

Buněčná léčba v kardiologii: přehled aktuálních dat za rok 2005

R. Panovský

Klíčová slova

kmenové buňky – buněčná transplantace – srdeční selhání

Souhrn

Souhrnný článek shrnující aktuální výsledky především klinických studií buněčné léčby v kardiologii. Zhodnocení využití kosterních myoblastů, buněk kostní dřevě a mobilizace kmenových buněk.

Keywords

stem cells – cell therapy – heart failure

Summary

Cell therapy in cardiology: state of the art 2005. The article reviews results of recent studies of cell therapy in cardiology. It is focused on using skeletal myoblasts, bone marrow cells and ways for mobilization of stem cells.

Úvod

V poslední době dochází k výraznému pokroku v prevenci a léčbě srdečních onemocnění, zejména ischemické choroby srdeční. Jsou k dispozici nové léky, zlepšující se chirurgické a intervenční postupy, jsou vyvinuty potahované stenty. Díky tomuto pokroku klesá kardiiovaskulární mortalita, pacienti po infarktu myokardu se dožívají vyššího věku, trpí méně anginou pectoris. Na druhé straně ale dochází ke zvyšování incidence srdečního selhání (i v souvislosti s lepší prognózou infarktu myokardu), které zůstává stále velkým problémem i přes výše zmínované zlepšení farmakoterapie. Transplantace srdce je řešením pro vybrané jedince v konečné fázi onemocnění, zdaleka ne však pro většinu pacientů se srdečním selháním. Rovněž mechanické srdeční náhrady nejsou systémovým řešením.

Proto jsou hledána nová řešení, nové postupy léčby, s cílem zlepšit funkci levé komory srdeční a zmírnit symptomatologii nemocných se srdečním selháním. Srdeční selhání je následkem smrti kardiomyocytů a neschopnosti srdce výraznější vlastní regenerace. Proto jednou ze zkoumaných variant terapie je kompenzace ztráty kardiomyocytů a podpora regenerace myokardu využitím buněčné léčby. Náhrada jizevnatě tkáně funkčními buňkami by znamenala kauzální a definitivní vyléčení postiženého myokardu.

V době před 10–15 lety byly započaty experimenty s využitím různých druhů buněk k obnově myokardu. Byly zkoušeny embryonální kmenové buňky, dospělé i fetální kardiomyocyty, fibroblasty, buňky hladkého svalstva, mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě a skeletální myoblasty [1–7]. Vzhledem k převážně pozitivním výsledkům s některými typy buněk došlo na přelomu tisíciletí k zahájení klinických studií buněčné terapie. Případná transplantace dospělých kardiomyocytů je limitována jejich velmi nízkou rezistencí k ischemii při implantaci do jizvy a neschopností vlastního dělení ex vivo. Využití embryonálních kmenových buněk zůstává omezené na experiment vzhledem k etickým problémům spojených s jejich využitím. Proto je pozornost vědců soustředěna především na využití skeletálních myoblastů a buněk kostní dřevě.

Kosterní myoblasty

Kosterní myoblasty, neboli satelitní buňky jsou mononukleární unipotentní prekurzorové buňky kosterních svalů, které jsou při svalovém zranění rychle mobilizovány, proliferují, fúzí, a tím zajišťují regeneraci poškozených svalových vláken. Po několika letech experimentů byly skeletální myoblasty, jako první buněčná léčba v klinické medicíně vůbec, použity k obnově myokardu u nemocného podstupující revaskularizační operaci [8]. Důvody k prvnímu použití právě těchto buněk byly

především praktické. Jedná se o buňky, které se za normálních okolností vyvíjejí ve funkční sval, jsou kontraktilní a mají schopnost vlastní regenerace. Při použití autologních buněk odpadá problém případné imunosuprese. Buňky mají velký proliferativní potenciál, který je omezen na myogenní buněčnou linii, tedy by nemělo hrozit riziko malignity. Další výhodou je jejich výrazná rezistence vůči ischemii, a tedy vyšší pravděpodobnost jejich přežití v málo vaskularizované jizvě. Navíc jsou relativně lehce dostupné – z malé svalové biopsie lze získat poměrně velké množství buněk. Zvířecí experimenty u infarktu myokardu prokázaly diferenciaci implantovaných kosterních myoblastů do svalových vláken, absenci jejich spojení (coupling) s kardiomyocyty a poměrně výrazné zlepšení regionální i celkové funkce levé komory [5,9–14]. Nyní je v experimentech dokonce zkoušeno i genetické preprogramování myoblastů s cílem jejich možné diferenciaci v kardiomyocyty [15].

Mechanismus příznivého vlivu implantace kosterních myoblastů na srdeční funkci není jednoznačně vysvětlen. Jednou z možností je zpevnění stěny srdeční v místě infarktového ložiska a zabránění její remodelace. Další cestou je zlepšení kontraktility levé komory díky kontrakcím implantovaných buněk. Proti této možnosti částečně hovoří výše uvedená absence spojení mezi implantovanými buňkami a kardiomyocyty. Uvažuje se též o variantě fúze myoblastu se sousedním kardiomyocytem [1]. Tato možnost již byla prokázána, ale počty takto fúzovaných buněk jsou zřejmě příliš malé k tomu, aby se jejich činnost projevila zlepšením funkce levé komory [16]. Jiné teorie hovoří o zlepšení kontraktility parakrinními faktory secernovanými implantovanými buňkami [17].

Úplně první klinická transplantace buněk do myokardu se uskutečnila v Bichatově nemocnici (l'hôpital Bichat) v Paříži v červnu roku 2000, kde tým profesora Menasché [8] implantoval 72letému nemocnému po infarktu myokardu zadní stěny 874 miliónů buněk odebraných z musculus vastus lateralis. Im-

plantace buněk byla provedena peroperačně během revaskularizační operace. Zadní stěna levé komory byla předoperačně akinetická a neviabilní, ale za 5 měsíců po zákroku vykazovala při pozitronové emisní tomografii (PET) viabilitu a dle echokardiografie bylo prokázáno zlepšení kontraktility. U pacienta došlo také ke zmírnění symptomů ze III. na II. stupeň klasifikace NYHA. Nezachytili žádné závažné arytmie. Lze ale předpokládat, že chirurgická revaskularizace mohla sama výrazně zlepšit klinický stav pacienta, takže podíl transplantovaných buněk na zlepšení je nejasný.

Stejní autoři [18] později zveřejnili výsledky 1. fáze klinického výzkumu autologní transplantace satelitních buněk u nemocných s těžkou poinfarktovou dysfunkcí levé komory (ejekční frakce < 35 %, průkaz neviabilního myokardu pomocí dobutaminové echokardiografie a pozitronové emisní tomografie). Na 10 nemocných indikovaných k operační revaskularizaci prokázali proveditelnost a bezpečnost perioperační implantace kosterních myoblastů do poinfarktového myokardu. Popisují 1 časně úmrtí bez souvislosti s procedurou, záchyt monomorfní komorové tachykardie u 4 nemocných řešený implantací kardioverteru-defibrilátoru a 1 nekardiální úmrtí 17,5 měsíce po implantaci. U nemocných došlo ke zlepšení funkční třídy NYHA (z 2,7 na 1,6), zvýšení ejekční frakce (z 24 na 32 %) a zlepšení ztlušťování 14 z 22 (63 %) nerevaskularizovaných, původně neviabilních segmentů. Výsledky jsou hodnoceny opatrně s ohledem na malý počet pacientů, absenci kontrolní skupiny a jistý podíl revaskularizace na klinickém zlepšení pacientů.

Velmi podobný design měly i další studie, které se také týkaly nemocných po prodělaném infarktu myokardu, u kterých byly kosterní myoblasty implantovány injekčně do neviabilní tkáně během revaskularizační operace. Herreros et al [19] u 12 nemocných prokázali jednoduchost a bezpečnost procedury – v pooperačním období nezjistili žádné komorové arytmie. 3 měsíce po výkonu zaznamenali zvýšení ejekční frakce levé komory z 35 % na 53 %, zlepšení regionální kontraktility v segmentech s implantovanými buňkami (změna wall motion score index z 2,64 na 1,64) a zvýšení metabolismu v infarktové zóně při vyšetření pozitronovou emisní tomografií.

Čínští autoři [20–21] implantovali 4 nemocným s ICHS kosterní myoblasty také během CABG do infarktového ložiska a periinfarktově. Během 3–4 měsíců sledování uvádějí pouze ojedinělé časně komorové arytmie bez nutnosti léčby, zlepšení EF (z 37 na 49 %), zmenšení rozměru levé komory, zlepšení perfuze a metabolismu v místě implantace buněk. Pacienti měli méně intenzivní dušnost dle klasifikace NYHA.

Siminiak et al [22–23] popisují u 10 nemocných 3 a 6 měsíců po implantaci 20 miliónů myoblastů významné zlepšení regionální kontraktility v místech původně neviabilní tkáně. Nepopisují žádné úmrtí, 4 nemocní měli časně pooperačně setrvalé komorové tachykardie s nutností podávání amiodaronu. Po 3 měsících od výkonu se již žádné závažné komorové arytmie nevyskytovaly a nebylo třeba žádného pacienta léčit žádnými antiarytmiky. U nemocných došlo 4 měsíce po výkonu ke zlepšení ejekční frakce levé komory z 35 % na 42 %, po 12 měsících a 3 letech efekt přetrvával. Stejný tým vědců testoval ve studii Poznan trial [24] podání skeletálních myoblastů perkutánní cestou přes koronární sinus. U 10 nemocných popisují zlepšení klasifikace NYHA u všech léčených pacientů a zlepšení ejekční frakce levé komory o 3–8 % u většiny nemocných.

Během implantace mechanické podpory levé komory (left ventricular assist device – LVAD) aplikovali Pagani et al [25] skeletální myoblasty injekčně do infarktového a periinfarktového myokardu 5 nemocným ve stadiu refrakterního srdečního selhání na podkladě ischemické kardiomyopatie, kteří byli na čekací listině na srdeční transplantaci. Následně histologicky vyšetřili 4 explantovaná srdce a u 3 z nich prokázali myoblasty, které přežily a diferencovaly se v myofibrily.

Dib et al [26] podali nemocným po infarktu myokardu, s ejekční frakcí levé komory pod 40 % autologní skeletální myoblasty během bypassové operace (24 pacientů) nebo během implantace LVAD (6 nemocných čekajících na ortotopickou transplantaci srdce). U nemocných se zlepšila ejekční frakce levé komory z 28 na 35 % (po 1 roce), respektive na 36 % (po 2 letech sledování), dle PET byla nalezena nová ložiska viability v původní jizvě po infarktu. Navíc histologicky prokázali přežití implantovaných buněk v myokardu u 4 z 5 explantovaných srdcí. Pacienti neměli žádné maligní arytmie.

Jinou aplikační cestu použili Smits et al [27] z Rotterdamu. 5 nemocným po prodělaném infarktu myokardu přední stěny s průkazem neviabilního dysfunkčního myokardu v povodí infarktové tepny aplikovali skeletální myoblasty transendokardiální injekcí pomocí elektromechanického mapování systémem NOGA. Procedura proběhla vždy bez komplikací, 1 nemocný měl implantován defibrilátor pro záchyt asymptomatické nesetvalé komorové tachykardie. Ejekční frakce levé komory se nemocným zlepšila ze vstupních 36 % na 41 % po 3 měsících a na 45 % po 6 měsících. Navíc bylo magnetickou rezonancí zjištěno zlepšení regionální kontraktility cílové oblasti.

Injekcemi z dutiny levé komory aplikovali kosterní myoblasty i Ince et al [28]. 6 nemocných po prodělaném infarktu myokardu ab-

solvávalo technicky úspěšnou implantaci buněk, neměli žádné periprocedurální komplikace. U 2 nemocných byly časně po implantaci myoblastů zachyceny 3 epizody komorové tachykardie, u prvního byly léčeny amiodaronem, u druhého implantací implantabilního defibrilátoru. V dalším sledování již ani 1 z těchto pacientů neměl další komorovou tachykardii. V kontrolní skupině měli během sledování 3 pacienti komorové tachykardie, všichni byli léčeni implantací kardioverteru-defibrilátoru. V léčené skupině došlo ke zlepšení ejekční frakce levé komory z 24,3 % na 32,2 % po 1 roce sledování, klasifikace NYHA byla zlepšena z 3,17 na 1,67 a nemocní za 6 minut walk testu ušli o 122 metrů více než před implantací buněk. V kontrolní skupině žádný z těchto parametrů zlepšen nebyl.

Pro úplnost ještě uvádíme kazuistiku 1. autologní transplantace myoblastů během revaskularizační operace na bíficím srdci provedenou v Singapuru [29]. Pacient s akutním antero-septálním infarktem myokardu měl 6 měsíců po výkonu zmenšený perfuzní defekt.

Z výše uvedených studií fáze 1 klinického výzkumu vyplývá, že výsledky léčebného použití kosterních myoblastů jsou nadějně, implantace buněk se ukazuje jako poměrně lehce proveditelná, bez větších periprocedurálních komplikací. Data ohledně rizika arytmií jsou rozporuplná. Je zkoumána možnost genetické modifikace myoblastů směrem k expresi connexinu-43, hlavní bílkoviny pro tvorbu „gap junction“, s cílem snížit riziko arytmiogenicity [30]. Všechny studie prokazují zlepšení subjektivních nebo objektivních parametrů, nicméně ve většině chybí kontrolní soubor a k definitivním závěrům je třeba více dat na větších souborech pacientů. Klinický výzkum zatím zůstává omezen na pacienty se srdečním selháním ischemické geneze.

Kmenové buňky kostní dřene

Kmenové buňky (embryonální nebo dospělé) a prekurzorové buňky jsou charakterizovány 2 specifickými vlastnostmi, tj. svou schopností se diferencovat v různé definitivní tkáně na jedné straně a schopností vlastní regenerace bez ztráty diferenciačního potenciálu na straně druhé. Dospělé kmenové buňky lze v lidském těle najít především v kostní dřeni, ale i v játrech, příčně pruhovaných svalech, tukové tkáni, srdci, mozku a dalších orgánech.

Buňky kostní dřene jsou multipotentní. Hematopoetická frakce kmenových buněk zajišťuje kontinuální regeneraci jednotlivých krevních komponent – erytrocytů, trombocytů, lymfocytů, granulocytů a makrofágů. Hematopoetické buňky jsou nejlépe prostudovanými kmenovými buňkami, a slouží tedy jako určitý prototyp pro pochopení všech dospělých kmenových buněk. V posledním čtvrtstoletí sloužila právě tato frakce buněk k alogenní

i autologní transplantaci při různých hematologických onemocněních. Ne všechny buňky v kostní dřeni jsou však kmenové. Z celkového počtu hematopoetických dřevových buněk (cca $15\text{--}30 \times 10^6$ na kg hmotnosti těla) je kmenových buněk jen asi 1–2 %, tedy $1,5\text{--}3 \times 10^6$ na kg hmotnosti těla. Díky své regenerační schopnosti zůstává jejich „pool“ v těle prakticky neměnný po většinu lidského života [31–32].

Vedle výše popsaných buněk existují v kostní dřeni i buňky stromální, které zajišťují mikroprostředí pro proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk. Zároveň jsou zdrojem nehematopoetických mezenchymálních kmenových buněk. Tyto buňky se mohou diferencovat do mnoha buněčných linií – do osteoblastů, chondrocytů, adipocytů, fibroblastů, myoblastů a kardiomyoblastů [33]. Jsou také velmi málo četné, je jich cca 0,001–0,05 % z mononukleárních dřevových buněk a nacházejí se i v jiných tkáních, například v tukové tkáni a v periferní nebo pupečnickové krvi.

Zatím neexistuje žádný specifický marker, který by identifikoval „opravdové“ kmenové buňky v kostní dřeni. K odlišení různých typů buněk kostní dřene se využívají imunofluorescenční techniky a imunocytochemické metody využívající monoklonální protilátky. Různé antigeny takto detekované jsou tříděny do několika skupin, které jsou označovány písmeny CD (cluster of differentiation). Pro hematopoetické kmenové a progenitorové buňky jsou typické antigeny CD34 a CD133 (označované někdy i jako AC133), ale také CD45 a CD117 [34]. Naopak mezenchymální kmenové buňky jsou CD34 negativní, CD45 negativní a CD14 negativní, ale exprimují například markery CD90, CD106 a CD13.

Zajímavostí je, že „přednastavení“ kmenových buněk na diferenciaci do určité buněčné linie nemusí být nutně konečné, ale pravděpodobně existuje možnost změny do jiné linie. Této vlastnosti se říká transdiferenciaci [35–42]. V současné době se neví, která část buněk kostní dřene je ideální pro léčebné využití v kardiologii. Nejčastěji bývá využívána mononukleární frakce buněk kostní dřene [41,43], která obsahuje směs různých buněk, které napomáhají různým způsobem regeneraci myokardu a cév: ze zvířecích experimentů je známo, že hemangioblasty pomáhají formování nových cév a mezenchymální kmenové buňky se dle některých prací diferencují do kardiomyocytů, endotelu a buněk hladkých svalů. Mezodermální progenitorové buňky se dále diferencují do endoteliálních buněk. A endoteliální progenitorové buňky se mohou diferencovat do bijících kardiomyocytů [43–46].

Čeho lze v dysfunkčním myokardu po transplantaci kmenových buněk dosáhnout? Teoreticky se očekává nahrazení nefunkčních, nekrotických a apoptotických kardiomyocytů pl-

ně funkčními buňkami, zvýšení počtu kontraktálních elementů, zmenšení rozsahu dysfunkčního myokardu a zlepšení funkce levé komory, podpora místní angiogeneze a rozvoje kolaterál. V řadě studií na zvířatech opravdu došlo ke zlepšení funkce a perfuze myokardu levé komory diferenciací části implantovaných buněk do myocytů a do buněk tvořících nové kapiláry a cévy. Došlo tedy k podpoře angiogeneze, vaskulogeneze i myogeneze [47]. Je velmi cenné s ohledem na omezenou schopnost dospělého srdce obnovit svůj poškozený myokard [48]. Kromě zlepšení ejekční frakce byl prokázán i příznivý vliv transplantace kmenových buněk na remodelaci levé komory s vytvořením silnější stěny v jizvě, zlepšením elasticity jizvy a zabráněním dilatace levé komory [49–50]. Na histologické úrovni bylo prokázáno méně apoptotických a hypertrofických myocytů a periinfarktové zóně, redukce množství kolagenu, vyšší kapilární denzita a zvýšení množství viabilního myokardu [43,51]. Je známo, že pokud jsou kmenové buňky implantovány do oblastí poinfarktové jizvy, diferencují se především ve fibroblasty. Regeneraci myokardu zajišťují jen v případě kontaktu s kardiomyocyty nebo endoteliálními buňkami cév [43,52–53].

V současné době je transplantace kmenových buněk klinicky zkoušena a studována zejména u nemocných s ischemickou chorobou srdeční a dysfunkčním myokardem. Více zkušeností je s nemocnými s akutním infarktem myokardu zasahujícím významnou část myokardu levé komory, o něco méně pak s pacienty s chronickou ischemickou chorobou srdeční a dysfunkcí levé komory. Odhaduje se, že v současné době podstoupilo implantaci dřevových buněk více než 400 kardiologických nemocných [54].

Jako první popsali implantaci buněk kostní dřene 5 nemocným po infarktu myokardu s trvající akineziou postižených myokardiálních segmentů v roce 2001 Hamano et al [55]. Studii zahajovali již v roce 1999. Zákrok provedli peroperačně současně s našitím bypassů, buňky implantovali do nerevaskularizovatelné oblasti. Po 1 roce sledování uvádějí zlepšení perfuze daných oblastí dle scintigrafie u 3 nemocných. Hlavním přínosem této práce bylo prokázání bezpečnosti metody – u nemocných nezaznamenali žádné významné nežádoucí účinky, včetně arytmií.

Fuchs et al [56] publikovali v roce 2003 výsledky pilotní studie zaměřené na využitelnost transendokardiální aplikace autologních buněk kostní dřene. Podali 10 nemocným s ischemickou chorobou srdeční, se stabilní anginou pectoris III.–IV. stupně dle kanadské klasifikace (CCS), nerevaskularizovatelným významným nálezem na věnčitých tepnách a průkazem reverzibilní ischemie dle fotonové emisní počítačové tomografie (SPECT) 4 týdně

kultivované autologní buňky kostní dřene do míst s prokázanou ischemií myokardu pomocí elektromechanického mapování. Výkon byl úspěšný u všech nemocných, nebyly zaznamenány žádné významné nežádoucí účinky léčby a za 3 měsíce po výkonu došlo ke zmírnění anginózních potíží (z 3,1 na 2,0 stupně dle CCS), které bylo objektivizováno prodloužením délky zátěžové testu na běhátku a zmírněním ischemie během tohoto testu.

Stejný aplikační přístup byl použit i v dalších studiích [57–59]. Perin, Silva et al zjistili u 14 nemocných s chronickou ischemickou chorobou srdeční, dysfunkcí levé komory a reverzibilním postižením myokardu dle SPECT významné zmenšení defektu myokardu (dle SPECT) a významné zlepšení ejekční frakce levé komory (z 20 na 29 %) za 2 a 4 měsíce po implantaci autologních mononukleárních buněk kostní dřene. Efekt přetrval i po 6 a 12 měsících. U nemocných se nevykly žádné závažné periprocedurální problémy ani žádné následné komplikace s výjimkou 1 nemocného, který zemřel náhlou smrtí 14 dní po implantaci buněk. Pacient nebyl pitván.

Podobně postupovali i Tse et al [60] u 8 nemocných s ICHS. Za 3 měsíce po výkonu se jejich pacientům omezily epizody anginy pectoris, nemocní spotřebovali méně nitroglycerinů a dle magnetické rezonance došlo ke zlepšení perfuze a funkce myokardu levé komory v místech původní ischemie. Nebyly zaznamenány žádné závažné arytmie ani jiné komplikace léčby.

Beeres et al [61] aplikovali autologní mononukleární buňky kostní dřene NOGA-katétrem 23 nemocným s chronickou ICHS, anginou pectoris III.–IV. stupně CCS při maximální léčbě, u kterých nebyla možnost konvenční revaskularizace. Nemocní neměli žádné procedurální komplikace, ani následné arytmie. Snížily se anginózní potíže, množství užitého nitroglycerinu, zlepšila se kvalita života nemocných a došlo i ke zvýšení ejekční frakce z 53 na 77 % (po 6 měsících).

Stamm et al [62] aplikovali během bypassové operace autologní kmenové buňky z kostní dřene 6 nemocným po infarktu myokardu (v časovém rozmezí 10. den–3 měsíce po infarktu) do hraniční zóny infarktu. Za 3–9 měsíců po operaci došlo u pacientů ke zmírnění symptomů, perfuze myokardu se zlepšila u 5 nemocných a funkce levé komory u 4 nemocných. Z nežádoucích účinků popisovali supraventrikulární arytmie u 2 nemocných, pneumonii u 1 a perikardiální výpotek u dalších 2 pacientů. I u této studie je problémem rozlišení účinků transplantace kmenových buněk od efektu revaskularizace myokardu, konkrétně u nežádoucích účinků je velmi pravděpodobné, že mohly souviset spíše s revaskularizační operací.

Tomuto problému se pokusili čelit Galiñanes et al [63], kteří studovali 14 nemocných po proběhlém infarktu myokardu. Rozdělili 34 myokardiálních segmentů, u kterých nebyly známky viability při dobutaminové echokardiografii a u kterých byla fibróza potvrzena histologicky perioperačně, do 3 skupin – na přemostěné aortokoronárním bypassem, léčené injekcemi autologních buněk kostní dřeně a na segmenty léčené oběma metodami. Za 6 týdnů a 10 měsíců zjistili zlepšení funkce pouze těch původně neviabilních segmentů, které byly revaskularizovány a zároveň do nich byla provedena aplikace dřeňových buněk.

Autor tohoto článku měl možnost pobytu na Univerzitě v Düsseldorfu na Klinice pro kardiologii, pneumologii a angiologii, kde pod vedením profesora B. E. Strauera pracuje tým lékařů zabývající se transplantací autologních kmenových buněk kostní dřeně kardiologickým nemocným. Ve 2 základních indikacích, a to u pacientů s větším akutním infarktem myokardu po direktní angioplastice a u nemocných s chronickou ICHS a dysfunkcí levé komory, provedli již více než 40 transplantací kmenových buněk cestou intrakoronárního podání. Dle výsledků prvních 10 nemocných [64–66] po infarktu myokardu došlo 3 měsíce po transplantaci ke zmenšení infarktové oblasti dle ventrikulografie levé komory, zvýšení srdečního indexu a kontraktivity infarktových segmentů. Transplantace byly provedeny 10. den po infarktu. Nebyly zaznamenány žádné závažné komplikace léčby. Stejným způsobem implantovali kmenové buňky 22 nemocným po starším infarktu myokardu (5 měsíců–8,5 roku) v rámci studie IACT (Intracoronary Autologous mononuclear bone marrow Cell Transplantation). Po 3 měsících udávají zmenšení velikosti infarktového ložiska o 30 %, zvýšení EF o 15 %, zlepšení kontraktivity infarktové stěny, zvýšení max. dosažené spotřeby kyslíku o 11 % a zvýšení metabolismu v infarktové stěně dle PET o 15 %. Kontrolní pacienti po PTCA bez implantace buněk se v těchto parametrech nezlepšili [67–68].

Intrakoronární aplikace buněk byla použita i v dalších studiích. Chen et al [69] randomizovali 69 nemocných s akutním infarktem myokardu řešeném direktní perkutánní angioplastikou k léčbě autologními mezenchymálními buňkami kostní dřeně nebo placebem. Oproti ostatním studiím byla implantace buněk opožděna – odběr buněk se uskutečnil 8. den po infarktu a buňky byly před implantací 10 dní kultivovány. Během 3 a 6měsíčního sledování nepopisují závažné nežádoucí účinky léčby a nemocní v buněčné skupině měli zlepšenu ejekční frakci levé komory z 49 % na 67 %. Došlo také ke zlepšení regionální kontraktivity v místě infarktu a ke zmenšení perfuzního defektu.

Fernández-Avilés et al [70] implantovali dřeňové buňky intrakoronárně 20 nemocným v průměru 13,5 dne po akutním infarktu myokardu. Za 6 měsíců sledování zjistili zmenšení endsystolického rozměru levé komory, zlepšení regionální i celkové funkce levé komory dle magnetické rezonance a také žádné nežádoucí účinky.

Ruan et al [71] dvojitě zaslepeně randomizovali 20 nemocných s akutním infarktem myokardu k léčbě autologními buňkami kostní dřeně nebo pouhým sérem. Za 3 a 6 měsíců popsali zlepšení maximální rychlosti pohybu myokardu a maximálního systolického strainu v infarktové oblasti, EF levé komory v buněčné skupině. Kontrolní skupina se nezlepšila, navíc u ní došlo k dilataci levé komory. Zlepšení kontraktivity a peruze myokardu u nemocných s akutním infarktem myokardu randomizovaných k aplikaci kmenových buněk kostní dřeně prokázali i další práce [72–73].

Ve studii TOPCARE-AMI (Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction) podali autoři [74–76] 59 nemocným 4. den po akutním infarktu myokardu (léčeném direktní angioplastikou) intrakoronárně do infarktové tepny infuzi kmenových buněk buď z kostní dřeně, nebo progenitorové buňky z periferní krve. Kmenové buňky z periferní krve byly před aplikací kultivovány a namnoženy za pomoci lidského rekombinantního VEGF (cévní endoteliální růstový faktor, vascular endothelial growth factor) a atorvastatinu na žádoucí množství. Za 1 rok po výkonu došlo ke zmenšení endsystolického objemu, zvýšení ejekční frakce levé komory z 50 % na 58 %, zlepšení regionální kontraktivity v oblasti infarktu myokardu, zvýšení koronární průtokové rezervy infarktové tepny a zvýšení viability myokardu v infarktové zóně oproti kontrolnímu souboru. Nebyl nalezen významný rozdíl mezi použitím kmenových buněk získaných z kostní dřeně a z periferní krve. Nezaznamenali žádné arytmie nebo jiné závažné nežádoucí účinky. Nebylo více restenóz než v populaci neléčené buňkami.

Na základě těchto nadějných výsledků byla v Německu zahájena velká multicentrická studie REPAIR-AMI [77], ve které bylo 204 nemocných s akutním infarktem myokardu a EF levé komory pod 45 % randomizováno k intrakoronárnímu podání infuze autologních progenitorových dřeňových buněk nebo placebo 3. až 6. den po infarktu. Za 4 měsíce došlo k výraznějšímu zvýšení ejekční frakce u nemocných s buněčnou léčbou. Tito nemocní měli navíc snížený kombinovaný endpoint mortality, reinfarktu a rehospitalizace pro srdeční selhání. Větší příznivý efekt aplikace buněk byl u nemocných s těžší dysfunkcí levé komory.

V jiné studii [78] byly podány intrakoronárně buňky kostní dřeně (s převahou CD 133+ bu-

ňek) 19 nemocným 11. den po infarktu myokardu. V léčené skupině se vyskytlo více restenóz v léčené skupině (9 nemocných z 19 léčených oproti 2 nemocným ze 16 v kontrolní skupině). Po 4 měsících došlo v buněčné skupině ke zvýšení ejekční frakce levé komory ze 45 % na 52 %, zmenšil se perfuzní defekt o 6 % a zlepšilo se vychytávání značené fluoro-deoxyglukózy v infarktovém ložisku při PET-vyšetření. V kontrolní skupině ke zlepšení nedošlo. Zvýšený nálezy in-stent-restenóz, respektive výraznější progresy aterosklerózy v jiných částech tepny po aplikaci kmenových buněk byl popsán ještě v několika dalších studiích [79–80], zatímco ve většině výše uvedených studií popsán nebyl.

V randomizované klinické studii BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) [81] bylo zahrnuto 60 nemocných s akutním infarktem myokardu. Pacienti randomizovaní k intrakoronární infuzi autologních dřeňových buněk měli po 6 měsících sledování zlepšenou ejekční frakci (o 6,7 % oproti 0,7 % v kontrolní skupině, $p < 0,01$) a zmenšený endsystolický objem levé komory. Změny byly podobné ve všech zkoumaných podskupinách. Příznivý efekt na celkovou funkci levé komory byl dán především zlepšením regionální kontraktivity v hraniční infarktové zóně. V léčené skupině nebyly žádné závažné nežádoucí účinky, včetně arytmií a in-stent-restenózy.

Velmi zajímavý design měla randomizovaná, dvojitě zaslepená slepá, placebem kontrolovaná studie Erbse et al [82] z Lipska. 26 nemocných s chronickou ICHS randomizovali po úspěšné revaskularizaci chronicky uzavřené tepny. Všichni nemocní byli 4 dny po randomizaci léčeni G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) k mobilizaci cirkulujících progenitorových buněk. Tyto byly následně izolovány z periferní krve, kultivovány a 10. den po revaskularizaci infuzně aplikovány do léčené tepny. Nemocní v kontrolní skupině, kteří dostali v infuzi pouze sérum, byli za 3 měsíce beze změn, zatímco u léčených nemocných došlo ke zlepšení mikrovaskulární (zvětšená koronární průtoková rezerva, zlepšená reakce na acetylcholin) i makrovaskulární funkce (menší velikost infarktového ložiska, zlepšení EF o 14 %, snížení počtu hibernovaných segmentů) myokardu levé komory srdeční. Mobilizované progenitorové buňky pomocí G-CSF transplantovali i ve studii [83] 6 nemocných s chronickou ICHS a ejekční frakcí LK pod 25 %. Buňky byly implantovány do srdce během bypassové operace. Nemocní udávali 4 měsíce po terapii zlepšení kvality života a zmírnění dušnosti a došlo i ke zlepšení objektivních parametrů při kontrolní echokardiografii, thaliové scintigrafii a pozitronové emisní tomografii.

V České republice byly implantovány mononukleární buňky kostní dřeně již na několika pracovištích a na dalších se podobné programy připravují. První publikovali úspěšně provedenou transplantaci dřevňových buněk Pěnička et al [84] z Kardiologické kliniky FN Královské Vinohrady ve spolupráci s Ústavem hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) v Praze. Grantový projekt zaměřený na tuto tematiku řeší v současné době pracoviště II. interní kliniky 1. LF UK a VFN Praha ve spolupráci s ÚHKT a FN Královské Vinohrady. Na pracovišti autorů byl program transplantace mononukleárních buněk kostní dřeně nemocným po akutním infarktu myokardu zahájen během podzimu 2003 ve spolupráci s Interní hematologickou klinikou FN Brno. Do konce října 2005 byly dřevňové buňky aplikovány 40 nemocným. Dle předběžných výsledků vedla léčba ke zlepšení regionální kontraktility myokardu a ke zmenšení perfuzního defektu [85–87].

Všechny publikované studie jsou limitované malým počtem pacientů a byly zaměřeny především na proveditelnost a bezpečnost metody. Přesto je nutno zdůraznit, že ve většině prací bylo zjištěno zlepšení srdeční funkce.

Podpora vlastní regenerace

Pouze minimální množství progenitorových buněk, které jsou za normálních okolností z kostní dřeně uvolněny do periferní krve, je součástí homeostatických procesů. U nemocných s akutním infarktem myokardu, množství cirkulujících mononukleárních buněk významně stoupá [88]. Důvodem je skutečnost, že tkáňová ischemie mobilizuje dřevňové buňky. Experimentálně bylo prokázáno, že při infarktu je koncentrace CD34+ buněk v periferní krvi nezávislým prediktorem zlepšení celkové i regionální funkce levé komory [89] a buňky původem z kostní dřeně byly nalezeny po infarktu v myokardu experimentálních zvířat [39]. Navíc u myši, které dostaly před infarktem myokardu intravenózně faktor stimulující granulocyty (G-CSF), byla prokázána zvýšená regenerace infarktového ložiska endogenními progenitorovými buňkami [37]. Při studování lidských transplantovaných srdcí bylo histologicky zjištěno, že kardiomyocyty s chromozomem Y mohou být nalezeny v ženském srdci transplantovaném mužskému příjemci [90–91]. Z toho se vyvozuje, že dřevňové buňky příjemce migrují do srdce, tam se usazují a mohou se diferencovat v kardiomyocyty. Bohužel, pravděpodobně jen velmi malé množství těchto kardiomyocytů je dřevňového původu (0,2–1,0 %). Z těchto údajů je zřejmé, že poškozené srdce je schopno jisté regenerace. Nicméně celý proces endogenní reparace je příliš slabý a nestačí adekvátně upravit veškerou ztrátu kardiomyocytů [92].

Případné použití cytokinů k indukci endogenní mobilizace kmenových buněk kostní dřeně do myokardu postiženého infarktem myokardu by bylo méně nebezpečné než použití neautologických buněk, a to jak z hlediska přenosu infekčního agens, tak z hlediska rejeckce implantovaných buněk. Proto byl zahájen výzkum faktorů, které by mohly napomáhat zvýšení množství CD34+ buněk v periferní krvi nebo jejich uchycení v myokardu, např. IL-8 (interleukin-8) [93–94], G-CSF, GM-CSF (granulocyte–monocyte colony stimulating factor) [95], SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), SCF-1 (stem cell factor 1) [96], PDGF (platelet-derived growth factor) [97], TGFβ (transforming growth factor beta) [98], HIV-1α (hypoxia-inducible factor 1α) [99], matrixová metaloproteináza, ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) [100], TNFα (tumor necrosis factor alpha) a mnoha dalších. Kromě těchto působků je popisován i mobilizační efekt např. chemoterapeutika cyklofosfamidu, statinů [101–102] nebo estrogeneru [103]. K mobilizaci angiogeneze jsou zkoumány například FGFs (fibroblast growth factors) [104–105], VEGF [106–108], IGF-1 (insulin-like factor 1) [109] nebo HGF (hepatocyte growth factor) [110–112]. Jsou zkoumány možnosti implantace buněk se zvýšenou schopností sekrece růstových faktorů nebo geneticky modulovaných buněk, které nesou angiogenetické růstové faktory. Tato modulace by mohla zlepšit přežití buněk, případná exprese cytokinů nebo růstových faktorů by mohla zvýšit parakrinní efekt implantovaných buněk [113–115].

Prakticky existují 2 možnosti indukce exprese žádoucí DNA v buňkách. Jednou je integrace terapeutické sekvence DNA do virových vektorů a jejich podání pacientovi. Druhou možností je přímé podání samotné DNA ve formě plazmidu. Od roku 1995 byla provedena řada studií testujících použitelnost a efekt plazmidové formy DNA kódujících ČI „kódující“ VEGF v léčbě kritické končetinové ischemie. V oblasti myokardiální genové terapie lze použít několik způsobů indukce angiogeneze. Virové vektory lze podat intrakoronárně nebo intramyokardiálně. Plazmidovou DNA je možno aplikovat přímo do myokardu. Doposud proběhlo také několik randomizovaných studií s myokardiální angiogenezí pomocí růstových faktorů podaných jako proteiny. Výsledky jsou spíše rozpačité a čeká se na další studie s genovým transferem, který umožňuje dlouhodobější expresi biologicky aktivních růstových faktorů [116].

G-CSF, SDF-1, SCF-1

V současné době je nejčastěji zkoumaným mediátorem granulocyty stimulující faktor (G-CSF). Jedná se o silný mobilizační faktor progenitorových buněk, který je produkován

monocyty, fibroblasty a endoteliálními buňkami. V experimentech na králících vedlo podání lidského G-CSF těsně po experimentálním infarktu myokardu k urychlení procesu hojení a regenerace myokardu. Levá komora byla méně dilatovaná, zvýšila se ejekční frakce a infarktová stěna nebyla ztenčena [117–118]. Mechanismem jeho působení je zřejmě snížení stromálního buněčného faktoru (SDF-1) a zvýšení množství jeho receptoru CXCR4 v kostní dřeni. SDF-1 se nachází ve stromálních buňkách kostní dřeně a je nezbytný k přežití, proliferaci a diferenciaci hematopoetických buněk v kostní dřeni. Předpokládá se, že dřevňové buňky jsou integrovány se stromatem. Právě koncentrační gradient SDF-1 přes endotel v kostní dřeni je hlavním mechanismem udržení kmenových buněk v kostní dřeni (homing). Fyziologicky je v kostní dřeni největší koncentrace tohoto cytokinu ve srovnání s ostatními tkáněmi [119]. Zvýšení koncentrace SDF-1 v srdci by měl způsobovat větší přesun progenitorových buněk do srdeční tkáně a její zvýšenou regeneraci [120–123]. V časně poinfarktové době nekrotický myokard secernuje SDF-1 [124–125]. Upregulace jeho sekrece stoupá těsně po vzniku infarktu a klesá za přibližně 7 dní. Nicméně tento proces není dostatečný k dostatečné regeneraci myokardu. Důvodem může být koncentrace faktoru v srdci, která ani při této upregulaci nedosahuje jeho koncentrace v kostní dřeni. V experimentu je proto zkoušeno i podání SDF-1 pomocí genové terapie přímo do postiženého myokardu [100,121] nebo užití kombinace G-CSF s SDF-1 [122].

V jiných experimentálních studiích bylo dosaženo zvýšené mobilizace progenitorových buněk kombinací G-CSF a SCF-1 [126–127] a na zvířatech bylo prokázáno snížení poinfarktové mortality a zlepšení srdeční funkce při využití této kombinace [118,128]. Myokard v místě infarktu vykazoval výraznou regeneraci a angiogenezi.

Na základě těchto experimentálních dat byly započaty malé, nerandomizované klinické studie exogenního podání angiogenetických faktorů nemocným trpícím ischemií myokardu a nevhodným k operační nebo intervenční léčbě. Tyto studie ukázaly bezpečnost a proveditelnost angiogenetické genové terapie v léčbě ischemické choroby srdeční [106–108,116, 129–131], ale zdaleka nevyřešili všechny otázky spojené s touto terapií, především dlouhodobý efekt léčby.

Studie navíc ukázaly možný příznivý vliv léčby. Například Kuethé et al [132] léčili 5 nemocných s G-CSF celkem 8 dní po úspěšně direktní angioplastice při akutním infarktu myokardu. Počet cirkulujících CD34+ byl největší 5. den. Za 3 měsíce se zlepšila EF ze 42 % na 51 %, regionální wall motion score kleslo z 13,5 na 9,9 a regionální perfuzní skóre

z 9,6 na 7,0. Neměli žádné závažné nežádoucí účinky. Podobné výsledky udávají i autoři studie Rigenera study [133]. Guterson et al [134] zase zařadili nemocné se srdečním selháním III.–IV. stupně dle NYHA. Pomocí G-CSF léčili 13 nemocných, u 9 z nich prokázali následné zlepšení stadia podle klasifikace NYHA a zvýšení zátěžové tolerance.

Do randomizované studie ROT FRONT je plánováno zařadit 20 nemocných s ICHS, funkční třídou II.–III. dle NYHA (New York Heart Association), EF < 40 % a neviabilním myokardem. Dosud byly publikovány předběžné výsledky 5 nemocných [135]. Z kontrolní skupiny zemřel 1 pacient náhlou smrtí 11. týden po zařazení. Ze 4 nemocných léčených G-CSF došlo během 6 měsíců sledování u 1 nemocného ke zlepšení klinického stavu, u 1 ke zhoršení a 2 zůstali stabilní. Na definitivní výsledky studie si budeme muset ještě počkat.

Seiler et al [95] zkoumali v randomizované, dvojitě zaslepené, placebem kontrolované studii vliv G-CSF na rozvoj kolaterál u 21 nemocných s těžkou ICHS nevhodnou ke konvenční revaskularizační léčbě. U nemocných léčených intrakoronární injekcí s následným 14denním podáváním G-SCF došlo ke statisticky významnému zlepšení kolaterálního průtoku.

Studie MAGIC [136] zkoumala účinek infuze autologních periferních progenitorových buněk mobilizovaných G-CSF u pacientů po PTCA. Bylo plánováno zařadit celkem 27 nemocných. Vyhodnoceno bylo prvních 10 pacientů, u kterých došlo k významnému zlepšení zátěžové kapacity, ejekční frakce a myokardiální perfuze za 6 měsíců ve srovnání s těmi, kteří dostali pouze G-CSF bez buněk a s kontrolami. Velkým problémem bylo ale neočekávaně vysoké množství in-stent-restenózy (70 %!), pro které byl zastaven nábor dalších pacientů. Autoři to vysvětlují tím, že progenitorové buňky mohou být přitáhnuty poškozeným endotelem a diferencovány do buněk hladkého svalstva pod vlivem lokálně působících cytokinů a dodávají, že by tento efekt mohl zřejmě být eliminován pomocí speciálních „anti-restenotických“ látek umístěných do potahovaného stentu.

Zatím největší studií s využitím G-CSF v léčbě nemocných s akutním infarktem myokardu je studie FIRSTLINE-AMI (The Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor) [137–138]. Všechny 50 nemocných mělo infarkt myokardu léčený primární koronární angioplastikou s implantací stentu a použitím abciximabu. Polovina byla navíc léčena 6denním subkutánním podáváním G-CSF. Tato terapie vedla k mobilizaci CD34+ mononukleárních buněk – došlo ke 20násobnému zvýše-

ní těchto buněk v periferní krvi. Za 4 a za 12 měsíců po léčbě došlo k výraznějším ztlušťování infarktové stěny levé komory, ejekční frakce levé komory se zvýšila z 48 % na 54 %, resp. 56 %, a na rozdíl od kontrolní skupiny nedošlo k dilataci levé komory. Tento pozitivní vliv na funkci a remodelaci levé komory nebyl doprovázen žádnými závažnými nežádoucími účinky, včetně případných restenóz.

VEGF

VEGF je zásadní regulátor fyziologické i patologické angiogeneze, ale napomáhá i mobilizaci endoteliálních progenitorových buněk z kostní dřeně [139]. Nejedná se o 1 protein, ale o „rodinu“ několika glykoproteinů, z nichž je nejčastěji zkoumán VEGF-1. Dále existují například VEGF-B, VEGF-2 (tj. VEGF-C), VEGF-D, PLGF (placental growth factor) a další.

V experimentech vedlo podání VEGF samotného, nebo aplikace skeletálních myoblastů geneticky upravených k expresi VEGF k rozvoji kolaterál a zlepšení perfuze i funkce myokardu [107,114,140]. Případně zavedení léčby VEGF do praxe je zatím limitováno několika nevyřešenými otázkami. V některých experimentech vedla zvýšená exprese VEGF ke vzniku intramurálních angiomů s vývojem srdečního selhání a smrti [108] nebo akceleraci tvorby aterosklerotického plátu [141]. Zvýšení plazmatické hladiny VEGF vede navíc ke strachu z rozvoje angiogeneze v případném okultním nádoru.

V klinických studiích fáze 1/2 se zkoumá především u nemocných s těžkou ischemickou chorobou srdeční s omezenými možnostmi konvenční revaskularizační léčby. Po jeho podání bylo prokázáno prodloužení doby zátěže při zátěžovém testu, zmírnění anginózních potíží a zlepšení perfuze a funkce levé komory [106,130–131]. Zkouší se podání intravenózní, intrakoronární nebo intramyokardiální peroperačně [129].

Losordo et al [116] v placebem kontrolované, dvojitě zaslepené studii u 19 nemocných s ICHS s anginou pectoris III.–IV. stupně CCS, bez možnosti revaskularizace srovnávali placebo s různými dávkami plazmidu kódujícího expresi VEGF-2 při podání pomocí katétru pro elektromechanického mapování. Po 1 roce sledování došlo u léčených nemocných ke zmírnění anginózních potíží (o 1,3 stupně CCS a menší počet záchvatů anginy pectoris), prodloužení tolerance zátěže o 91 sekund a zmenšení oblasti ischemie podle elektromechanického mapování. Nebyly zaznamenány žádné hemodynamické alterace stavu pacientů, závažné komorové arytmie, známky infarktu myokardu dle EKG ani perforace myokardu.

Zatím byly provedeny 3 větší klinické studie s VEGF s rozpornými výsledky. Euroinject One Trial [142–143] byla multicentrická, randomizovaná, placebem kontrolovaná, dvojitě zaslepená studie, do které bylo zařazeno 80 nemocných s chronickou ICHS, anginou pectoris III.–IV. stupně CCS. Pacienti dostali pomocí NOGA elektromechanické mapování buď placebo nebo plazmid kódující sekreci VEGF (VEGF-A165). Po 3 měsících sledování bylo zjištěno zlepšení regionální kontraktility v místě aplikace plazmidu a statisticky nevýznamný trend ke zmenšení perfuzního deficitu při SPECTu. Nežádoucí příhody byly v obou skupinách podobné.

Studie KAT byla randomizovaná, placebem kontrolovaná, dvojitě slepá studie KAT (Kuopio Angiogenesis Trial) [144]. Do této studie byla zařazeno 103 nemocných s ischemickou chorobou srdeční, anginou pectoris II.–III. stupně CCS, léčených PTCA (v 90 % s implantací stentu). Nemocní byli randomizováni k intrakoronárnímu podání VEGF pomocí adenovirového vektoru nebo VEGF plazmidu nebo Ringerova roztoku. Cílem studie bylo především potvrdit bezpečnost metody, což se autorům podařilo – po 6 měsících sledování měli u všech pacientů 6% riziko restenózy, jednotlivé skupiny se od sebe nelišily. Naopak, nemocní léčení adenovirovým vektorem měli významně zlepšenou perfuzi myokardu.

Podobné pacienty zahrnovala i studie VIVA [145]. Bylo do ní zařazeno celkem 178 nemocných s těžkou anginou pectoris a bez možnosti konvenční revaskularizace, kteří byli randomizováni k intrakoronárnímu podání velké nebo malé dávky VEGF nebo placeba. Prokázali, že metoda je bezpečná a u nemocných s vysokou dávkou faktoru došlo po 12 týdnech léčby k významnému zmírnění anginy pectoris a nevýznamnému prodloužení doby zátěže při zátěžovém testu na běhátku.

FGFs

Další skupina bílkovin, nazvaná společně jako růstový faktor fibroblastů, zahrnuje také několik různých proteinů, které především regulují angiogenezi, a tím mohou zlepšovat jak průtok krve ischemickou končetinou, tak myokardem, zvyšovat denzitu kapilár, a tím zlepšovat funkci srdeční [146–148]. FGF také napomáhá diferenciaci kmenových buněk v kardiomyocyty [149]. Podobně jako u VEGF, i preklinické studie s FGF přinesly slibné výsledky, ale klinické studie zatím přináší spíše rozpačité výsledky.

Zatím byly provedeno několik menších [150] a 3 středně velké klinické studie. Randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie AGENT (Angiogenetic GENE Therapy) [151] ukázala, že intrakoronární podání FGF-4 u 79 pacientů vedlo po 4 a po 12 týd-

nech ke zlepšení tolerance námahy, zlepšení výsledků zátěžového echokardiografického vyšetření a angiografickému průkazu neovaskularizace. Studie ale nebyla natolik silná, aby výsledky dosáhly statistické významnosti. Navíc není nic známo o dlouhodobém efektu léčby.

Studie AGENT 2 [152] zkoumala efekt intrakoronárního podání Ad5FGF-4 genu na myokardiální perfuzi u 52 nemocných se stabilní anginou pectoris. Studie byla randomizovaná, placebem kontrolovaná a dvojitě zaslepená. U léčených nemocných došlo po 8 týdnech ke zmenšení velikosti zátěžového reverzibilního perfuzního defektu (stress related reversible perfusion defect size – RPDS) o 21 % ve srovnání s placebovou skupinou, ale ani zde nebylo dosaženo statistické významnosti. Avšak při vynechání 1 nemocného, který se v placebové skupině nadprůměrně výrazně zlepšil zřejmě z důvodu chyby v medikaci před zátěžovým testem, vyšlo zlepšení statisticky významně. Léčba byla bez závažných nežádoucích účinků.

Zatím největší studií s využitím FGF byla randomizovaná multicentrická studie FIRST (FGF Initial Revascularization Trial) [153]. Celkem 337 nemocných bylo randomizováno k jednorázovému intrakoronárnímu podání různých dávek rekombinantního FGF-2. Léčba FGF vedla k nevýznamnému zmírnění anginních potíží a prodloužení doby zátěžového testu.

Další faktory

Studium dalších cytokinů zatím nepřesáhlo experimentální práce.

TNF α je velmi silný prozánětlivý cytokin, který je rychle vyplavován při ischemické příhodě. Data o jeho působení jsou rozporuplná. Zatímco overexprese tohoto faktoru vede k rozvoji fenotypu srdečního selhání a *TNF α* je podezírán z vlivu na zvětšení velikosti infarktu, anti-TNF-terapie nevedla k příznivým účinkům. Předpokládá se, že blokáda *TNF α* by zmenšila velikost infarktu pouze při její velmi časně realizaci. *TNF α* má i chemoatraktivní schopnosti, ale na kmenové buňky kostní dřene působí spíše antiproliferativně. Tedy případné použití *TNF α* by mohlo být užitečné při optimálním načasování, ale v opačném případě by mohlo situaci i zhoršit.

HGF je faktor objevený v souvislosti s regenerací jater, ale jeho působení není omezeno jen na játra, nýbrž účastní se dějů v nejrůznějších tkáních. Jedním z jeho účinků je spouštěcí proliferace buněk. Napomáhá i přežití kardiomyocytů za podmínek ischemie, snižuje apoptózu kardiomyocytů. Genové terapie s intramyokardiální aplikací *HGF* po infarktu vedla ke zvýšení angiogeneze a částečnému zachování myokardiální kontraktilní funkce. Je produkován i stromálními buňkami kostní

dřeně a napomáhá jejich adhezi, proliferaci a přežití. Jeho pomocný účinek v regeneraci myokardu kmenovými buňkami je dán zřejmě především jeho schopností vytvořit optimální mikroprostředí pro adhezi buněk.

HIF-1 α je nezbytný pro normální embryonální vývoj srdce. Terapeutické pokusy s využitím *HIF-1 α* jsou zaměřeny na indukci neoangiogeneze. Ve zvířecích experimentech významně zmenšuje velikost infarktů a zvyšuje denzitu kapilár v infarktovém ložisku. Kromě přímé účinku je také schopen aktivovat a sladit řadu dalších cytokinů [154].

Existuje záplava cytokinů a růstových faktorů, které hrají roli v buněčné regeneraci infarktového myokardu. První výsledky přináší naději na možnost příznivého ovlivnění těchto dějů, ale je třeba dalších studií k potvrzení těchto zatím předběžných výsledků a k nalezení nejúčinnějšího růstového faktoru, eventuálně kombinace různých faktorů, jejich ideální dávky a cesty podání.

Limitace a nezodpovězené otázky

Buněčná léčba se stává velkou nadějí pro miliony pacientů žijících se srdečním onemocněním. Přes veškeré naděje je nutno si uvědomit, že výzkum buněčné léčby je teprve na svém počátku, a že přetrvává stále velké množství otázek otevřeno. Ve většině studií došlo k neodiskutovatelnému zlepšení funkce myokardu, na druhé straně se v mnoha pracích nepodařilo prokázat výraznější uchycení implantovaných buněk v myokardu. Kromě zlepšení systolické funkce levé komory, je opakovaně prokázáno i zlepšení diastolické funkce, zlepšení perfuze myokardu, zvýšení denzity kapilár a zábrana remodelace levé komory. Není ale zatím shoda, jakým způsobem vede implantace dřevných buněk k těmto příznivým účinkům. Dle některých studií se jedná o transdiferenciaci buněk kostní dřene v příslušnou buněčnou linii. Na tuto možnost ukazuje řada studií, v nichž byly po implantaci buňky kostní dřene detekovány v hraniční zóně infarktu a byla na nich prokázána exprese srdečních nebo endoteliálních proteinů [35,37,39–43,155–160]. Nicméně existují jiné práce, které expresi markerů srdečních proteinů buď zcela popírají [161–164], nebo ji hodnotí ne jako efekt diferenciace, ale jako následek fúze mezi buňkou kostní dřene a sousední „hostitelskou“ buňkou s převzetím fenotypu okolní tkáň [156,165–168]. Dle jiných autorů dochází i k diferenciaci a zároveň i k fúzi buněk [169–170]. Není zcela zřejmý důvod rozdílných nálezů z různých laboratoří. Může to být dáno rozdílnou metodikou pokusů. Navíc je známo, že kvantifikace diferenciace buněk je výrazně závislá na použité technice. Na každý pád se jedná o problém, který bude nutno dále velmi intenzivně zkoumat. Ke zlepšení funkce myokardu jistě přispívá i novotvoře-

ní kapilár [171]. Další, velmi pravděpodobnou, možností je parakrinní efekt buněk [172–174]. Mononukleární buňky kostní dřene uvolňují angiogenní růstové faktory jako například VEGF, FGF a angiotensin. Lidské endoteliální progenitorové buňky zase produkují různé růstové faktory, které zlepšují přežití kardiomyocytů, zabraňují apoptóze a zintenzivňují angiogenezi [49]. Tak například při experimentech na primátech se zjistilo zlepšení regionální perfuze a funkce myokardu levé komory po implantaci dřevných značených buněk i za situace, kdy bylo v myokardu detekováno zcela minimální množství těchto implantovaných buněk. Autoři ale zjistili, že implantované buňky produkují již in vitro značné množství VEGF a po jejich implantaci do myokardu došlo ke zvýšení regionálních hladin VEGF [175]. Je tedy možné, že tento parakrinní efekt hraje výraznější roli v regeneraci myokardu než vlastní usídlení implantovaných buněk. Ale nejenom vlastní regenerace kontraktilní tkáně, ale i například zpevnění jizvy, zlepšení diastolické funkce, příznivé ovlivnění apoptózy a zábrana remodelace myokardu po infarktu mohou hrát důležitou roli ve zlepšení klinického stavu pacientů.

Dalším zásadním, dosud nevyřešeným, problémem zůstává otázka, které buňky nebo buněčné kombinace by měly být zkoumány a využívány. Kmenové a progenitorové buňky vykazují velkou „plasticitu“. Jsou velmi senzitivní vůči podmínkám, ve kterých se diferencují. I malá změna kultivačního média může vyústit v diferenciaci buněk v zásadně odlišnou buněčnou linii [171]. A neplatí to jen pro in vitro podmínky, ale i při in vivo aplikaci jsou pro osud kmenové buňky zcela zásadní její kontakty mezi okolními buňkami a vliv mikroprostředí. Zatím není konsenzus v tom, zda je lépe přímo využít neselektované buňky kostní dřene (resp. neselektované mononukleární buňky periferní krve) nebo vybrat pouze některou podskupinu buněk (například CD34+ nebo CD133+ buňky, nebo některé jiné) [177]. Další otázkou je, zda implantovat nediferencované nebo diferencované kmenové buňky. K transplantaci nediferencovaných buněk kostní dřene vede teorie diferenciace závislé na prostředí. Multipotentní buňka se v periferním orgánu diferencuje tak, aby se z ní stala buňka daného orgánu. Tedy v srdci se kmenová buňka může vyvinout do kardiomyocytu nebo endoteliální buňky, pokud se dostane do regenerujícího myokardu, ale také do fibroblastu, pokud se její vývoj děje v jizvě [178]. Nevýhodou může teoreticky být vznik arytmogenních ložisek v případě diferenciace v jiné buňky než kardiomyocyt. Velkým problémem je předpokládána absence příznivého účinku takového postupu, pokud jsou buňky implantovány do poškozeného myokardu, kde neprobíhají reparační procesy [39]. Další nevýhodou je „zbytečná“ implantace buněk,

kteří nejsou kmenové a regeneraci myokardu tedy nepomohou. Hledají se cesty, jak indikovat diferenciaci dřevných buněk *ex vivo* před jejich implantací pomocí nejrůznějších agens. V současné době je známo, že 5-azacytidine (5-aza) napomáhá transdiferenciaci myších buněk kostní dřevě v bijící myocyty [15,36, 38,179–180]. Dále se zkoumají například amfotericin-B, inzulin nebo dexametazone [181]. Buňky mohou být používány bez další manipulace, nebo mohou být geneticky modifikované ke zvýšené expresi terapeutických genů, například G-CSF nebo VEGF [182].

Kromě výše uvedených buněčných linií se v poslední době objevují i práce zkoumající využití mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně. Podle zatím předběžných experimentů lze předpokládat, že tyto buňky mají potenciál k diferenciaci v kardiomyocyty [179], resp. k podpoře angiogeneze produkcí řady cytokinů (např. VEGF, HGF, TGFβ) a působí též antiapoptoticky [183–184]. V pokusech se zvířaty byly kmenové buňky z tukové tkáně stejně účinné na regeneraci infarktového myokardu jako buňky kostní dřevě [185].

Významným otázkou zůstává i množství buněk, které je třeba implantovat, např. do infarktového ložiska, aby došlo k účinné a pokud možno kompletní regeneraci poškozené tkáně. Dosavadní klinické studie se liší řádově v počtu implantovaných buněk ($1,5 \times 10^6$ – $1,0 \times 10^9$) a stále není jasné, jaké množství buněk je skutečně optimální [55,57,58,62,64,65, 74]. A v žádné z těchto studií nedošlo k úplné regeneraci poškozené tkáně. Pravděpodobně je třeba přizpůsobit počet implantovaných buněk stupni a rozsahu poškození myokardu a počty buněk použitých v dosavadních studiích jsou nedostatečné. Normálně velká levá komora dospělého člověka obsahuje přibližně $5,5 \times 10^9$ myocytů [186]. Dle rozsahu infarktového ložiska tento počet buněk klesá, je nahrazen jizvou. Při odhadu ideálního počtu kmenových buněk potřebných k regeneraci tohoto ložiska je ovšem zapotřebí vzít v úvahu též nejistotu stran skutečného množství kmenových buněk mezi odseparovanými mononukleárními dřevnými buňkami, jejich ztráty během aplikace, migraci buněk do jiných orgánů po transplantaci a jejich případnou diferenciaci v jiný druh buněk. Optimální počet implantovaných buněk tedy zůstává stále velkým problémem a je zapotřebí ještě mnoha klinických dat k jeho vyřešení [187]. Navíc je některými autory popírána závislost efektu buněčné léčby na počtu implantovaných buněk a jako nejdůležitější faktor úspěchu transplantace je zdůrazňována funkční kapacita buněk hodnocená pomocí migrační aktivity [75].

Je zřejmé, že je třeba lépe definovat cílovou populaci pro buněčnou léčbu, která může mít

z terapie největší prospěch, stanovit přesná vstupní a vylučovací kritéria, optimální odstup implantace buněk od proběhlého infarktu myokardu, nejlepší cestu implantace, počet buněk a samozřejmě ideální druh buněk. Je třeba si také uvědomit heterogenitu srdečních onemocnění. Je dost dobře možné, že se v budoucnosti bude výběr buněk lišit podle druhu srdečního postižení. V případě chronické ischemie by byly léčbou volby buňky s potenciálem především angiogenetickým (tedy především různé buněčné populace získané z kostní dřevě nebo periferní krve), zatímco v případě těžkého srdečního selhání by se vybraly spíše buňky s potenciálem obnovy kontraktilní funkce (například skeletální myoblasty). Zároveň je třeba hlouběji poznat kmenové a progenitorové buňky, popsat jejich charakteristiky a následně provést experimentální porovnání účinků jednotlivých subpopulací buněk.

Dalším nevyřešeným problémem je optimální způsob aplikace buněk. Intravenózní infuze buněk je velice jednoduchá a bezpečná metoda. Jejím omezením je zcela nedostatečný přísun buněk do cílového orgánu. Využití této aplikační cesty ve výzkumu je proto spíše ojedinelé. Naproti tomu chirurgická peroperační aplikace zřejmě není ideální kvůli velké zátěži pro pacienta. Výjimkou by mohla být transplantace kmenových buněk doprovázející jinou, např. revaskularizační operaci. Intenzivně jsou zkoumány možnosti intramyokardiální aplikace vedené za pomoci elektromechanického mapování, ale zřejmě největší naděje jsou vkládány do intrakoronárního podání buněk, které i přes poměrnou jednoduchost zajišťuje relativně vysokou koncentraci aplikovaných buněk v místě žádoucího působení a je zřejmě nejúčinnější [188]. Další možností je podání buněk do koronární vény.

U pacientů s akutním infarktem myokardu se hledá optimální načasování transplantace. Ve zvířecích experimentech bylo prokázáno, že většina buněk implantovaných velmi časně do infarktové zóny nepřežije několik prvních dnů (přežití kolem 4 dnů), nezmění velikost jizvy a ani nezlepší funkci levé komory. Příčinou je nejspíše akutní zánětlivá reakce na akutní infarkt. Implantace kmenových buněk v této době není úspěšná, protože se implantované buňky pravděpodobně změní na zánětlivé buňky. Na druhou stranu se předpokládá, že efekt transplantace buněk by měl být vyšší, pokud dojde k implantaci dříve než se vytvoří definitivní jizva. Je zřejmé, že implantované buňky jsou senzitivní vůči svému okolí a jeho signálům. Zatímco při akutním infarktu jsou aktivovány cytokiny a růstové faktory, které směřují cirkulující progenitorové buňky do myokardu a napomáhají tam jejich usídlení a přeměně na svalové nebo cévní buňky, v době již vytvořené jizvy je velké riziko přeměny implantovaných buněk ve fibroblasty [189]. Opti-

mální čas implantace buněk u nemocných s akutním infarktem myokardu by se tedy měl nacházet v době po odeznění zánětlivé reakce, ale ještě před vytvořením jizvy, tedy přibližně mezi 4. dnem a koncem 2. týdne.

Je paradoxem, že přes poměrně velký počet experimentálních a klinických studií (více než 1 600 prací) je stále málo výsledků „definitivních“. V experimentu bylo zkoušeno více než 10 různých buněčných typů, které byly podány více než 5 různými způsoby, více než 6 různým modelům akutního nebo chronického poškození myokardu, a to více než 8 různým živočišným rodům [190]. Velkou výjimkou jsou práce srovnávající různé buněčné linie mezi sebou. Díky jim víme, že skeletální myoblasty jsou k úpravě systolické a diastolické funkce vhodnější než fibroblasty [3,191] a stejně dobré nebo o něco lepší než buňky kostní dřevě [192–194]. Jiná srovnání nejsou k dispozici. Výjimečné jsou i práce studující kombinaci buněk, například současné podání skeletálních myoblastů a mezenchymálních buněk kostní dřevě [193, 195, 196].

Výše uvedené nevyřešené otázky se týkají buněčné léčby ve snaze regenerovat nefunkční myokard, a tím zmírnit symptomy srdečního selhání. V poslední době se ale objevují práce využívající buněčné léčby i u odlišných diagnóz. Například vědecký tým v Paříži zkouší implantaci mononukleárních buněk kostní dřevě do akinetické zadní stěny levé komory u nemocných s těžkou postischemickou mitrální regurgitací během operace mitrální chlopně [197].

Mocini et al z Říma [198] se zase pokoušejí pomocí genové a buněčné terapie vyrobit „biologický pacemaker“. Tyto směry využití buněčné léčby jsou však na samém počátku výzkumu a na větší data si budeme muset ještě počkat.

Závěr

Ačkoliv biologický mechanismus účinku buněčné léčby na regeneraci myokardu zůstává nevyjasněný, na základě prvních klinických výsledků je zřejmé, že tato léčba je velkým příslibem pro léčbu kardiovaskulárních onemocnění. Prvotní výsledky klinických studií jsou fascinující a nadějně a znamenají oprávnění k zahájení velkých, randomizovaných, slepých studií buněčné léčby v kardiologii s cílem nalézt optimální léčebný postup.

Práce byla podpořena Výzkumným záměrem MSM 0021622402.

Literatura

1. Al Attar N, Carrion C, Ghostine S et al. Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovasc Res* 2003; 58: 142–148.

2. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *Allergy Clin Immunol* 2003; 111(2, Suppl): 745–753.
3. Hutcheson KA, Atkins BZ, Hueman MT et al. Comparison of benefits on myocardial performance of cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and fibroblasts. *Cell Transplant* 2000; 9: 359–368.
4. Kim WG, Park JJ, Chung DH, Na CY. Autologous cardiomyocyte transplantation in an ovine myocardial infarction model. *Int J Artif Org* 2002; 25: 61–66.
5. Scorsin M, Hagège A, Vilquin JT et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocytes and skeletal myoblasts transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 119: 1169–1175.
6. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD et al. Autologous smooth muscle cell transplantation improved heart function in dilated cardiomyopathy. *Ann Thorac Surg* 2000; 70: 859–865.
7. Yoo KJ, Li RK, Weisel RD et al. Smooth muscle cells transplantation is better than heart cells transplantation for improvement of heart function in dilated cardiomyopathy. *Yonsei Med J* 2002; 43: 296–303.
8. Menasché P, Hagège AA, Scorsin M et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279–280.
9. Horackova M, Arora R, Chen R et al. Cell transplantation for treatment of acute myocardial infarction: unique capacity for repair by skeletal muscle satellite cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(4): 1599–1608.
10. Chiu RCJ, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995; 60: 12–18.
11. Murry CE, Wiseman RW, Schwartz SM et al. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; 98(11): 2512–2523.
12. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4(8): 929–933.
13. Tambara K, Sakakibara Y, Sakaguchi G et al. Transplanted skeletal myoblasts can fully replace the infarcted myocardium when they survive in the host in large numbers. *Circulation* 2003; 108(suppl 1): 259–263.
14. Van den Bos EJ, Wagner A, Mahrholdt H et al. Improved efficacy of stem cell labeling for magnetic resonance imaging studies by the use of cationic liposomes. *Cell Transplant* 2003; 12(7): 743–56.
15. Heng BC, Haider HK, Sim EK et al. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the cardiomyogenic lineage in vitro. *Cardiovasc Res* 2004; 62(1): 34–42.
16. Reinecke H, Murry CE. Transmural replacement of myocardium after skeletal myoblast grafting into the heart. Too much of a good thing? *Cardiovasc Pathol* 2000; 9: 337–344.
17. Menasché P. Skeletal myoblast for cell therapy. *Coronary Artery Disease* 2005; 16(2): 105–110.
18. Menasché P, Hagège AA, Vilquin JT et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe post-infarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078–1083.
19. Herreros J, Prósper F, Perez A et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003; 24: 2012–2020.
20. Zhang FM, Yang Z, Chen Y et al. Clinical cellular cardiomyoplasty: Technical considerations. *J Card Surg* 2003; 18: 268–273.
21. Kao RL, Zhang F, Yiang ZJ et al. Cellular cardiomyoplasty using autologous satellite cells: from experimental to clinical study. *Basic Appl Myol* 2003; 13: 23–28.
22. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004; 148(3): 531–537.
23. Siminiak T, Kalawski R, Jerzykowska O et al. Transplantation of autologous skeletal myoblasts during CABG for myocardial regeneration. Three years follow-up. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 201.
24. Siminiak T, Fiszer D, Jerzykowska O et al. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: The POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005; 26(12): 1188–1195.
25. Pagni F, DerSimonian R, Zawadzka A et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia damaged myocardium in humans. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 879–888.
26. Dib N, Michler RE, Pagni FD et al. Safety and Feasibility of Autologous Myoblast Transplantation in Patients With Ischemic Cardiomyopathy: Four-Year Follow-Up. *Circulation* 2005; 112: 1748–1755.
27. Smits PC, van Geuns RJM, Poldermans D et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 2063–2069.
28. Ince H, Petzsch M, Renders TC et al. Transcatheter transplantation of autologous skeletal myoblasts in postinfarction patients with severe left ventricular dysfunction. *J Endovasc Ther* 2004; 11: 695–704.
29. Haider HK, Tan ACK, Aziz S et al. Myoblast transplantation for cardiac repair: a clinical perspective. *Molecular Therapy* 2004; 9(1): 14–23.
30. Roselle Abraham M, Henrikson CA, Tung L et al. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblasts for cardiac transplantation. *Circ Res* 2005; 97: 159–167.
31. Brehm M, Zeus T, Strauer BE. Stem cells – clinical application and perspectives. *Herz* 2002; 27: 611–620.
32. Haider HK, Ashraf M. Bone marrow stem cells in the infarcted heart. *Coronary Artery Disease* 2005; 16(2): 99–103.
33. Kucia M, Dawn B, Hunt G et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95(12): 1191–1199.
34. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90: 5002–5012.
35. Condorelli G, Borello U, De Angelis L et al. Cardiomyocytes induce endothelial cells to trans-differentiate into cardiac muscle: implications for myocardium regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(19): 10733–10738.
36. Tomita S, Li RK, Weisel RD et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100(Suppl II): 247–256.
37. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701–705.
38. Bittira B, Kuang JQ, Al Khaldi A et al. In vitro preprogramming of marrow stromal cells for myocardial regeneration. *Ann Thorac Surg* 2002; 74: 1154–1159.
39. Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001; 107: 1395–1402.
40. 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: 93–98.
41. Davani S, Marandin A, Mersin N et al. Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 2003; 108(suppl II): 253–258.
42. Chedrawy EG, Wang JS, Hguyen DM et al. Incorporation and integration of implanted myogenic and stem cells into native myocardial fibres: Anatomic basis for functional improvements. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 2002; 124: 584–590.
43. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7(4): 430–436.
44. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001; 105: 829–841.
45. Goodell MA, Jackson KA, Majka SM et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 938: 208–218.
46. Krause DS, Thiese ND, Collector MI et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369–377.
47. Hamano K, Li TS, Kobayashi T et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1210–1215.
48. Schwartz Y, Kornowski R. Progenitor and embryonic stem cell transplantation for myocardial angiogenesis and functional and functional restoration. *Eur Heart J* 2003; 24: 404–411.
49. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T et al. Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1804–1810.
50. Sakai T, Li RK, Weisel RD et al. Autologous heart cell transplantation improves cardiac function after myocardial injury. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1074–1081.
51. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 123: 1132–1140.
52. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634–637.
53. Fuchs S, Baffour R, Zhou Y et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37: 1726–1732.
54. Stern DM, Hess DC, Borlongan CV. Healing a broken heart with stem cells. *Cell Transplantation* 2004; 13(7–8): 725–727.
55. Hamano K, Nishida M, Hirata K et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease. Clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ J* 2001; 65: 845–847.
56. Fuchs S, Sattler LF, Kornowski R et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease. A feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(10): 1721–1724.
57. Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplan-

- tation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294–2302.
58. Silva SA, Dohmann HFR, Perin EC et al. Immediate and short-term safety of catheter-based autologous bone marrow mononuclear cell implantation in patients with severe ischaemic heart failure. *Eur J Heart Failure* 2003; Suppl 2(1): 137–138 (abstr).
59. Perin EC, Dohmann HFR, Borojevic R et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110(Suppl II): 213–218.
60. Tse HF, Kwong YL, Chan JKF et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47–49.
61. Beeres SLMA, Zeppenfeld K, Bax JJ et al. Intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells in no-option patients with chronic ischaemia is safe, increase quality of life and improves left ventricular ejection fraction. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 663 (abstr).
62. Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45–46.
63. Galiñanes M, Loubani M, Davies J et al. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant* 2004; 13: 7–13.
64. Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Intracoronare, humane autologe Stammzelltransplantation zur Myokardregeneration nach Herzinfarkt. *Dtsch Med Wschr* 2001; 126: 932–938.
65. Strauer BE, Brehm M, Zeus T et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913–1918.
66. Brehm M, Zeus T, Strauer BE. Stem cells – clinical application and perspectives. *Herz* 2002; 27: 611–620.
67. Koesterling M, Brehm M, Zeus T et al. Regeneration of heart function in chronic coronary heart disease with chronic myocardial infarction: controlled study with intracoronary autologous mononuclear bone marrow cell transplantation. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 532 (abstr).
68. Brehm M, Koesterling M, Zeus T et al. Improvement of heart function in chronic coronary heart disease with chronic myocardial infarction: controlled study with intracoronary autologous mononuclear bone marrow cell transplantation (IACT-study). *Circulation* 2005; 111(13): 1721.
69. Chen SL, Fang WW, Ye F et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94: 82–95.
70. Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cell after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95: 742–748.
71. Ruan W, Pan CZ, Huang GQ et al. Assessment of left ventricular segmental function after autologous bone marrow stem cells transplantation in patients with acute myocardial infarction by tissue tracking and strain imaging. *Chin Med J* 2005; 118(14): 1175–1181.
72. Grajek S, Popiel M, Breborowicz P et al. Improvement of left ventricle function (LVP) in patients with AMi after infusion of bone marrow stem cells (BMSC). *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 318 (abstr).
73. Vanderheyden M, Mansour S, Vandekerckhove B et al. Intracoronary injection of enriched CD133+ bone marrow cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 686 (abstr).
74. Assmus B, Schächinger V, Teupe C et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009–3017.
75. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): Mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *Circulation* 2003; 108(18): 2212–2218.
76. Schächinger V, Assmus B, Britten MB et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction. Final one-year results of the TOPCARE-AMI trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690–1699.
77. Schächinger V et al. REPAIR-AMI: Reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodelling in acute myocardial infarction. *AHA Scientific Sessions*, Dallas, 13.–16. 11. 2005. (abstr).
78. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B et al. Intracoronary Injection of CD133-Positive Enriched Bone Marrow Progenitor Cells Promotes Cardiac Recovery After Recent Myocardial Infarction: Feasibility and Safety. *Circulation* 2005; 112(Suppl I): 178–183.
79. Mansour S, Vanderheyden M, Wijns W et al. Effects of intracoronary administration of enriched haematopoietic bone marrow stem cells on in-stent restenosis & progression of coronary atherosclerosis in patients with recent myocardial infarction. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 122 (abstr).
80. Sanz R, Villa A, Pena G et al. Rate of in-stent restenosis is low in acute myocardial infarction after intracoronary bone marrow stem cells transplantation. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl.): 152 (abstr).
81. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 141–148.
82. Erbs S, Linke A, Adams V et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion. First randomized and placebo-controlled study. *Circ Res* 2005; 97: 756–762.
83. Ozbaran M, Omay SB, Nalbantgil S et al. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 342–350.
84. Pěnička M, Widimský P, Kobylka P et al. Transplantace autologních kmenových buněk kostní dřeně po akutním infarktu myokardu, způsobeném uzávěrem kmene levé věnčité tepny. *Cor Vasa* 2003; 45(9): 465–468.
85. Meluzin J, Groch L, Janoušek S et al. Autologous transplantation of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. The effect of the number of transplanted cells on the reduction of infarct size. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 220 (abstr).
86. Meluzin J, Mayer J, Groch L et al. Autologní transplantace dřevňových buněk u nemocných s akutním infarktem myokardu. *Cor Vasa* 2004; 46(8): 384–388.
87. Kaminek M, Meluzin J, Groch L et al. Úprava infarktového ložiska autologní transplantací mononukleárních buněk kostní dřeně: role kvantitativního Tc-99m-MIBI SPECT a F-18-FDG PET při monitorování léčby. *Cor Vasa* 2005; 47(5): 203–207.
88. Shintani S, Murohara T, Ikeda H et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776–2779.
89. Leone AM, Rutella S, Bonanno G et al. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function. *Eur Heart J* 2005; 26(12): 1196–204.
90. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE et al. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts *Circ Res* 2002; 90: 634–640.
91. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346(1): 5–15.
92. Haider HK, Ashraf M. Bone marrow stem cells in the infarcted heart. *Coron Artery Dis* 2005; 16(2): 99–103.
93. Laterveer L, Lindley IJ, Hamilton MS et al. Interleukin-8 induces rapid mobilization of hematopoietic stem cells with radioprotective capacity and long-term myelolymphoid repopulating ability. *Blood* 1995; 85: 2269–2275.
94. He T, Peterson TE, Katusic ZS. Paracrine mitogenic effect of human endothelial progenitor cells: Role of interleukin-8. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: 968–972.
95. Seiler C, Pohl T, Wustmann K et al. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony stimulating factor in patients with coronary artery disease. A randomized, double blind, placebo-controlled study. *Circulation* 2001; 104: 2012–2017.
96. Edwards RG. Stem cells today: B1. Bone marrow stem cells. *Reproductive Biomedicine Online* 2004; 9(5): 541–583.
97. Li X, Tjwa M, Moons L et al. Revascularization of ischemic tissues by PDGF-CC via effects on endothelial cells and their progenitors. *J Clin Invest* 2005; 115(1): 118–127.
98. Li TS, Hayashi M, Ito H et al. Regeneration of infarcted myocardium by intramyocardial implantation of ex vivo transforming growth factor- β -preprogrammed bone marrow stem cells. *Circulation* 2005; 111(19): 2438–2445.
99. Azarnoush K, Maurel A, Sebbah L et al. Enhancement of the functional benefits of skeletal myoblast transplantation by means of coadministration of hypoxia-inducible factor 1 α . *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130(1): 173–179.
100. Abbott JD, Huang Y, Liu D et al. Stromal cell-derived factor-1 α plays a critical role in stem cell recruitment to the heart after myocardial infarction but is not sufficient to induce homing in the absence of injury. *Circulation* 2004; 110(21): 3300–3305.
101. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885–2890.
102. Llevadot J, Murasawa S, Kureischi Y et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 399–405.
103. Strehlow K, Werner N, Berweiler J et al. Estrogen increases bone-marrow derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation* 2003; 107: 3059–3065.
104. Magnusson PU, Ronca R, Dell'Era P et al. Fibroblast growth factor receptor-1 expression is required for hematopoietic but not endothelial cell development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(5): 944–949.
105. Leong-Poi H, Christiansen J, Heppner P et al. Assessment of endogenous and therapeutic arteriogenesis by contrast ultrasound molecular imaging of integrin expression. *Circulation* 2005; 111(24): 3248–3254.

106. Losordo DW, Vale PR, Symes JF et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis. Initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800–2804.
107. Tio RA, Tkebuchava T, Scheuermann TH et al. Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium. *Hum Gene Ther* 1999; 10: 2953–2960.
108. Lee RJ, Springer ML, Blanco-Bose WE et al. VEGF gene delivery to the myocardium. Deleterious effect of upregulated expression. *Circulation* 2000; 102: 898–901.
109. Linke A, Muller P, Nurzynska D et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(25): 8966–8971.
110. Miyagawa S, Sawa Y, Taketani S et al. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation* 2002; 105: 2556–2561.
111. Kondo I, Ohmori K, Oshita A et al. Treatment of acute myocardial infarction by hepatocyte growth factor gene transfer. The first demonstration of myocardial transfer of a functional gene using ultrasonic microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 644–653.
112. Tambara K, Premaratne GU, Sakaguchi G et al. Administration of control-released hepatocyte growth factor enhances the efficacy of skeletal myoblast transplantation in rat infarcted hearts by greatly increasing both quantity and quality of the graft. *Circulation* 2005; 112(Suppl 1): 129–134.
113. Sakai T, Ling Y, Payne TR, Huard J. The use of ex vivo gene transfer based on muscle-derived stem cells for cardiovascular medicine. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 115–120.
114. Suzuki K, Murtuza B, Smolenski RT et al. Cell transplantation for the treatment of acute myocardial infarction using vascular endothelial growth factor-expressing skeletal myoblasts. *Circulation* 2001; 104(Suppl 1): 207–212.
115. Yau TM, Fung K, Weisel RD et al. Enhanced myocardial angiogenesis by gene transfer with transplanted cells. *Circulation* 2001; 104(Suppl 1): 218–222.
116. 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: 1012–2018.
117. Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by post infarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation* 2004; 109: 2572–2580.
118. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(18): 10344–10349.
119. Hattori K, Heissig B, Tashiro K et al. Plasma elevation of stromal-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001; 97: 3354–3360.
120. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing BM SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat Immunol* 2002; 3: 687–694.
121. Tang YL, Qian K, Zhang YC et al. Mobilizing of haematopoietic stem cells to ischemic myocardium by plasmid mediated stromal-cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) treatment. *Regul Pept* 2005; 125: 1–8.
122. Askari A, Unzek S, Popovic ZB et al. Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy. *Lancet* 2003; 362: 697–703.
123. Jo DY, Hwang JH, Kim JM et al. Human bone marrow endothelial cells elaborate non-stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1)-dependent chemoattraction and SDF-1-dependent transmigration of haematopoietic progenitors. *Br J Haematol* 2003; 121(4): 649–652.
124. Pillarisetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation* 2001; 25(5): 293–300.
125. Ma J, Ge J, Zhang S et al. Time course of myocardial stromal cell-derived factor 1 expression and beneficial effects of intravenously administered bone marrow stem cells in rats with experimental myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 2005; 100(3): 217–223.
126. Yan W-Q, Briddell R, Hartley C et al. Mobilization of long-term hematopoietic reconstituting cells in mice by the combination of stem cell factor plus granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1994; 84: 795–799.
127. Sesti C, Hale SL, Lutzko C, Kloner RA. Granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor improve contractile reserve of the infarcted left ventricle independent of restoring muscle mass. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(9): 1662–1669.
128. Norol F, Merlet P, Isnard R et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a non-human primate model. *Blood* 2003; 102: 4361–4368.
129. Rosengart TK, Lee LY, Patel SR et al. Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. *Circulation* 1999; 100: 468–474.
130. Symes JF, Losordo DW, Vale PR et al. Gene therapy with vascular endothelial growth factor for inoperable coronary artery disease. *Ann Thor Surg* 1999; 68: 830–837.
131. Vale PR, Losordo DW, Milliken CE et al. Randomized, single-blind, placebo-controlled pilot study of catheter-based myocardial gene transfer for therapeutic angiogenesis using left ventricular electromechanical mapping in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 2138–2143.
132. Kuethe F, Figulla HR, Voth M et al. Mobilisation von Stammzellen durch den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor zur Regeneration myokardialen Gewebes nach Herzinfarkt. *Dtsch Med Wochenschr* 2004; 129: 424–428.
133. Leone AM, Garramone B, Giannico MB et al. Safety and potential efficacy of granulocyte-colony stimulating factor in the acute myocardial infarction (the Rigena study). *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl.): 531 (abstr).
134. Gutersohn A, Duehrseln U, Huettmann A et al. Stem cell therapy increases exercise tolerance in patients with heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 319 (abstr).
135. Belenkov IuN, Ageev FT, Mareev Vlu et al. Mobilization of bone marrow stem cells in the management of patients with heart failure: protocol and first results of ROT FRONT trial. *Kardiologia* 2003; 43: 7–12.
136. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751–756.
137. Ince H, Petzsch M, Kleine DH et al. Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005; 112: 3097–3106.
138. Ince H, Petzsch M, Kleine DH et al. Prevention of Left Ventricular Remodeling With Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Acute Myocardial Infarction: Final 1-year Results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial. *Circulation* 2005; 112(Suppl 1): 73–80.
139. Yoon YS, Johnson IA, Park JS et al. Therapeutic myocardial angiogenesis with vascular endothelial growth factors. *Mol Cell Biochem* 2004; 264: 63–74.
140. Askari A, Unzek S, Goldman CK et al. Cellular, but not direct, adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor results in improved left ventricular function and neovascularization in dilated ischemic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(10): 1908–1914.
141. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG et al. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001; 7: 425–429.
142. Gyöngyösi M, Khorsand A, Zamini S et al. NO-GA-guided analysis of regional myocardial perfusion abnormalities treated with intramyocardial injections of plasmid encoding vascular endothelial growth factor A-165 in patients with chronic myocardial ischemia: subanalysis of the EUROINJECT-ONE multicenter double-blind randomized study. *Circulation* 2005; 112(Suppl 1): 157–165.
143. Kastrup J, Jørgensen E, Rück A et al. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris: A randomized double-blind placebo-controlled study: The Euroinject One Trial. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45(7): 982–988.
144. Hedman M, Hartikainen J, Syvanne M et al. Safety and feasibility of catheter-based local intracoronary vascular endothelial growth factor gene transfer in the prevention of postangioplasty and in-stent restenosis and in the treatment of chronic myocardial ischemia: phase II results of the Kuopio angiogenesis trial (KAT). *Circulation* 2003; 107: 2677–2683.
145. Henry TD, Annex BH, McKendall GR et al. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in ischemia or vascular angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359–1365.
146. Giordano FJ, Ping P, McKirnan MD et al. Intracoronary gene transfer of fibroblast growth factor-5 increases blood flow and contractile function in ischemic region of the heart. *Nat Med* 1996; 2: 534–539.
147. Ueno H, Li JJ, Masuda S et al. Adenovirus-mediated expression of secreted form of basic fibroblast growth factor (FGF-2) induces cellular proliferation and angiogenesis in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2453–2460.
148. Nakajima H, Sakakibara Y, Tambara K et al. Therapeutic angiogenesis by the controlled release of basic fibroblast growth factor for ischemic limb and heart injury: toward safety and minimal invasiveness. *J Artif Organs* 2004; 7: 58–61.
149. Rosenblatt-Velin N, Lepore MG, Cartoni C et al. FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2005; 115(7): 1724–1733.
150. Laham RJ, Sellke FW, Edelman ER et al. Local perivascular delivery of basic fibroblast growth factor in patients undergoing coronary bypass surgery: results of phase I randomized double blind, placebo-controlled trial. *Circulation* 1999; 100: 1865–1871.

151. Grines CL, Watkins MW, Helmer G et al. Angiogenic gene therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002; 105: 1291–1297.
152. Grines CL, Watkins MW, Mahmarian J et al. A randomized double-blind placebo controlled trial of Ad5FGF-4 gene therapy and its effect on myocardial perfusion in patients with stable angina. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 1339–1347.
153. Simons M, Annex BH, Laham RJ et al. Pharmacological treatment of coronary artery disease with recombinant fibroblast growth factor-2: double-blind, randomized, controlled clinical trial. *Circulation* 2002; 105: 788–793.
154. Vandervelde S, Van Luyn MJA, Tio RA, Harmsen MC. Signaling factors in stem cell-mediated repair of infarcted myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39(2): 363–376.
155. Yeh ETH, Zhang S, Wu HD et al. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+ – enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 2003; 108: 2070–2073.
156. Xu W, Zhang X, Qian H et al. Mesenchymal stem cells from adult human bone marrow differentiate into a cardiomyocyte phenotype in vitro. *Exp Biol Med* 2004; 229: 623–631.
157. Kim YH. Intramyocardial transplantation of circulating CD34+ cells: source of stem cells for myocardial regeneration. *J Korean Med Sci* 2003; 18(6): 797–803.
158. Shim WS, Jiang S, Wong P et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324(2): 481–8.
159. Piao H, Youn TJ, Kwon JS et al. Effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation in acutely infarcting myocardium. *Eur J Heart Failure* 2005; 7(5): 730–738.
160. Murasawa S, Kawamoto A, Horii M et al. Niche-dependent translineage commitment of endothelial progenitor cells, not cell fusion in general, into myocardial lineage cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(7): 1388–1394.
161. Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256–2259.
162. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664–668.
163. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004; 428: 668–673.
164. Limbourg FP, Ringes-Lichtenberg S, Schaefer A et al. Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment. *Eur J Heart Failure* 2005; 7(5): 722–729.
165. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545–548.
166. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425: 968–973.
167. Shi D, Reinecke H, Murry CE, Torok-Storb B. Myogenic fusion of human bone marrow stromal cells, but not hematopoietic cells. *Blood* 2004; 104(1): 290–294.
168. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; 10: 494–501.
169. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100(21): 12313–12318.
170. Zhang S, Wang D, Estrov Z et al. Both cell fusion and transdifferentiation account for the transformation of human peripheral blood CD34-positive cells into cardiomyocytes in vivo. *Circulation* 2004; 110(25): 3803–3807.
171. Asahara T, Murohara T, Sullivan A et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–967.
172. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 2002; 16: 1558–1566.
173. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into adult growing vasculature. *Circ res* 2004; 94: 230–238.
174. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res* 2004; 94: 573–574.
175. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 2005; 23(3): 355–364.
176. Fukuhara S, Tomita S, Yamashiro S et al. Direct cell–cell interaction of cardiomyocytes is key for bone marrow stromal cells to go into cardiac lineage in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 125: 1470–1480.
177. Lindsay AC, Halcox JP. Stem cells as future therapy in cardiology. *Hospital Medicine* 2005; 66(4): 215–220.
178. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E et al. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiological and therapeutic implication. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 699–705.
179. Rangappa A, Fen C, Lee EH et al. Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 775–779.
180. 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.
181. Shim W, Wong P. Stem cell cardiomyoplasty: State-of-the-art. *Ann Acad Med Singapore* 2004; 33(4): 451–460.
182. Suarez de Lezo J, Romero M, Torres A et al. Regeneration versus left-ventricular function recovery after revascularised acute anterior wall myocardial infarction. A randomised study. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 318 (abstr).
183. Planat-Bernard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; 109: 656–663.
184. Rehman J, Traktuev D, Li J et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 2004; 109: 1292–1298.
185. Valina CM, Pinkernell, Luka T et al. Intracoronary transplantation of cells isolated from subcutaneous fat tissue or bone marrow into an acute myocardial infarction model in swine shows similar improvement of LV function. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 687 (abstr).
186. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344(23): 1750–1757.
187. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003; 92(2): 139–150.
188. Wilenski RL, Freyman T, Polin GM et al. A comparison of 3 methods of mesenchymal stem cell delivery following transmural myocardial infarction in a porcine model. *Eur Heart J* 2005; 26(Suppl): 219 (abstr).
189. Li RK, Mickle DAG, Weisel RD et al. Optimal time for cardiomyocyte transplantation to maximize myocardial function after left ventricular injury. *Ann Thorac Surg* 2001; 72: 1957–1963.
190. Ott HC, McCue J, Taylor DA. Cell-based cardiovascular repair. *Basic Res Cardiol* 2005; 100(6): 504–517.
191. Atkins BZ. Results of cellular therapy for ischemic myocardial dysfunction. *Minerva Cardioangiol* 2002; 50: 333–341.
192. Thomson RB, Emami SM, Davis BH et al. Comparison of intracardiac cell transplantation: autologous skeletal myoblasts versus bone marrow cells. *Circulation* 2003; 108(Suppl II): 264–271.
193. Ott HC, Bonaros N, Marksteiner R et al. Combined transplantation of skeletal myoblasts and bone marrow stem cells for myocardial repair in rats. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 627–634.
194. Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N et al. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133+ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44(2): 458–463.
195. Souza LC, Carvalho KA, Rebelatto C et al. Combined transplantation of skeletal myoblasts and mesenchymal cells (cocultivation) in ventricular dysfunction after myocardial infarction. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 2004; 83(4): 288–299.
196. Memon IA, Sawa Y, Miyagawa S et al. Combined autologous cellular cardiomyoplasty with skeletal myoblasts and bone marrow cells in canine hearts for ischemic cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130(3): 646–653.
197. Chachques JC, Cattadori B, Herreros J et al. Treatment of heart failure with autologous skeletal myoblasts. *Herz* 2002; 27: 570–578.
198. Mocini D, Colivicchi F, Santini M. Stem cell therapy for cardiac arrhythmias. *Ital Heart J* 2005; 6(3): 267–71.

*Doručeno do redakce 19. 12. 05
Přijato k otištění po recenzi 9. 1. 06*

MUDr. Roman Panovský, Ph.D.

I. interní kardiologická klinika
LF MU a FN U sv. Anny, Brno