart perfusie wordt gekenmerkt door de bloedstroom te matchen aan de vraag van het hart. Daarom is het belangrijk niet alleen te kijken naar de maximale bloedstroom, maar ook naar de reactie in veranderingen van de coronarestroom in de vraag van het hart en de verdeling van de hart perfusie.⁸

In het onderzoek van Tang et al.²¹ is gekeken naar wat voor effect MSCs hebben op de LV functie en de morfologie na een hartinfarct samen met reperfusie. Eén week na het hartinfarct kregen ratten MSCs of niet. De groep met MSCs hadden na vier weken een veel betere functie in de LV, significant grotere LV wanddikte en kleinere infarct grootte. Tevens waren de MSCs positief voor cTnT (cardiac troponin-T) kleuring, wat erop duidt dat een klein aantal van de getransplanteerde MSCs gedifferentieerd zijn in hartspiercellen. De getransplanteerde MSCs in het geïnfarceerde gebied hadden tevens significant hogere expressie van cTnT, CD31 en gladde-spier-actine, er was nieuwe vascularisatie te zien en de capillaire dichtheid was hoger. MSCs kunnen de hartstructuur en functie dus verbeteren door het gecombineerde effect van myogenese en angiogenese.²¹

MSCs zijn niet alleen in staat te differentiëren in functionele hartspiercellen *in vitro* onder speciale stimulaties, maar *in vivo* kunnen MSCs bij een acuut hartinfarct model of in een myocard milieu ook differentiëren in hartspiercellen.²¹ De differentiatie zorgt voor een significant hogere capillaire dichtheid en het aantal hartspiercellen in het geïnfarceerde gebied van MSC behandelde dieren. Deze veranderingen kunnen leiden tot een verlaging in littekenweefsel, verlaagde remodellering en verbeterende hartfunctie dat het gevolg is van verbeterende bloedtoevoer in het beschadigende hartgebied.

Transplantatie van MSCs in het ischemische myocard met reperfusie is veilig en effectief. MSC differentiatie in endotheelcellen kunnen gerelateerd zijn aan de aanwezigheid van VEGF *in vivo* en *in vitro*. Geïmplanteerde MSCs verbeterden de hartstructuur en -functie door het effect van myogenese en angiogenese samen. Deze bevinding suggereert dat MSC transplantatie misschien ooit een alternatieve therapie kan zijn voor hartfalen.

4.4 Immunomodulatie

Belangrijke aspecten van geïmplanteerde cel-gastheer interactie bevatten de gastheer immuunreactie, het nestelings mechanisme en de differentiatie van de geïmplanteerde cellen onder invloed van lokale signalen. Er is gezien dat MSCs in staat zijn de T-lymfocyten deling te onderdrukken in een gemixte lymfocyt reactie, waarbij autologe of allogene T-cellen of dendritische cellen bij betrokken zijn.²² Het remmede effect beperkt zich niet alleen door het ontbreken histocompatibility complex II (MHC), maar gebeurt ongeacht de soorten van MSCs of T-cellen.²² Dit suggereert dat MSCs getransplanteerd kunnen worden tussen mensen met een verschillend MHC. MSCs remmen dus juist de T-cel proliferatie terwijl het omgekeerde wordt verwacht. MSCs gekweekt met reageerde T-cellen veroorzaken meestal niet T-cel deling en ze verlagen meestal de reactie van de reagerende T-cellen naar andere stimulerende cellen of niet specifieke activators zoals phytohemagglutine. Het gebrek aan reactie is niet vanwege de T-cel apoptose of andere schadelijke effecten, aangezien de T-cellen kunnen herstellen en reageren op ander stimulators in de afwezigheid van MSCs.⁸

MSCs worden niet gelyseerd door alloreactieve killer cellen. Ze worden geremd door de vorming van cytotoxische T-lymfocyten, hulpcellen bij graft-versus-host disease.²² MSCs remmen T-cellen alleen als ze gepresenteerd worden in kweken en het effect is andersom als de MSCs worden verwijderd. Wat ervoor zorgt dat het remmede effect van korte duur en niet blijvend is.²³ Het remmende effect van MSCs blijft onveranderd tijdens de vergroting in cel kweken.

Hoe MSC de allogene rejectie ontwijken is moeilijk te zeggen. MSCs brengen wel MHC klasse I moleculen tot expressie. Deze kunnen herkend worden als doelwit door voor geactiveerde cytotoxische T-lymfocyten, maar deze onderdrukken de differentiatie van cytotoxische T-lymfocyt voorlopers tot cytotoxische T-lymfocyt effectoren door uitscheiding van remmende factoren.²² Analyses van cytokines in geremde gemixte lymfocyt reactie (MLR) kweken laten zien dat de verhoging van interferon- γ (IFN- γ) en IL-10,



en de verlaging van TNF- α productie.²⁴ Het immuun remmende effect lijkt dus gedeeltelijk te komen door oplosbare factoren. MSCs in kweken scheiden verscheidende factoren uit, zoals IL-6, IL-8, postagladin E₂ en VEGF.²² Sommige onderzoeken vermoeden de rol van de oplosbare factoren, terwijl andere onderzoeken dit helmaal niet ondersteunen. Zo vindt Di Nicola et al.²⁵ dat de remming van T-lymfocyt deling bij MSCs bemiddeld wordt door oplosbare factoren, inclusief hepatocyte groei factor (HGF), en transformeerde groei factor- β 1. Daarnaast vonden hij dat het tegen gaan van het delingseffect omgekeerde was bij die toevoeging van monoklonale antilichamen tegen HGF en transformeerde groei factor- β 1. De rol van het HGF is echter controversieel.

Sommige onderzoekers hebben laten zien dat het remmende effect zelfs blijft als de MSCs gescheiden zijn van T-cellen door een semipermeabel membraan.²² Dit wijst er op dat het ingrijpt op de oplosbare factoren en dat cel-cel contact niet nodig is. Een ander onderzoek heeft echter laten zien dat het remmende effect van korte duur, dosis afhankelijk en afhankelijk is van de aanwezigheid van MSCs en daarom dus wel cel-cel contact nodig is.²² Het is dus niet eenvoudig te onderscheiden wie er nu gelijk heeft.

IL-2 en IFN- γ zijn twee belangrijke cytokines die verantwoordelijk zijn voor de activatie en proliferatie van CD4⁺ en CD8⁺ T-cellen. In de aanwezigheid van MSCs slaagt de toevoeging van deze cytokines er niet in om T-cellen te delen.²⁶ Er is laten zien dat CD8⁺ cellen het doelwit zijn van cellen die niet delen in de aanwezigheid van MSCs.²² Het opduiken van een populatie van CD8⁺ regulatoire T-cellen zou het remmende effect van MSCs kunnen verklaren.

Verschillende mechanismes zijn dus waarschijnlijk betrokken bij MSC geïnduceerde immuun suppressie, afhankelijk van de lymfocyten populatie die gebruikt is, de technieken van MSC kweken en het soort stimulatie. De precieze mechanismen van het remmende effect van MSCs op T-lymfocyten is nog niet duidelijk.

4.5 MSCs induceren nieuwe vascularisatie door VEGF

Vasculair endothele groei factor (VEGF) kan voor nieuwe vascularisatie zorgen. Dit kan een nieuwe manier zijn om de behandeling van hartziekten te bekijken. VEGF therapie wordt echter vaak geassocieerd met een kortdurend therapeutisch effect en het eventuele risico op het ontstaan van een hemangioma. VEGF kunnen toegediend worden via een intramyocard injectie van VEGF eiwit. Echter vindt hier niet genoeg angiogenese plaats. VEGF kunnen ook getransporteerd worden in een vector, maar deze transfectie is minder effectief in hartspiercellen. Om een veilige en langdurige angiogenese methode te ontwikkelen bij hartfalen is onderzoek gedaan naar MSCs transplantatie. In een studie van Tang et al.²⁷ is dit effect onderzocht. Ze hebben één week na een hartinfarct autologe MSCs aan ratten gegeven. Na twee maanden had deze groep, in tegenstelling tot die geen MSCs kregen, significant verhoogde VEGF expressie, samen met verhogende vasculaire dichtheid en regionale bloedstroom in het geïnfarceerde gebied. Angiogenese was significant verhoogd in het midden van het littekenweefsel en een beetje langs de zijkant van het littekenweefsel bij de groep die MSCs kregen. In deze groep was de apoptose ook verlaagd in bijna het hele hart. Dit zorgt ervoor dat het apoptotisch effect wordt tegen gegaan van MSC transplantatie in het hart.²⁷ De nieuwe vascularisatie zorgde naast een verlaging in apoptose van de hypertrofie in hartspiercellen, ook voor een verbeterende LV contractie. De onderliggende mechanismes van de MSCs verbetering voor de hartfuncties zijn dus misschien betrokken bij nieuwe vascularisatie, geïnduceerd door differentiatie van MSCs tot endotheelcellen en paracrine uitscheiding van groeifactoren, naast de apoptose verlaging en de hartcel regeneratie. Twee maand na de transplantatie van de MSCs was er een significantie verbetering van de LV functie. Autologe MSCs transplantatie kunnen dus een veelbelovende therapeutische strategie zijn, vrij van immuun rejectie, voor nieuwe vascularisatie in ischemische hartziekten. Angiogenese blijkt een grote rol te spelen om de overlevende



hartspiercellen te beschermen tegen apoptose na een hartinfarct. Het therapeutische vermogen van MSCs hebben misschien meer te maken met hun mogelijkheid om te differentiëren in vasculair endotheel dan de factoren die ze uitscheiden.²⁷

Vergelijkbare onderzoeken werden gedaan door Yang et al.²⁸ waarbij ratten na een hartaanval MSCs kregen met een transfectie van menselijke VEGF₁₆₅, een liposoom met menselijke VEGF gen plasmiden of medium (controle) kregen en door Gao et al.²⁹ waarbij ratten ook het menselijke VEGF₁₆₅ MSCs kregen, alleen dan via een adenovirus. De groepen die VEGF₁₆₅ MSCs kregen hadden een kleiner geïnfarceerde hart en een betere hartfunctie. Tevens was de capillaire dichtheid in deze groep significant groter. De transplantatie van de getrasfekteerde MSCs induceerde hart angiogenese en hartcel regeneratie, waardoor progressieve hart disfunctie voorkomen kan worden in ischemische harten. Eén voordeel om VEGF en MSCs te combineren is het maken van een reservoir voor hartspiercellen die deel uit kunnen maken van het myocardium. De transplantatie van menselijke VEGD₁₆₅ MSCs in een adenovirus kan zorgen voor een kortdurende bron van VEGF, welke kan helpen om het therapeutische niveau van VEGF te behouden voor angiogenese in combinatie met hart herstel. De transplantatie van dit soort MSCs kan zorgen voor een betere verbetering van de hart perfusie en het herstel van de hartfunctie op zowel cellulaire of gen therapie alleen.

5. Wijze van toedienen

Er zijn verschillende manieren om MSCs toe te dienen, afhankelijk van het doel en beschikbare middelen. Er zijn vier verschillende manieren met elk zijn eigen voor- en nadelen.³⁰ Een intraveneuze infusie is een eenvoudige methode en is mogelijk voordelig voor de algemene bloedsomloop, maar heeft een lage effectiviteit om de stamcellen naar het hart te brengen. Deze methode is gebruikt in fase I van allogene MSC studies in patiënten. Een intracoronaire infusie wordt vaker gebruikt en kan binnendringen in het beschadigde gebied, maar kan zorgen voor een microvasculaire obstructie. Directe endocardiale injectie (binnenkant van het hart) zorgt voor toegang in alle gebieden in het LV

die beschadigd is. Meerdere experimenten op dit moment gebruiken een katheter om de stamcellen toe te dienen. Een epicardiale injectie (buitenkant van het hart) kan nauwkeurig worden toegepast als er sprake is van een hartoperatie.

6. Optimale tijdstip om MSCs toe te dienen

MSCs kunnen hartinfarcten repareren en hartfunctie verbeteren. Potentiële mechanismes kunnen angiogenese en myogenese zijn in het ischemische hart.²¹ Het lokale milieu, zoals ontstekings cytokines vrijgekomen uit het gebied van een hartinfarct, kunnen ook een belangrijke rol spelen in deze processen, vooral tijdens het nestelen van de MSC, de overleving, de transplantatie en de differentiatie.^{1, 8} Aan de ene kant kunnen ontstekings cytokines gunstig zijn voor MSC differentiatie in endotheelcellen, gladde spiercellen en hartspiercellen. Aan de andere kant kan een ongunstig ontstekingsmilieu, met overmatige oxidatieve lading, schadelijk zijn voor de geïmplanteerde cellen. Tot nu toe is het onduidelijk of getransplanteerde stamcellen verschillende effecten kunnen genereren als de cellen zijn getransplanteerd op verschillende tijdstippen na een hartaanval. Daarom is er in 2007 door Hu et al.¹ onderzocht wanneer MSCs het beste toegediend kunnen worden. Hierbij werden ratten geïnjecteerd met gelabelde MSCs één uur, één week of twee weken na een hartaanval. Vier weken na de hartaanval waren de fractionele reductie en ejectie fractie significant verlaagd en waren de LV diastolische en systolische druk verhoogt. Intramyocard transplantaties van MSCs verbeterden de hartfunctie en verzwakten de vergroting van het hart significant, dit effect piekte in de groep die MSCs na één week toegediend kregen. Littekenweefselformatie was ook het kleinst in deze groep. Eveneens was in deze groep de vaatdichtheid significant groter. Dit was zelfs bijna tot het normale niveau en uit de morfologie bleek dat de meeste getransplanteerde MSCs overleefden en transplanteerden in het myocardium.¹ Transplantaties van MSCs één week na de hartaanval zorgt voor het beste therapeutische voordeel, welke gekenmerkt is



door minimale littekenformatie en maximale hartfunctie vier weken na de hartaanval en celtransplantatie therapie.

Dit optimum kan verklaard worden door meerder mechanismes; de geïmplanteerde cellen overleefden beter in deze groep, of er was meer angiogenese in de beschadigde harten in de groep die MSCs kregen naar één week, of verbeterde overleving van geïmplanteerde cellen kan voor een verhoogd paracrine effect zorgen dat de hartspiercellen beschermd voor apoptose of stimuleert de angiogenese.¹

Acute en chronische ontstekingsreacties ontstaan na een acuut hartaanval, gevolgd door massieve hartcel necrose. Leukocyten en mastcellen dringen snel in het ischemische myocardium en dit piekt tussen 24 en 72 uur na de hartaanval. Na één week is het meest van het geïnfarceerde gebied samengeteld uit granulerend weefsel en necrose, en is de acute ontstekingsreactie bijna compleet. Na twee weken begint het littekenweefsel zich te vormen en treed ventriculaire remodellering op. Uit het onderzoek van Hu et al.¹ blijkt dat de niche van het locale myocard bij één week na een hartaanval ligt en zorgt dat de stamcel zich kan nestelen, overleven en differentiëren. Dit komt doordat na één week littekenformatie nog niet is opgetreden en de ontsteking is gereduceerd, wat het makkelijker maakt om getransplanteerde cellen te integreren en voor functioneel herstel zorgt.¹ Uit vergelijkbare onderzoeken blijkt echter dat het optimum van toedienen van MSCs verschilt. Andere onderzoeken beweren dat het optimum namelijk rond de twee weken ligt.^{31, 32} Ondanks dat dit optimale tijdstip van toedienen twee maal zo laat is, is er geen verschil in argumentatie voor het optimale tijdstip. Ook in deze onderzoeken nam eerst de ontsteking af en er was nog geen littekenweefsel ontstaan. Alleen duurde het in deze onderzoeken dus langer voordat de ontsteking was afgenomen en voordat er littekenweefsel ontstond.

Wanneer MSCs het beste kunnen worden toegediend blijft dus onduidelijk. Echter maakt dit niets uit voor het volgende probleem: het duurt namelijk langer dan 1-2 weken om voldoende MSCs te verkrijgen. Zo duurde het in het onderzoek van Hu et al. 28 dagen om voldoende MSCs te

verkrijgen. In andere onderzoeken was het ook mogelijk om in kortere tijd voldoende MSCs te maken, zoals in twee³³ of drie weken.²¹ In de theorie is het dus een prima idee dat er een optimaal tijdstip is wanneer het beste MSCs toegediend kunnen worden, maar in praktijk kan zal het tot nu toe niet mogelijk om een patiënt met zijn eigen MSCs te injecteren na een hartinfarct.

7. Het effect van de leeftijd van de MSCs

Klinisch gezien zijn oudere patiënten kwetsbaarder om een acuut hartinfarct te krijgen. Er is echter weinig bekend over de eigenschappen van jonge en oude donor verkregen MSCs transplantatie naar patiënten. Het effect van MSCs zou misschien kunnen afhangen van de leeftijd van de donor MSCs. Daarom is in 2008 hierna onderzoek gedaan door Yi-qing et al.³⁴ Hierbij kregen ratten met een hartinfarct MSCs van een jonge en een oude donor rat. De snelheid van de apoptose in de groep die oude MSCs kregen was significant hoger. Tevens waren de VEGF gen expressie en capillaire dichtheid lager in deze groep. De transplantatie van jonge MSCs verlaagde de apoptose van hartspiercellen rondom het geïnfarceerde gebied en de hartfunctie was verbeterd. Jonge donor verkregen MSCs kunnen de hartfunctie dus significant verbeteren als ze getransplanteerd zijn in het geïnfarceerde gebied door angiogenese en verlaging van apoptose in hartspiercellen.³⁴ Een vergelijkbare conclusie kwam uit het onderzoek van Hao Zhang et al.³⁵

Jonge mensen die een hartinfarct krijgen en behandeld worden met MSCs hebben dus een betere kans om te herstellen, tenzij MSCs gemoduleerd of jonger gemaakt kunnen worden.

8. Geen verschil van gedifferentieerde en ongedifferentieerde MSCs op de werking

In sommige *in vitro* onderzoeken worden gedifferentieerde MSCs gebruikt, terwijl in andere onderzoeken ongedifferentieerde MSCs gebruikt worden. Om te kijken of de differentiatie van MSCs in hartspiercellen wel of niet een voordeel



hebben is hiernaar gekeken in 2007 door Nassiri et al.³⁶ De gedifferentieerde en ongedifferentieerde cellen werden binnen 28 dagen hartspiercellen op een soort gelijke wijze en werden goed ontwikkelde structuren in de getransplanteerde cellen. Verbeteringen in de functie van het LV en verlaging in het geïnfarceerde gebied waren in beide groepen in dezelfde verhouding gezien, evenzo vasculaire dichtheid.³⁶ Het is dus waarschijnlijk niet nodig om beenmerg verkregen MSCs voorafgaand te differentiëren om effectief zijn om het geïnfarceerde myocardium te regenereren en de hartfunctie te verbeteren.

9. MSCs verbeteren met atorvastatine behandeling

Atorvastatine wordt normaal gebruikt om het cholesterol in het bloed te verlagen. Daarnaast stabiliseert het de plaque en voorkomt het beroertes. Als MSCs getransplanteerd worden, en eerst behandeld zijn met atorvastatine, zorgt dit voor een verhoogde hart perfusie en contractie.³⁷ Tevens verhoogd het de overleving en differentiatie en verkleind atorvastatine het geïnfarceerde gebied. Een gecombineerde behandeling, met atorvastatine en MSCs, remmen significant de apoptose van de hartspiercellen, verlagen oxidatieve stress en onderdrukken expressie van ontstekings cytokines (TNF- α , IL-1 β en IL-6) in het postinfarct myocard.³⁷ Atorvastatine behandeling beschermd dus het myocard op een acuut infarct en reperfusie door het maken van een beter milieu om de geïmplanteerde MSCs te laten overleven en te differentiëren. Het voordeel van de gecombineerde therapie is dat het kan zorgen voor een statine/cholesterolsyntheseremmer ingrijpende remming van apoptose, oxidatieve stress en ontsteking van het geïnfarceerde myocard.

10. G-CSF kan de myocard regeneratie verbeteren

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) mobiliseert de beenmerg verkregen MSCs, welke differentiëren in hartspiercellen na een hartinfarct. Er is echter niets bekend over het effect van G-CSF

op stamcel infiltratie in het geïnfarceerde gebied. Adachi et al.³⁸ zocht in de infiltrerende cellen naar side population (SP) cellen. Dit is unieke beenmerg cel fractie dat rijk is aan hemopoetische stamcellen. Tot twee weken na een hartinfarct werden deze cellen geïnfiltreerd in het hart. Infiltrerende SPs waren vooral verhoogd in de groep die vier dagen van de twee weken met G-CSF behandeld waren. De infiltratie van de ontstekingscellen was niet beïnvloedt door de G-CSF behandeling. SPs infiltrerende namelijk in het hart vanaf één dag na het hartinfarct en waren constant aanwezig in de volgende 14 dagen. Dit terwijl de infiltratie van de ontstekingscellen piekte op 3-5 dagen na het hartinfarct en was bijna weg 14 dagen na het hartinfarct. Dit resultaat komt overeen met de algemene accepteerde ontstekingsprocessen na een hartinfarct. SPs kunnen dus infiltreren in het geïnfarceerde hart. G-CSF versterkt deze MSC infiltratie zonder ontstekingscellen te verhogen. Dit suggereert dat G-CSF het myocard regeneratie versterkt zonder de ontsteking slechter te maken in het geïnfarceerde hart.³⁸ Het bewijst echter niet dat geïnfiltreerde SPs konden differentiëren in hartspiercellen en/of vaatcellen. Verder is onduidelijk of de verhoging van infiltratie genoeg is om het myocard regeneratie te versterken en de hartfunctie te verbeteren. De LV functie was namelijk niet beïnvloed door de G-CSF behandeling, ondanks de significante verhoging van SPs infiltratie.

11. Het elektrofysiologisch remodelleren van hartspiercellen

MSC transplantatie is dus effectief gebleken om de hartfunctie te verbeteren in experimenten met dieren en patiënten die een hartinfarct en hart hypertrofie hebben gehad. MSCs hebben sterke effecten op hartspiercellen via onder andere remming van apoptose en verzwakking van de ontsteking in het hart. Echter zijn de biologische acties van MSCs op hartspiercellen onbekend. Daarom is er door Benzhi et al.³⁹ gekeken of MSCs de elektrofysiologische eigenschappen van de 'neonatale rat ventriculaire myocyten' beïnvloedt. Hierbij werd vooral gekeken naar de effecten van



MSCs van de buitenwaartse kaliumstroom in 'neonatale rat ventriculaire myocyten'. De repolarisatie van actiepotentialen wordt ook geassocieerd met andere ion-kanalen zoals kalium kanalen, calcium kanalen en natrium kanalen.⁴⁰ Als zowel MSCs als 'neonatale rat ventriculaire myocyten' te gelijk gekweekt werden, was er een korte verhoging van de buitenwaartse kaliumstroom te zien, vergezeld met significante veranderingen in activatie, inactivatie en herstel van de buitenwaartse kaliumstroom. Tevens was $K_{v4.2}$ mRNA, wat codeert voor het kanaal dat de buitenwaartse kaliumstroom, groter als beide celsoorten tegelijk waren gekweekt. Basis fibroblast groei factor (bFGF) reguleerde de $K_{v4.2}$ mRNA expressie omhoog en verbeterende de buitenwaartse kaliumstroom. MSCs reguleren dus de buitenwaartse kaliumstroom omhoog van 'neonatale rat ventriculaire myocyten' door onder andere bFGF uit te scheiden, wat op zijn beurt weer de expressie van $K_{v4.2}$ opreguleert en de kinetica van de buitenwaartse kaliumstroom verandert.³⁹

Het elektrofysiologisch remodelleren is een belangrijke eigenschap van vele hartspiercellen. Vele studies hebben gezien dat er een dramatische verlaging was van de buitenwaartse kaliumstroom in het geïnfarceerde, hypertrofe en ander hartziekte.⁴⁰ De regulatie van MSCs op de buitenwaartse kaliumstroom van 'neonatale rat ventriculaire myocyten' werd geconcludeerd uit *in vitro* onderzoek of MSCs dit ook kunnen reguleren in cardiomyocyten *in vivo* is de vraag. In ieder geval is door dit onderzoek bekend dat MSCs de buitenwaartse kaliumstroom omhoog reguleren in 'neonatale rat ventriculaire myocyten', wat weer een nieuw mechanisme betreft in een therapeutische rol van MSCs in hartziekten.³⁹

12. Conclusie

Het gebruik van stamcellen voor de behandeling van hartinfarcten is een relatief nieuw idee op het gebied van harttherapie. MSCs zijn beenmerg verkregen stamcellen die in staat zijn het herstel van het hart na een hartinfarct te vergemakkelijken. Ze zorgen voor nieuwe vascularisatie en myogenese. Verder zijn ze een

rijke bron van paracrines, cytokines (TNF- α , IL-1 β en IL-6) en eiwitten (collageen en VEGF) die bijdragen aan het herstel van het hart. Een hart dat behandeld is met MSC heeft een verhoging in perfusie, verlaging in apoptose, verkleinde infarct grootte, grotere wanddikte en verbetering in globale en regionale hartfunctie. Verder hebben ze het voordeel van immuunprivilege en -suppressie, de mogelijkheid om te groeien in een kweek en om zich te nestelen in de beschadigende gebieden. Geïmplanteerde MSCs kunnen de hartstructuur en functie uiteindelijk vooral verbeteren door het gecombineerde effect van myogenese en angiogenese

Naast de essentie hoe MSCs zelf te werk gaan is het ook van belang te weten wanneer en hoe MSCs toegediend moeten worden om het maximale effect te verkrijgen. De moeilijkheid zit hem hier in het feit dat het te lang duurt om de gewenste hoeveelheid MSCs te verkrijgen. Het optimale tijdstip om MSCs toe te dienen ligt namelijk rond 1-2 weken, terwijl het produceren van voldoende MSCs 3-4 weken duurt. Daarnaast speelt de leeftijd van de MSCs zelf ook nog een rol in het herstel van het hart. De MSCs hoeven niet van te voren gedifferentieerd te zijn. Het werkt echter wel in het voordeel als MSCs van te voren behandeld worden met atorvastatine en kunnen eventueel behandeld worden met G-CSF om de myocard regeneratie te verbeteren.

MSC transplantatie kan een nieuwe veelbelovende therapeutische methode zijn, vrij van immuun rejectie, voor nieuwe vascularisatie in ischemische hartziekten. Angiogenese blijkt een grote rol te spelen om de overlevende hartspiercellen te beschermen tegen apoptose na een hartinfarct. De potentiële impact van de stamceltherapie hoeft niet alleen vernieuwend te zijn voor de cardiovasculaire geneeskunde, maar kan ook voor andere ziekten een belangrijke rol spelen.

Referenties

1. Xinyang Hu, Jianan Wang, Jie Chen, Ronghua Luo, Aina He, Xiaojie Xie, Jiahui Li. 2007. Optimal temporal delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in rats with myocardial infarction. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 31 438—443.



2. Vincent F. M. Segers en Richard T. Lee. 2008. Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*, Vol 451, 2 1, doi:10.1038/nature06800.
3. Rishi Sharma en Ram Raghubri. 2007. Stem Cell Therapy: A Hope for Dying Hearts. *Stem cell and development*, 16:517–536.
4. Jose J. Minguell, Alejandro Erices. 2006. Mesenchymal Stem Cells and the Treatment of Cardiac Disease. *Exp Biol Med*, 231:39–49.
5. D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, I. Jakoniuk, S. M. Anderson, B. Li, J. Pickel, R. McKay, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, P. Anversa. 2001. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, 410:701–705.
6. D. Orlic, J. Kajstura, S. Chimenti, F. Limana, I. Jakoniuk, F. Quaini, B. Nadal-Ginard, D. M. Bodine, A. Leri, P. Anversa. 2001. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98:10344–10349.
7. Geraldo A. Ramos and Joshua M. Hare. 2007. Cardiac Cell-Based Therapy: Cell Types and Mechanisms of Actions. *Cell Transplantation*, Vol. 16, pp. 951–961.
8. Mark F. Pittenger and Bradley J. Martin. 2004. Mesenchymal Stem Cells and Their Potential as Cardiac Therapeutics. *Circulation Research*, 95:9-20.
9. L. C. Amado, A. P. Saliaris, K. H. Schuleri, M. St John, J. S. Xie, S. Cattaneo, D. J. Durand, T. Fitton, J. Q. Kuang, G. Stewart, S. Lehrke, W. W. Baumgartner, B. J. Martin, A. W. Heldman, J. M. Hare. 2005. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:11474–11479.
10. R. R. Makkar, M. J. Price, R. Lill, M. Frantzen, K. Takizawa, T. Kleisli, J. Zheng, S. Kar, R. McClellan, T. Miyamoto, Bick J. -Forrester, M. C. Fishbein, P. K. Shah, J. S. Forrester, B. Sharifi, P. S. Chen, M. Qayyum. 2005. Intramyocardial injection of allogeneic bone marrow derived mesenchymal stem cells without immunosuppression preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.*, 10: 225–233.
11. Y. L. Tang, Q. Zhao, Y. C. Zhang, L. Cheng, M. Liu, J. Shi, Y. Z. Yang, C. Pan, J. Ge, M. I. Phillips. 2004. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul. Pept.* 117:3–10.
12. M. Gnecci, H. He, O. D. Liang, L. G. Melo, F. Morello, H. Mu, N. Noiseux, L. Zhang, R. E. Pratt, J. S. Ingwall, V. J. Dzau. 2005. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat. Med.*, 11:367–368.
13. Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S, Morisaki T, Yutani C, Kitamura S, Nakatani T. 2003. Direct cell-cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 125:1470–1480.
14. Hellstrom M, Kalen M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. 1999. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*, 126:3047–3055.
15. Jun Guo, Guo-sheng Lin, Cui-yu Bao, Zhi-min Hu, and Ming-yan Hu. 2007. Anti-Inflammation Role for Mesenchymal Stem Cells Transplantation in Myocardial Infarction. *Inflammation*, Vol. 30, Nos. 3-4.
16. Ono, K., A. Matsumori, T. Shioi, Y. Furukawa, S. Sasayama. 1998. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts. Possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation*, 98:149Y156.
17. Cuiyu Bao, Jun Guo, Guosheng Lin, Ming Yan en Zhimin Hu. 2008. TNFR gene-modified mesenchymal stem cells attenuate inflammation and cardiac dysfunction following MI. *Scandinavian Cardiovascular Journal*, 42: 56-62.
18. Jugdutt, B. I. 2003. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation*, 108:1043Y1395.
19. Zhoe Xiang, Ronglih Liao, Matthew S. Kelly en Myron Spector. 2006. Collagen–GAG Scaffolds Grafted onto Myocardial Infarcts in a Rat Model: A Delivery Vehicle for Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Engineering*, Volume 12, Number 9, 2467-2478.
20. R.K. Li, Z.Q. Jia, R.D. Weisel, D.A. Mickle, A. Choi, en T.M. Yau. 1999. Survival and function of bioengineered cardiac grafts. *Circulation*, 100, I163.
21. Junming Tang, Qiyang Xie, Guodong Pan, Jianing Wang, Mingjiang Wang. 2006. Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 30 353–361.
22. Pankaj Kumar Mishra. 2008. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for treatment of heart failure: is it all paracrine actions and immunomodulation? *Journal of Cardiovascular Medicine*, 9:122–128.
23. Krampere M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E. 2003. Bonemarrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101:3722–3729.
24. Klyushnenkova E, Mosca JD, Zernetkina V, Majumdar MK, Beggs KJ, Simonetti DW, et al. 2005. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*, 12:47–57.
25. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, et al. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99:3838–3843.
27. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. 2005. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*, 19:1597–1604.
28. Yao Liang Tang, Qiang Zhao, Y. Clare Zhang, Leilei Cheng, Mingya Liu, Jianhui Shi, Yin Zeng Yang, Chuizhen Pan, Junbo Ge, M. Ian Phillips. 2004. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF



- and neovascularization in ischemic myocardium. *Regulatory Peptides*, 117, 3–10.
29. Jinfu Yang, Wenwu Zhou, Wei Zheng, Yanlin Ma, Ling Lin, Tao Tang, Jianxin Liu, Jiefeng Yu, Xinmin Zhou, Jianguo Hu. 2007. Effects of Myocardial Transplantation of Marrow Mesenchymal Stem Cells Transfected with Vascular Endothelial Growth Factor for the Improvement of Heart Function and Angiogenesis after Myocardial Infarction. *Cardiology*, 107:17–29.
 30. Feng Gao MD, Tao He MD, HongBing Wang MD, ShiQiang Yu MD, DingHua Yi MD, WeiYong Liu MD, ZhenJie Cai MD. 2007. A promising strategy for the treatment of ischemic heart disease: Mesenchymal stem cell mediated vascular endothelial growth factor gene transfer in rats. *Can J Cardiol*, 23(11):891-898.
 31. Editorial. 2008. Cell therapy for myocardial infarction: Special delivery. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44 (2008) 473–476.
 32. Li RK, Mickle DA, Weisel RD, Rao V, Jia ZQ. 2001. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg*, 72:1957–63.
 33. Ren-Ke Li, MD, PhD, Donald A. G. Mickle, MD, Richard D. Weisel, MD, Vivek Rao, MD, PhD, and Zhi-Qiang Jia, MD. 2001. Optimal Time for Cardiomyocyte Transplantation to Maximize Myocardial Function After Left Ventricular Injury. *Ann Thorac Surg*, 72:1957– 63.
 34. Mai Hou^{1,2}, Ke-ming Yang¹, Hao Zhang¹, Wei-Quan Zhu, Fu-jian Duan, Hao Wang, Yun-hu Song, Ying-jie Wei, Sheng-shou Hu. 2007. Transplantation of mesenchymal stem cells from human bone marrow improves damaged heart function in rats. *International Journal of Cardiology*, 115, 220–228.
 35. Wang Yi-qing, Wang Miao, Zhang Peng, Song Jing-jin, Li Yuan-peng, Hou Shu-hong and Huang Cong-xin. 2008. Effect of transplanted mesenchymal stem cells from rats of different ages on the improvement of heart function after acute myocardial infarction. *Chin Med*, 121(22):2290-2298.
 36. Hao Zhang, Shafie Fazel, Hai Tian, Donald A. G. Mickle, Richard D. Weisel, Takeshiro Fujii and Ren-Ke Li. 2005. Increasing donor age adversely impacts beneficial effects of bone marrow but not smooth muscle myocardial cell therapy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289:2089-2096.
 37. Seyed Mahdi Nassiri, Zohreh Khaki, Masoud Soleimani, Seyed Hossein Ahmadi, Issa Jahanzad, Shahram Rabbani, Mohammad Sahebjam, Farid Azmoudeh Ardalan en Mahmood Sheikh Fathollahi. 2007. The similar effect of transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells with or without prior differentiation induction in experimental myocardial infarction. *Journal of Biomedical Science* 14:745–755.
 38. Yue-Jin Yang, Hai-Yan Qian, Ji Huang, Yong-Jian Geng, Run-Lin Gao, Ke-Fei Dou, Guo-Sheng Yang, Jian-Jun Li, Rui Shen, Zuo-Xiang He, Min-Jie Lu en Shi-Hua Zhao. 2008. Atorvastatin treatment improves survival and effects of implanted mesenchymal stem cells in post-infarct swine hearts. *European Heart Journal*, 29, 1578–1590.
 39. Yuichiro Adachi, Jun-ichi Imagawa, Yoshiyuki Suzuki, Kenji Yogo, Masanori Fukazawa, Osamu Kuromaru, Yoshihiko Saito. 2004. G-CSF treatment increases side population cell infiltration after myocardial infarction in mice *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, Volume 36, 707–710.
 40. Cai Benzhi, Zhao Limei, Wang Ning, Liu Jiaqi, Zhu Songling, Meng Fanyu, Zhou Hongyu, Lu Yanjie, Ai Jing, Yang Baofeng. 2008. Bone marrow mesenchymal stem cells upregulate transient outward potassium currents in postnatal rat ventricular myocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, YJMCC-06495; No. of pages: 8; 4C.
 41. Kääb S, Nuss HB, Chiamvimonvat N, O'Rourke B, Pak PH, Kass DA, et al. 1996. Ionic mechanism of action potential prolongation in ventricular myocytes from dogs with pacing-induced heart failure. *Circulation Research*, 78(2):262–7.