



**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**  
**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



III. interní-kardiologická klinika 3. LF UK a FNKV

**Jiří Pelnař**

**Prevence poinfarktové remodelace levé  
komory srdeční implantací kmenových  
buněk**

*Prevention of postinfarction left ventricular  
remodeling with stem  
cells implantation*

*Diplomová práce*

Praha, březen 2010

Autor práce: Jiří Pelnař

Studijní program: Všeobecné lékařství

Magisterský studijní obor: VSEOB

Vedoucí práce:

**MUDr. Zuzana Moťovská, Ph.D.**

Pracoviště vedoucího práce:

**III. interní-kardiologická klinika 3. LF UK a FNKV**

Datum a rok obhajoby: 1.4. 2010

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předkládanou práci zpracoval samostatně a použil jen uvedené prameny a literaturu. Současně dávám svolení k tomu, aby tato diplomová práce byla používána ke studijním účelům.

V Praze dne 19. března 2010

Jiří Pelnař

## **Poděkování**

Rád bych tímto poděkoval paní MUDr. Zuzaně Mořovské, Ph.D. za její vítanou pomoc při volbě tématu této práce, jakožto i za její připomínky a čas, který mi při tvorbě této práce věnovala.

# Obsah

|  |    |
|--|----|
| <b>OBSAH</b> .....   | 5  |
| <b>ÚVOD</b> .....  | 6  |
| <b>1. POINFARKTOVÁ REMODELACE MYOKARDU</b> .....   | 7  |
| 1.1 PATOFYZIOLOGIE .....   | 7  |
| 1.2 SOUČASNÉ MOŽNOSTI OVLIVNĚNÍ REMODELACE .....   | 8  |
| <b>2. KMENOVÉ BUŇKY A ZPŮSOBY JEJICH SRDEČNÍ IMPLANTACE JAKO<br/>PREVENCE REMODELACE LEVÉ KOMORY</b> ..... | 9  |
| <b>3. VÝSLEDKY STUDIÍ NA ZVÍŘECÍCH MODELECH</b> .....  | 11 |
| <b>4. VÝSLEDKY KLINICKÝCH STUDIÍ</b> .....   | 15 |
| <b>5. NEŽÁDOUCÍ ÚČINKY BUNĚČNÉ IMPLANTACE</b> .....  | 36 |
| <b>ZÁVĚR</b> .....   | 38 |
| <b>SOUHRN</b> .....  | 40 |
| <b>SUMMARY</b> .....   | 41 |
| <b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....   | 42 |

## Úvod

Problematika onemocnění kardiovaskulárního systému byla během mého studia na lékařské fakultě jedním z témat mě bližších. Stejně tak mě v posledních letech zaujal výzkum zabývající se kmenovými buňkami a jejich využitím na poli regenerativní medicíny. Tato poměrně nově se rozvíjející oblast lékařství může být do budoucna velkým příslibem. Proto mě přišlo zajímavé vytvořit přehled současného stavu využití metod regenerativní medicíny v kardiologii, konkrétně při prevenci remodelace levé komory srdeční po proběhlém infarktu. Je zřejmé, že pokud by věda dokázala nalézt způsob pro vytvoření podmínek, za kterých by kmenové buňky mohly podpořit funkci takto poškozeného srdečního svalu, bylo by to pro řadu pacientů velkým přínosem.

# 1. Poinfarktová remodelace myokardu

Za poinfarktovou remodelaci myokardu jsou považovány změny v jeho stavbě, a to jednak strukturální změny oblastí zasažených infarktem a jednak změny, které postihují zbylý, infarktem nepostižený myokard. Dochází ke ztenčování a roztažení nekrotického myokardu a k dilataci a hypertrofii zbylé části komory. Tyto strukturální změny vedou následně ke změnám funkčním, a pokud proces remodelace progreduje, může se vyvinout až srdeční selhávání. Proces remodelace tak může významně ovlivnit prognózu přežívání pacientů. Míra, do které se remodelace projeví, závisí na rozsahu infarktového ložiska - větší a transmurální infarkty spíše vyvolají následnou remodelaci.<sup>15,16</sup>

## 1.1 Patofyziologie

Náhlý výpadek části myokardu z funkce v důsledku infarktu vyvolá ve zbývajícím nepostiženém myokardu nárůst na něj kladené zátěže. Ve zvýšeně zatížených kardiomyocytech se aktivuje kaskáda intracelulárního přenosu signálu, čímž se mění jejich struktura. Makroskopicky jsou pak změny svalových buněk patrné jako hypertrofie a dilatace srdeční tkáně.<sup>15,16</sup>

Arbitrárně se dá proces poinfarktové remodelace rozdělit do dvou fází, časně a pozdní. Časná fáze (prvních 72 hodin po infarktu) je charakterizovaná změnami probíhajícími v infarktovém ložisku. To se rozpíná a ztenčuje. Tento děj je dán zánětlivými procesy zde probíhajícími. Do infarktu vcestovalé neutrofily enzymaticky štěpí kolagenní trámce spojující kardiomyocyty a tím snižují mechanickou odolnost postižené oblasti. Tímto procesem vzniklá časná dilatace srdeční komory

vede v okolním myokardu k zvýšení diastolické a systolické zátěže.<sup>15,16</sup>

Pozdní fáze, následující po prvních 72 hodinách po infarktu, je spjata se změnami levé komory srdeční jako celku. Dochází při ní k dilataci komory, k deformaci jejího tvaru a k hypertrofii jejích stěn. Zvýšeně namáhané myocyty v dilatované komoře reagují hypertrofií. Tato hypertrofie je adaptivní odpovědí myokardu, kompenzuje zvýšenou zátěž, zmírňuje progresivní dilataci komory a stabilizuje kontraktilitu myokardu. Kardiomyocyty hypertrofují účinkem neurohormonálních působků (katecholaminy, endothelin-1, systém renin-angiotensin-aldosteron), mechanickým roztažením, a parakrinně a autokrinně působícími faktory.<sup>15,16</sup>

## **1.2 Současné možnosti ovlivnění remodelace**

Pro zmírnění nežádoucích dopadů poinfarktové remodelace se v současné době využívá několik postupů, vycházejících z patofyziologických změn v myokardu probíhajících. Hlavní proměnné ovlivňující remodelaci jsou velikost infarktu, mechanické zatížení komory, neurohormonální aktivace a lokálně působící růstové faktory.<sup>16</sup>

Reperfúze ischemické oblasti snižuje rozsah remodelace jednak tím, že uchrání část myokardu od propadnutí nekróze, jednak může také ovlivnit vývoj vlastního infarktu v tom smyslu, že je zvýšeně odolný vůči pnutí síle, a tak méně náchylný k roztažení.<sup>16</sup>

Farmakologicky lze proces remodelace ovlivnit především inhibitory ACE a  $\beta$  - blokátory.<sup>16</sup>



## **2. Kmenové buňky a způsoby jejich srdeční implantace jako prevence remodelace levé komory**

Infarkt myokardu je hlavní příčinou vzniku městnavého srdečního selhání. Jen v USA je městnavým srdečním selháním postiženo přibližně 5 milionů lidí a 400 000 osob ročně je tímto onemocněním nově postiženo. Ze studií prováděných na zvířecích modelech a z prvních klinických studií vyplývá, že by kmenové buňky mohly být využity pro regeneraci a náhradu poškozeného myokardu, a tak předcházet vývoji remodelace levé komory srdeční a vzniku městnavého srdečního selhání.<sup>17</sup>

Ačkoli v lidském srdci existuje subpopulace plně nediferencovaných kardiomyocytů schopná mitotického dělení, nejsou tyto buňky schopny podstatné regenerace poškozeného myokardu. V úvahu tak připadá možnost transplantace kmenových buňek, které by schopnost regenerace podpořily.<sup>17</sup>

Kmenová buňka je definována jako nediferencovaná buňka schopná proliferace a diferenciaci v jeden či více typů specializovaných buňek, tedy například kardiomyocytů.<sup>17</sup>

Existuje více typů buňek, které by mohly být použity pro náhradu poškozeného myokardu a omezení remodelace. Současný výzkum se snaží objevit ideální buňku, či kombinaci buňek vhodnou pro implantaci. V úvahu připadá využití embryonálních kardiomyocytů, fetálních kardiomyocytů, adultních kardiomyocytů, myocytů kosterního svalstva, progenitorových endoteliálních buňek, embryonálních kmenových buňek, mezenchymálních kmenových buňek nebo autologních mononukleárních buňek kostní dřeně či jejich frakcí.<sup>17</sup>

Je také potřeba objasnit, jaký způsob vnesení kmenových buňek do srdce je optimální. Implantace může být provedena injekčně, kdy jsou buňky přímo vpraveny do myokardu. Intramyokardiální injekce může být provedena jako součást kardiochirurgického výkonu. Z hlediska aplikace je tento způsob poměrně jednoduchý, pod kontrolou zraku lze přesně určit vhodné místo podání a v porovnání s intrakoronárním či intravenózním podáním by mohlo stačit menší množství buňek. Nevýhodou tohoto způsobu jsou s ním spjatá peroperační a postoperační rizika. Další možností injekční implantace je vpravení buňek do myokardu při perkutánní katetrizaci levé komory. Při tomto způsobu aplikace je přesné místo injekce voleno za pomoci elektromechanického mapování. Toto mapování umožňuje rozlišit viabilní myokard od jizevnaté tkáně a posoudit transmuralitu infarktu.<sup>17</sup>

Intrakoronární podání umožňuje, na rozdíl od podání intramyokardiálního, homogenní usídlení buňek. Ostrůvky buňek, které mohou vznikat při intramyokardiálním podání mohou vyvolat elektrickou nestabilitu myokardu a dát vznik moratorovým tachykardiím. Při intrakoronárním podání je třeba opatrně volit množství podaných buňek a dobu jejich podání tak, aby nedošlo k poškození myokardu.<sup>17</sup>

Intravenózní podání kmenových buněk by mohlo být výhodné pro svoji jednoduchost, nicméně předpokladem pro úspěch tohoto postupu je přítomnost efektivního „homing“ mechanismu kmenových buněk.<sup>17</sup>

Kromě typu buněk, jejich množství a způsobu podání je také otázkou, v jakém časovém odstupu po vzniku infarktu je optimální doba pro implantaci. Není jisté, zda je nejvhodnější podat buňky časně po infarktu, kdy v nekrotickém ložisku probíhá silná zánětlivá reakce, nebo později, ve fázi remodelace. Jako

nejvhodnější doba k implantaci se jeví období mezi 7 – 14 dnem po vzniku infarktu, kdy již odezněla nejsilnější zánětlivá reakce, ale jizva v místě infarktu ještě nebyla zcela dotvořena.<sup>17</sup>

### **3. Výsledky studií na zvířecích modelech**

Preklinický výzkum hodnotící účinky buněčné implantace na zvířecích modelech infarktu myokardu v řadě případů ukázal možný léčebný potenciál této metody. Proběhly rozličné studie zkoumající efekt podání různých buněčných linií, s využitím rozdílných technik jejich aplikace. Porovnání výsledků těchto studií je nicméně svízelné, jelikož jednotlivé studie se mezi sebou liší nejenom druhem podávaných buněk a technikou implantace, ale také různě načasovanou implantací, různým počtem přenášených buněk, zkoumaným zvířecím druhem, dobou sledování, vyšetřovacími metodami ke sledování použitými a také rozdílným spektrem sledovaných funkčních, morfologických a histologických charakteristik. Nicméně výsledky, které tento výzkum přinesl jsou slibné, jak co do možného zlepšení srdeční funkce, tak i co se bezpečnosti této metody týče.

Po intramyokardiální implantaci mezenchymálních kmenových buněk prasatům došlo oproti kontrolní skupině k signifikantně vyššímu nárůstu LVEF, podobně i další zkoumané parametry srdeční funkce, jako například LVEDP doznaly 8 týdnů po implantaci signifikantně lepších výsledků, v porovnání s kontrolou.<sup>18</sup> Navazující studie zkoumající regeneraci myokardu po intramyokardiálním podání mezenchymálních kmenových buněk prasatům zjistila, že zatímco u neléčené skupiny nedošlo v srdci k výrazné novotvorbě viabilní tkáně, ve skupině léčené se

v průběhu 8 týdnů po infarktu zformoval výrazně silnější lem subendokardiální viabilní tkáně a došlo ke ztenčení tkáně jizevnaté. Při bližším zkoumání tohoto lemu bylo zjištěno, že je tvořen správně uspořádanými kardiomyocyty, o něco menšími, než kardiomyocyty normální. Také bylo zjištěno, že novotvořená tkáň aktivně přispívá ke zlepšení kontraktility myokardu.<sup>19</sup>

V další studii byl porovnáván účinek implantace fetálních kardiomyocytů a myoblastů kosterního svalstva. Studie byla provedena na potkanech Wistar. Měsíc po intramyokardiálním podání buněk došlo k signifikantnímu nárůstu LVEF, srovnatelnému u obou skupin. U skupiny kontrolní přitom došlo k signifikantnímu poklesu LVEF.<sup>20</sup> Ve studii zkoumající efekt intramyokardiální implantace myoblastů kosterního svalstva u ovcí byla s odstupem 4 a 12 měsíců od implantace histologicky prokázána přítomnost dobře diferencovaných buněk kosterního svalstva s tendencí k paralelnímu uspořádání. Navíc bylo echokardiograficky a tkáňovým dopplerovským zobrazením zjištěno, že léčba vedla, oproti kontrole, k signifikantně většímu zlepšení srdeční funkce (LVEF, LVEDV, HR, WMS) a lokální kontraktility infarktového ložiska.<sup>21</sup>

Při posuzování vlivu intravenózní implantace endoteliálních progenitorových buněk bylo zjištěno, že po aplikaci lidských EPC potkanům s IM, došlo k usídlování těchto buněk v poškozené srdeční tkáni a k diferenciaci těchto buněk do zralých buněk endoteliálních. U léčených potkanů byla po 28 dnech signifikantně vyšší hustota kapilár v porovnání s kontrolami a podobně byl u léčené skupiny nižší poměr plochy jizevnaté tkáně k celkové ploše levé komory. Také echokardiografické vyšetření ukázalo příznivý vliv implantace na srdeční funkci.<sup>22</sup> Zkoumána byla také možnost společného, intramyokardiálního podání EPC a MSC. Na potkanním modelu isoproterenolem indukovaného poškození

myokardu bylo zjištěno, že samotná implantace buď EPC či MSC vede v porovnání s kontrolou k signifikantnímu a srovnatelnému zlepšení parametrů srdeční funkce (LVEF, FS, LVEDD, LVEDP). Implantace obou buněčných typů najednou pak zase vedla k signifikantně většímu zlepšení srdeční funkce v porovnání se skupinami léčenými pouze jedním buněčným typem.<sup>23</sup>

Také kardiomyocyty by dle proběhlých studií mohly být pro buněčnou terapii přínosem. Kromě již výše zmíněné studie<sup>20</sup> byl pozitivní efekt zjištěn také po intramyokardiální implantaci neonatálních kardiomyocytů potkanům. 6 měsíců po implantaci byla u léčených potkanů, v porovnání s kontrolami, zjištěna větší tloušťka stěny komory v místě infarktu a byly zde nalezeny nakupení implantovaných buněk. Také srdeční funkce doznala u léčené skupiny signifikantního zlepšení (LVEF, WMS).<sup>24</sup> Že je při implantaci kmenových buněk možné využít různých mechanických pomůcek ke zlepšení retence implantovaných buněk v myokardu ukázala studie, která zkoumala účinek společné intramyokardiální aplikace neonatálních kardiomyocytů a fibrinové těsnící hmoty u potkana. 4 týdny po implantaci byla tloušťka stěny v místě infarktu větší u skupiny, které navíc kromě NC byla podána i fibrinová hmota. Podobně, vyšetření PCR ukázalo vyšší retenci buněk při podání fibrinové hmoty a také sledované parametry srdeční funkce byly po podání buněk a fibrinové hmoty signifikantně lepší, než po podání buněk samotných.<sup>25</sup>

Další nadějnou buněčnou populací jsou mononukleární buňky kostní dřeně. 3 týdny po intramyokardiální implantaci těchto buněk prasatům bylo zaznamenáno signifikantně větší zlepšení LVEF oproti kontrolám, podobné změny ve prospěch implantace byly patrné také u hodnot LVEDP, v rozsahu defektu prokrvení myokardu, který se u léčené skupiny výrazně zmenšil a také

v podílu infarktového ložiska na celkové ploše komory. Holterovské monitorování zvířat neprokázalo výskyt maligních arytmií. Vyšetření také ukázala zvýšenou míru neovaskularizace u léčené skupiny.<sup>26</sup>

Bylo uskutečněno také několik studií porovnávajících jednotlivé techniky podání buněk. Takto byl sledován osud mononukleárních buněk periferní krve podaných buď intramyokardiálně, intrakoronárně či retrográdně skrze koronární žíly. Hodinu poté byla vyhodnoceno rozložení buněk v organismu, přičemž bylo patrné, že velká část buněk se bez ohledu na způsob podání vždy retinovala v plicích a viscerálních orgánech, méně pak již v muskuloskeletálním systému a cirkulující krvi. Nejvyšší procento buněk se v myokardu nacházelo po intramyokardiálním podání ( $11,3 \pm 3\%$ ), méně pak po podání do žil ( $3,2 \pm 1\%$ ) a tepen ( $2,6 \pm 0,3\%$ ).<sup>27</sup> Další studie, s odlišnými výsledky, ale také s odlišným postupem ukázala, že při podání MSC 1 měsíc po vzniku IM u prasat došlo k nejvyššímu osídlení myokardu po podání intrakoronárním, následovalo podání intramyokardiální a endomyokardiální.<sup>28</sup>

## 4. Výsledky klinických studií

### • Perkutánní intramyokardiální podání kmenových buněk u pacientů s akutním infarktem myokardu. První studie na člověku.<sup>1</sup>

Studie se snažila ověřit bezpečnost a proveditelnost perkutánní intramyokardiální implantace mononukleárních buněk kostní dřeně za použití elektromechanického mapování (EMM). Byly sledovány parametry bezpečnosti (projevy CMP, perikardiální výpotek, perforace myokardu, setrvalá komorová tachykardie, IM, poškození aortální chlopně, intramyokardiální kalcifikace/nádory) a dále byly hodnoceny změny LVEF, třídy NYHA a parametrů zjištěných EMM.

U všech 20 pacientů v této studii byla provedena PCI a zahájena standardní léčba IM. Navíc byly pacientům 10,5±5 dní od vzniku IM implantovány BMMNC rozdělené do 20 injekcí. Následně byli pacienti 12 měsíců sledováni.

Výsledky: Během dvanácti měsíců žádný z pacientů nezemřel ani neprodělal další IM, nebyly prokázány intramyokardiální kalcifikace či tumory. Také nebyly zjištěny setrvalé ventrikulární arytmie či zhoršení stupně dle NYHA v porovnání se stavem při propuštění z nemocnice.

6 měsíců po implantaci bylo u 15 pacientů provedeno EMM. Bylo zaznamenáno zlepšení nominálního unipolárního napětí (ze 7,5±3,4 mV na 10,0±3,9 mV) i normalizovaného unipolárního napětí (z 45,5±14,3 % na 59,3±19,2 %). Oblast nízkého napětí se zmenšila z 28,7±14,3 % na 20,3±13,5 %.

LVEF zjišťovaná angiograficky vzrostla signifikantně jak mezi vyšetřením v době IM (33,2±5,5 %) a v době implantace (40,7±6,6 %), tak mezi implantací a vyšetřením 6 měsíců po implantaci (50,4±14,4 %). Echokardiografické vyšetření LVEF

v době implantace, 6 a 12 měsíců po ní ukázalo následující hodnoty: implantace  $40,8 \pm 6,8$  %, 6M  $47,3 \pm 9,5$  %, 12M  $47,0 \pm 10,5$  %.

Závěr této studie byl, že metoda implantace kmenových buněk zde popsaná je bezpečná a proveditelná, nicméně je ještě zapotřebí dalších studií na větších skupinách pacientů a s přítomnou kontrolní skupinou, aby mohl být hodnocen možný příznivý vliv na srdeční funkci.

- **Efekt autologní intrakoronární transplantace mezenchymálních buněk kostní dřeně na funkci levé komory u pacientů s akutním infarktem myokardu.<sup>2</sup>**

V průběhu studie byl hodnocen účinek implantace MSC na srdeční funkci po IM. Studie byla provedena na 69 pacientech, kteří prodělali PCI do 12 hodin od vzniku infarktu myokardu. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin. První skupině (34 pacientů) byly intrakoronárně podány MSC, druhé skupině (35 pacientů) pouze solný roztok. Všichni pacienti byli vyšetřeni PET, srdeční katetrizací a echokardiograficky v den implantace a 3 a 6 měsíců po ní. Elektromechanické mapování bylo provedeno u 15 pacientů z MSC léčené skupiny a u 8 pacientů ze skupiny kontrolní den před implantací a 3 měsíce po ní.

Výsledky: Ventrikulografie ukázala, že procento hypokinetických, akinetických a dyskinetických segmentů signifikantně pokleslo v průběhu 3 měsíců ve skupině léčené MSC (u MSC léčených z  $32 \pm 11\%$  na  $13 \pm 5\%$ , u kontrolní skupiny z  $33 \pm 10\%$  na  $28 \pm 10\%$ ). Rychlost pohybu srdeční stěny v oblasti infarktu signifikantně vzrostla u MSC léčené skupiny (z  $2,17 \pm 1,3$  cm/s na  $4,2 \pm 1,7$  cm/s), nikoliv však u skupiny kontrolní (z  $2,19 \pm 1,5$  cm/s na  $2,7 \pm 1,7$  cm/s). LVEF léčené skupiny po třech měsících ( $67 \pm 11\%$ ) signifikantně vzrostla v porovnání



s počátečním stavem ( $49\pm 9\%$ ) i v porovnání s LVEF kontrolní skupiny po třech měsících ( $53\pm 8\%$ ). Mezi 3. a 6. měsícem nedošlo v léčené skupině ke změně LVEF.

PET vyšetření ukázalo, že defekty perfúze 3 měsíce po implantaci byly v MSC léčené skupině signifikantně menší než ve skupině kontrolní ( $134\pm 66\text{ cm}^2$  vůči  $185\pm 87\text{ cm}^2$ ).

LVEDV a LVESV v MSC léčené skupině byly po třech měsících signifikantně nižší, než ve skupině kontrolní (LVEDV  $136\pm 31\text{ ml}$  vůči  $162\pm 27\text{ ml}$ , LVESV  $63\pm 20\text{ ml}$  vůči  $88\pm 19\text{ ml}$ ). 24 hodinové elektrokardiografické monitorování neprokázalo v průběhu tříměsíčního sledování výskyt arytmií.

Následující tabulka ukazuje změny zaznamenané elektromechanickým mapováním u MSC léčené skupiny.

| <b>Tab. 9</b>          | <b>Den před implantací</b> | <b>3 měsíce po implantaci</b> |
|------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Lokální zkrácení (%)   | $7,32\pm 1,86$             | $11,29\pm 1,64$               |
| Unipolární napětí (mV) | $7,61\pm 1,09$             | $10,38\pm 1,12$               |
| Defekt perfúze (%)     | $36\pm 6$                  | $20\pm 5$                     |
| LVEDV (ml)             | $169\pm 21$                | $131\pm 19$                   |
| LVESV (ml)             | $76\pm 18$                 | $58\pm 13$                    |

Výsledkem studie tedy bylo zjištění, že implantace MSC signifikantně vylepšila funkci levé komory.

(Vzhledem k faktickým nesrovnalostem v tomto článku přítomným je však k výsledkům této studie třeba přistupovat s velkou obezřetností).

**• Intrakoronární podání CD34+ CXCR4+ buněk kostní dřeně a neselektovaných mononukleárních buněk kostní dřeně u pacientů s akutním STEMI a sníženou ejekční frakcí levé komory: výsledky randomizované multicentrické studie (REGENT).<sup>3</sup>**

Populace buněk kostní dřeně exprimující znaky CD34 a CXCR4 může být izolována z kostní dřeně. Tato subpopulace buněk je rychle mobilizována v průběhu akutního infarktu myokardu v reakci na SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), který je uvolňován srdečním svalem. Buňky s výše zmíněnými znaky navíc exprimují i znaky kardiální a endoteliální linie diferenciaci, protože je tato buněčná populace pravděpodobně schopna navodit proces regenerace po IM. Snahou autorů studie bylo porovnat účinek intrakoronární implantace vybrané populace buněk kostní dřeně s účinkem neselektované populace mononukleárních buněk.

Do studie bylo zařazeno 200 pacientů s akutním infarktem myokardu léčeným PCI a s LVEF nižší než 40%. Pacienti byli náhodně rozděleni do tří skupin. 80 pacientům byly podány selektované buňky, 80 pacientům neselektované a 40 pacientů utvořilo skupinu kontrolní. V průměru 7 (3-12) dní po PCI byla pacientům odebrána kostní dřeň, patřičné buňky byly vybrány a ještě týž den implantovány. Pacienti byli šest měsíců sledováni a vyšetřováni pomocí angiografie a magnetické rezonance. Angiografie byla provedena v průběhu implantace buněk a MRI vyšetření 1-3 dny po implantaci. Po 6 měsících byla tato dvě vyšetření zopakována. Kontrolní skupina byla vyšetřována pouze pomocí MRI.

Výsledky: Na začátku studie nebyly mezi jednotlivými skupinami signifikantní rozdíly v LVEF a v srdečních objemech. Vyšetření MRI po 6 měsících ukázalo nárůst LVEF u skupiny

léčené selektovanými (z 35% na 38%) i neselektovanými buňkami (z 37% na 40%). Nicméně o signifikantní nárůst LVEF se jednalo pouze ve skupině s neselektovanými buňkami. V kontrolní skupině nedošlo k signifikantnímu nárůstu LVEF. Srovnání změn LVEF neukázalo signifikantní rozdíl mezi léčenými skupinami a skupinou kontrolní. ESV ani EDV nedoznaly v žádné ze skupin signifikantní změny.

Výsledky angiografického vyšetření ukázaly vzestup LVEF v obou léčených skupinách, avšak nebyl mezi nimi signifikantní rozdíl.

Při snaze identifikovat faktory, které vedou k signifikantnímu klinickému zlepšení LVEF, bylo zjištěno, že pacienti s počáteční ejekční frakcí nižší než medián počáteční LVEF v dané skupině dospěli v průběhu léčby selektovanými i neselektovanými buňkami k signifikantnímu nárůstu EF, v porovnání s pacienty z daných skupin s počáteční EF nad mediánem, u kterých k signifikantnímu nárůstu EF nedošlo. Tento fenomén nebyl přítomen v kontrolní skupině. Také bylo zjištěno, že u pacientů léčených oběma typy buněk, u kterých byla PCI provedena po delší době než medián dané skupiny, došlo k výraznějším nárůstu LVEF v porovnání s časněji intervenovanými pacienty.

Sledování hlavních nežádoucích účinků léčby na kardiovaskulární systém neukázalo signifikantní rozdíl mezi léčenými skupinami a skupinou kontrolní.

Tato studie tedy zjistila, že užití selektovaných či neselektovaných buněk kostní dřeně u pacientů po IM nevedlo v průběhu 6 měsíců k signifikantnímu nárůstu EF. Nicméně byl odhalen trend k signifikantnímu zlepšení EF u pacientů s výrazně sníženou EF (pod 37%) u obou skupin. Toto zjištění bylo ovšem získáno *post hoc* analýzou a je proto třeba přistupovat k němu obezřetně.

- **Transplantace progenitorových buněk a zvýšení regenerace u akutního infarktu myokardu (TOPCARE-AMI).<sup>4</sup>**

Autoři studie posuzovali proveditelnost, bezpečnost a klinický dopad intrakoronární implantace autologních progenitorových buněk u pacientů s akutním infarktem myokardu. Studie byla provedena na 20 pacientech s IM léčeným PCI a implantací stentu. Tito pacienti byli rozděleni do dvou skupin. Jedné skupině pacientů (11) byly podány progenitorové buňky cirkulující krve (CPC), druhé skupině (9) pak progenitorové buňky kostní dřeně (BMC). Implantace buněk proběhla  $4,3 \pm 1,5$  dní po vzniku IM. Jako referenční skupina bylo vybráno 11 pacientů shodujících se s populací ve studii v ejekční frakci, v lokalizaci a velikosti infarktu, u kterých byla provedena akutní reperfuční terapie.

Pacienti byli vyšetřováni angiograficky (LVEF, objemy LK, regionální pohyb srdeční stěny). Zátěžová echokardiografie po aplikaci dobutaminu byla použita pro zjištění WMSI (wall-motion score index), počítaný jako součet skóre (1=norma, 2=hypokineze, 3=akineze, 4=dyskineze) 16 segmentů levé komory dělený počtem segmentů. Dále byli pacienti vyšetřeni PET a katetrizačně byla hodnocena koronární rezerva. Pacienti byli sledováni 4 měsíce.

Výsledky: Mezi počátečním vyšetřením a vyšetřením po 4 měsících došlo k signifikantnímu nárůstu LVEF a regionální pohyblivosti infarktové oblasti. Detailní analýza regionální pohyblivosti ukázala nejvýraznější zlepšení v okrajových částech přiléhajících k centrální zóně infarktu. Globální a regionální zlepšení funkce LK se signifikantně nelišilo mezi dvěma léčenými skupinami. U pacientů léčených CPC (korespondující hodnoty u skupiny léčené BMC v závorkách) vzrostla LVEF z  $51,3 \pm 11\%$  ( $51,9 \pm 9\%$ ) na  $59,5 \pm 9\%$  ( $60,7 \pm 9\%$ ) a regionální pohyblivost

stěny v místě infarktu vzrostla z  $-1,5 \pm 0,3$  ( $-1,6 \pm 0,2$ ) na  $-0,6 \pm 0,6$  ( $-0,4 \pm 0,8$ ). LVESV poklesl z  $56,9 \pm 17,6$  ml ( $55,2 \pm 24$  ml) na  $48,9 \pm 14,2$  ml ( $34,9 \pm 13$  ml). V referenční skupině, které nebyly implantovány buňky, ale jinak byla stejně léčena nebyly zaznamenány signifikantní změny sledovaných hodnot. LVEF byla v této skupině signifikantně nižší a LVESV se zvětšil po 4 měsících.

Echokardiografie provedená bezprostředně před implantací ukázala 86 hypo/akinetických segmentů v klidu, 75 h/a segmentů při zátěži dobutaminem. Po 4 měsících bylo v klidu přítomno 44 h/a segmentů. Nebyl zjištěn signifikantní rozdíl WMSI mezi oběma léčenými skupinami.

Vyšetření koronární rezervy ukázalo v obou léčených skupinách její signifikantní nárůst. Na počátku byla koronární rezerva v infarktové tepně signifikantně nižší než v tepně referenční. Po 4 měsících se rezerva signifikantně zvětšila v obou těchto tepnách, nicméně v tepně infarktové signifikantně více oproti tepně referenční.

Zobrazení pomocí FDG-PET bylo provedeno den po implantaci a 4 měsíce po ní k posouzení viability myokardu v oblasti infarktu. Byl zaznamenán signifikantní nárůst vychytávání FDG v infarktové oblasti (z  $54,1 \pm 12,5\%$  na  $62,9 \pm 11,0\%$ ), zatímco vychytávání v povodí referenční tepny nedoznalo signifikantní změny (z  $72,4 \pm 5\%$  na  $73,7 \pm 7,5\%$ ). Opět neexistoval signifikantní rozdíl mezi oběma léčenými skupinami.

U pacientů v průběhu studie nedošlo k žádnému úmrtí ani k projevům maligní arytmie. U 5 pacientů došlo k restenóze stentem ošetřeného úseku.

Z výše popsaných zjištění vyplývá, že intrakoronární transplantace progenitorových buněk je proveditelná a bezpečná. Tento typ léčby byl také spojen se signifikantním nárůstem LVEF,

s hlubokým zlepšením v abnormalitách pohybu infarktem zasažené stěny a se signifikantním zmenšením LVESV, což svědčí pro pozitivní vliv na prevenci remodelace LK.

• **Chybění dodatečného pozitivního efektu intrakoronární transplantace autologních kmenových buněk periferní krve u pacientů s akutním infarktem myokardu.<sup>5</sup>**

Tvůrci studie ověřovali, zda intrakoronární implantace autologních kmenových buněk periferní krve (PBSC) mobilizovaných pomocí G-CSF může vylepšit srdeční funkci po akutním infarktu myokardu.

Pro studii bylo vybráno 73 pacientů s IM v předchozích 14 dnech, kteří byli úspěšně léčeni PCI a u nichž byl IM v povodí arteria LAD. Pacienti tvořili tři skupiny. Jedna skupina (32) byla tvořena pacienty, u nichž byla provedena primární PCI do 12 hodin od vzniku infarktu. Druhé skupině (10) byly podány kmenové buňky. Ve třetí skupině (31) byli pacienti, u nichž byla PCI provedena elektivně (mezi 12 hodinami až 14 dny od vzniku IM) ve stejném časovém odstupu od IM, jako ve skupině léčené kmenovými buňkami.

Srdeční funkce byla monitorována echokardiograficky 4 dny po provedení PCI a následně po 6 měsících. Byla zjišťována LVEF a WMSI. MRI vyšetření bylo provedeno u skupiny s primární PCI a u skupiny léčené kmenovými buňkami ve stejných časových intervalech jako echokardiografie.

Po 6 měsících byla také provedena angiografie u všech pacientů léčených PBSC, u 75% pacientů po primární PCI a u 55% pacientů s elektivní PCI. Byl hodnocen stupeň restenózy a u PBSC léčené skupiny byl vyhodnocován efekt terapie na myokardiální mikrocirkulaci skrze měření koronární rezervy.

Dále byla hodnocena bezpečnost terapie sledování hlavních nežádoucích kardiovaskulárních událostí.

Výsledky: Podání G-CSF bylo pacienty dobře snášeno, při implantaci buněk nebyly zjištěny známky ischemie myokardu či arytmií. Holterovské monitorování po 6 měsících neodhalilo znaky ventrikulárních arytmií v PBSC léčené skupině. Během 6 měsíců sledování nedošlo ve skupině léčené PBSC ani ve skupině po primární PCI k úmrtí či ke vzniku IM. Ve skupině s elektivní PCI došlo ke dvěma úmrtím z kardiální příčiny a k nutnosti hospitalizovat 4 pacienty pro srdeční selhání. K restenóze došlo u 1 jednoho pacienta z PBSC skupiny, u 2 pacientů po primární PCI a u 5 pacientů po elektivní PCI.

Echokardiografické vyšetření ukázalo signifikantní nárůst LVEF ve všech skupinách oproti počátečním hodnotám. Stejně se zachoval i WMSI. Ani jedna z těchto hodnot však nebyla v některé ze skupin signifikantně vyšší v porovnání s ostatními. Hodnoty jsou v následující tabulce.

| Tab. 10         | LVEF (%) |                  |          | WMSI      |                  |            |
|-----------------|----------|------------------|----------|-----------|------------------|------------|
|                 | počátek  | po 6<br>měsících | změna    | počátek   | po 6<br>měsících | změna      |
| Buněčná terapie | 40,1±6,5 | 49,4±13,4        | 9,3±12,5 | 1,87±0,37 | 1,60±0,46        | -0,27±0,37 |
| Primární PCI    | 42,6±6,3 | 48,6±7,1         | 6,0±7,7  | 1,82±0,24 | 1,56±0,34        | -0,26±0,39 |
| Elektivní PCI   | 42,1±8,0 | 48,5±12,3        | 6,5±8,9  | 1,80±0,36 | 1,61±0,45        | -0,21±0,38 |

Vyšetření MRI také ukázalo signifikantní zlepšení LVEF v obou vyšetřovaných skupinách. Analýza systolického pohybu stěny LK ukázala, že zlepšení funkce bylo dáno především zlepšením pohybu infarktem postižené části stěny.

Hodnota koronární rezervy vzrostla u PBSC léčené skupiny během 6 měsíců z 1,82±0,49 na 2,84±0,79.

Na základě těchto výsledků autoři studie zjistili, že implantace G-CSF mobilizovaných PBSC je bezpečná, ale zřejmě nepřináší dodatečný vliv na zlepšení srdeční funkce v porovnání s reperfuční terapií samotnou.

• **Intrakoronární podání buněk kostní dřeně po infarktu myokardu: data z 18 měsíců trvajících sledování v rámci randomizované, kontrolované studie BOOST (Bone marrow transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration).<sup>6</sup>**

Snahou studie bylo posoudit dlouhodobý efekt intrakoronární implantace autologních buněk kostní dřeně (BMC). 60 pacientů bylo náhodně rozděleno do dvou skupin po 30. Pacienti první skupiny byli standardně léčeni, pacientům druhé skupiny byly navíc k léčbě standardně intrakoronárně podány BMC.

Po randomizaci ( $3,5 \pm 1,5$  dne po PCI) byla u všech pacientů vyšetřena srdeční funkce pomocí MRI. Po tomto vyšetření ( $4,8 \pm 1,3$  dne od PCI) byla pacientům odebrána kostní dřeň a o osm hodin později došlo k implantaci. 6 a 18 měsíců od implantace bylo u všech pacientů zopakováno MRI vyšetření. Během této doby byl také sledován klinický stav pacientů.

Výsledky: Během studie se při odběru kostní dřeně či při implantaci kmenových buněk neobjevily komplikace, nedošlo k ischemizaci myokardu. Došlo k jednomu úmrtí v kontrolní skupině 9 měsíců po randomizaci. Během 18 měsíců museli být tři pacienti kontrolní skupiny a jeden pacient z léčené skupiny hospitalizováni pro dekompenzované srdeční selhání. Jeden pacient léčené skupiny prodělal ve 4. měsíci nonSTEMI. 4 pacienti z kontrolní skupiny a 5 pacientů z léčené skupiny museli podstoupit PCI infarktové cévy. Nebyly zjištěny signifikantní rozdíly v přítomnosti synkop, setrvalých komorových arytmií či



funkčního zařazení dle NYHA. Echokardiograficky nebyly zjištěny intramyokardiální kalcifikace či tvorba tumorů.

Na počátku studie nebyl signifikantní rozdíl mezi zkoumanými skupinami v hodnotách indexů objemu a hmoty levé komory, LVEF, regionálního pohybu srdeční stěny, ztlušťování stěny či objemu zvýrazněného pozdním kontrastem (oblast infarktu). Transmurální rozsah infarktu byl  $61,0 \pm 16,5\%$  v kontrolní skupině a  $61,4 \pm 18,5\%$  ve skupině léčené.

LVEF léčené skupiny byla v 6. měsíci o 6,7% vyšší než na počátku. V 18. měsíci však byla vyšší jen o 5,9%. V kontrolní skupině byl tento nárůst o 0,7% v 6. měsíci a o 3,1% v měsíci 18. Nárůst v 6. měsíci tak byl signifikantně vyšší v léčené skupině, avšak po 18 měsících nebyl signifikantně vyšší.

Rychlost nápravy LVEF v průběhu celých 18 měsíců byla signifikantně vyšší u léčené skupiny.

Index LVEDV (LVEDV dělený povrchem těla) se v průběhu studie zvyšoval v obou skupinách, index LVESV se v průběhu studie signifikantně nezměnil. Index hmoty levé komory a objem zvýrazněný pozdním kontrastem v obou skupinách během 18 měsíců signifikantně poklesl. Regionální ztlušťování stěny v místě infarktu a pohyb stěny v této oblasti se v obou skupinách v průběhu studie signifikantně zlepšil. Pro žádný z těchto parametrů však nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými skupinami.

Studie BOOST ukázala, že intrakoronární implantace BMC je bezpečná metoda, 6 měsíců po implantaci došlo k signifikantně většímu nárůstu LVEF v porovnání s kontrolou, nicméně tato signifikance se vytratila po 18 měsících a nebylo tak potvrzeno, že jediná dávka BMC může vyvolat dlouhodobé zlepšení funkce levé komory. Analýza srdeční funkce v čase však ukázala

signifikantně vyšší rychlost zlepšování srdeční funkce u léčené skupiny v porovnání s kontrolou.

Ačkoli tato studie nebyla koncipována k posouzení mechanismu, kterým dochází ke změně srdeční funkce, zjištění, že implantace BMC neredukovala pozdní zvýraznění kontrastem, svědčí proti možnosti, že by implantace vedla k podstatné tvorbě nové myokardiální tkáně. Implantace BMC navíc neměla signifikantní dopad na vývoj LVEDV, což znamená, že i efekt na poinfarktovou remodelaci je omezený.

- **Implantace autologních myoblastů při ischemické kardiomyopatii (MAGIC): První randomizovaná placebem kontrolovaná studie transplantace myoblastů.<sup>7</sup>**

Cílem studie MAGIC bylo ověřit, nakolik je implantace autologních myoblastů kosterního svalstva efektivní a arytmogenní.

Studie byla provedena multicentricky, randomizovaně, dvojitě slepě a s kontrolou placebem. Byla provedena na pacientech s dysfunkcí levé komory (LVEF  $\leq$  35%), infarktem myokardu a indikací ke chirurgickému výkonu na koronárních tepnách (CABG). Tito pacienti byli rozděleni do tří skupin, kde první a druhé skupině byly implantovány SM v rozdílném množství (400 milionů (33 pacientů) nebo 800 milionů (34 pacientů) SM). Třetí skupina byla kontrolní. Implantace byla provedena intramyokardiálně do oblasti jizvy a kolem ní přibližně 30 vpichy.

Poté byli pacienti 6 měsíců sledováni, echokardiograficky vyšetřováni, přičemž byly hodnoceny parametry srdeční funkce (LVEF, návrat kontrakce myokardu v dříve akinetických segmentech, objemy levé komory, funkční zařazení dle NYHA) a byly sledovány hlavní kardiovaskulární nežádoucí události (úmrtí,

IM, městnavé srdeční selhání, nutnost resuscitace, CMP, arytmie).

Výsledky: Počáteční počet akinetických segmentů v jednotlivých skupinách byl 97 (kontroly), 93 (nízká dávka) a 98 (vysoká dávka). Procento pacientů, u kterých došlo během 6 měsíců ke zlepšení kinetiky alespoň v jednom segmentu, bez zhoršení kinetiky v segmentu jiném, se mezi jednotlivými skupinami signifikantně nelišilo – 48% v kontrolní skupině, 35% ve vysokodávkové skupině a 40% v nízkodávkové skupině. Také změna WMSI nebyla signifikantně rozdílná mezi skupinami. LVEF na počátku nebyla mezi skupinami signifikantně rozdílná a ve všech skupinách vzrostla během 6 měsíců v obdobném rozsahu.

Naproti tomu se mezi skupinami v průběhu času vyvinul signifikantní rozdíl v komorových objemech. Na počátku nebyl signifikantní rozdíl mezi skupinami v LVEDV, po 6 měsících však tento objem vzrostl v kontrolní skupině, zatímco v nízkodávkové skupině poklesl a ve vysokodávkové skupině poklesl ještě výrazněji. Změny LVESV byly obdobné.

Procento pacientů, u nichž se třída NYHA zlepšila o 1 stupeň se mezi skupinami signifikantně nelišilo, stejně tak se nelišilo subjektivní vnímání kvality života dle dotazníku SF-36.

Kritéria bezpečnosti implantace nevykazovala signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami.

Tyto výsledky neprokazují pozitivní vliv implantace SM na vývoj srdeční funkce u pacientů se závažnou ischemickou chorobou srdeční. Zajímavé je ale zjištění, týkající se vlivu implantace na vývoj LVEDV a LVESV. Ačkoli neexistoval signifikantní rozdíl ve výskytu nežádoucích účinků po implantaci SM, byl výskyt arytmií dvakrát vyšší v obou léčených skupinách oproti skupině kontrolní (nízkodávková léčba 4%, vysokodávková léčba 5%, kontroly 2% pacientů s komorovými arytmiemi

v průběhu 6 měsíců) a je tedy, dle autorů studie, nutné přistupovat k těmto údajům opatrně a ověřit riziko arytmí a dalších faktorů týkajících se bezpečnosti implantace na větší skupině.

**• Transplantace autologních myoblastů kosterního svalstva u pacientů s neuktním infarktem myokardu: 1 rok trvající sledování.<sup>8</sup>**

Autoři studie sledovali proveditelnost a bezpečnost intramyokardiální implantace SM v průběhu CABG u pacientů s chronickým, více než 4 týdny starým, infarktem myokardu. Byla provedena na 12 pacientech, u kterých byla po CABG a implantaci autologních SM echokardiograficky zkoumána regionální a globální srdeční funkce. Před implantací, 3 a 12 měsíců po ní bylo provedeno PET vyšetření k posouzení viability a prokrvení myokardu. Pro srovnání byla vytvořena referenční skupina ze 14 dříve operovaných pacientů. V charakteristice zkoumané a referenční skupiny neexistovaly signifikantní rozdíly.

Buňky byly implantovány několika subepikardiálními injekcemi v místě infarktu a v jeho okolí.

Výsledky: Viabilita myokardu před operací byla u zkoumané skupiny posouzena PET a zátěžovou echokardiografií dobutaminem. V referenční skupině byla provedena pouze zátěžová echokardiografie. 12 měsíců po operaci bylo ve zkoumané skupině zjištěno signifikantní zlepšení ejekční frakce, WMSI a došlo ke zmenšení objemů levé komory. Také byl signifikantní rozdíl ve změně kontraktility segmentů, v nichž byla provedena implantace, oproti segmentům, kde implantace provedena nebyla. V referenční skupině nebyly změny LVED, objemů levé komory či WMSI signifikantní. Rozdíly v LVEF a objemech levé komory mezi oběma skupinami byly po 12

měsících signifikantní. Hodnoty získané echokardiografickým vyšetřením ukazuje následující tabulka.

| <b>Tab. 11</b>                  | <b>Před operací</b> | <b>3 měsíce po operaci</b> | <b>12 měsíců po operaci</b> |
|---------------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>Globální WMSI</b>            |                     |                            |                             |
| Referenční skupina              | 2,1                 |                            | 2,02                        |
| Skupina po implantaci           | 1,8                 | 1,25                       | 1,15                        |
| <b>WMSI léčených segmentů</b>   |                     |                            |                             |
| Referenční skupina              | 2,99                |                            | 2,82                        |
| Skupina po implantaci           | 3,02                | 1,64                       | 1,36                        |
| <b>WMSI neléčených segmentů</b> |                     |                            |                             |
| Referenční skupina              | 1,65                |                            | 1,55                        |
| Skupina po implantaci           | 1,29                | 1,05                       |                             |
| <b>LVEF</b>                     |                     |                            |                             |
| Referenční skupina              | 33,6                |                            | 38,6                        |
| Skupina po implantaci           | 35,6                |                            | 55,1                        |

Vyšetření PET bylo provedeno pouze ve skupině léčené SM. Vychytávání  $^{18}\text{F}$ -FDG bylo signifikantně vyšší po třech a 12 měsících, v porovnání s vyšetřením před operací. Rozdíl viability byl ještě výraznější, když byly hodnoceny pouze segmenty ošetřené implantací. Vyšetření perfúze pomocí  $^{13}\text{N}$ -amoniaku ukázalo signifikantní zlepšení po 12 měsících, nikoli však po 3. Podobně jako při hodnocení viability, i v perfúzi byly změny nejvíce vyjádřeny v ošetřených segmentech.

Bylo tedy zjištěno, že intramyokardiální implantace SM, jako adjuvantní terapie při CABG, je proveditelná a bezpečná a je spojena se zlepšením LVEF a zvýšením viability a perfúze neviabilního myokardu. Nicméně tento pozitivní efekt není jednoznačný, protože nelze s jistotou určit, do jaké míry je dán vlastní operací CABG, která byla provedena ve stejné oblasti, jako implantace. K potvrzení by bylo nutné uskutečnit randomizovanou studii s kontrolou.

- **Porovnání účinku intrakoronárního podání G-CSF mobilizovaných kmenových buněk periferní krve (PBSC) na funkci a remodelaci levé komory u pacientů s akutním infarktem myokardu vůči pacientům s infarktem myokardu staršího data (studie MAGIC Cell-3-DES).<sup>9</sup>**

Tato studie byla provedena k posouzení bezpečnosti intrakoronárního podání PBSC a k porovnání účinku této léčby u dvou skupin pacientů – pacientů s akutním infarktem myokardu (AMI) a pacientů s infarktem staršího data (OMI).

U všech pacientů do studie zařazených byla provedena úspěšná revaskularizace stentem uvolňujícím léky (DES). Poté byli pacienti náhodně rozděleni do skupin. U pacientů ve skupině AMI byla implantace provedena do 14 dnů (v průměru  $4,0 \pm 3,1$  dnů) od vzniku infarktu, u pacientů skupiny OMI pak byly buňky implantovány po více než 14 dnech (v průměru  $514 \pm 524$  dnů). K oběma léčeným skupinám byly vytvořeny také skupiny kontrolní.

V průběhu 6 měsíců byly hodnoceny změny LVEF pomocí MRI, změny objemů levé komory, změny prokrvení myokardu a výskyt hlavních nežádoucích účinků na kardiovaskulární systém (úmrtí, IM, nutnost revaskularizace, hospitalizace pro zhoršení ischemie či srdečního selhávání).

Výsledky: V průběhu sledování nebyl zjištěn zvýšený výskyt kardiovaskulárních nežádoucích účinků v léčených skupinách oproti neléčeným.

Změny LVEF ve skupině léčené časně po IM byly signifikantně vyšší v porovnání s kontrolou. Také v této skupině došlo k signifikantně vyššímu poklesu LVESV a k zmenšení objemu infarktového ložiska v porovnání s kontrolou. Ve skupině léčené ve větším časovém odstupu od vzniku IM nebyly zaznamenány signifikantní změny.

CFR (rezervní průtok koronárními tepnami) měřený v postižené tepně byl po 6 měsících signifikantně vyšší jednak ve skupině časně léčené v jí příslušné kontrolní skupině. U pozdně léčených skupin byl nárůst CFR signifikantní pouze u pacientů po implantaci buněk, nikoli u pacientů kontrolních. Následující tabulka shrnuje naměřené hodnoty na počátku a konci studie.

| Tab. 12             | Časně léčená skupina  |               |                   |               | Pozdně léčená skupina |               |                   |               |
|---------------------|-----------------------|---------------|-------------------|---------------|-----------------------|---------------|-------------------|---------------|
|                     | Skupina po implantaci |               | Kontrolní skupina |               | Skupina po implantaci |               | Kontrolní skupina |               |
|                     | Na počátku            | Po 6 měsících | Na počátku        | Po 6 měsících | Na počátku            | Po 6 měsících | Na počátku        | Po 6 měsících |
| LVEF (%)            | 52,0±9,9              | 57,1±8,7      | 53,2±13,3         | 53,1±11,5     | 48,5±12,9             | 48,5±12,7     | 45,1±10,2         | 45,3±11,0     |
| LVEDV (ml)          | 143,1±27,2            | 146,5±27,6    | 129,8±28,0        | 139,9±42,7    | 171,0±54,0            | 176,2±48,9    | 171,3±54,6        | 173,4±47,8    |
| LVESV (ml)          | 69,0±21,5             | 63,5±20,3     | 62,7±30,9         | 69,2±38,0     | 90,9±44,8             | 94,5±45,2     | 96,0±36,7         | 97,4±38,1     |
| Objem infarktu (ml) | 40,5±16,8             | 28,0±16,8     | 45,5±30,5         | 46,3±32,3     | 44,8±29,5             | 39,3±22,8     | 43,2±29,8         | 44,7±35,0     |
| CFR                 | 1,59±0,55             | 2,48±0,63     | 1,60±0,42         | 2,35±0,58     | 1,97±0,60             | 2,70±0,88     | 1,94±0,72         | 2,10±0,80     |

Šest měsíců po implantaci tedy došlo k signifikantnímu zlepšení funkce levé komory u časně léčených pacientů. U pozdně léčených k takovému významnému zlepšení nedošlo, ačkoli u nich došlo k zlepšení koronárního průtoku. Také využití léky uvolňujících stentů v kombinaci s podáním G-CSF v této studii se ukázalo jako bezpečné a nevedlo k zvýšené náchylnosti k restenózám.

**• Dlouhodobý efekt intrakoronární implantace autologních mononukleárních buněk kostní dřeně po akutním infarktu myokardu: randomizovaná studie s kontrolou ASTAMI.<sup>10</sup>**

Do studie ASTAMI bylo zařazeno 100 pacientů s prvním STEMI léčeným PCI. Pacienti byli náhodně rozděleni na dvě skupiny - jedné kontrolní a druhé, které byly 4- 8 dní po infarktu intrakoronárně podány mononukleární buňky. Poté byly

hodnoceny změny LVEF, změny kapacity pro zátěž a kvalita života. Současně byla hodnocena bezpečnost léčby. Echokardiografické vyšetření bylo provedeno na počátku studie a poté ve 3., 6. a 12. měsíci a po třech letech, vyšetření MRI bylo provedeno 2-3 týdny po implantaci, a dále 6 měsíců a 3 roky po ní.

Výsledky: Míra výskytu nežádoucích kardiovaskulárních projevů se mezi oběma skupinami nelišila a byla nízká. V průběhu tří let nebyly echokardiograficky zjištěny signifikantní rozdíly ESV, EDV, LVEF či WMSI mezi oběma skupinami. Obdobné výsledky dala také magnetická rezonance, která navíc neukázala signifikantní rozdíl ve velikosti infarktu mezi skupinou léčenou a kontrolní.

Při zátěžovém vyšetření nebyly 2-3 týdny po implantaci meziskupinové rozdíly. 3 roky po implantaci však byl v léčené skupině zjištěn vyšší nárůst doby možné zátěže (1,5 minuty v léčené skupině oproti 0,6 minuty ve skupině kontrolní). Změny  $VO_2$  (spotřeba kyslíku),  $VE/VCO_2$  (poměr ventilace k produkci  $CO_2$ ) či OUES (oxygen uptake efficiency slope) se však mezi skupinami signifikantně nelišily.

Implantace mononukleárních buněk kostní dřeně nevedla ke zlepšení LVEF v průběhu tří let, ačkoli v léčené skupině došlo ke středně velkému zlepšení doby zátěže. Současně nebyl prokázán zvýšený výskyt nežádoucích projevů po implantaci.

**• Intrakoronární implantace progenitorových buněk kostní dřeně po akutním infarktu myokardu (studie REPAIR-AMI; reinfusion of enriched progenitor cells and infarct remodeling in acute myocardial infarction).<sup>11</sup>**

Studie REPAIR-AMI byla dvojitě slepá, randomizovaná, placebem kontrolovaná studie, do které bylo zařazeno 204



pacientů po infarktu myokardu. U nich bylo zjišťováno, zda intrakoronární implantace progenitorových buněk kostní dřene (heterogenní populace z hematopoetických, mezenchymálních, mononukleárních a dalších progenitorových buněk) vede ke zlepšení srdeční funkce.

Pacienti byli rozděleni na dvě skupiny. Jedné byly podány progenitorové buňky (101 pacientů), druhé bylo podáno placebo (103 pacientů). U pacientů bylo provedeno angiografické vyšetření v době implantace a 4 měsíce po ní a byly určeny LVEF, objemy levé komory a regionální pohyblivost infarktového ložiska. Dále byl sledován výskyt možných nežádoucích projevů terapie (úmrť, IM, nutnost revaskularizace, hospitalizace pro srdeční selhání).

Výsledky: Během 4 měsíců došlo k signifikantně vyššímu nárůstu LVEF u léčené skupiny (z  $48,3 \pm 9,2\%$  na  $53,8 \pm 10,2\%$ , nárůst o 4,5%) oproti skupině kontrolní (z  $46,9 \pm 10,4\%$  na  $49,9 \pm 13,0\%$ , nárůst o 2,5%). Vyšetření dále ukázalo signifikantně vyšší zlepšení regionální kontraktility u léčené skupiny oproti kontrole. Enddiastolické objemy levé komory se v obou skupinách lehce zvýšily, endsystolické objemy zůstaly nezměněné u léčené skupiny, zatímco u kontrolní skupiny se zvýšily. Absolutní hodnota změny LVESV byla signifikantně odlišná mezi oběma skupinami.

Také byl odhalen vztah mezi mírou změny LVEF a její počáteční hodnotou. U pacientů s počáteční hodnotou LVEF nižší či rovnou mediánu byl nárůst LVEF po čtyřech měsících trojnásobný v léčené skupině oproti skupině kontrolní (7,5% oproti 2,5%). U pacientů s počáteční hodnotou LVEF vyšší než medián byl rozdíl v nárůstu LVEF mezi oběma skupinami pouze 0,3% (4,0% u léčené skupiny oproti 3,7% u kontrol).

Dále byla objevena závislost mezi načasováním implantace a nárůstem LVEF během 4 měsíců. Příznivý efekt implantace se projevil pouze u pacientů, u nichž byl tento výkon proveden 4 a více dnů po reperfúzi. Implantace buněk 5 a více dní po reperfúzi byla spojena s absolutním nárůstem LVEF o 5,1% (u kontrol  $1,9 \pm 7,6\%$ , u léčené skupiny  $7,0 \pm 7,7\%$ ). Implantace provedená do 4. dne od reperfúze nebyla spojena s přínosem pro LVEF ( $3,9 \pm 5,4\%$  v kontrolní skupině,  $4,5 \pm 6,8\%$  v léčené skupině).

Nežádoucí klinické projevy za hospitalizace, po 4 a po 12 měsících se na úrovni jednotlivých sledovaných projevů signifikantně nelišily. Nicméně kombinovaná incidence infarktu myokardu, nutnosti revaskularizace či úmrtí byla signifikantně nižší u skupiny léčené progenitorovými buňkami.

Tato studie tedy ukázala pozitivní efekt implantace progenitorových buněk kostní dřeně na srdeční funkci, s tím, že tento efekt byl výraznější u pacientů s větším poškozením srdeční funkce.

**• Vliv načasování intrakoronární transplantace autologních kmenových buněk kostní dřeně na účinek a bezpečnost této léčby po infarktu myokardu: analýza randomizovaných klinických studií s kontrolou.<sup>12</sup>**

Autoři tohoto článku porovnávali výsledky studií zveřejněných mezi lety 1990-2007 na portálech PubMed, MEDLINE a Cochrane Evidence-Based Medicine. Vybírány byly randomizované klinické studie s minimálně 3 měsíce trvajícím sledováním pacientů po intrakoronární implantaci kmenových buněk kostní dřeně. Byly pak porovnány výsledky studií, kde byla implantace provedena časně (do 24 hodin od vzniku infarktu), se studiemi, kde byla implantace provedena mezi 4-7 dnem od vzniku infarktu.

Analyzovány byly následující studie:

S implantací do 24h: Janssens et al. – Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (2006), Ge et al. – TCT-STAMI (2006), Yao et al. – Observation on the safety: clinical trial on intracoronary autologous mononuclear cells transplantation for acute myocardial infarction (2006).

S implantací mezi 4-7 dnem: Schachinger et al. – REPAIR-AMI (2006), Wollert et al. – BOOST (2004), Meyer et al. – BOOST (2006), Lunde et al. – ASTAMI (2006), Suarez et al. – Regenerative therapy in patients with a revascularized acute anterior myocardial infarction and depressed ventricular function (2007).

Výsledkem analýzy bylo zjištění, že implantace provedená 4-7 dnů po infarktu vede k signifikantnímu zlepšení LVEF, zmenšení LVESV, snižuje nutnost revaskularizace, snižuje výskyt nového IM či úmrtí, omezuje tendenci k restenóze v postižené tepně a snižuje výskyt komorových arytmií. Změny těchto parametrů po časně implantaci nebyly statisticky signifikantní. Implantace provedená s odstupem 4-7 dnů je tedy z těchto hledisek účinnější.

## 5. Nežádoucí účinky buněčné implantace

Při posuzování výsledků tohoto potenciálně nového terapeutického postupu je nezbytné sledovat také výskyt možných nežádoucích účinků.

Řada studií provedených na zvířatech neukázala, že by buněčná terapie byla spjata s nežádoucími projevy na organismus. Tento poznatek posloužil jako odrazový můstek pro následující klinické studie.

Hypoteticky je uvažováno několik způsobů, kterými by buněčná terapie mohla vést k poškození organismu. Intrakoronární způsob podání kmenových buněk by mohl vést k obstrukci koronárních tepen a dále poškozovat myokard. Klinické studie zkoumající efekt intrakoronárního podání BMMNC či MSC však ukázaly tento způsob aplikace jako bezpečný.<sup>14</sup>

Také možný vznik tumorů z implantovaných buněk je další obavou výzkumných týmů. Tvorba novotvarů, ať již angiomů, myomů či myosarkomů, dosud také nebyla v klinických studiích zaznamenána. Je však nutné pečlivě analyzovat transplanted buňky, aby tak byl odhalen jejich případný maligní potenciál.<sup>14</sup>

Další možnou komplikací této terapie by mohlo být zavlečení infekčního agens do organismu v průběhu implantace. Kontaminované buňky vnesené do myokardu by mohly vyvolat závažné infekční komplikace (endokarditida, myokarditida). Při práci s buňkami je proto nutné dodržovat postupy, které toto riziko minimalizují.<sup>14</sup>

Významnou možnou komplikací by dále mohl být vznik arytmií.<sup>14</sup> Zvýšený výskyt ventrikulárních tachykardií byl zaznamenán v několika studiích (*konkrétně: Menasche, P. et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol, 2003, vol. 41, no. 7, p.*

1078 –1083, Smits, P. C. et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol*, 2003, vol. 42, no. 12, p. 2063–2069, Dib, N. et al. Feasibility and safety of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy. *Cell Transplant*, 2005, vol. 14, no. 1, p. 11–19, Pagani, F. D. et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans: histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol*, 2003, vol. 41, no. 5, p. 879–888) využívajících myoblasty kosterního svalstva a arytmie se v těchto studiích shodně vyskytovaly nejvíce mezi 11. a 30. dnem, a nebyly již pozorovány po delším časovém odstupu v řádu několika měsíců.<sup>13</sup>

Jelikož se dosud proběhlé klinické studie ukazují jako bezpečné, lze uvažovat o pokročení ke studiím rozsáhlejším, které by přesněji ukázaly klinický dopad této terapie.

## Závěr

V této práci zahrnuté studie a jejich výsledky nedokáží dát jednoznačnou odpověď na otázku, zda bude v budoucnu možné bránit rozvoji poinfarktové srdeční remodelace pomocí kmenových buněk.

Studie prováděné na zvířatech však v řadě případů skutečně ukázaly jistý vliv této terapie na vývoj srdeční funkce po infarktu myokardu. Navíc při těchto studiích nebyly zjištěny nežádoucí účinky, které by znemožňovaly ověřování tohoto nového terapeutického přístupu na lidech. Dá se tedy říci, že zvířecí studie ukázaly, že další klinický výzkum v této oblasti je vhodný, nicméně přesné postupy a nejvhodnější metody implantace nelze z těchto studií jednoznačně vyvodit.

Ve většině klinických studií byly dosud použity mononukleární buňky kostní dřeně či myoblasty kosterního svalstva, méně pak již byl zkoumán efekt implantace mezenchymálních kmenových buněk. Tyto studie přinesly rozporuplné a obtížně porovnatelné výsledky. Zatímco některé studie svědčily pro pozitivní efekt implantace, jiné naopak tento přídatný efekt na zlepšení srdeční funkce neprokázaly. V jiných studiích byl prokázán pozitivní vliv v prvních měsících po implantaci, který se však s postupujícím časem vytratil. Problémem většiny studií byla nedostatečná doba sledování efektu terapie. Tyto studie také ukázaly buněčnou terapii jako veskrze bezpečnou, ačkoli je nutné stále k použití této terapie přistupovat obezřetně, především v otázce možného proarytmogenního efektu této terapie, který by mohl být nejvíce vyjádřen při intramyokardiálním podání a při využití myoblastů kosterního svalstva.

Nicméně i tyto výsledky klinických studií ospravedlňují další výzkum na tomto poli, který by již s určitostí dokázal vyhodnotit, zda je tato terapie přínosem, a jaká metoda je případně nejúčinnější a pro pacienty nejbezpečnější. V další fázi tedy bude nutné provést studie na rozsáhlejších populacích s delším časovým obdobím pro sledování, s využitím celého spektra implantačních technik a implantovatelných buněk, které jsou dnes k dispozici. Tyto studie by měly být provedeny dle co možná nejshodnějších standardů tak, aby byly výsledky mezi sebou vzájemně porovnatelné.

## Souhrn

Buněčná terapie je lákavý a snad i nadějný prostředek, který by v blízké budoucnosti mohl být využit pro předcházení závažným důsledkům, jež pro srdeční sval a tedy i celý lidský organismus vyplývají z prodělaného infarktu myokardu. Podlehnutí části myokardu nekróze vyvolává ve větší či menší míře remodelaci srdeční komory, čímž dochází k progresivnímu zhoršování srdeční funkce, což může často vést až k srdečnímu selhávání. Potenciální včasná obnova viabilní srdeční tkáň implantací kmenových buněk, by měla možnost proces srdeční remodelace zastavit či zvrátit.

Implantace kmenových buněk do srdečního svalu po infarktu myokardu může být provedena různými technikami, za využití různých typů buněk a v různém časovém odstupu po prodělaném infarktu. Řada dosud proběhlých studií na zvířecích modelech ukázala, že implantace kmenových buněk má na vývoj srdeční funkce příznivý vliv, přičemž nebyl dokumentován takový výskyt nežádoucích účinků, které by vylučovaly další výzkum v podobě studií klinických.

Z klinických studií v této práci zaznamenaných nevyplývá jednoznačný závěr. Některé studie hovoří spíše ve prospěch buněčné terapie, jiné její přínos neprokázaly. Z těchto nejasných závěrů ale vyplývá potřeba dále na tomto poli systematicky pátrat tak, aby byl přínos implantace kmenových pro prevenci srdeční remodelace s určitostí potvrzen, či vyvrácen.



## **Summary**

Cell therapy is a tempting and possibly promising therapeutic approach, which could be used in the near future to prevent the serious health effects on the heart and thus on the whole human organism resulting from myocardial infarction. The portion of the heart afflicted by infarction disrupts the architecture of the heart chamber as a whole and causes it to undergo the process of remodeling in a less or more pronounced manner. This process leads to progressive deterioration of the heart function, which may eventually lead to heart failure. The potential regeneration of a viable heart tissue by stem cells implantation would have the means of ceasing or reverting this harmful process.

The introduction of stem cells into the heart tissue following a myocardial infarction can be achieved by several different techniques, using various cell types and in various time intervals after the occurrence of myocardial infarction. So far, a number of studies using animal models of myocardial infarction, have shown that the stem cells implantation has a favorable effect on the restoration of heart function, while not showing such occurrence of adverse effects that would exclude further investigation in the form of clinical studies.

The clinical studies described in this work do not allow to make a definite conclusion. Some of the studies are rather in favor of cell therapy, while other did not support its benefit. It is therefore necessary to methodically continue with the investigations in order to definitely confirm or disprove the potential benefit of stem cells implantation in preventing the heart remodeling.

## Seznam použité literatury

1. Krause, K. et al. Percutaneous intramyocardial stem cell injection in patients with acute myocardial infarction. First-in-man study. *Heart*, 2009, vol. 95, no. 14, p. 1145-1152
2. Chen, SL. 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, vol. 94, no. 1, p. 92-95
3. Tendera, M. et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+ CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre myocardial regeneration by intracoronary infusion of selected population of stem cells in acute myocardial infarction (REGENT) trial. *Eur Heart J*, 2009, vol. 30, no. 11, p. 1313-1321
4. Assmus, B. et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*, 2002, vol. 106, no. 24, p. 3009-3017
5. Choi, JH. et al. Lack of additional benefit of intracoronary transplantation of autologous peripheral blood stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Circ J*, 2007, vol. 71, no. 4, p. 486-494
6. Meyer, G. P. et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*, 2006, vol. 113, no. 11, p. 1287-1294
7. Menasché, P. et al. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized

- placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*, 2008, vol. 117, no. 9, p. 1189-1200
8. Gavira, J. J. et al. Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006, vol. 131, no. 4, p. 799-804
  9. Kang, HJ. et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: The MAGIC cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation*, 2006, vol. 114, no. 1, p. 145-151
  10. Beitnes, J. O. et al. Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomised, controlled study. *Heart*, 2009, vol. 95, no. 24, p. 1983-1989
  11. Schächinger, V. et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006, vol. 355, no. 12, p. 1210-1221
  12. Zhang, S. et al. Impact of timing on efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: A pooled subgroup analysis of randomized controlled trials. *Clin Cardiol*, 2009, vol. 32, no. 8, p. 458-466
  13. Oettgen, P. et al. Cardiac stem cell therapy: need for optimization of efficacy and safety monitoring. *Circulation*, 2006, vol. 114, no. 4, p. 353-358
  14. Boyle, A. J. et al. Stem cell therapy for cardiac repair – ready for the next step. *Circulation*, 2006, vol. 114, no. 4, p. 339-352
  15. Pfeffer, M. A., Braunwald, E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*, 1990, vol. 81, no. 4, p. 1161-1172

16. Sutton, M. G., Sharpe, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: Pathophysiology and therapy. *Circulation*, 2000, vol. 101, no. 25, p. 2981-2988
17. Lee, M. S., Makkar, R. R. Stem-cell transplantation in myocardial infarction: A status report. *Ann Intern Med*, 2004, vol. 140, no. 9, p. 729-737
18. Amado, L. C. et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, vol. 102, no. 32, p. 11474-11479
19. Amado, L. C. et al. Multimodality noninvasive imaging demonstrates in vivo cardiac regeneration after mesenchymal stem cell therapy. *J Am Coll Cardiol*, 2006, vol. 48, no. 10, p. 2116-2124
20. Scorsin, M. et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000, vol. 119, no. 6, p. 1169-1175
21. Ghostine, S. et al. Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation*, 2002, vol. 106, no. 12, p. 131-136
22. Kawamoto, A. et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, vol. 103, no. 5, p. 634-637
23. Zhang, X. et al. Combined transplantation of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells into a rat model of isoproterenol-induced myocardial injury. *Arch Cardiovasc Dis*, 2008, vol. 101, no. 5, p. 333-342
24. Müller-Ehmsen, J. et al. Rebuilding a damaged heart: Long term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation*, 2002, vol. 105, no. 14, p. 1720-1726

25. Li, YS. et al. Transplantation of neonatal cardiomyocytes plus fibrin sealant restores myocardial function in a rat model of myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)*, 2007, vol. 120, no. 22, p. 2022-2027
26. Kamihata, H. et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*, 2001, vol. 104, no. 9, p. 1046-1052
27. Hou, D. et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery. *Circulation*, 2005, vol. 112, no. 9, p. 150-156
28. Moscoso, I. et al. Analysis of different routes of administration of heterologous 5-azacytidine-treated mesenchymal stem cells in a porcine model of myocardial infarction. *Transplant Proc*, 2009, vol. 41, no. 6, p. 2273-2275