

Stammzellen

Revolution oder Flop?



Chronologie

1981

Martin G.R.: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci 1981

Erstmalige Gewinnung embryonaler Stammzellen der Maus in Kultur und Nachweis der Pluripotenz

1985 und 1991

Doetschmann, T.C.: The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. J Embryol. Exp. Morphol 1985

Wobus, A.M.. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents,.... Differentiation 1991

Nachweis der Differenzierung embryonaler Stammzellen in der Kultur zu Herzmuskelzellen

Chronologie

1994

Soonpaa, M: Formation of nascent intercalated disks between grafted fetal cardiomyocytes and host myocardium, Science 264 (1994), 98-101

**Integration fetaler
Maus-Cardiomyozyten in
das Myokard allogener
Mäuse**

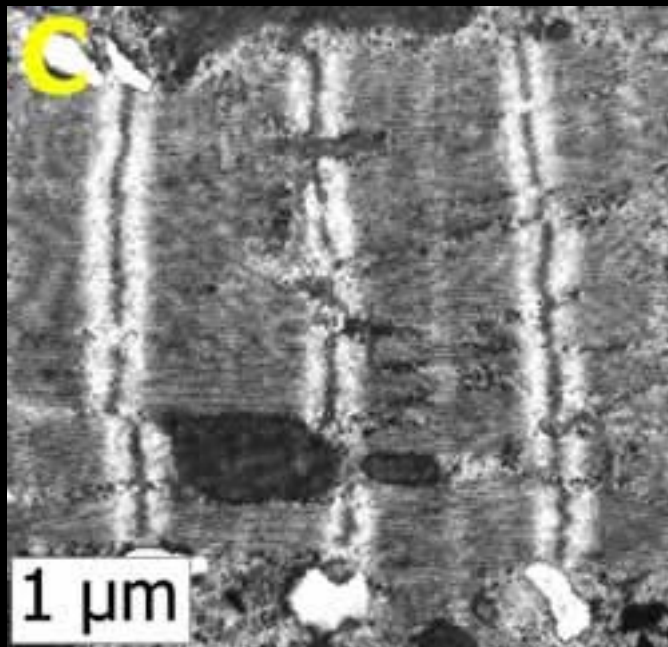


Chronologie

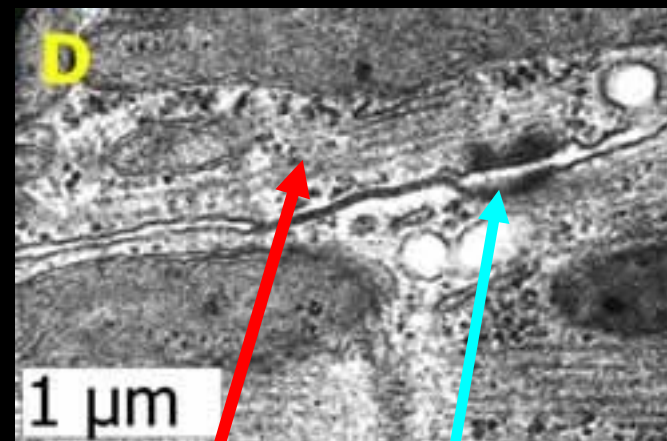
2001

Kehat, I.: Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J. Clin. Invest. 2001

Nachweis der Differenzierung humaner Stammzellen in der Kultur zu Herzmuskelzellen



Hoch entwickelte Sarkomerstruktur



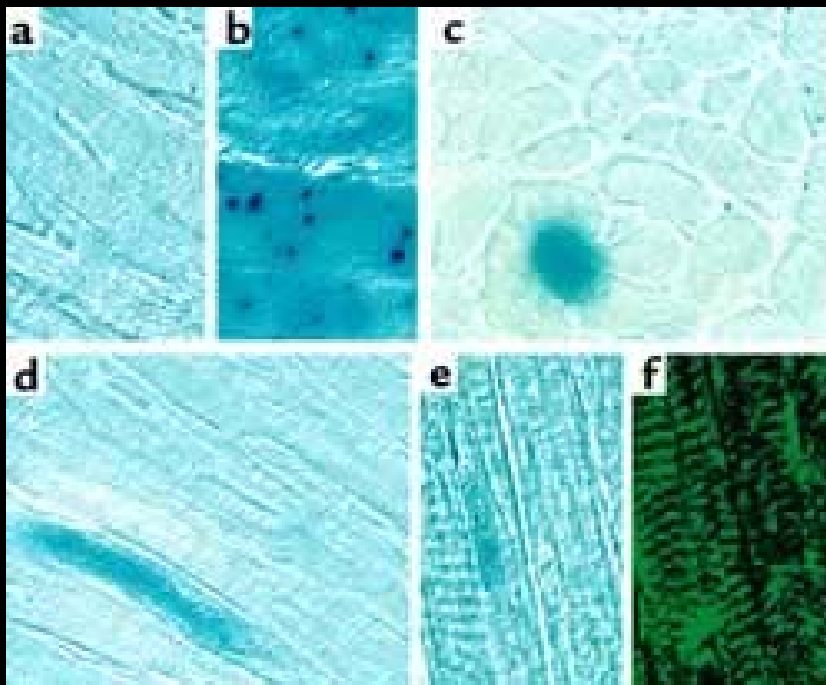
T-Tubuli und Gap-junctions

Chronologie

2001

Jackson, K.A.: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. J. Clin. Invest

Humane Knochenmarkstammzellen können in letal bestrahlten, myelodeprimierten Mäusen nach einem artefiziellen Infarkt in Cardiomyozyten differenzieren (allerdings in sehr geringer Anzahl)



a,b) Beta-Galaktosidase-Färbung in Kontroll- und Therapiegruppe

c,d) Infarkttherz mit „blauen“ Herzmuskelzellen.

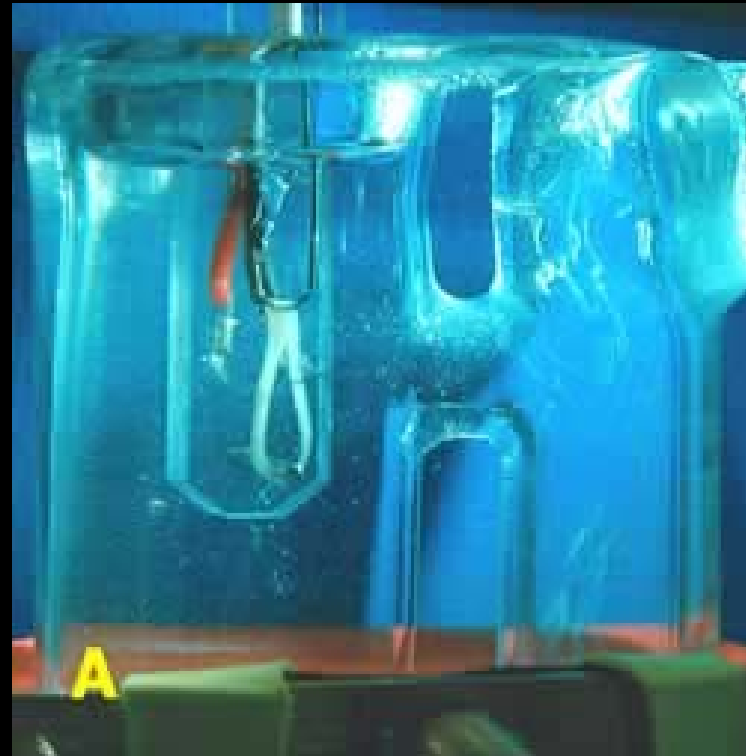
e,f) Alpha-Actin-Färbung

Chronologie

2002

Zimmermann, W.H.: Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. Circ Res. 2002

Kulturelle Konstruktion von 3-dimensionalem ringförmigen Herzmuskel (bei neugeborenen Ratten mit Collagen I und Matrixproteinreicher Kultur.)



Chronologie

2002

Quaini, F.: Chimerism of transplanted heart. N. Engl. J. Res. 2002

Nachweis von Y-Chromosomen in weiblichen Spenderherzen männlicher Empfänger (Einwanderung von vermutlich KM-Zellen in das humane Herz).

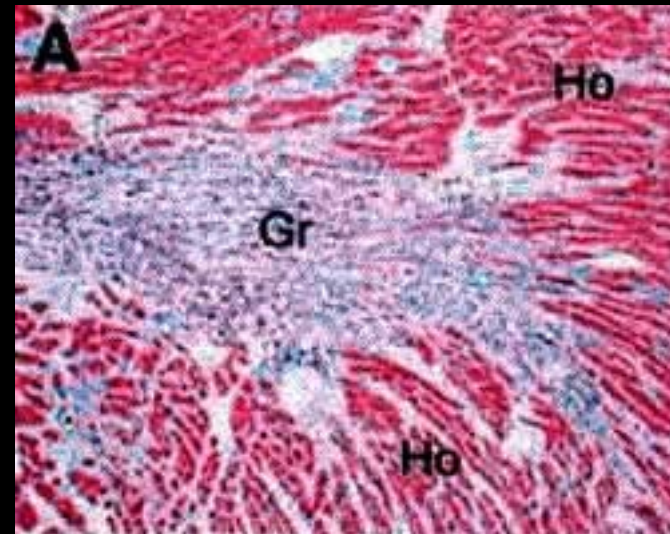
Vermutlich nur sehr geringe Zahl der migrierten Zellen

Chronologie

2002

Reinecke, H: Skeletal muscle cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes. J. Mol. Coll. Cardiol.

Keine Differenzierung skelettaler Myoblasten in Herzmuskelzellen, aber..



1998

Taylor, D.A.: Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. Nat. Med.

Zunahme der Kontraktilität !!

Terminologie

Embryonale vs. adulte Stammzellen

Kerntransfer und therapeutisches Klonen

- Dolly (tierische Klonversuche),
- Südkoreanische Forscher (humane ES-Linie),
- überwältigende Vision (Eigenorgannachschub)

Totipotent – Pluripotent – multipotent

- Embryonale Stammzellen
- Embryonale Keimzellen
- Adulte Stammzellen, z.B. Knochenmarkstammzellen

Zellphysiologie

Mesenchymal

Endothelial

Angioblasten

CD 34

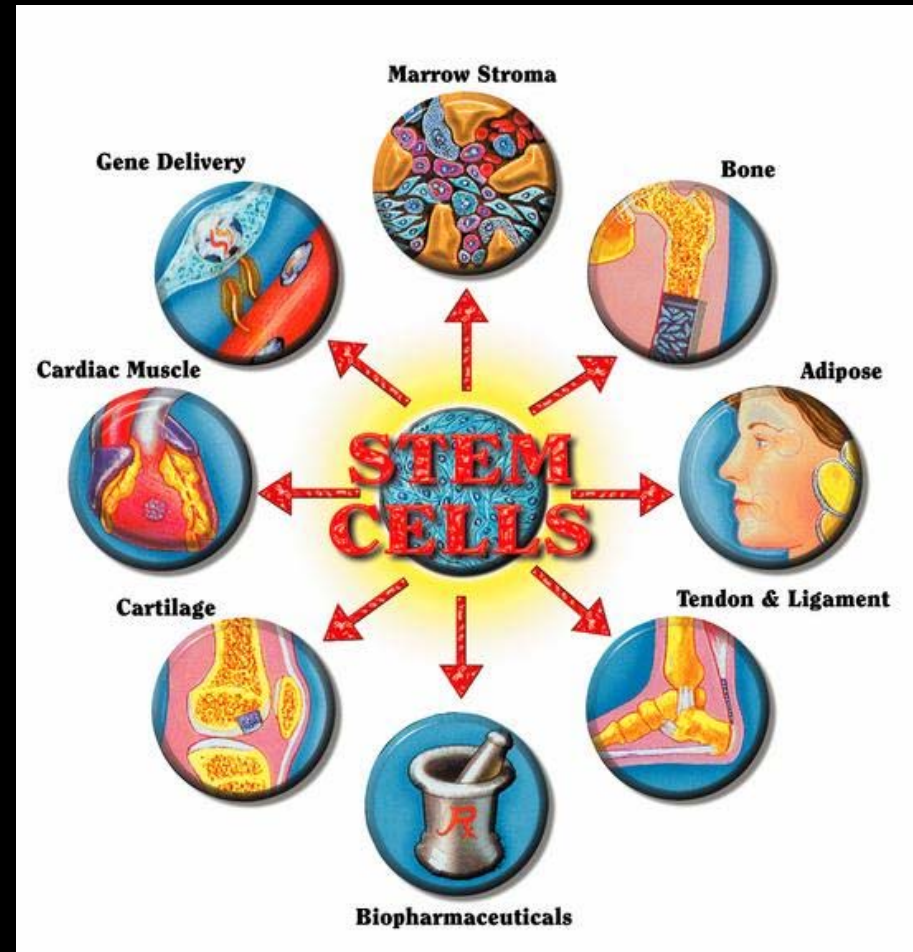
CD45

CD 113

CD117^{bright}

VEGF, GATA-2

?????



Zellphysiologie oder welche Zelle ist die richtige??

Pool von mononukleären Knochenmarkzellen, darunter Mesenchymale Zellen (CD 34-, CD 45-) als Vorläufer von Cardiomyozyten.

Bisher fragliche Effektivität

Endotheliale Vorläuferzellen mit Eigenschaften von embryonalen Hämangioblasten sind im adulten Knochenmark vorhanden (Sie exprimieren CD 34+, sind GATA-2 + (Transkriptionsfaktor), besitzen $\alpha 4$ -Integrine) und können durch G-CSF stimuliert werden.

Angioblasten

CD 34

CD45

CD 113

CD117^{bright}

VEGF, GATA-2

Zellphysiologie oder welche Zelle ist die richtige??

Kocher, A.A.: Neovascularisation of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodelling and improves cardiac function. Nature, 2001



Die stärkste Proliferation nach Gabe von VEGF zeigen CD34+/CD117^{bright}/GATA-2^{Hi} – Zellen.

Potential dieser Zellen:

1. Induktion einer Neovasculogenese durch Kapillarsynthese und Angioblastennachweis
2. Reaktion auf Signale aus ischämischem Gewebe führt zur Migration und Proliferation
3. Reduktion der Kollagendeposition und Narbenbildung
4. Konsekutive Verbesserung der myokardialen Pumpfunktion
5. Hohe Expression von u (urokinase-type)-PA als Marker der proteolytischen Aktivität durch G-CSF, M-CSF

Folge: Frühe Neoangiogenese verhindert spätes remodelling

Entwicklungsmöglichkeiten von Stammzellen



Leberzellen



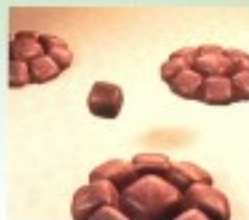
pluripotente Stammzellen
z.B. aus Nabelschnurblut



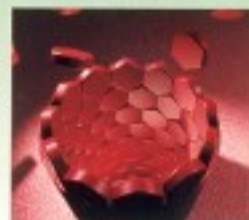
Zellen des Blutes



Nervenzellen



Inselzellen der
Bauchspeicheldrüse



Endothelzellen der
Blutgefäße



Knorpel
und Knochen



Muskelzellen

Nachteile embryonaler Stammzellen

- ethische Probleme
- Schwierige Isolation
- Risiko der Abstoßung
- Notwendigkeit der Immunsuppressiven Therapie
- Arrhythmogenes Potential
- Hohes Risiko der Teratogenizität
- Fehlen spezifischer Oberflächenmerkmale zur einfachen Identifikation

Vorteile adulter Stammzellen

- keine ethischen Bedenken
- Leichte Gewinnung (GCSF, Plasmapherese, KM-Pkt.)
- Differenzierung zwischen mesenchymalen, endothelialen oder hämatologischen Vorläufern möglich
- Keine Abstoßung
- Klinische Anwendung bereits durchgeführt
- Fehlen spezifischer Oberflächenmerkmale zur einfachen Identifikation

Klinische Anwendung in der Kardiologie ????

Potentielle Ziele

- Verhindern von Remodelling (Dilatation, Narbenbildung)
- Verhinderung der Herzinsuffizienz mit hämodynamischen/rhythmogenen Konsequenzen
- Alternative zur HTX
- Induktion der Angiogenese nach AMI

Durch Regeneration von Myokard und Neovaskularisation

Klinische Anwendung in der Kardiologie

Bsp. 1

Strauer, BE: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. Circulation 2002

Eckpunkte der Studie

2 x 10 Patienten mit akutem Myokardinfarkt

Standard-Initialtherapie inkl. PCI

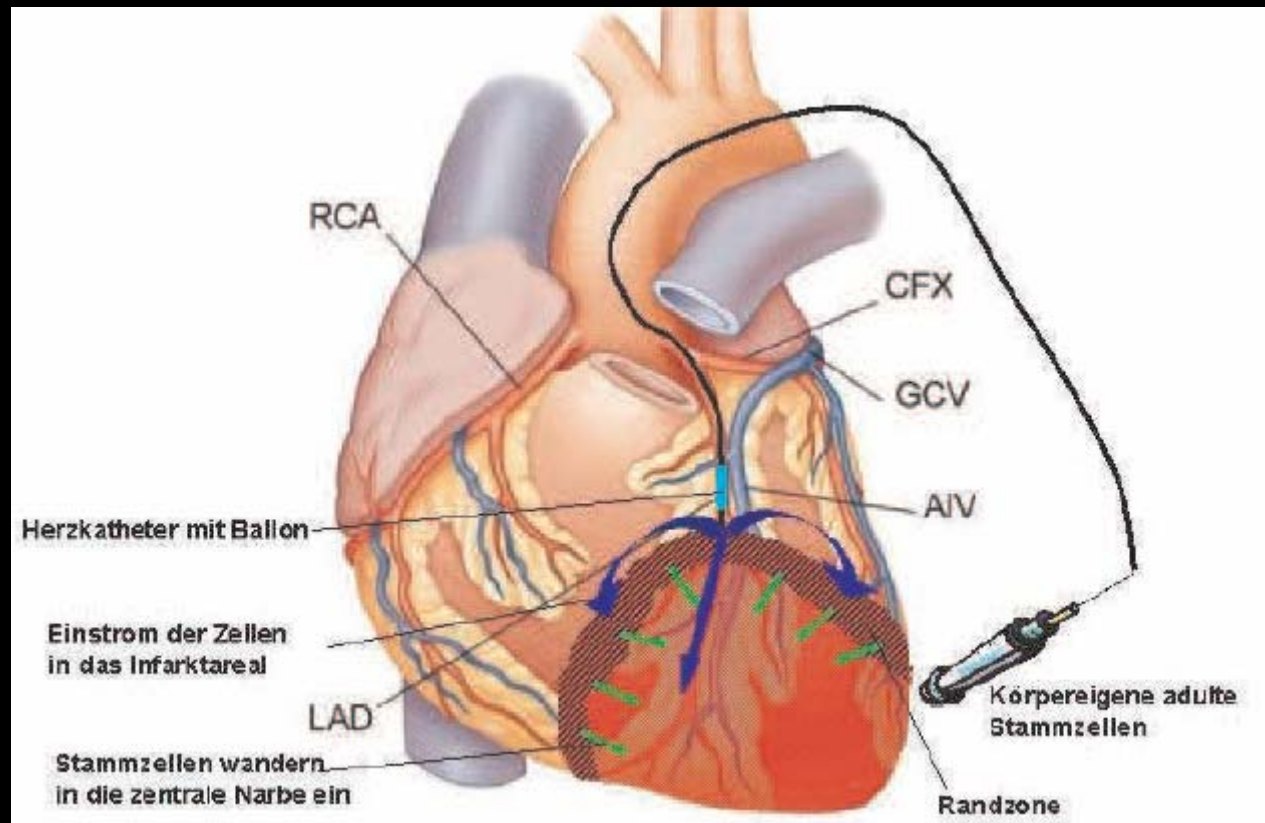
4 Tage nach Infarkt Gewinnung CD34+ Stammzellen per KM-Punktion.

5 Tage nach AMI intrakoronare fraktionierte Applikation von 20ml Suspensat mittels „stop-flow-PTCA“

Nachuntersuchung nach 3 Monaten zeigte

- Signifikante Reduktion der Infarktgrösse um 18%
- Signifikante Verbesserung von Schlagvolumenindex und lv Kontraktilität

Strauer, BE: Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. Circulation 2002



Myokardregeneration nach Herzinfarkt durch Zellersatz mittels intrakoronarer autologer Stammzelltransplantation. Nach mechanischer Rekanalisation des Infarktgefäßes werden die humanen autologen Knochenmarksstammzellen intrakoronar in das Infarktgebiet mittels **Stop-Flow-PTCA** unter Überdruck-Perfusion eingebracht. Die in der gesunden Randzone angesiedelten autologen Stammzellen migrieren sekundär in das nekrotische Infarktareal und differenzieren in Kardiomyozyten und Endothelzellen, so dass es zur Verkleinerung des Infarktareals und funktionellen Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion kommt.

Klinische Anwendung in der Kardiologie

Bsp. 2

Stamm C, Steinhoff G: Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. Lancet 2002

Eckpunkte der Studie

6 Patienten mit AMI > 10 d und < 3 Monate mit Indikation zur CABG, aber nicht-revaskularisierbarer Akinesie der Infarktzone.

1 Tag vor CABG Gewinnung CD133+ Stammzellen per KM-Punktion.

Intramyokardiale Injektion nach Anlage aller Bypässe von 10 x 0,2ml Suspensat.

Nachuntersuchung nach 9-16 Monaten zeigte

- Signifikante Reduktion der Infarktgrösse
- Signifikante Verbesserung der Ejektionsfraktion

Klinische Anwendung in der Kardiologie

Bsp. 3

Kueth F.: Mobilization of stem cells by granulocyte colony stimulating factor for the regeneration of myocardial tissue after myocardial infarction. DMW Schr, 02/2004

Eckpunkte der Studie

5 Patienten mit AMI zusätzlich zur Standardtherapie 48h nach PCI mit G-CSF behandelt.

Behandlungsdauer 7,6 d.

Nachuntersuchung nach 3 Monaten zeigte

- Signifikante Verbesserung der linksventrikulären Funktion (RNV) und Perfusion (SPECT)

Klinische Anwendung in der Kardiologie

Bsp. 4

Kang H-J.: The MAGIC cell randomised trial. Lancet 2004

Eckpunkte der Studie

Drei Patientengruppen (n=27) nach AMI > 48h oder altem AMI und Primärdiagnostik:

1. C-CSF
2. G-CSF + intrakoronare Applikation von CD34+-Knochenmarkzellen
3. Nur Standardtherapie

Randomisation

Gewinnung der Stammzellen mittels Apherese

Verzögerte PCI am 5.Tag mit Applikation der Zellen (mind. 7×10^6)

Follow-up nach 6 Monaten zeigte

- Verbesserung der Ejektionsfraktion
- Reduktion des systolische lv Volumens
- Verbesserte Perfusion (SPECT)

Nur für G-CSF + Stammzellgruppe !?!

Klinische Anwendung in der Kardiologie

Bsp. 4

Kang H-J.: The MAGIC cell randomised trial. Lancet 2004

Eckpunkte der Studie

Hohe Restenose-Rate in den G-CSF Gruppen !

5/7 Patienten der G-CSF+ Gruppe und 2/3 Patienten in der G-CSF ohne SZ-Therapie-Gruppe.

Annahme: G-CSF stimuliert Differenzierung von Vorläuferzellen in Zellen der glatten Gefäßmuskulatur im verletzten Segment

Allerdings:

Implantation ungewöhnlich langer stents (im Mittel 22.8 mm)

Evtl. Verbesserung durch beschichtete stents

Klinische Anwendung in der Kardiologie

Bsp. 5

Wollert KC: I.c. autologous bone-marrow cell transfer after ami: the BOOST randomised controlled clinical trial. Lancet 7/2004, Vol. 364

60 Patienten, zwei Gruppen, 6,9 % verbesserte EF im 6 Monate follow-up.

Mögliche Probleme und Kritik an den erwähnten Studien I

G-CSF fördert stent-thrombosen

Risiko der KM-Punktion unter Thrombozytenaggregationshemmung

Keine bisher klare Beweißlage für

- Differenzierung intramyokardial zu Endothel oder Kardiomyozyt in bedeutender Zahl
- Ansiedelung intramyokardial beim Menschen zweifelhaft
- Warum siedeln sich keine im Blut zirkulierenden Stammzellen ab?
- Art der zu verwendeten Stammzellen unklar

Keine Verblindung der Studien

Keine sichere Abgrenzung zum reinen Revaskularisationserfolg in vielen Studien

Klinische Anwendung kommt sicherer Datenlage durch Grundlagenforschung zuvor

Mögliche Probleme und Kritik an den erwähnten Studien II

Möglicherweise arrhythmogenes Potential der Stammzellen !

Menasche, P.: Myoblast transplantation for heart failure. Lancet 2001

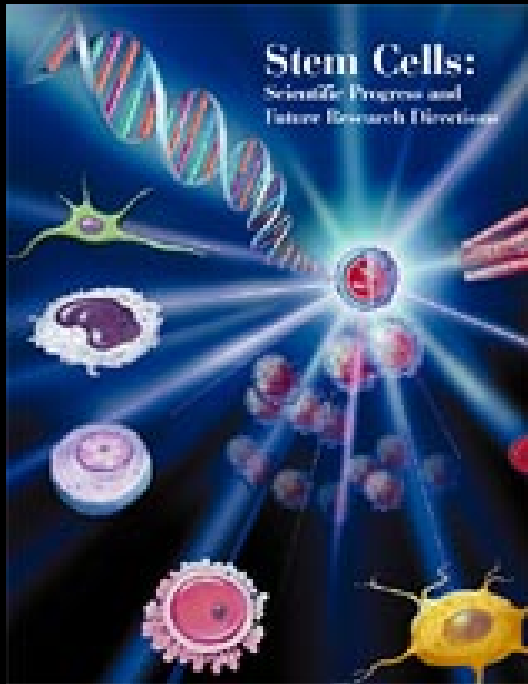
4 von 10 behandelten Patienten benötigten im Verlauf einen AICD.

Balsam L.: Hematopoietic stem cells adopt mature hematopoietic fates in ischemic myocardium. Nature 4/2004.

Mit GFP-markierte hämatopoetische Stammzellen von Mäusen wurden intramyokardial oder i.v. injiziert.

Die Zellen waren nach 30 Tagen fast nicht mehr nachweisbar, die zuvor isolierten Zellen exprimierten keine Merkmale herzspezifischen Gewebes.

Utopie, Wunschgedanke oder seriöse Medizin ??



Ausblick

- Erkennung von Reprogrammierungsmechanismen
- Verbesserte Stammzellkultur
- Identifikation geeigneter Stammzellen
- Randomisierte, verblindete Studien
- Entwicklung und Identifikation von Growth-Faktoren

Fazit:

