

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



**Regenerace myokardu po intrakoronární aplikaci mononukleárních
buněk kostní dřeně u pacientů s akutním infarktem s opožděnou reperfuzí
a dysfunkcí levé komory**

Myocardial regeneration after intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction and late reperfusion

Doktorandská disertační práce

MUDr. Skalická Hana

Školitel: MUDr. Jan Horák, CSc.

Praha 2010

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 30.09.2010

MUDr. Hana Skalická

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli MUDr. J. Horákovi CSc., za odborné vedení, rady a pomoc po celou dobu mého postgraduálního studia. Dále bych ráda poděkovala přednostovi II. interní kliniky kardiologie a angiologie Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty University Karlovy prof. MUDr. A. Linhartovi, DrSc. za podporu v úsilí dokončit disertační práci. Nelze opomenout rovněž na prof. MUDr. M. Aschermann, DrSc., a Doc. MUDr. Palečka PhD. Ráda bych poděkovala všem kolegům a kolegyním, se kterými jsem se po dobu postgraduálních studií setkala a kteří měli pro mou práci pochopení. Poděkování patří i moji rodině za toleranci mé práce po večerech a víkendech.

Obsah

1	Úvod.....	9
1.1	Akutní infarkt myokardu s ST elevacemi.....	9
1.1.1	Patofyziologický průběh změn v myokardu na celulární úrovni	11
1.1.2	Rozsah postižení myokardu při STEMI	12
1.2	Remodelace levé komory po infarktu myokardu	13
1.2.1	Definice	13
1.2.2	Patofyziologie poinfarktové remodelace.....	14
1.2.3	Fáze poinfarktové remodelace.....	16
1.3	Vlastní regenerační schopnost myokardu.....	19
1.4	Možnost ovlivnění progresu remodelace levé komory a srdečního selhání	20
1.5	Terapie STEMI, srdečního selhání a remodelace levé komory	20
1.6	Nekonvenční možnosti léčby kmenovými buňkami po infarktu myokardu.....	22
1.7	Kmenové buňky.....	23
1.7.1	Rozdělení a typy kmenových buněk	24
1.8	Rozdělení kmenových buněk dle možnosti jejich využití:	28
1.9	Mechanismus účinku kmenových buněk.....	29
1.10	Množství aplikovaných buněk	30
1.11	Výběr metody aplikace kmenových buněk	30
1.12	Načasování podání KB po STEMI	32
1.13	Racionále studie v době jejího zahájení.....	33
2	Cíle práce.....	35
2.1	Pracovní hypotéza.....	36
2.2	Cílové ukazatele	37

3	Metodika.....	38
3.1	Druh studie	38
3.2	Soubor pacientů	38
3.3	Vstupní kritéria	38
3.4	Vyřazující kritéria.....	39
3.5	Randomizace	40
3.6	Design studie a načasování implantace kmenových buněk.....	40
3.7	Odběr, zpracování kmenových buněk	43
3.8	Zpracování kostní krve a příprava suspense jaderných buněk	45
3.9	Intrakoronární aplikace mononukleárních buněk kostní dřeně	46
3.10	Elektrokardiografie a hodnocení EKG křivky	47
3.11	Ambulantní monitorování dle Holtera	47
3.12	Echokardiografické vyšetření	48
3.12.1	Rozměry levé komory	49
3.12.2	Hmotnost levé komory, relativní tloušťka stěny LK	50
3.12.3	Endsystolický a enddiastolický objem LK.....	51
3.12.4	Systolická funkce levé komory	52
3.12.5	Hodnocení regionální kontraktility LK.....	53
3.12.6	Hodnocení diastolické funkce:	54
3.12.7	Velikost levé síně	56
3.12.8	Velikost pravostranných oddílů	56
3.12.9	Hodnocení chlopenních vad	58
3.13	Dobutaminová echokardiografie.....	59
3.14	Kontrolní koronarografie	60
3.15	Vyšetření myokardiální viability pomocí SPECTu	61

3.16	Kvalita života	62
3.17	Statistická analýza.....	63
4	Výsledky.....	64
4.1	Vstupní charakteristika souboru	65
4.2	Akutní katetrizační vyšetření, perkutánní koronární angioplastika při akutním STEMI.....	66
4.3	Vývoj v laboratorních nálezech se zaměřením na krevní obraz, biochemii a zánětlivé parametry.....	70
4.4	Hodnoty krevního tlaku a tepové frekvence.....	72
4.5	Vývoj EKG změn	73
4.6	Načasování buněčné aplikace	74
4.7	Množství aplikovaných buněk.....	75
4.8	Bezpečnost implantace BMNCs.....	76
4.8.1	Krátkodobé sledování (4 měsíce).....	76
4.8.2	Dlouhodobé sledování (24 měsíců).....	79
4.9	Echokardiografické hodnocení remodelačních změn.....	82
4.9.1	Vliv poinfarktové remodelace na změnu velikosti levé komory.....	82
4.9.2	Hodnocení velikosti levé komory	82
4.9.3	Rozměrové hodnocení.....	83
4.9.4	Hmotnost levé komory	87
4.9.5	Hodnocení změn objemů levé komory.....	88
4.9.6	Hodnocení systolické funkce levé komory	91
4.9.7	Frakční zkrácení	93
4.10	Dobutaminová echokardiografie – hodnocení viability myokardu	95
4.11	Změny chlopenního aparátu (změny morfologické a hemodynamické).....	96

4.12	Diastolická funkce – její charakter a změna během 24 měsíčního sledování.....	97
4.13	Změna velikosti levé síně.....	100
4.14	Hodnocení vlivu remodelace levé komory na pravostranné srdeční oddíly	102
4.15	Hodnocení velikosti infarktového ložiska.....	104
4.16	Kvalita života	105
5	Diskuze.....	107
5.1.1	Způsob aplikace.....	108
5.1.2	Typ aplikovaných buněk	109
5.1.3	Množství aplikovaných kmenových buněk.....	112
5.1.4	Načasování aplikace BMNCs:	113
5.2	Bezpečnost intrakoronární aplikace BMNCs	115
5.3	Krátkodobé sledování	116
5.4	Dlouhodobý efekt terapie kmenovými buňkami:	120
5.5	Poinfarktová remodelace levé komory	121
5.5.1	Diastolická funkce levé komory po akutním infarktu myokardu.....	122
5.5.2	Změna velikosti levé síně a mitrální regurgitace.....	124
5.6	Efekt na kvalitu života.....	124
5.7	Limitace studie	125
6	Závěr.....	127
7	Literatura	128
8	Seznam zkratk	144
9	Seznam tabulek	146
10	Seznam grafů.....	149
12	Seznam publikací autora	154
12.1	Publikace s IF in extenso, které jsou ve vztahu k tématu dizertační práce	154

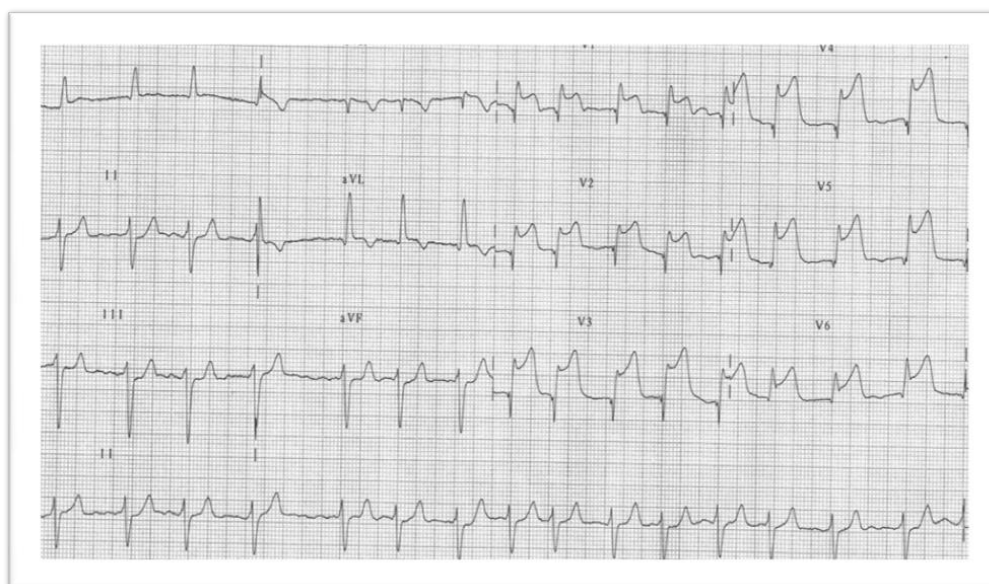
12.2	Publikace bez IF in extenso, které jsou ve vztahu k tématu dizertační práce	154
12.3	Publikace s IF in extenso, bez vztahu k tématu dizertační práce.....	154
12.4	Publikace bez IF in extenso, bez vztahu k tématu dizertační práce.....	155
12.5	Abstrakta	155
13	Přílohy	157

1 Úvod

1.1 Akutní infarkt myokardu s ST elevacemi

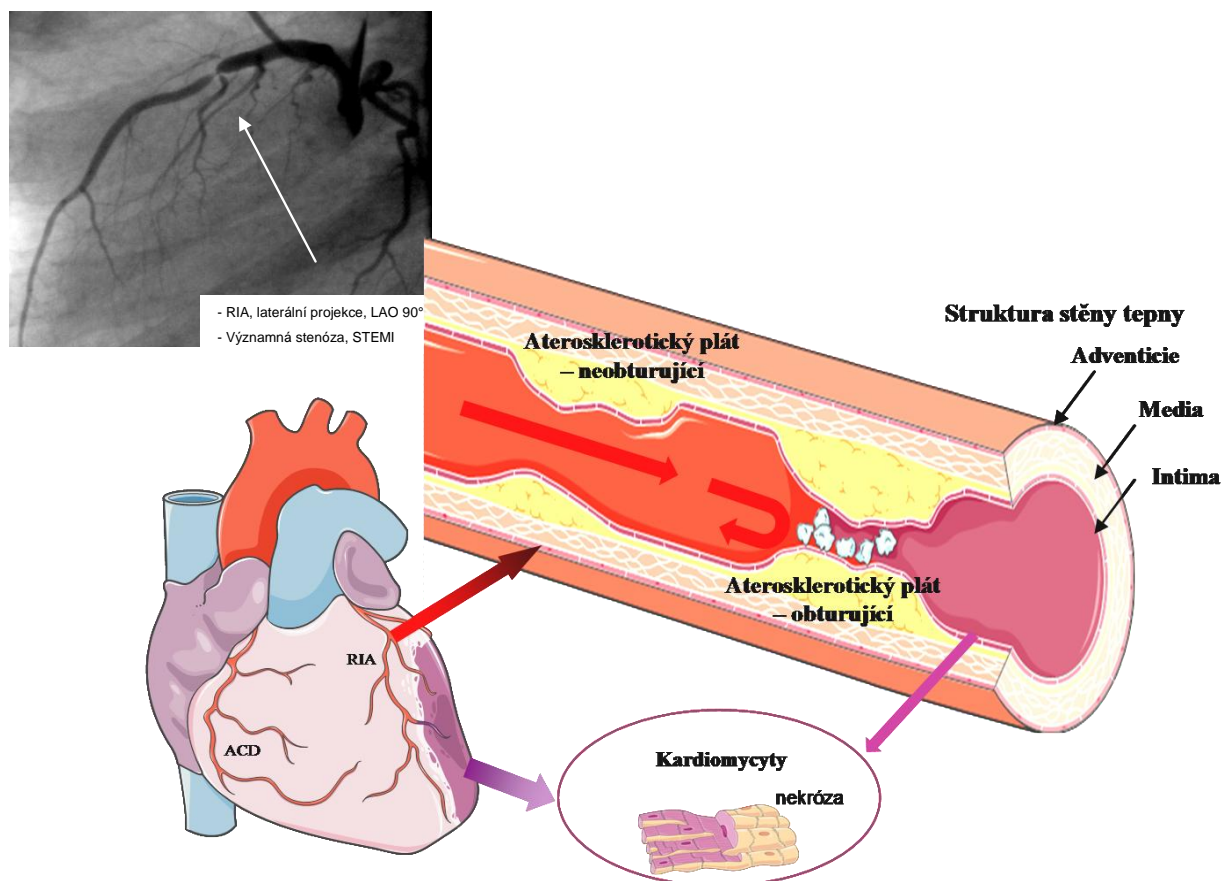
Akutní infarkt myokardu s ST elevacemi (STEMI) je dynamický, komplexně probíhající proces, při kterém dochází k omezení až přerušení perfuze myokardu. Je definovaný anamnézou infarktové bolesti, elevací kardiospecifických markerů (kreatinkinázy - CK, MB frakce kreatinkinázy - CKMB, troponinu I - TnI) a v prvních hodinách typickými elevacemi ST úseku na elektrokardiografickém vyšetření (EKG, viz obr. 1).

Obr. 1.: EKG nález - akutní anteroextenzivní infarkt myokardu s ST elevacemi.



Bez léčby se obvykle STEMI vyvine do obrazu tzv. Q infarktu. Nekrotický myokard se hojí jizvou, která je elektricky němá a na EKG je rozpoznatelná dle tzv. kmitu Q. V případě, že dojde k časně reperfuzi, bez tvorby jizvy, může přejít v příznivější formu non-Q infarktu ¹. V naprosté většině případů vzniká STEMI na podkladě koronární aterosklerózy (v 95%). V místě koronárního plátu dochází působením lokálních a systémových faktorů k ruptuře vnitřní vrstvy tepny (intimy) a obnažení subintimálních silně protrombogenních hmot. V tomto terénu se následně tvoří destičkový trombus a výsledkem je uzávěr tepny ²⁻⁴, obr. 2.

Obr. 2.: Infarkt myokardu přední stěny při aterosklerotickém postižení koronární tepny (ramus interventricularis anterior \approx RIA), nekróza kardiomyocytů za místem uzávěru tepny.



RIA- ramus interventricularis anterior, *ACD* – arteria coronaria dextra

Klinicky závažný STEMI vzniká nejčastěji v souvislosti s uzávěrem některé z hlavních epikardiálních tepen. Důsledkem děje je ireverzibilní ischemická nekróza srdečního svalu vedoucí ke ztrátě kontraktilních elementů, kardiomyocytů (buněk tvořících základní stavební jednotku myokardu).

1.1.1 Patofyziologický průběh změn v myokardu na celulární úrovni

Při akutním STEMI dochází k poškození všech 3 složek myokardu – kardiomyocytů (CM), extracelulární matrix a kapilární mikrocirkulace. Hlavní roli zde hrají především CM. Souvisí to s jejich jedinečnými vlastnostmi a schopností kontraktility. Jedná se o buňky s vysokou senzitivitou k hypoxii⁵⁻⁷, u kterých již po několika sekundách deplece kyslíku dojde k vyčerpání energetických zásob. Během následných minut trvání hypoxie se u nich rozvíjí změna ultrastruktury. Tento proces je velmi komplexní, probíhá v několika fázích v závislosti na časovém intervalu trvání infarktu. Přestavbové změny jsou primárně reverzibilní a po přibližně 20 - 40 minutách ireversibilní.

Časový průběh změn ultrastruktury myokardu se zaměřením na CM:

1. Rozsah sekund: Probíhá mírný influx vápníkových iontů do buněk, mírný eflux draslíkových iontů z buněk, destabilizuje se membránová rovnováha. Počíná snížení energetických zásob.
2. Rozsah minut: Změny v ultrastruktuře CM a jejich metabolické postupy se rozvíjí. V CM dochází ke konverzi energeticky výhodného aerobního na energeticky nevýhodný anaerobní metabolismus. Tento stav vede k depleci adenosintrifosfátu (ATP) a neefektivně se hromadí produkty metabolismu (laktát, mastné kyseliny). To podporuje vznik poruchy membránových ATP-dependentních transportérů souvisejících s napětím a rovnováhou na buněčné membráně a intracelulárními (ICT) ději. Rozvíjí se iontová dysbalance, buňka není schopná udržet membránový potenciál, dochází k úniku draslíku extracelulárně, naopak sodík a vápník se hromadí ICT. Aktivují se ICT proteolytické enzymy, které vedou k nastartování kaskádovitých procesů samonatravení buněk a k jejich zániku (nekróze). Aktivuje se exprese některých pro-apoptotických genů. V makroskopickém pohledu do 2 minut po přerušení perfuze myokardem klesá jeho kontraktilita a zhoršuje se poddajnost

v neprokrvené oblasti levé komory (LK).

3. Rozvoj klinické symptomatiky a ireversibilního poškození myokardu se zánikem CM nastává přibližně za 20-40min od okluze tepny. V místě poškození se rozvíjí zánětlivý proces s nadprodukcí prozánětlivých faktorů, tzv. cytokininová bouře. Aktivuje se produkce růstových faktorů. V první linii se jedná především o granulocytární stimulující faktor (G-CSF) a růstový faktor uvolňující se z destiček (PDGF \approx platelet derived growth factor), které přispívají ke stimulaci lymfoproliferace a rozvoji myokardiální nekrózy v místě porušené perfuze^{2, 8}. Mezi další faktory spolupodílející se na procesu patří prozánětlivé kininy jako interleukin 1, 6 (IL1, 6) a tumor necrosis faktor alfa (TNF alfa)^{9, 10}.
4. Za 8-10 hodin od infarktu postupně infiltrují ložisko fibroblasty. Jejich produkce a specifická migrace je zesilovaná endokrinní a parakrinní stimulací růstovými faktory a kininy (viz výše) a začíná tvorba fibrotické jizvy¹¹.

1.1.2 Rozsah postižení myokardu při STEMI

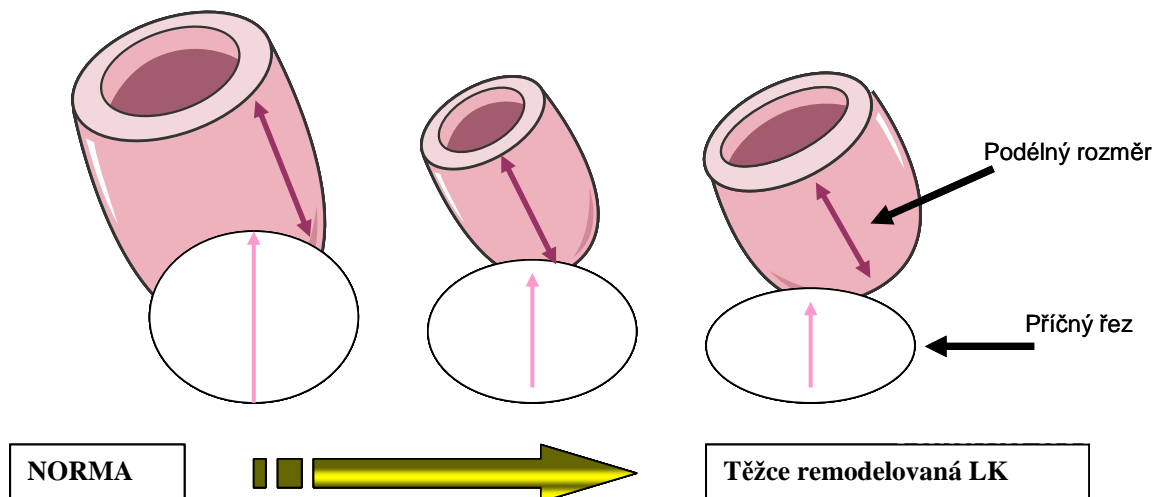
Rozsah postižení myokardu závisí na velikosti povodí infarktové tepny, délce trvání ischemie¹², dále na přítomnosti kolaterální cirkulace, předchozího ischemického zatížení myokardu¹³ a v nezanedbatelné míře i na podané léčbě¹⁴. Odhaduje se, že 1g myokardu obsahuje přibližně 20 milionů CM. Průměrně velká LK o hmotnosti 200g odpovídá čtyřem miliardám CM. Velikost infarktu myokardu, přesněji velikost nekrotického ložiska, lze definovat také procentuální ztrátou srdeční svaloviny. Méně než 10% představuje malý infarkt, 10-30% střední a nad 30% myokardu velký infarkt. V případě ztráty více než 40% buněk dochází k rozvoji kardiogenního šoku^{6, 15}. U nemocných s velkým infarktem myokardu se rozvíjí dysfunkce LK s postupným poklesem její ejekční frakce (LVEF) a změnou morfologické struktury komory a její architektiky tzv. remodelace komory^{14, 16-18}.

1.2 Remodelace levé komory po infarktu myokardu

1.2.1 Definice

Remodelace LK je v obecném pojetí definovaná jako strukturální změna komory, vzniklá v souvislosti s dlouhodobým neadekvátním tlakově-objemovým přetížením. Průběh remodelace je regulovaný mechanickými, neurohumorálními a genetickými faktory. Projevuje se změnou tvaru, velikosti (viz obr. 3) a funkce komory¹⁹.

Obr. 3.: Remodelace struktury levé komory. Dochází ke změně geometrie komory, kdy se zvětšuje její příčný rozměr a současně zmenšuje rozměr podélný.



První koncept stran patofyziologických pochodů remodelace byl publikován roku 1985, Pfefferem a spol.²⁰ s následným doplněním roku 1990 o vazbu na STEMI se zaměřením na terapeutické zásahy ovlivňující rozvinutí ireversibilní remodelace.

V dnešní době jsou nejčastěji popisovány tři možné varianty remodelačních změn:

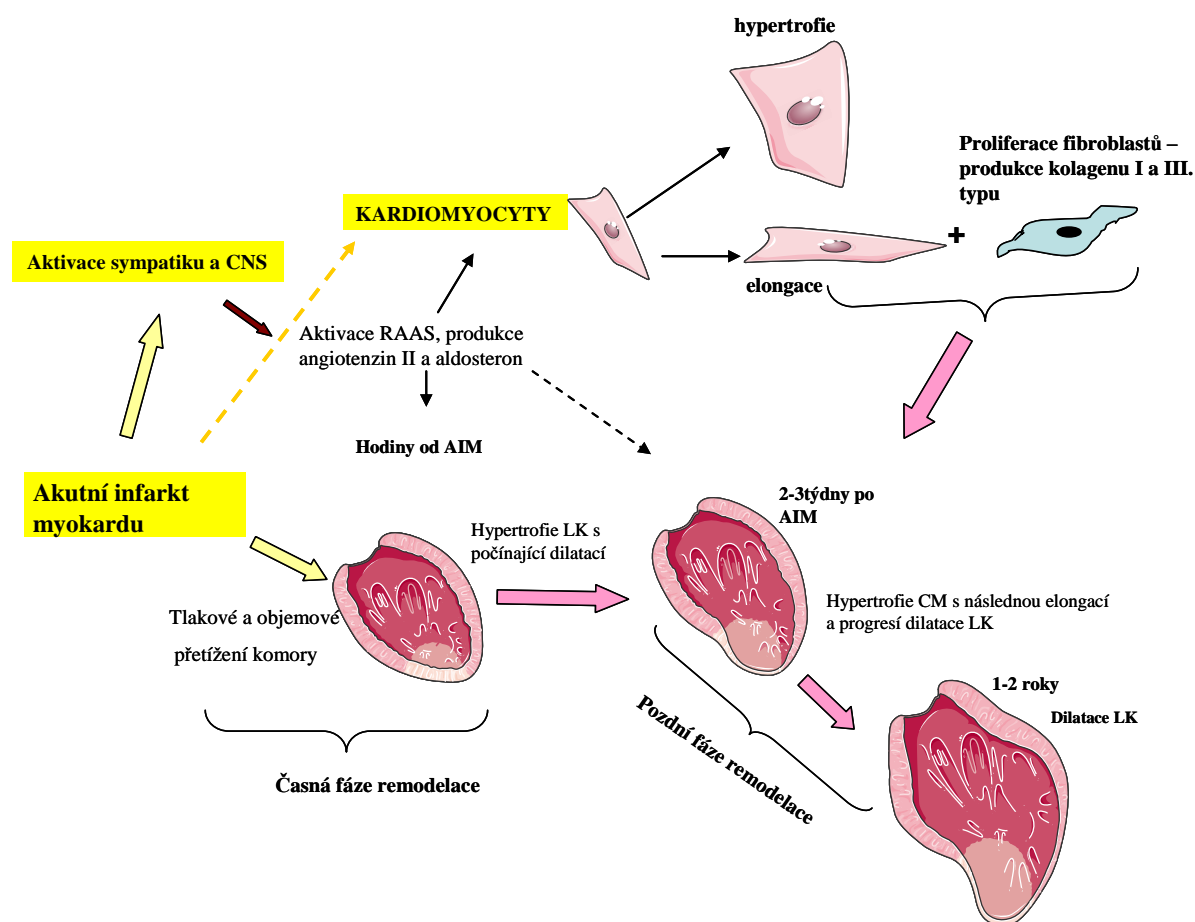
- 1) Koncentrická hypertrofie, u které je převažujícím vyvolávajícím faktorem tlakové zatížení s následnou adaptační hypertrofií CM (jejich objemovým ztluštěním a zvětšením).
- 2) Excentrická hypertrofie, vznikající jako reakce na dlouhodobé objemové přetížení s prodloužením CM a ztenčením stěny myokardu.

3) Kombinovaná remodelace, popisovaná především u nemocných se STEMI, kdy dochází jak k tlakovému přetížení v oblasti mimo infarktového ložiska, tak objemovému přetížení^{16, 18}.

1.2.2 Patofyziologie poinfarktové remodelace

Při velkém AIM dochází k rozvoji nekrózy myokardu v infarktovém ložisku²¹. Kontraktilní tkáň je nahrazená fibrotickou jizvou²², která nemá schopnost kontrakce. Při velkém ložisku postižení dochází k významné alteraci funkce komory a poklesu srdečního výdeje. Ostatní segmenty komory se snaží srdeční výdej udržet svojí hyperkontraktilitou. Mění se napětí ve stěně myokardu, LK se snaží s přetížením vyrovnat, tzv. „vybalancovat“ protichůdně působící síly^{18, 23}. Výsledkem je hypertrofie CM mimo neinfarktovou zónu^{24, 25}. Pokud komora dlouhodobě není schopná udržet dostatečný srdeční výdej, dochází k jejímu objemovému přetížení, vedoucímu ke ztenčení stěny komory v místě infarktové jizvy a dilataci podporované expanzivním chováním infarktu na podkladě apoptózy CM v periinfarktové zóně²⁶⁻³⁰, obr. 4.

Obr. 4.: Patofyziologie remodelace LK po akutním infarktu myokardu s rozvojem srdečního selhání (popis viz výše).



AIM – akutní infarkt myokardu, LK – levá komora, RAAS – renin angiotenzin aldosteronový systém

1.2.3 Fáze poinfarktové remodelace

Proces remodelace probíhá ve dvou fázích, které jsou navzájem velmi úzce spjaté a dělení je ve své podstatě uměle dané časovým intervalem. Fáze se volně prolínají a není možné jednotlivé děje striktně oddělit.

První tzv. časná fáze remodelace (do 72 hod od STEMI) představuje děj velmi úzce související se změnami při akutním STEMI. Během této doby je zóna infarktového ložiska hojně infiltrovaná zánětlivými elementy. V první linii se jedná především o neutrofilly, následované lymfocyty a makrofágy. Do ložiska migrují prakticky paralelně také fibroblasty. Ty produkují neadekvátní množství extracelulární matrix, především její hlavní komponenty kolagenu. Tvorba představuje dvoj až trojnásobné zvýšení množství kolagenu v jednotce objemu myokardu oproti normě. V této fázi lze nalézt v oblasti periinfarktové zóny tzv. zónu omráčeného myokardu. Jedná se o postischemický viabilní myokard, který je v daném časovém úseku neaktivní s alterovanou funkcí. CM jsou zde na rozhraní „života a smrti“³¹. Návrat funkce těchto CM může trvat mnoho hodin, výjimečně až dnů³¹. Závisí na mechanických a neurohumorálních podnětech. Jejich reverse k viabilitě významně ovlivňuje definitivní systolickou funkci komory. Remodelace je v této fázi iniciovaná produkcí cytokinů, transkripčních faktorů a neuromodulátorů. Jedná se jak o faktory lokální tak systémové. Pravděpodobně hlavní regulační roli v této fázi má Angiotenzin II, mezi další významné regulátory změn se řadí dále katecholaminy a aldosteron.

Druhou fází je fáze pozdní remodelace (nad 72 hodin po STEMI), navazující na děj předchozí. Může trvat několik měsíců až let. V této fázi dochází k hypertrofii a elongaci CM, dilataci komory s výslednou alterací její architektoniky a omezení její kontraktilní funkce. V zóně infarktového ložiska probíhá dokončení fibrotizace (tvorbě fibrotické jizvy) vedoucí k postupně se rozvíjející poruše poddajnosti komory a diastolické dysfunkce¹⁸. Tlakové napětí na primárně zdravý nepostížený myokard díky úbytku funkčních CM vede dle hypotézy

Grossmanna a Pfeffera ²³ k hypertrofii zbylých funkčních myokardiálních buněk. Komora se tak snaží kompenzovat napětí kladené na její stěnu (teorie je založena na Laplaceově zákoně) s její sekundární dilatací (dle Frank-Starlingova zákona). Tento proces je doprovázený zhoršenou perfuzí v dané lokalitě a drobnou mikrotraumatizací s horším prokrvením hypertrofovaného myokardu. Děj je spojen s lokální produkcí zánětlivých cytokinů (IL 1, IL 6, TNF alfa, TGF beta). Ty parakrinně působí na ostatný myokardiální komponenty. Dochází k down regulaci adhezivních molekul CM, především konexinů (typ - 40, 43, 45). Následuje pokles funkčních intercelulárních spojení (gap junction) a dysregulaci přenosu elektrické aktivity. Výsledkem je pro-arytmogenní substrát. Existuje mnoho regulačních neurohumorálních faktorů, které se na výše uvedeném procesu podílejí (viz tbl. 1).

Tbl. 1.: Neurohumorální faktory podílející se na poinfarktové remodelaci levé komory a srdečního selhání.

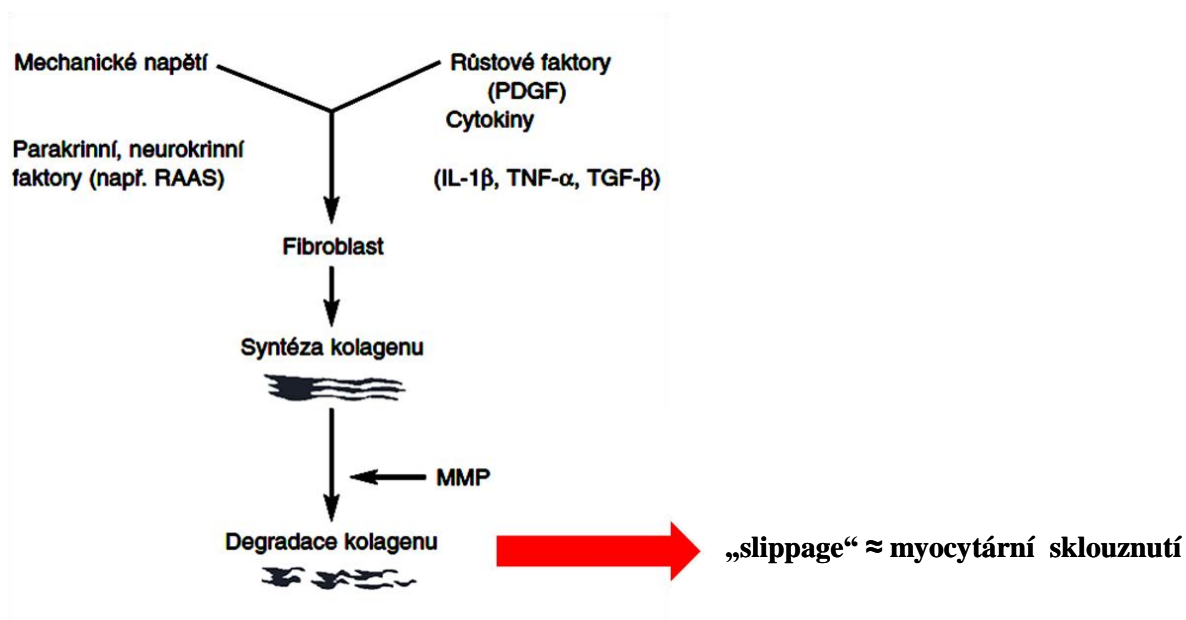
Buněčný růst	Fibróza	Apoptóza	Kontra-regulační faktory
Angiotenzin II	Angiotenzin II	TNF-alfa	ANF
Katecholaminy	ET-1		Bradykinin
Endotelin	Aldosteron		BNP
TNF-alfa	TGF-beta		
Růstové faktory			
ET – 1			

TNF-alfa (tumor necrosis factor alfa), TGF beta (tumor growth factor beta), ANF (atrial natriuretic factor), BNP (brain natriuretic peptide), ET -1 (endotelin 1)

Pravděpodobně jedním z nejdůležitějších je i v této fázi angiotenzin II. Jeho produkce je stimulovaná aktivovaným sympatikem (adrenalin, noradrenalin) a aktivací oblasti juxtaglomerulárního aparátu ³² při nižším srdečním výdeji přes RAAS systém a vlastní myokardiální stimulaci. Angiotenzin II působí přes ICT probíhající typickou signální dráhu MAP-kinázu-kinázu. V místě poškození zvyšuje produkci a inhibici degradace

cytoplasmatické serinové proteázy - matrix metaloproteinázy (MMP) ³³. Tím podněcuje degradaci kolagenu. Následuje rozvolnění intercelulárních vazeb a dochází k procesu myocytárního sklouznutí „slippage“ ²⁵, viz obr. 5. Výsledkem je ztenčení stěny myokardu a dilatace LK. Dalšími významnými regulačními faktory této fáze jsou TGF-beta, TNF alfa, katecholaminy, endotelin v kombinaci s vlivy mechanickými ³⁴.

Obr. 5.: Degradace kolagenu prostřednictvím působení MMP (serinové proteázy – matrix metaloproteinázy). Děj je ovlivněn mechanickými a růstovými faktory (PDGF - destičkový růstový faktor, interleukiny, TNF alfa, TGF beta), popis blíže viz text.



1.3 Vlastní regenerační schopnost myokardu

Po dlouhé desetiletí bylo srdce považované za terminálně diferencovaný orgán, bez regenerační schopnosti a CM za buňky postmitotické bez regeneračního potenciálu (popisovaná je hypertofie CM při stresovém zatížení spíše než hyperplasie). Názor vychází z teorie popsané Linzbacherem (40 léta 20. století). Teprve až v roce 1990 Anversa a spolupracovníci³⁰ prokázali, že CM jsou schopné navození apoptózy, aktivní buněčné smrti nebo-li sebevraždy buňky. Poukázali tím zároveň na jejich schopnost mitotické aktivity sílící při poškození myokardu jako např. po AIM. Apoptóza, se tak jeví jako klíčový faktor přežití CM za různých podmínek³⁵. Nový koncept o charakteru CM se vyvinul později až v 90 letech minulého století, kdy byly identifikované tzv. cardiac residential progenitor stem cells (CSCs). Jejich existence poukázala na možnost spontánní regenerace myokardu. Tyto buňky se pravděpodobně podílí na fyziologické celoživotní homeostáze myokardu. Otázkou neustále zůstává, zda se jedná o buňky endogenní či extrakardiální. Za zdroj extrakardiálních buněk jsou potencionálně považované buňky pocházející z kostní dřeně. Tato teorie je podpořena pozorováním z transplantační medicíny. V případech, kdy bylo muži transplantováno srdce ženského dárce (tzv. mix gender transplantace) se s odstupem času prokázala v malém vzorku CM přítomnost Y chromosomu (buněčný chimerismus XX a XY). Zdrojem XY CM mohou být pouze mobilizované buňky vlastního organismu. V každém případě se zdá, že schopnost regenerace malé části CM je v savčím myokardu za fyziologických i patologických podmínek možná a může se podílet na dlouhodobé homeostáze srdečního svalu^{36, 37}.

1.4 Možnost ovlivnění progresu remodelace levé komory a srdečního selhání

O rozsahu progresu postinfarktové remodelace rozhodují především dva faktory, jejichž ovlivněním lze této komplikaci zabránit:

1. Včasná rekanalizace uzavřené koronární tepny zastaví postup nekrózy před dosažením epikardu a "zachráněná" subepikardiální vrstva svaloviny je dostatečně pevná k prevenci rozvoje dalšího poškození komory popř. vzniku aneurysmatu
- 2 Snížení nitrokomorového (tj. především systolického) tlaku sníží sílu působící na tvořící se jizvu zevnitř směrem ven a zabrání tak částečně její expanzi.

1.5 Terapie STEMI, srdečního selhání a remodelace levé komory

Současná strategie léčby se zaměřuje hlavně na snížení rozsahu infarktového ložiska, ztráty CM, dosažením co nejčasnější reperfúze myokardu¹⁷. V rámci reperfúzní terapie jsou 2 možnosti výběru – perkutánní koronární intervence (PCI) či trombolýtická terapie. Primární PCI dokáže snížit mortalitu infarktu na 5-6%³⁸, tj. zhruba na polovinu proti trombolýtické léčbě. Lze ji tedy považovat za léčebnou metodu první volby pokud je provedena ve srovnatelném časovém intervalu v jakém by byla provedena trombolýza (začátek PCI by neměl být opožděn proti začátku trombolýzy o více než 90 minut³⁹).

Dlouhodobá následná medikace regulující další vývoj remodelace:

- *Inhibitory angiotensin konvertujícího enzymu (ACEi):* Brání progresi endsystolického a enddiastolického objemu LK a tím progresi dysfunkce a kompenzatorní hypertrofii, která zhoršuje její diastolickou funkci⁴⁰⁻⁴³. Mechanismus účinku není zcela jasný, ale zřejmě se podílí na ovlivnění RAAS osy a regulace TGF beta, které hrají významnou roli v aktivaci fibroblastů a procesu hojení. Nabízí se také možnost zásahu do signálních cest, např. do genetické modifikace cesty syntézy angiotensinu II⁴⁴.

- *Inhibitory receptorů pro aldosteron (spironolakton a eplerenon):* Zpomalují přechod od hypertrofie do srdečního selhání redukcí fibrózy, oxidativního stresu a zánětu. Tyto údaje získané v experimentu korelují s výsledky klinických studií ⁴⁵⁻⁴⁹. Přidání spironolaktону k ACEi vede ke zlepšení ejekční frakce a redukuje se markery myokardiální fibrózy.
- *Betablokátory:* Léky vedoucí k reverzní remodelaci LK. Efekt je podpořen zejména v kombinaci s ACEi. V klinických studiích MERIT-HF, CIBIS ⁵⁰⁻⁵² betablokátory snižovaly celkovou mortalitu o 34–65 %, a to zejména díky snížení kardiovaskulárních příhod. Studie CARMEN ⁵³ prokázala, že časná kombinace ACEi a neselektivního betablokátoru carvedilolu vedla k reverzní remodelaci LK u pacientů s mírným až středním stupněm srdečního selhání.
- *Statiny:* Dle experimentálních studií ⁵⁴ ovlivňují (snižují) aktivitu matrix metaloproteinázy (viz výše) a podílejí se na regulaci tkánového angiotenzin-reninového systému ^{55,56}.

Invazivní metody:

Resynchronizační terapie pomocí biventrikulární stimulace představuje metodu, která u selektované skupiny pacientů zlepšuje nejenom funkční stav, ale i prognózu. Účinek je založen na principu reversní remodelace při sníženém mechanickém napětí stěny komory. Toto mechanické odlehčení vede nejen k potlačení aktivace signálních cest pro apoptózu, tvorbu TNF alfa, ale i pro ukládání kolagenu do myokardu ¹⁸.

1.6 Nekonvenční možnosti léčby kmenovými buňkami po infarktu myokardu

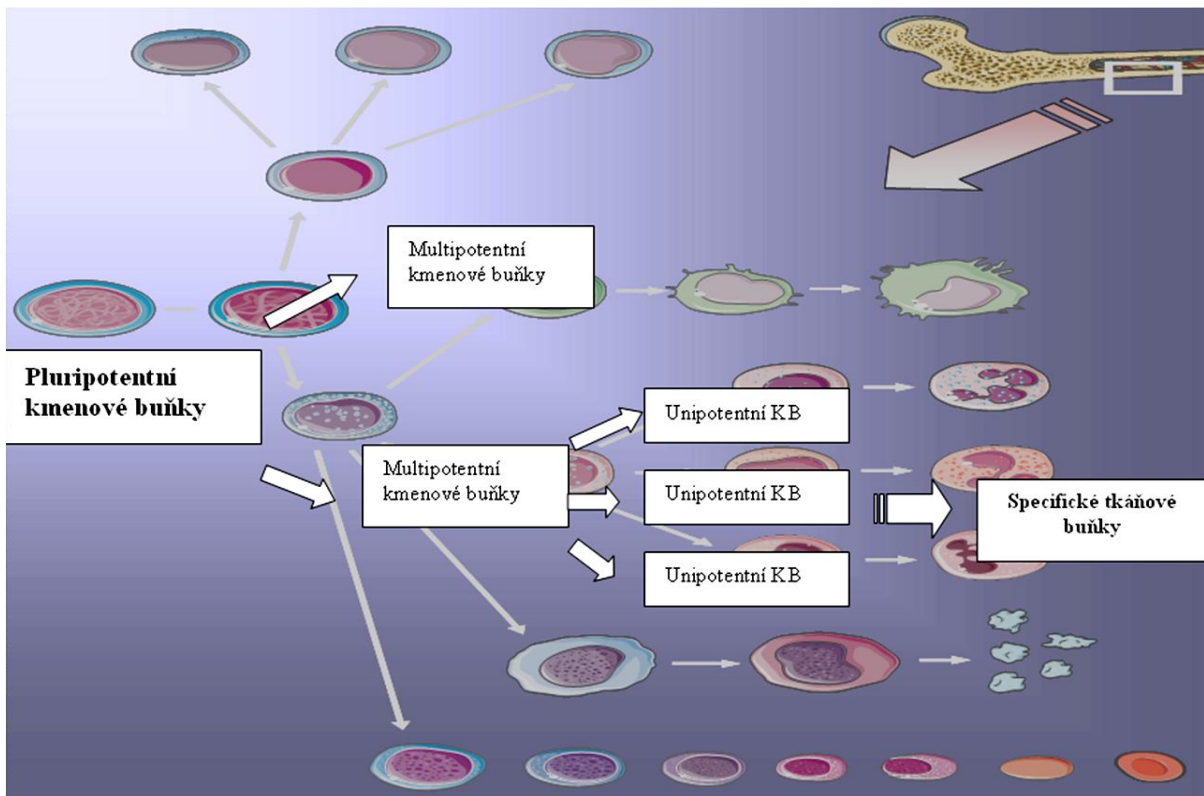
I přes výše uvedené postupy u nemocných s velkým infarktem myokardu (ztráta kolem 25-40% CM) nejsme schopni zabránit progresi onemocnění do chronického srdečního selhání (CHSS) se všemi jeho důsledky pro kvalitu života a prognózu nemocných. Prozatím žádná konvenční medikamentózní léčba nebo klinicky používaná procedura neumožňuje nahradit nekrotický či fibroticky změněný myokard kontraktilní tkání. Naději do této oblasti vnesly v posledním desetiletí první experimentální a klinické práce zabývající se aplikací kmenových buněk (KB) do myokardu. Zájem o využití KB v kardiologii vyvolaly experimentální studie amerických autorů *Orlice a spol.* (první publikované v časopise *Nature* v roce 2001^{57, 58}), které prokázaly na myších modelech regeneraci postischemicky poškozeného myokardu po intrakoronární aplikaci KB o 53%. Toto zjištění představovalo převratnou změnu v náhledu na možnosti ovlivnění poinfarktové remodelace LK. Následovalo množství dalších experimentálních prací, které prokazovaly alespoň částečnou možnost regenerace ischemií poškozeného myokardu s využitím různých typů KB⁵⁹⁻⁶⁶. Velmi časně se objevily i první malé, nerandomizované klinické práce, které pozorování *Orlice a spol.* částečně, ale ne zcela přesvědčivě potvrdily^{67, 68}. Již v počátcích však byla v oblasti implantace KB do myokardu řada nejasností a obav. Limitující byl především strach z dlouhodobých nežádoucích účinků léčby. Jistá skepse také souvisí s nedostatečnou znalostí všech patofyziologických dějů reparace a remodelace LK a s nejasným mechanismem působení KB. Výsledky prvních klinických studií byly také částečně kontroverzní. Lze to demonstrovat již na výsledcích prvních pilotních studií. V práci publikované *Aviléssem a spol.*⁶⁹, ve které byly pěti pacientům intrakoronárně aplikovány BMSCs 10-15 dní po AIM, bylo popsáno signifikantní zlepšení kontraktility a systolické funkce LK⁷⁰. Oproti tomu v prakticky současně publikované studii *Stamma a spol.*⁷¹ na šesti pacientech, kterým byly KB aplikovány injekčně do myokardu, nebyla efektivita potvrzena. Jednalo se o studie s rozdílným designem,

ve kterých byly buňky aplikovány rozdílným způsobem (intrakoronárně vs. perioperačně) a bylo použito i rozdílné množství a typ KB.

1.7 Kmenové buňky

Kmenové buňky jsou nediferencované progenitorové buňky s vysokou mitotickou a proliferační aktivitou⁷². Mají schopnost sebeobnovy, klonogenicity a multipotence^{73, 74}. Jednotlivé KB jsou charakterizované svými povrchovými antigeny - markery určujícími schopnost kumulace a diferenciaci^{9, 75}. Představují heterogenní skupinu pluripotentních, multipotentních a unipotentních buněk⁷⁶, obr. 6.

Obr. 6.: Typy kmenových buněk – rozdělení dle potence pluripotentní, multipotentní a unipotentní buňky (KB – kmenové buňky).



1.7.1 Rozdělení a typy kmenových buněk

Vzhledem k velkému množství různých typů buněk a s ohledem na množnost jejich separace je klíčovým momentem výběr typu implantovaných buněk ⁷⁶. Nejjednodušší a nejpřehlednější je dělení podle zdroje KB, tbl. 2.

Tbl. 2.: Rozdělení a typy kmenových buněk (KB).

Rozdělení a typy kmenových buněk	
1. dospělé kmenové buňky	A. skeletální myoblasty – získávají se biopsií kosterního svalstva B. buňky kostní dřene – tvoří 20% buněčného obsahu kostní dřene - mezenchymální buňky - multipotentní progenitorové buňky - hematopoetické kmenové buňky - endoteliální progenitorové buňky - monoklonální buňky kostní dřene
2. embryonální kmenové buňky, fetální a neonatální KB	
3. ostatní typy buněk organismu (potencionální zdroj KB)	naivní kardiomyocyty (cardiac stem cells), adipocyty

1.7.1.1 Dospělé kmenové buňky: Nachází se v zanedbatelném množství v tkáních a orgánech dospělého organismu. Mají plně vyjádřenou schopnost dělení a diferenciaci.

Skeletální myoblasty (SM), antigenní pozitivita CD56+: V klidovém neaktivním stavu se vyskytují na spodní membráně kosterního svalstva. Jsou snadno dostupné (získávají se biopsií kosterního svalstva). Experimentálně je potvrzená jejich vysoká afinita k zjizvené tkáni a schopnost potenciace myokardiální regenerace. Jejich přínos je popsán především ve vazbě na regulaci rozsahu poinfarktové jizvy a inhibice remodelace ⁷⁷⁻⁸¹. Jsou odolné vůči hypoxii. Zachovávají si po implantaci svoji funkční izolovanost od myokardu a tedy nejsou schopné vytvářet plně

vyvinutou syncytiální kontraktilitu čili synchronní odpověď na elektrický stimulus⁸² (pravděpodobně na podkladě deficitu adherentních vazebných proteinů - konexinu 43, N-cathedrinu⁸³). Výsledkem je riziko arytmogenního potenciálu.

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs), antigenní pozitivita - CD44+, CD34-, CD45- : V kostní dřeni tvoří 0,01-0,001% buněk. Jsou snadno dostupné (extrakce z punktátu, následovaná separací a kokultivací s růstovými faktory či 5-azacytidinem⁸⁴, popř. přímo kokultivací s CM⁸⁵). MSCs mají vysokou afinitou k infarktové zóně, fyziologicky se v malé míře podílejí na myokardiální reparaci (spontánně in vivo však prakticky nevýznamný, až zanedbatelný). MSCs mají obdobnou strukturu jako CM (sarkomery, jaderná struktura s expresí transkripčních faktorů⁸⁶). Nejsou schopné vytvářet plně vyvinutou syncytiální kontraktilitu (netvoří connexin 43)⁸⁷. Experimentálně je přesto potvrzena schopnost zlepšení funkce LK. Nevedou ke stimulaci angiogenezy, mohou však potencovat vznik buněčné fúze na okraji ložiska se zmenšením infarktového ložiska^{88, 89}.

Monoklonální buňky kostní dřene (BMNCs), antigenní pozitivita *CD 45 +*, *CD34+*, *CD14+*: Jsou snadno dostupné (trepanobiopsie kostní dřene). Potencují především neoangiogenezu, podílejí se na aktivaci vlastních reparačních procesů v myokardu, regulaci apoptózy a ovlivňují i fibroblasty a jejich fibroprodukcii. Mají schopnost klonality. Experimentálně se prokázala i jejich schopnost diferenciaci v buňky se strukturou specifickou pro CM (alfa-aktinin, specifický myosin, TnI)^{75, 90, 91}. Efektivita kardioprotektivní a angiogenní schopnosti není prozatím dostatečně potvrzená klinickými daty, nicméně probíhá řada experimentálních, ale i klinických prací které se touto problematikou zabývají⁹².

Multipotentní progenitorové buňky dospělých jedinců (MAPCs): Dosud nebyl definovaný specifický identifikační marker potvrzující existenci MAPCs. Je otázkou, zda se nejedná pouze o určité vývojové stadium buněk jiných. Mají vysokou aktivitu telomerázy a také velmi vysoké požadavky na kultivaci (velké objemy média pro udržení viability buněk; speciální růstové faktory – VEGF, fibronectin; nízká koncentrace buněk v misce). In vitro dávají vznik mnohým typům buněk, nemají teratogenní efekt^{93,94}.

Endoteliální progenitorové buňky (EPCs), antigenní pozitivita CD34+: Fyziologicky jsou vyplavovány z kostní dřeně (KD) do periferní krve a odtud do poškozené tkáně kde slouží pravděpodobně jako zdroj ztracených či opotřebovaných buněk. Podílejí se na reparaci a ochraně endotelu, zabraňují rozvoji endoteliální dysfunkce a snižují progresi aterosklerózy⁹⁵. Jejich počet inverzně koreluje s Framinghamským skóre kardiovaskulárního rizika⁹⁶. Vlastní produkce, migrace a integrace je stimulovaná růstovým G-CSF. K získání EPCs je nutné dosáhnout potenciace vyplavení ve větší koncentraci z KD, čehož lze dosáhnout podáním filgrastimu (hematopoetický růstový faktor, stimulující granulocytové kolonie, reguluje tvorbu a uvolňování funkčních neutrofilů z KD). Při intravenózním (i.v.) nebo subkutánním (s.c.) podání existuje pozitivní lineární korelace mezi dávkou a sérovou koncentrací filgrastimu a množstvím izolovatelných kmenových buněk z periferní krve s následnou možností expanze ex vivo⁹⁷⁻⁹⁹. Toho se využívá již řadu let u hematologických malignit.

1.7.1.2 Embryonální kmenové buňky (ESCs): Pluripotentní, stabilní buňky, které jsou v podstatě totožné s oplozeným vajíčkem. Zdrojem je embryo ve stadiu blastocysty či moruly popř. je lze zachytit v malém množství i z pupečnickové krve¹⁰⁰. ESCs

jsou buňky s dobrou diferenciační plasticitou do CM¹⁰¹⁻¹⁰³. Jsou ideální pro svou schopnost vytvořit plně funkční kardiomyocyt, včetně jednotlivých spojení (sarkomerické struktury, formace a intrakalární disky, desmosomy a gap junction). Jsou schopny experimentálně vytvořit plně funkční syncitium s propagací akčního potenciálu¹⁰⁴. ESCs experimentálně jsou schopné potenciace funkce LK se známkami zlepšení kontraktility^{105, 106}. Z etických důvodů zatím nebyla povolena žádná klinická studie s ESC u člověka. Není vyjasněná ani otázka jejich potenciální teratogenity. I přes tyto limitace se jedná o velmi nadějně buňky s velkou perspektivou v budoucnu^{107, 108}.

1.7.1.3 Fetální a neonatální kardiomyocyty: Pluripotentní buňky s dobrou schopností se integrovat do myokardu¹⁰⁹ a vytvářet vhodná intercelulární spojení s vlastní myokardiální tkání¹¹⁰. Zdrojem je fetální a neonatální srdce. Je u nich popsána vysoká imunogenicita s nutností imunosupresivní terapie po aplikaci. Problematické jsou malé dělicí schopnosti v implantované tkáni, životnost a signifikantní mezidruhové a etnické rozdíly⁷⁹.

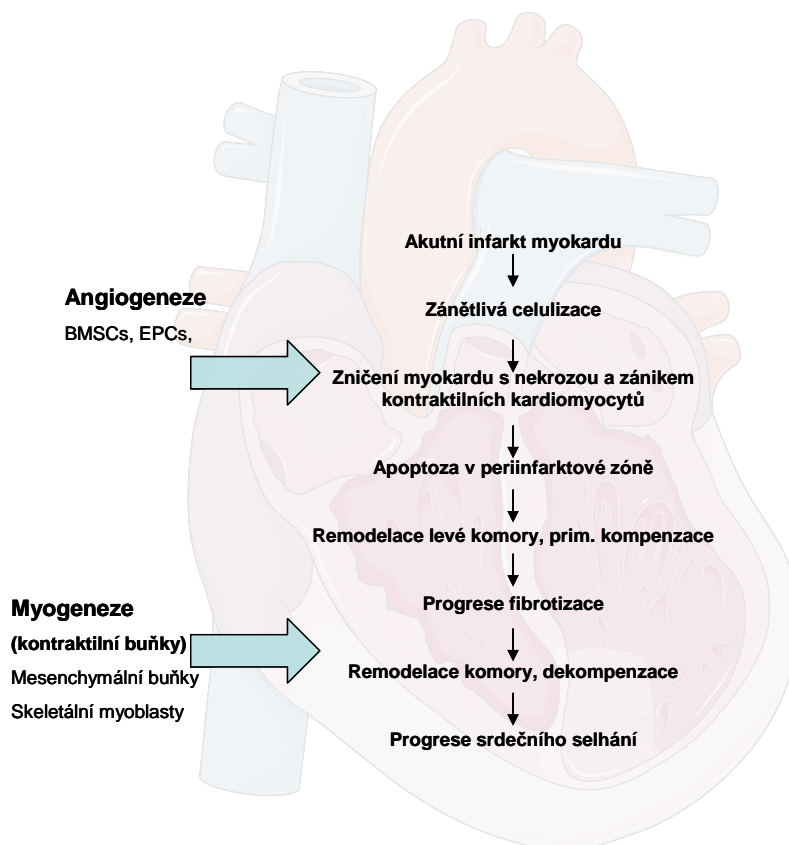
1.7.1.4 Cardiac stem cells (CSCs), antigenní pozitivita Sca-1¹¹¹, CD 31+¹¹², Isl-1¹¹³, Flk1+: Jedná se o malé naivní buňky s experimentálně prokázanou schopností sebeobnovy, klonality, multipotence, intramyokardiální integrace, myokardiální regenerace a regenerace endoteliálních buněk¹¹⁴⁻¹¹⁶. Prozatím nejsou dostupná dostatečná data o kinetice proliferace a diferenciace CSCs. Nejsou dostatečně prozkoumány nežádoucí účinky. V posledních letech je do CSCs vkládána velká naděje⁷⁰. V klinické praxi zatím nebyly použity vzhledem k problémům s odběrem a expanzí.

1.8 Rozdělení kmenových buněk dle možnosti jejich využití:

Pro experimentální a klinické využití je spíše vhodné rozdělení vycházející z jejich dostupnosti, afinitě k myokardu a endotelu cév a schopnosti mitotického dělení. Vychází z fyziologických a patofyziologických dějů poškození myokardu, ztráty specifického typu elementů a nutnosti jejich náhrady^{107, 117}, obr. 7.

Obr. 7.: Hypotéza výběru kmenových buněk vzhledem k jejich diferenační schopnosti.

Upraveno dle Taylora a spol.^{117, 118} Vysvětlivky: BMNCs – mononukleární buňky kostní dřeně, EPCs – endoteliální progenitorové buňky kostní dřeně.



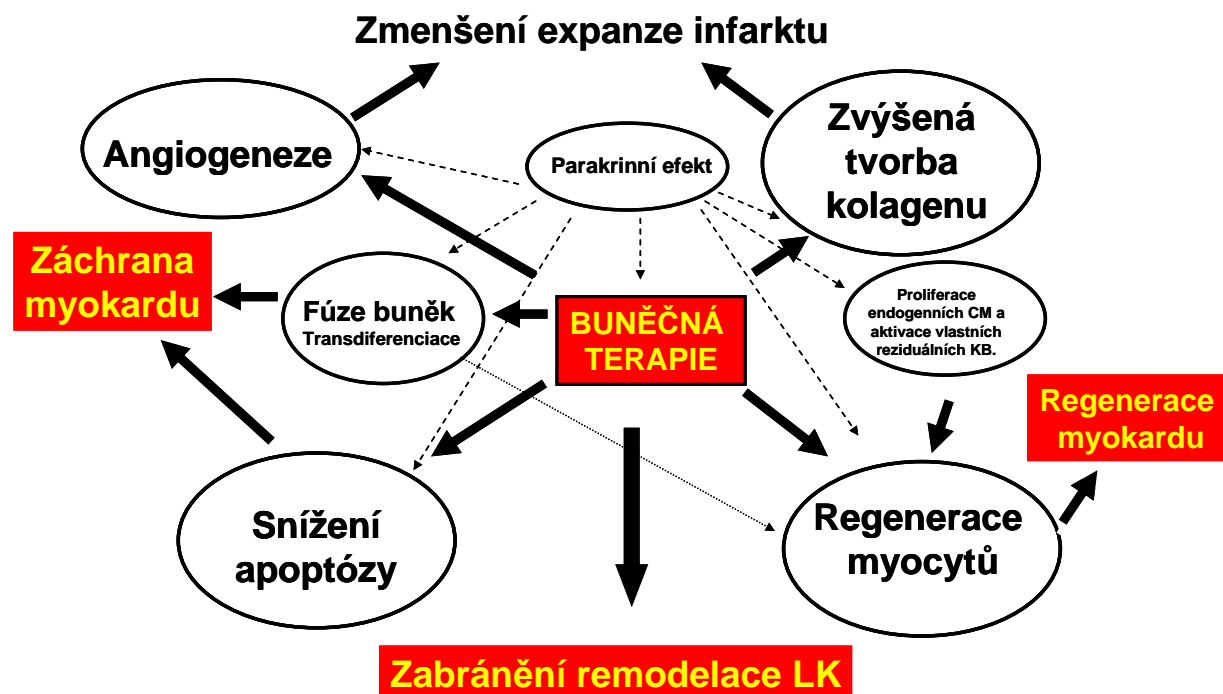
V pozdní fázi plně rozvinutého srdečního selhání jsou pro zrestaurování myokardu vhodné buňky potenciálně schopné aktivovat kontraktilitu a myogenezu myokardu, tedy mezenchymální buňky a skeletální myoblasty. Časně po STEMI je pro zlepšení průběhu

angiogenezy a záchranu hibernovaného myokardu výhodnější podání kmenových buněk kostní dřeně, ke kterým jsou řazeny EPCs, BMNCs a multipotentní buňky^{64, 119}. Z hlediska klinického použití je nejslibnější aplikace BMNCs. Jedná se totiž o buňky relativně snadno dostupné, které lze získat v dostatečném množství trepanobiopsií z lopaty kosti kyčelní ve směsných populacích buněk. Z experimentálních studií vyplývá jejich relativně dobrá schopnost diferenciací v CM a endotelové buňky¹²⁰, uspokojivá integrace v místě poškozeného myokardu a bezpečnost aplikace^{75, 121-123}. Potencují jak myokardiální regeneraci tak neoangiogenezi^{60, 65, 124-126}.

1.9 Mechanismus účinku kmenových buněk

Současný názor na mechanismus účinku KB není zcela jednotný. Pravděpodobně se jedná o jejich multifaktoriální působení^{67, 127}. Jedna z hypotéz regenerace myokardu pomocí KB je založena na jejich schopnosti transdiferenciací v CM a integraci do myokardu^{67, 128}. Tento mechanismus však t.č. dle experimentálních předpokladů není stěžejní. Podle publikovaných prací, v myokardu zůstává za 20 hodin od aplikace pouze cca.1-2% intrakoronárně (i.c.) podaných buněk¹²⁷, což bylo prokázáno i ve studii provedené v České republice¹²⁹. Druhou možností působení KB je parakrinní intercelulární stimulace regenerace myokardu chemokiny, které jsou produkovány jak vlastními buňkami myokardu tak jejich uvolněním podanými KB. Experimentálně byl potvrzen regulační efekt některých cytokinů: vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor - VEGF), růstového faktoru hepatocytů (hepatocyte growth factor - HGF) a faktoru stimulujícího kolonie G-CSF u STEMI¹³⁰. Dalším možným mechanismem je zabránění apoptotickému zániku CM v periinfarktové zóně a tím zpomalení remodelace LK, obr. 8.

Obr. 8.: Pravděpodobné mechanismy působení kmenových buněk na zlepšení funkce levé komory (LK).



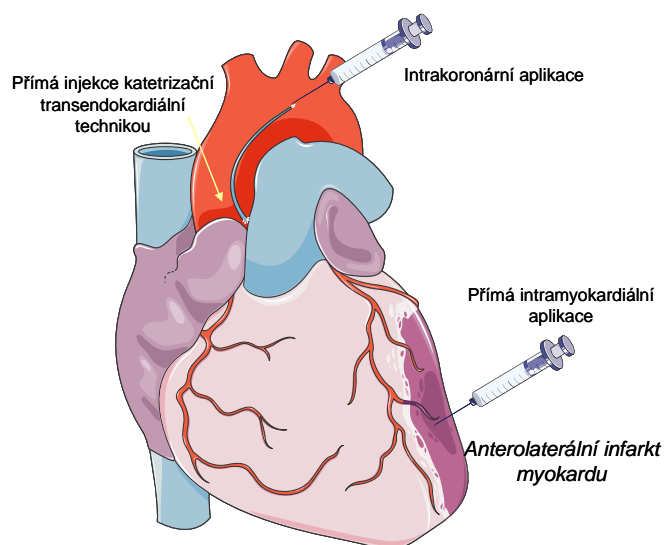
1.10 Množství aplikovaných buněk

Není přesně definované, jaký počet aplikovaných KB je pro ovlivnění funkce LK „ideální“. V publikovaných klinických studiích se počty aplikovaných buněk pohybují v řádu od 10^6 do 10^9 (76, 121, 131-133). V době zahájení studie nebyly o závislosti klinické efektivity na množství podaných buněk žádné informace.

1.11 Výběr metody aplikace kmenových buněk

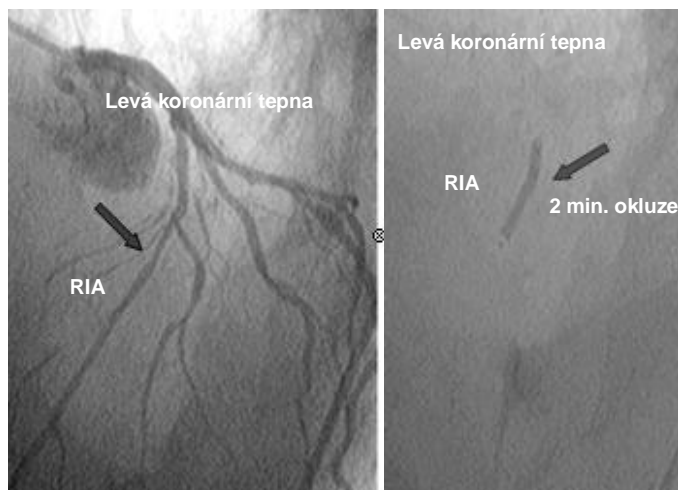
Způsob jakým jsou KB do myokardu implantovány může hrát důležitou roli z hlediska jejich integrace a ovlivnění myokardiální regenerace. Byla vyzkoušena řada různých metod aplikace, obr. 9.

Obr. 9.: Souhrn metod aplikace kmenových buněk, popis bliže viz text výše.



1.11.1 Intrakoronární aplikace: KB se aplikují katetrizační metodou s využitím balónkového katetru typu „over the wire“, který je zaveden standardní technikou do koronární tepny, kde na přechodnou dobu tepnu uzavírá. Luminem balónku jsou poté KB aplikovány za místo uzávěru tepny (obr. 10). Tato metoda byla použita pro svoji relativní jednoduchost a minimální invazivitu ve velkém množství experimentálních i klinických studií ^{76, 97}.

Obr. 10.: Intrakoronární implantace kmenových buněk do r. interventrikularis anterior (RIA)



metodou “ over the wire PCI“ katetrem s balónkem o průměru 3,5mm. Aplikace 5 ml buněčného koncentrátu během 2 minutové okluze tepny.

1.11.2 Přímá intramyokardiální aplikace chirurgickou cestou: Tohoto postupu se využívá při kardiochirurgických výkonech, u nemocných indikovaných k chirurgické revaskularizaci myokardu – bypasové operaci^{58, 71, 77, 80, 134-139}. Výhodou je možnost cílené přímé aplikace do ischemicky postiženého myokardu. Mezi nevýhody patří nízké množství aplikovaných buněk, potencionální arytmogenicita a vlastní invazivita chirurgické intervence⁸⁶.

1.11.3 Přímá injekce katetrizační transendokardiální technikou: Jedná se o transendomyokardiální injekci KB z dutiny LK¹³⁹ s použitím tzv. NOGA techniky, která zároveň umožňuje elektromechanické mapování infarktového ložiska. KB jsou implantovány do ischemických oblastí myokardu pomocí speciálního katetru^{140, 141}. Nevýhodou je finanční nákladnost a nutnost specializovaného technického zázemí. Probíhá několik studií využívajících tento způsob aplikace, výsledky zatím nejsou k dispozici.

1.12 Načasování podání KB po STEMI

V době vzniku naší práce žádná přesvědčivá data z větších klinických studií ohledně doby implantace nebyly publikované.

1.13 Racionále studie v době jejího zahájení

Jak již bylo výše uvedeno ve shrnutí lze říci, že většina nemocných s infarktem myokardu přichází k léčbě pozdě v době, kdy možnost efektivní záchrany myokardu reperfuční terapií je již malá. U některých nemocných navíc ani relativně rychlé otevření infarktové tepny nemusí vést k záchraně ischemického myokardu pro možnost poškození perfuze na úrovni mikrocirkulace a časnému či pozdnímu reperfučnímu poškození postižených buněk. U části pacientů tak AIM vede i dnes ke ztrátě značného množství kontraktálního myokardu a významnému poškození funkce LK srdeční. To vede často k dlouhodobému procesu patologické remodelace, který postihuje zbylý myokard, k expanzi akinetické zóny komory, změně její geometrie, progresivní dilataci dutiny a postupnému poklesu její systolické funkce nad rámec akutního poškození při vlastním infarktu. Finálním důsledkem je rozvoj CHSS, invalidizujícího onemocnění s vysokou morbiditou a mortalitou. Prozatím žádná konvenční léčba nebo klinicky používaná procedura neumožňuje nahradit nekrotický myokard nebo již zformovanou jizvu funkční kontraktální tkání. Z výše uvedených důvodů je proto vysoce teoreticky atraktivní koncept možnosti regenerace již odumřelé myokardiální tkáně přímo v infarktovém ložisku s náhradou zaniklých kontraktálních elementů i cévního zásobení novými funkčními buňkami. Zdá se, že uvolnění některých KB s jejich následným zachycením v infarktové zóně je normální odpovědí na AIM u savců. Stupeň regenerace myokardu, spojený s tímto procesem (jak již bylo výše uvedeno), je ale bohužel za přirozených podmínek zanedbatelný. Tyto skutečnosti však tvoří teoretickou bázi pro současné pokusy o buněčnou terapii akutních i chronických forem ischemické choroby srdeční. Cílem je zvýšit v myokardu počet KB, schopných diferenciací v infarktovém ložisku natolik, aby byl nastartován v klinicky významném měřítku proces novotvorby kontraktálních a cévních struktur (regenerace myokardu), nebo aby bylo alespoň zabráněno pokračující apoptóze buněčných elementů s perspektivou dlouhodobého zlepšení či stabilizace celkové funkce LK a tím i zlepšení prognózy a klinického stavu nemocných. Jednou z možností získání dostatečného množství KB

je odběr krve z kostní dřeně s následnou jejich izolací nebo izolace buněk z periferní krve s jejich následnou expanzí ex vivo. Takto získané KB je pak možno vpravit přímo do infarktové zóny katetrizační technikou přes infarktovou tepnu. Četné experimentální práce na zvířatech prokázaly schopnost těchto buněk zachytit se v infarktové zóně, zvýšit zde neovaskulogenezu, částečně se diferencovat v buňky podobné CM a zlepšit významně srdeční funkci⁵⁷. Závěry experimentálních studií vedly k prvním pokusům o klinickou aplikaci u nemocných s ischemickou chorobou srdeční. Výsledky prvních malých a nerandomizovaných studií s intrakoronární aplikací kmenových buněk po AIM^{69, 71}, které byly publikovány v době zahájení projektu, byly nadějně. U části nemocných došlo ke zlepšení celkové funkce levé komory, zlepšení parametrů její remodelace, viability v infarktovém ložisku a zmenšení perfuzního defektu. Nicméně tyto studie byly provedeny na pacientech s relativně dobrou celkovou funkcí LK, s různými časovými intervaly reperfuze terapie a jako srovnávací byly použity historické skupiny pacientů. Z těchto poznatků vycházel návrh naší klinické studie, ověřující účinnost a bezpečnost i.c. podání mononukleárních dřevých buněk v léčbě komorové dysfunkce u pacientů po rozsáhlém AIM s pozdní reperfuze. Jedná se o skupinu nemocných, u níž dochází k významné ztrátě kontraktilních elementů se všemi z toho vyplývajícími důsledky, u nichž by případný pozitivní efekt buněčné léčby měl největší význam.

2 Cíle práce

Cílem práce bylo ověřit první data o bezpečnosti a klinické účinnosti intrakoronárního podání autologních dřevňových mononukleárních buněk u pacientů po prodělaném rozsáhlém předním infarktu myokardu s ST elevacemi s následnou těžkou dysfunkcí levé komory.

Specificky jsme si kladli následující cíle:

1. Ověřit krátkodobou a dlouhodobou bezpečnost intrakoronární aplikace BMNCs (zhodnocení výskytu komplikací u skupiny s implantovanými KB ve srovnání s kontrolní skupinou).
2. Sledovat krátkodobý a dlouhodobý efekt buněčné léčby na systolickou funkci LK ve srovnání s kontrolní skupinou.
3. Zhodnotit efekt buněčné terapie na výslednou velikost infarktového ložiska pomocí perfuzní scintigrafie myokardu (SPECT).
4. Sledovat zda implantace BMNCs ovlivní poinfarktovou remodelaci levé komory.
5. Přispět k určení optimálního časového intervalu k provedení buněčné terapie po STEMI.
6. Zhodnotit klinickou účinnost léčby poinfarktově poškozeného myokardu z hlediska následné kvality života.

2.1 Pracovní hypotéza

1. Intrakoronární aplikace BMNCs je bezpečná a nepovede ke zvýšení počtu nežádoucích událostí ani ke zvýšení počtu maligních arytmií. Naopak díky ovlivnění změn a funkce komory povede ke snížení počtu rehospitalizací pro srdeční selhání.
2. Intrakoronární aplikace BMNCs časně po akutním infarktu myokardu povede u nemocných s těžkou poruchou systolické funkce levé komory k jejímu zlepšení (zvýšení LVEF).
3. Aplikace BMNCs povede k zamezení progresu nežádoucí poinfarktové remodelace levé komory a diastolické dysfunkce (zmenšení progresu velikosti LVEDV a LVESV).
4. Aplikace kmenových buněk povede ke zmenšení velikosti infarktového ložiska (dle SPECTu myokardu).
5. Dle teoretických předpokladů a výsledků dosavadních studií by pravděpodobně neměl být rozdíl v účinnosti metody při použití v časném infarktovém období ve srovnání s delším časovým odstupem.

2.2 Cílové ukazatele

1. Primární:

- a. Kombinovaný klinický ukazatel bezpečnosti aplikace BMSCs (úmrť, reinfarkt, hospitalizace pro srdeční selhání, výskyt maligních arytmií) za 4 měsíce po implantaci (u skupiny s implantovanými KB ve srovnání s kontrolní skupinou).
- b. Změna ejekční frakce levé komory za 4 měsíce po implantaci hodnocená echokardiograficky.

2. Sekundární:

- a. Kombinovaný klinický ukazatel bezpečnosti aplikace BMSCs (úmrť, reinfarkt, hospitalizace pro srdeční selhání, výskyt maligních arytmií) za 24 měsíců po implantaci.
- b. Změna ejekční frakce levé komory za 24 měsíců po implantaci hodnocená echokardiograficky.
- c. Změna enddiastolického a endsystolického objemu levé komory (LVEDV a LVESV).
- d. Změna segmentární funkce LK za 4 měsíce, hodnocena echokardiograficky.
- e. Dlouhodobý vliv na diastolickou funkci levé komory, hodnocena echokardiograficky.
- f. Hodnocení změny velikosti jednotlivých srdečních oddílů.
- g. Změna velikosti infarktového ložiska dle scintigrafického vyšetření myokardu - SPECTu.
- h. Sledování dlouhodobé klinické účinnosti léčby a objektivizovat je pomocí dotazníku kvality života.

3 Metodika

3.1 Druh studie

Fáze I/II – randomizovaná, multicentrická studie

Zúčastněná pracoviště:

- II. interní klinika kardiologie a angiologie, Všeobecná fakultní nemocnice, U nemocnice 2, Praha 2
- Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, Šrobárova 50, Praha 10

3.2 Soubor pacientů

V období od ledna 2004 do května 2006 jsme randomizovali do studie celkem 27 pacientů s akutním infarktem myokardu (definovaným dle guidelines pro STEMI¹). 17 nemocných bylo zařazeno do aktivně léčené skupiny a 10 pacientů do skupiny kontrolní.

3.3 Vstupní kritéria, shrnutí tbl. 3

Do studie byli zařazeni nemocní s prvním akutním infarktem myokardu s ST elevacemi do 80 let věku s dobou trvání ischemie nad 6 hodin a s uzavřenou infarktovou tepnou při vstupní angiografii, kteří byli léčeni metodou přímé koronární angioplastiky s implantací stentu a kteří splňovali následující kritéria:

- Technicky úspěšný výkon (PCI) s dobrým angiografickým výsledkem v místě intervence a dosažením alespoň TIMI 2 průtoku v intervenované tepně.
- Nepřítomnost dalších závažných změn na infarktové tepně nebo ostatních tepnách, vyžadujících chirurgickou intervenci v horizontu čtyř měsíců.
- Přítomnost dysfunkce LK (LVEF do 50%) s poruchou kinetiky v povodí infarktové tepny při vstupním echokardiografickém vyšetření (24-48 hod po primární intervenci).

- Souhlas se zařazením do studie, odběrem dřeňové krve, implantací KB do infarktové tepny a s provedením kontrolní angiografie za 4 měsíce po výkonu.

3.4 Vyřazující kritéria

- Kardiogenní šok nebo hemodynamická nestabilita pacienta v období po provedené přímé angioplastice.
- Krvácivé komplikace po výkonu, vyžadující krevní transfuzi nebo chirurgické řešení.
- Závažné postižení dalších věnčitých tepen, vyžadující chirurgické řešení.
- Porucha kinetiky LK v jiném než infarktovém povodí při vstupním echokardiografickém vyšetření (24-48 hod po AIM).
- Současná renální či hepatální dysfunkce nebo přítomnost jiných závažných onemocnění, limitujících prognózu nemocného.
- Historie leukopenie, trombocytopenie či jiného významného hematologického onemocnění, popř. cytostatická léčba v minulosti.

Tbl. 3.: Vstupní a vylučovací kritéria zařazení do studie (shrnutí základních bodů).

Vstupní kritéria:	Vylučovací kritéria
1. Věk < 80 let, první STEMI přední stěny.	1) Předchozí STEMI nebo porucha regionální kinetiky v jiném povodí.
2. Primární PCI s implantací stentu.	
3. Reperfuze 4–24 hod po začátku symptomů.	2) Těžká koronární nemoc vyžadující chirurgické řešení nebo difuzní postižení, neřešitelné intervenčně.
4. Průtok na začátku intervence TIMI 0-1.	
5. Průtok na konci intervence TIMI 2-3.	3) Hemodynamická nestabilita znemožňující odběr dřeňové krve.
6. LVEF ≤ 50% echokardiograficky	
hodnoceno 24-48 hodin po intervenci.	4) Závažné renální nebo hepatální postižení.

LVEF – ejekční frakce levé komory, STEMI – akutní infarkt myokardu s ST elevacemi, TIMI – timi frame count,

PCI – perkutánní koronární intervence

Záměrem při stanovení vstupních a vylučovacích kritérií bylo získání homogenního souboru nemocných z hlediska lokalizace infarktu, doby jeho trvání a závažných postižení LK, které by umožnilo validní srovnání při relativně malém počtu probandů. Studie byla schválena etickými komisemi zúčastněných pracovišť. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

3.5 Randomizace

Pacienti, splňující kritéria pro zařazení do studie byli randomizováni v poměru 2:1 do aktivní skupiny, léčené intrakoronární aplikací autologních dřevňových buněk nebo do skupiny kontrolní (metoda uzavřených obálek). Aktivní skupina nemocných byla dále randomizovaným způsobem rozdělena na časnou a pozdní skupinu, u nichž byl proveden odběr dřevňové krve se separací mononukleárních elementů níže popsaným způsobem – u časné terapeutické skupiny 3-5 den po intervenci, u pozdní skupiny 7-11 den po intervenci.

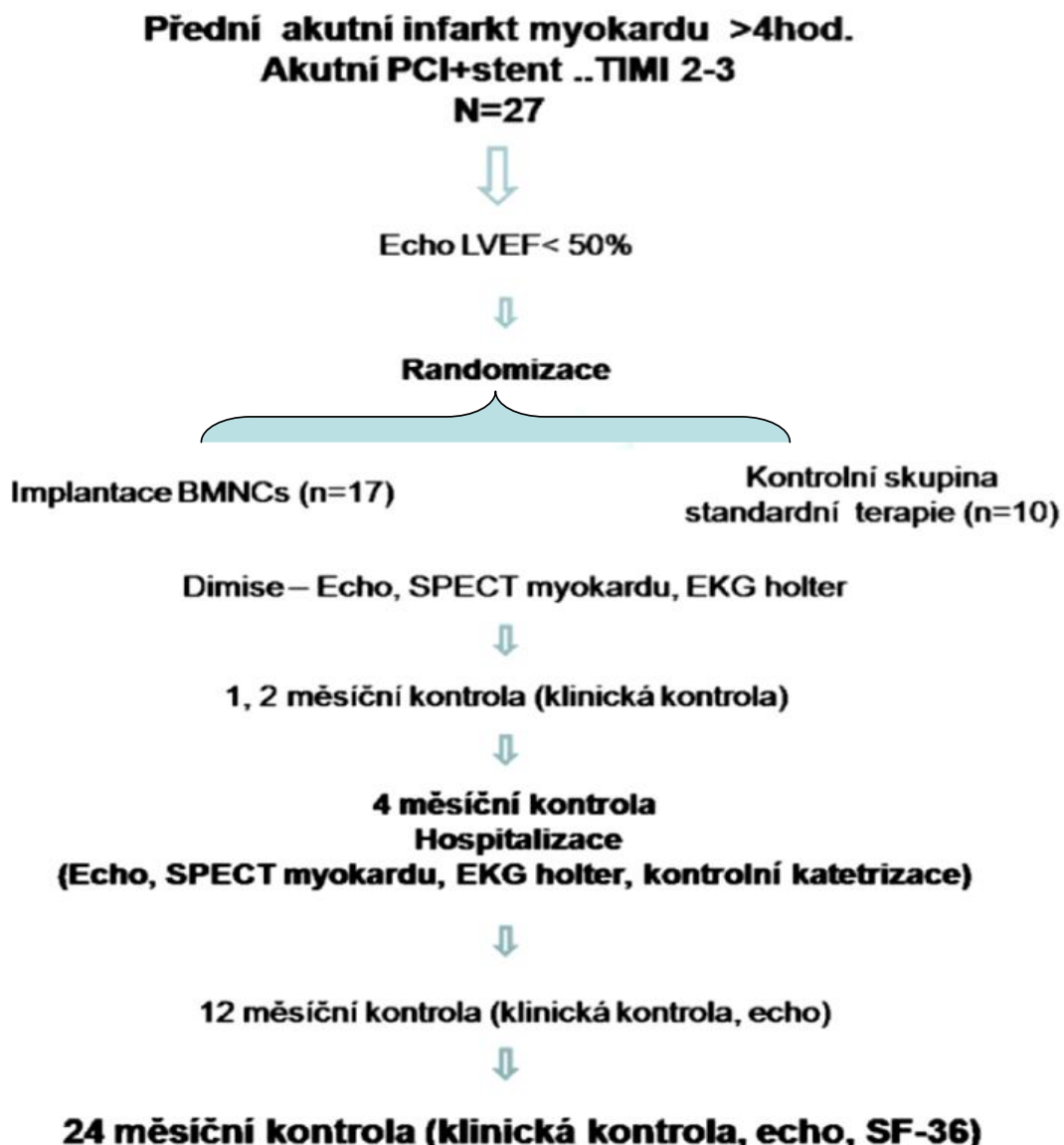
3.6 Design studie a načasování implantace kmenových buněk, (shrnutí viz obr. 11)

Všichni randomizovaní pacienti byli léčeni dle platných doporučení pro STEMI (kys. acetylsalicylová /Anopyrin 100mg ®/, klopidogrel /Plavix 75mg ®/, betablokátor, statin a ACEi s terapií diuretiky dle potřeby a aktuálního klinického stavu (furosemid, spironolakton).

- V rámci vstupního vyšetření byla provedena kompletní anamnéza se zacílením na rizikové faktory aterosklerózy.
- Kompletní laboratorní náběry byly provedeny opakovaně, zahrnovaly kardiomarkery 3x v odstupu 8 hodin po STEMI (CK, CK-MB, TnI), biochemické náběry dle standardů kliniky, krevní obraz a koagulace.
- EKG vyšetření bylo provedeno vstupně, dále 24 hodin po randomizaci, za 1, 2, 4, 12 a 24 měsíců. Vyšetření bylo zaměřeno na ST úsek, q kmit a výskyt extrasystolie.

- Holterovská 24 hodinová EKG monitorace byla provedena při dimisi, za 1 a 4 měsíce se zacílením na hodnocení počtu extrasystol a arytmií s otázkou hodnocení stability rytmu.
- Echokardiografické vyšetření bylo provedeno poprvé 24-48 hodin po intervenci před randomizací a následně při dimisi ze vstupní hospitalizace. Toto vyšetření sloužilo následně jako referenční nález. Seriová kontrolní echokardiografická vyšetření byla dále provedena za 4, 12 a 24 měsíců od zařazení pacienta se zaměřením na sledování systolické a diastolické funkce LK a hodnocení změn v rámci poinfarktové remodelace.
- SPECT myokardu byl proveden při dimisi nemocného z hospitalizace a za 4 měsíce se zaměřením na velikost infarktového ložiska a hodnocení viability myokardu ve sledovaných segmentech.
- Za 4 měsíce od randomizace byla provedena kontrolní hospitalizace. Nemocní podstoupili opět katetrizační vyšetření věnčitých tepen s cílem o hodnocení instent restenózy a nově vzniklých stenóz.
- Provedeny byly i kompletní laboratorní odběry včetně kardiomarkerů a hodnocení objektivního klinického nálezu.
- Ostatní sledování byla provedena ambulantně s kontrolou klinického stavu za 1, 2, 12 a 24 měsíců od výkonu.
- U všech zařazených nemocných bylo na konci studie (24 měsíců od randomizace) provedeno výstupní echokardiografické vyšetření, klinická kontrola, kontrola laboratoře a nemocní vyplnili dotazník kvality života (standardizovaný dotazník SF-36).

Obr. 11.: Struktura studie.



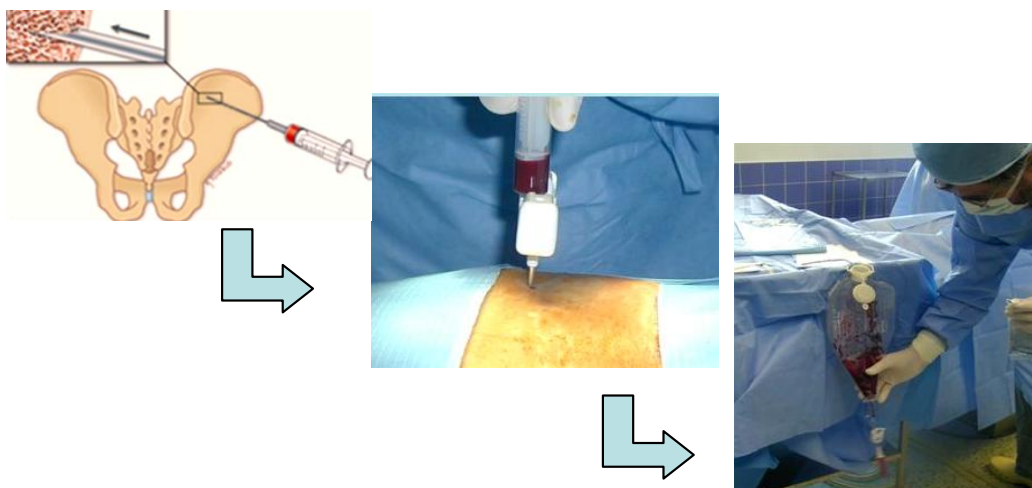
Echo – echokardiografické vyšetření, BMNCs – mononukleární buňky kostní dřeně, LVEF – ejekční frakce levé komory, SPECT – scintigrafické vyšetření myokardu, EKG holter – 24 hodinová holterovská monitorace EKG

3.7 Odběr, zpracování kmenových buněk

U stabilních pacientů v aktivně léčené skupině byl proveden odběr kostní dřeně ze zadní horní hrany lopaty kyčelní kosti (spina iliaca posterior superior). Výkon byl proveden na operačním sále (II. Chirurgická klinika – Kardiochirurgie VFN) v poloze na břiše, (obr. 12). Probíhal v kombinované analgosedaci a lokální anestezii. Analgosedace byla provedena způsobem běžným u jiných invazivních výkonů (odběr kostní dřeně pro diagnostické účely) kvalifikovaným anesteziologem. K úvodu do analgosedace byl použit ultrakrátce působící opiát Alfentanyl (Rapifen ®) v dávce 1-4 ml v závislosti na váze a věku pacienta (1 ml obsahuje 0.544 mg účinné látky). Následně byl pacientům podán Midazolam (Dormicum ®) v dávce 1-5 mg dle váhy a reakce pacienta. Po celou dobu průběhu analgosedace byli pacienti kontinuálně monitorováni (puls, tlak, dechová frekvence, saturace kyslíku a tvar EKG křivky). Působení Alfentanylu netrvá déle než 5 minut a jeho účinek je možno zrušit silnějším algickým podnětem či běžnými opiátovými antagonisty. Anesteziolog byl k dispozici po celou dobu výkonu. Odběr dřevné krve byl prováděn kvalifikovaným hematologem se zkušenostmi s odběrem kostní krve k účelům transplantace krvetvorných buněk. Účinek analgosedace byl posílen lokální anestézií 20 ml 1% Mezokainu. Užity byly atestované jednorázové jehly Somatex (síla 2,5 mm, délka 110 mm) s postranními otvory. Jehla byla před použitím propláchnuta heparinem. Za aseptických podmínek bylo 1-2 kožními vpichy provedeno 10-15 kostních vpichů ve 4 hloubkových etážích po 1 cm, vždy se odebralo nejvýše 2 ml dřevné krve do jednorázové injekční stříkačky s 0,1 ml sterilního heparinového roztoku 1:50. Délka celého výkonu i s úvodem do analgosedace nepřesahovala 15-20 minut. Případná lokální bolestivost po výkonu byla tlumena běžnými analgetiky. Odebrané porce se shromažďovaly v odběrovém setu Bone Marrow Collection Kit with Pre-Filter and Inline Filters (Baxter R4R2107). Při zachování odběrových objemů jednotlivých porcí (1 ml roztoku + 2 ml kostní krve) bylo dostatečné množství jaderných elementů v 50 -

70 ml kostní krve. Sběrný vak na konci setu R4R2107 se po skončení odběru uzavřel a celá soustava se při pokojové teplotě v transportním kontejneru dopravila k dalšímu zpracování do hematologické laboratoře (Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha).

Obr. 12.: Odběr kostní dřeně na kardiochirurgickém sále v poloze na břiše ze spina iliaca posterior superior opakovanými vpichy kostní dřeně s následným injikováním do sběrného vaku.



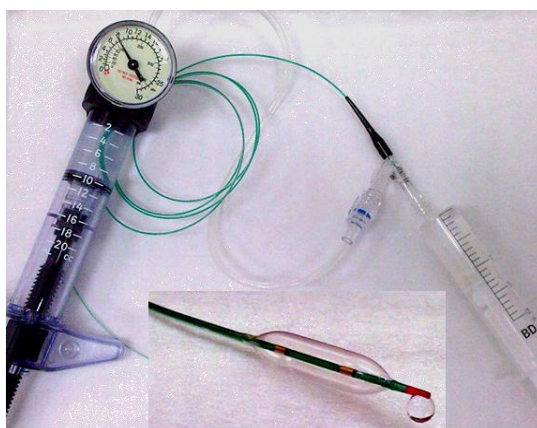
3.8 Zpracování kostní krve a příprava suspense jaderných buněk

V hematologické laboratoři se k celkovému objemu nesrážlivé kostní krve ve vaku s příslušným portem přidal Gelofusin (B.Braun, Melsungen AG) v objemu 25% celkového objemu kostní krve. Manipulace i následná sedimentace erytrocytů probíhala v laminárním boxu Biohazard. Po sedimentaci erytromasy v průběhu několika desítek minut se supernatant bohatý na jaderné buňky převedl pomocí plasmaextraktoru do transferového vaku o objemu do 600 ml. Přes Sampling site coupler EMC1401 (Baxter) se sterilně odebral vzorek na zjištění počtu jaderných buněk a centrifugací s následnou úpravou objemu pomocí plasmaextraktoru se adjustovala koncentrace jaderných buněk na cílový objem. Pro odstranění kontaminujících erytrocytů byla použita standardní gradientová centrifugace na HISTOPAQUE-1077 (Sigma) s následným trojím promytím a závěrečným převedením do autologní plazmy za současné adjustace na cílovou koncentraci jaderných buněk. Provedl se také odběr vzorku na kontrolu sterility a fenotypizaci jaderných buněk průtokovou cytometrií s monoklonálními protilátkami (anti CD 45, CD 3, CD 16, CD 19, CD 34 a CD 133). Cílová koncentrace jaderných buněk v roztoku byla cca 10^8 v 1 ml. Soustředili jsme se především na hodnocení počtu CD 34+ buněk a CFU-GM (Colony forming unit – granulocyte macrophage \approx kmenová buňka, z níž se dále diferencují granulocyty, monocyty a makrofágy). Pro intrakoronární aplikaci jaderných buněk byl buněčný koncentrát ponechán v uzavřeném systému transportního vaku až do vlastní aplikace v katetrizační laboratoři.

3.9 Intrakoronární aplikace mononukleárních buněk kostní dřeně

Autologní mononukleární buňky kostní dřeně (přesněji buněčný koncentrát) byly aplikovány nemocným ještě téhož dne, co byl proveden odběr kostní dřeně (t.j. za 3-5 dní po STEMI u časné a za 7-11 dní u pozdní terapeutické skupiny) intrakoronárně (i.c.). V rámci prevence trombotických komplikací byla pacientům ponechána antiagregační terapie (Anopyrin, Plavix). Před aplikací buněk byl podán bolus heparinu v závislosti na váze dle standardního protokolu 0,02 ml Heparinu/1kg váhy pacienta. Pro možnost podrobnějšího zhodnocení rychlosti průtoku krve tepnou byla použita metoda hodnocení pomocí „corrected TIMI frame count“ a stupeň perfuze na úrovni mikrocirkulace pomocí metody „myocardial blush grade“. Aplikace KB byla provedena v katetrizační laboratoři pod standardní RTG kontrolou metodou intermitentní ischemie, tzv. metodou „over the wire PCI“ popsanou Strauerem a spol.¹⁴². Do infarktové tepny byl zaveden, do místa předchozí intervence (stentu) krátký angioplastický balóněk s centrálním lumenem (Maveric, Boston Scientific, France, obr. 13).

Obr. 13.: Katetr s balónkem - Maveric, Boston Scientific, France.



Po nízkotlakém nafouknutí balónku byla do přechodně obturované tepny během cca 2-3 minut aplikována suspenze připravených dřeňových buněk o objemu 2-5 ml, poté byl

balónek vyfouknut a perfuze myokardu znovu obnovena. Celý postup byl opakován v intervalech 3-5 minut 3-5x do aplikace celého množství buněčného koncentrátu. Celková doba ischemie byla 7-18 min. Po ukončení výkonu byl pacient monitorován na koronární jednotce po dobu 24 hodin. Provedeny byly sériové náběry kardiospecifických enzymů a kontrolní 12 ti svodové EKG k vyloučení nové ischemické léze myokardu.

3.10 Elektroardiografie a hodnocení EKG křivky

Standardní 12 ti svodové EKG bylo hodnoceno opakovaně během vstupní hospitalizace (od přijetí 3 x po 8 hodinách s následnou kontrolou denně ráno, po implantaci u aktivně léčené skupiny také po 8 hodinách, dále při dimisi ze vstupní hospitalizace, při každé ambulantní kontrole a během 4 měsíční hospitalizace). Hodnotili jsme srdeční frekvenci, trvání jednotlivých úseků (PQ, QRS, QT) a dále změny ST segmentu se zaměřením na ischemické projevy tj. elevace a deprese.

3.11 Ambulantní monitorování dle Holtera

Pro informaci o výskytu poruch srdečního rytmu a počtu a závažnosti ischemických epizod jsme použili 24 hodinové ambulantní monitorování dle Holtera. Pacienti byli takto vyšetřeni při dimisi ze vstupní hospitalizace a za 1 a 4 měsíce od randomizace. Přístroj zaznamenával trvale po celou dobu vyšetření EKG křivku (3 svody – II, V1, V5). Analýza nálezů byla provedena po ukončení monitorace nezávislým specialistou (arytmologem). Hodnocení bylo zaměřeno především na četnost a povahu arytmií (vyloučení prognosticky závažných asymptomatických poruch rytmu). Dále jsme hodnotili i chování a změny ST úseku tj. přítomnost depresí a elevací.

3.12 Echokardiografické vyšetření

Echokardiografické vyšetření bylo provedeno podle standardního vyšetřovacího protokolu v echokardiografické laboratoři II. interní kliniky kardiologie a angiologie VFN a v echokardiografické laboratoři III. Interní kliniky FNKV, vždy na přístroji Vivid 7 (Vingmed-General Electric, Horten, Norway) ¹⁴³. Na vyšetřování sledovaného souboru nemocných (27 pacientů) se podíleli nezávislí zkušení vyšetřující. Všechny hodnoty byly měřeny nejméně třikrát a průměrovány. Vyšetření byla prováděna bez znalostí výsledků klinických a laboratorních. Měření byla prováděna podle doporučení Americké společnosti pro echokardiografii (ASE) ve standardních projekcích - parasternální krátké ose - PSAX, dlouhé ose - PLAX, apikální projekci – 4 dutinové (4AC), 5 dutinové (5AC), 3 a 2 dutinové (3AC a 2AC) sondou MS3 o frekvenci 3,5 MHz ¹⁴⁴. Jednotlivé parametry byly v řadě případů pro přesnost indexovány na velikost tělesného povrchu (BSA) podle vzorce (norma BSA je obecně považován 1,73 m² pro dospělé):

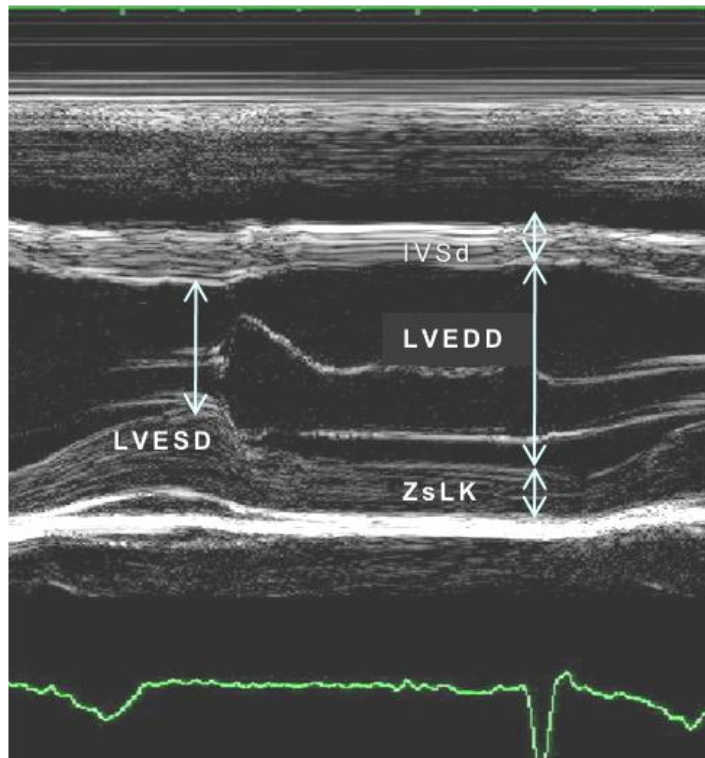
$$\text{indexace na BSA (m2)} = \text{váha (kg)}^{0,425} \times \text{výška (cm)}^{0,725} \times 71,84 \times 10^{-4}$$

Vzhledem k zacílení pohledu na efektivitu aplikace BMNCs a jejich vlivu na remodelaci LK bylo echokardiografické vyšetření směřováno především na hodnocení systolické a diastolické funkce LK a její kontraktilitu v jednotlivých segmentech.

3.12.1 Rozměry levé komory

Rozměry LK byly stanovovány z parasternální dlouhé osy ze záznamu M-způsobem, kdy kurzor je vedený kolmo na interventrikulární septum a zadní stěnu LK pod úrovní cípů mitrální chlopně. Měření byla prováděna na konci diastoly určeném kmitem R na současně registrovaném EKG. Metodou vedoucího echa byly měřeny tyto parametry: diastolický rozměr interventrikulárního septa (IVSd), diastolický rozměr LK (LVEDD), systolický rozměr dutiny LK (LVESD) a rozměr zadní stěny (ZsLK), obr. 14. Dilatace LK byla přítomná v případě LVEDD vztažený na povrch těla $>30\text{mm/m}^2$.

Obr. 14.: Ukázka echokardiografického jednorozměrného záznamu (M-mode) struktur levé komory (LK) získaného v PLAX projekci (IVSd – interventrikulární septum v diastole, LVEDD – diastolický rozměr levé komory, LVESD – systolický rozměr levé komory, ZsLK – zadní stěna).



3.12.2 Hmotnost levé komory, relativní tloušťka stěny LK

Stanovení hmotnosti LK bylo spočteno pomocí rovnice krychle a indexováno na BSA, přičemž norma pro muže 125g/m², ženy 111g/m².

$$\text{Hmotnost LK} = 1,04 \cdot [(IVSd + LKd + ZSd)^3 - LKd^3] - 13,6 \text{ g (parametry v cm)}$$

(LK – levá komora, IVSd – diastolický rozměr interventrikulárního septa, ZSd – rozměr zadní stěny v diastole, LKd – diastolický rozměr levé komory)

Relativní tloušťka stěny LK (RWT) byla kalkulovaná vzorcem:

$$RWT = \frac{2 \cdot ZSd}{LKd}$$

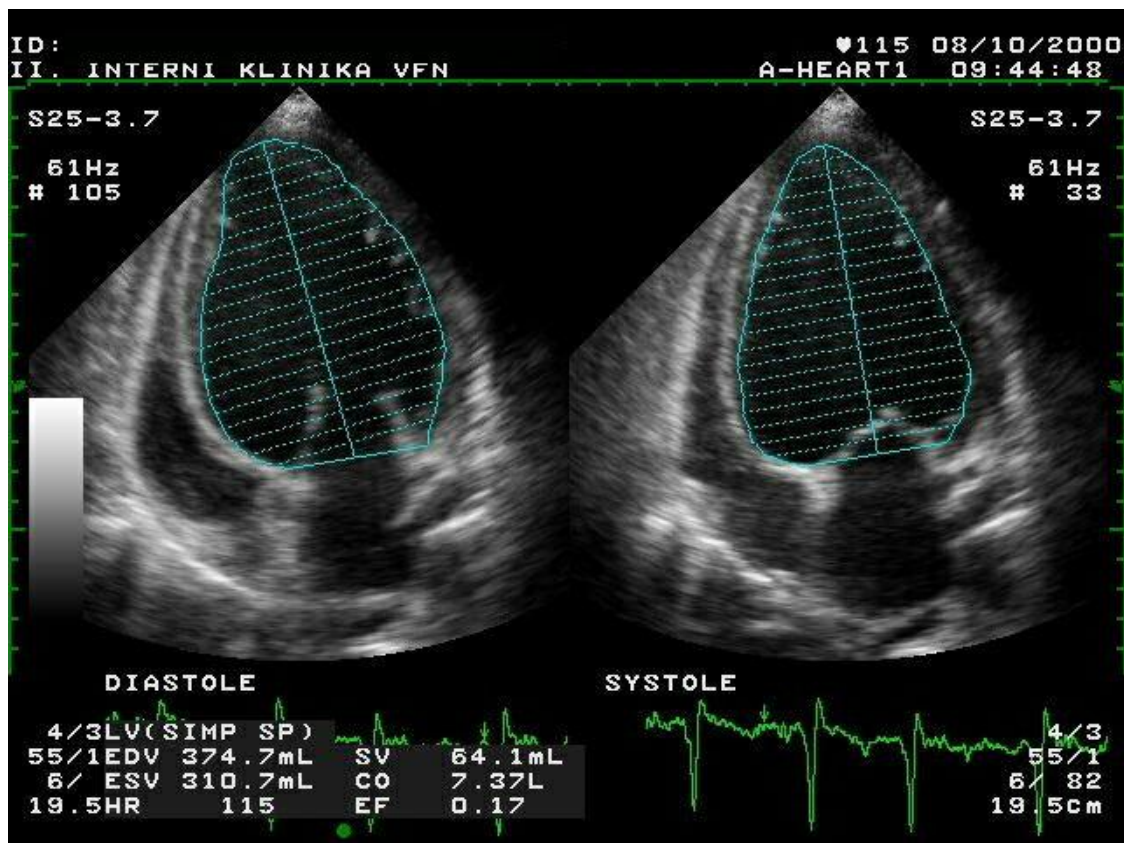
(ZSd \approx ZsLK – rozměr zadní stěny levé komory, LKd – rozměr levé komory v diastole)

Koncentrická remodelace nebo hypertrofie byly přítomny pokud RWT \geq 0,45. Geometrie LK pak byla následně klasifikovaná jako normální (normální hmotnost LK a normální RWT), koncentrická remodelace (normální hmotnost LK a vyšší RWT), excentrická hypertrofie (vyšší hmotnost LK a normální RWT) a koncentrická hypertrofie (zvýšená hmotnost a RWT).

3.12.3 Endsystolický a enddiastolický objem LK

Tyto objemy byly stanoveny dle Simpsonova pravidla ze 4AC projekce, které je založené na měření objemů LK metodou sumace disků. Hodnocení bylo provedeno obtažením kontury endokardu LK a stanovením dlouhé osy komory, obr. 15. Program rozdělí osu na definovaný počet disků a rozměry krátkých os vyhledá sám. Norma enddiastolického objemu (LVEDV) < 94ml/m² (160ml), endsystolického objemu (LVESV) < 44ml/m² (75ml).

Obr. 15.: Echokardiografické hodnocení funkce levé komory dle Simpsonova pravidla (EFLK – ejekční frakce levé komory).



3.12.4 Systolická funkce levé komory

Systolická funkce levé komory byla hodnocena pomocí 2 metod:

- Hodnocení systolické funkce způsobem M: Systolická funkce LK byla hodnocena podle parametru - frakčního zkrácení (FS – fractional shortening). FS odráží kontraktilitu basálních segmentů LK. Přesněji se jedná o basální část IVS a zadní stěny. Normální hodnoty jsou u dospělého $36 \pm 6\%$. Výpočet byl proveden z rovnice:

$$FS = \frac{LKd - LKs}{LKd}$$

(*LKd – diastolický rozměr levé komory, LKs – systolický rozměr levé komory*)

- Hodnocení globální systolické funkce z dvourozměrného zobrazení dle Simpsonova pravidla (metoda sumace disků). Jedná se o přesnější metodu k možnosti posouzení regionálních poruch kinetiky. Využívá se stanovení objemů LK (viz výše) – LVEDV (kmit R QRS komplexu) na konci diastoly a na konci systoly LVESV. Z těch je pak vypočítána LVEF dle vzorce:

$$LVEF (\%) = LVEDV - LVESV / LVEDV$$

(*LVEDV – enddiastolický objem levé komory, LVESV- endsystolický objem levé komory*)

Vyšetření bylo provedeno ve 2 na sebe kolmých řezech ze 4AC a 2AC projekce. LK byla rozdělena v podélné ose na 20 disků. Norma je 50 - 75%.

3.12.5 Hodnocení regionální kontraktility LK

K hodnocení regionální kontraktility LK byl použit klasický 16ti segmentový model. Ten využívá rozdělení stěn LK na jednotlivé segmenty v podélné a příčné ose. Podélně na 3 skupiny: basální, střední a apikální. V příčné ose na 1 - přední interventrikulární septum (IVS), 2 - přední stěna, 3 - laterální stěna, 4 - zadní stěna, 5 - spodní stěna, 6 - spodní IVS. Ve střední části komory jsou segmenty číslovány od 7-12 ve stejném pořadí, a v apikální části 13 - anteroseptální segment, 14 - posterolaterální, 15 – laterální, 16 – spodní segment.

Hodnocení je rozlišováno na 5 stupňů dle kinetiky v daném segmentu: 1. normokineza, 2. hypokineza, 3. akineza, 4. dyskineza a 5. aneurysma. Celkové skóre dělené počtem segmentů poskytuje semi - kvantitativní hodnocení poruch hybnosti stěn LK (WMSI \approx wall motion score index) ¹⁴⁵⁻¹⁴⁸.

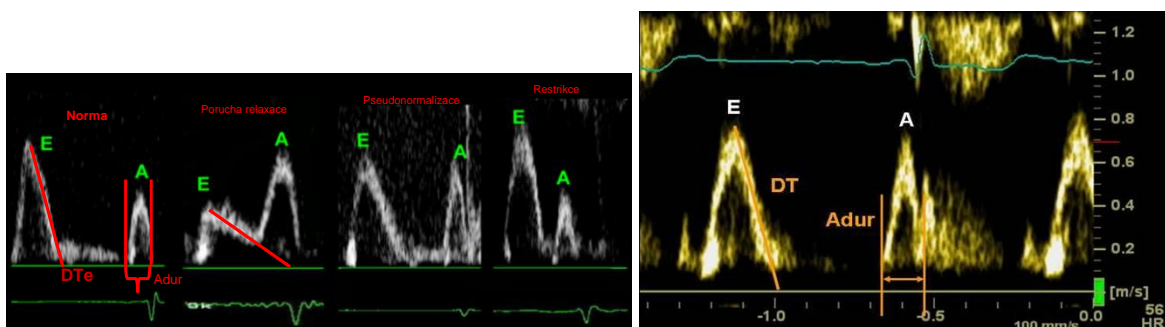
3.12.6 Hodnocení diastolické funkce:

Pro hodnocení diastolické funkce jsme použili nejběžnější způsob hodnocení pomocí pulzní dopplerovské echokardiografie, kdy využíváme záznamu toku přes mitrální chlopuň a toku v plicních žilách ze 4AC projekce.

Hodnoceny byly následující parametry:

1) Hodnocení rychlosti toku pomocí pulzní dopplerovské echokardiografie transmitrálně: Vrcholová rychlost vlny E je dána velikostí tlakového gradientu mezi síní a komorou na počátku diastoly. Její velikost odráží rychlost relaxace komory, tlak v levé síní (LS) a poddajnost LK. Doba poklesu rychlosti vlny E \approx decelerační čas (DTe). DTe odráží rychlost vzestupu tlaku v LK v časné diastole. Je závislý na délce trvání relaxace komory a je měřítkem její compliance. Velikost vlny A a její doba trvání (Adur) závisí na poddajnosti LK, preloadu a na kontraktilitě LS, obr. 16.

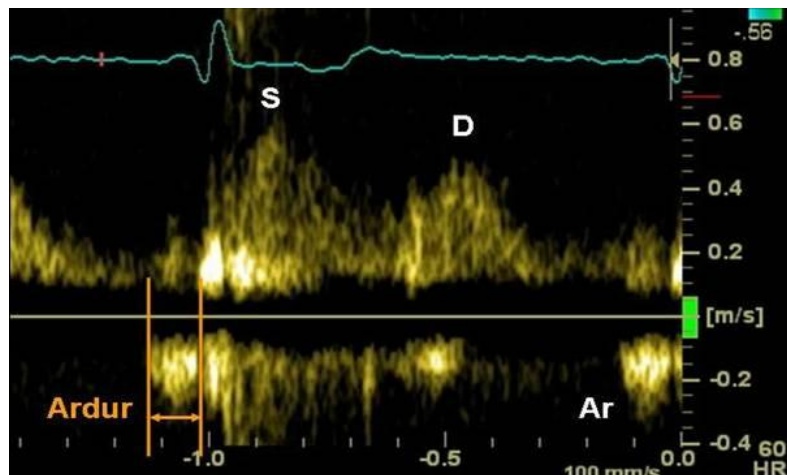
Obr. 16.: Pulzně dopplerovský záznam transmitrálního průtoku získaný ze 4AC projekce (E – vlna časného transmitrálního průtoku, A – vlna pozdního transmitrálního průtoku, DTe – decelerační čas vlny E, Adur – doba trvání vlny A).



2) Hodnocení rychlosti toku pomocí pulzní dopplerovské echokardiografie v pravé horní plicní žíle (ze 4AC projekce pod kontrolou barevného dopplerovského mapování). Měřena byla velikost vlny S, která je závislá na tlaku v LS a její poddajnosti. Vlna D \approx vlně E, délka

trvání reversní vlny Ar v plicní žíle během síňové systoly (Ardur) a následně spočten rozdíl trvání vln Ar a A (Ardur a Adur), obr. 17.

Obr. 17.: Pulsně doplerovský záznam průtoku přes plicní žíly ze 4AC projekce: hodnocení vlny S a D, délka trvání vlny Ar.



Těžká diastolická dysfunkce byla definovaná jako restriktivní typ plnění LK: E/A nad 2 společně s DTe pod 150ms, tbl. 4.

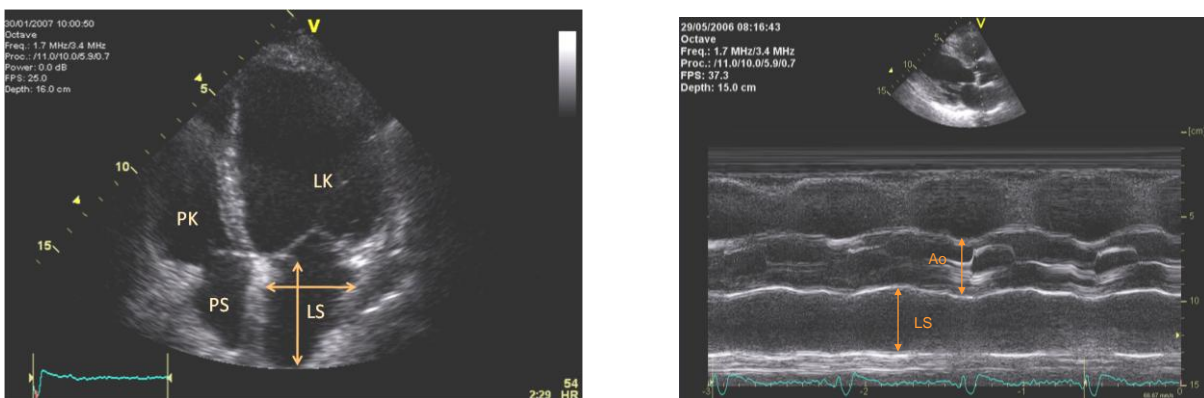
Tbl. 4.: Schéma klasifikace diastolické funkce levé komory (LK) podle Canadian Consensus on diastolic dysfunction¹⁴⁹.

Diastolická funkce	E/A	DTe (ms)	Ardur-Adur (ms)
Norma	> 1	150-200	< 20
Porucha relaxace	< 1	> 200	< 20
Pseudonormalizace	> 1	150-200	> 20
Restrikce	>> 1	< 150	> 20

3.12.7 Velikost levé síně

V rámci sledování remodelace srdce jsme porovnávali také vliv aplikace BMNCs na dlouhodobou změnu velikosti LS, obr. 18. Vyšetření bylo provedeno klasicky měřením způsobem M s kurzorem umístěným přes cípy aortální chlopně a kořen aorty. Měření je provedeno v okamžiku uzávěru aortální chlopně. Dále jsme měřili LS z apikální projekce – 4AC, a to příčný a longitudinální rozměr. Planimetricky jsme LS neměřili. Normální velikost LS je do 45mm (indexovaná k BSA do 22mm/m²). Transversální rozměr hodnocený ze 4AC projekce je zpravidla mírně větší oproti měření M modem.

Obr. 18.: Rozměrové hodnocení velikosti levé síně ze 4AC projekce a z PLAX projekce.

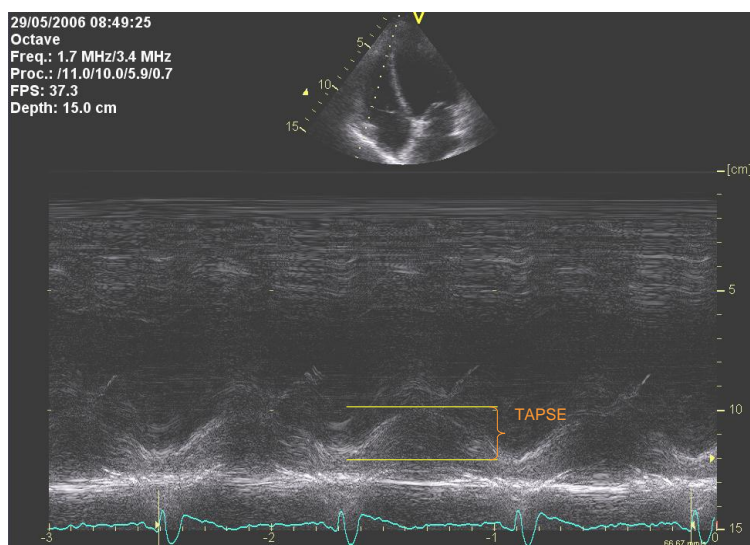


3.12.8 Velikost pravostranných oddílů

Hodnotili jsme také velikost pravostranných oddílů. Pravá komora (PK) byla měřena ze 4AC projekce. Stanovili jsme transversální rozměr v 1/3 podélného rozměru směrem k sondě od trikuspidálního anulu. Norma (absolutní rozměr) by neměl přesáhnout 42 mm.

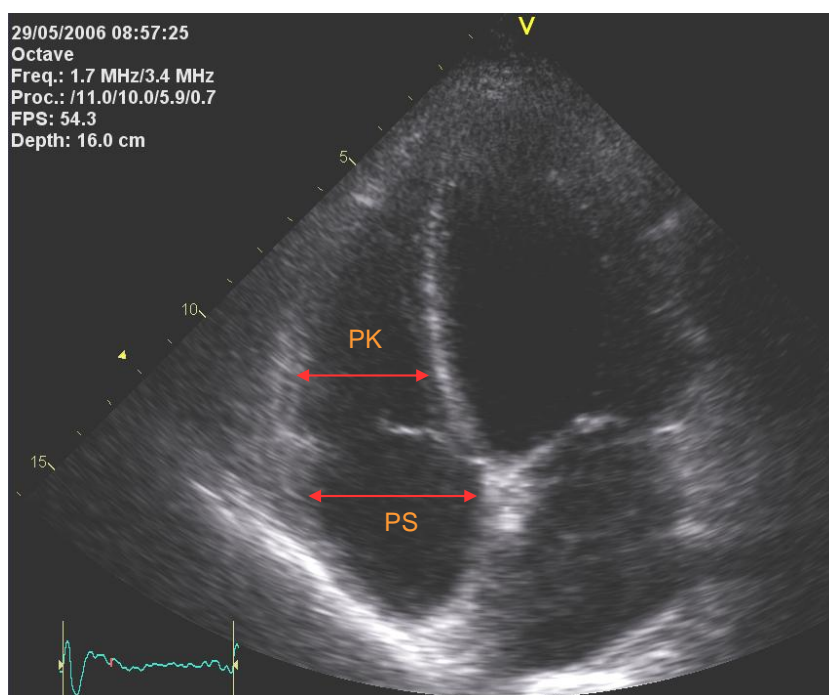
Hodnocení systolické longitudinální kontraktility bylo provedeno orientačně ze 4AC projekce dle amplitudy exkurse trikuspidálního anulu. Tento rozměr se označuje jako TAPSE (tricuspid annulus plane systolic excursion). Jeho normální hodnota je 25 ± 4 . Při systolické dysfunkci PK se hodnoty TAPSE snižují, obr. 19.

Obr. 19.: Hodnocení TAPSE (tricuspid annulus plane systolic excursion) ze 4AC projekce.



Pravá síň byla hodnocena obdobným způsobem, z transversálního rozměru ze 4AC projekce v 1/3 longitudinální směrem od sondy a trikuspidálního ústí, obr. 20. Za normu je považovaný rozměr do 45mm.

Obr. 20.: Hodnocení velikosti pravé síně a pravé komory ze 4AC projekce.

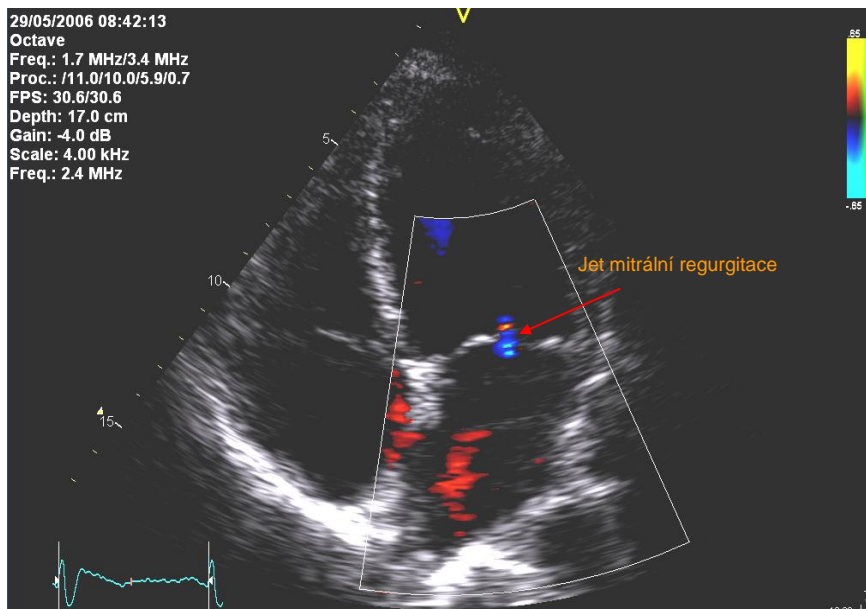


PS - pravá síň, PK – pravá komora

3.12.9 Hodnocení chlopenních vad

Strukturální a funkční změny srdečních chlopní byly hodnoceny pomocí dvourozměrného zobrazení a dopplerovských technik. Semi-kvantitativní hodnocení závažnosti regurgitačních vad aortální, mitrální chlopně bylo prováděno ze 4 stupňové klasifikace vycházející z propagace regurgitačních proudění do příslušného srdečního oddílu posuzované dopplerovským mapováním¹⁵⁰, obr. 21.

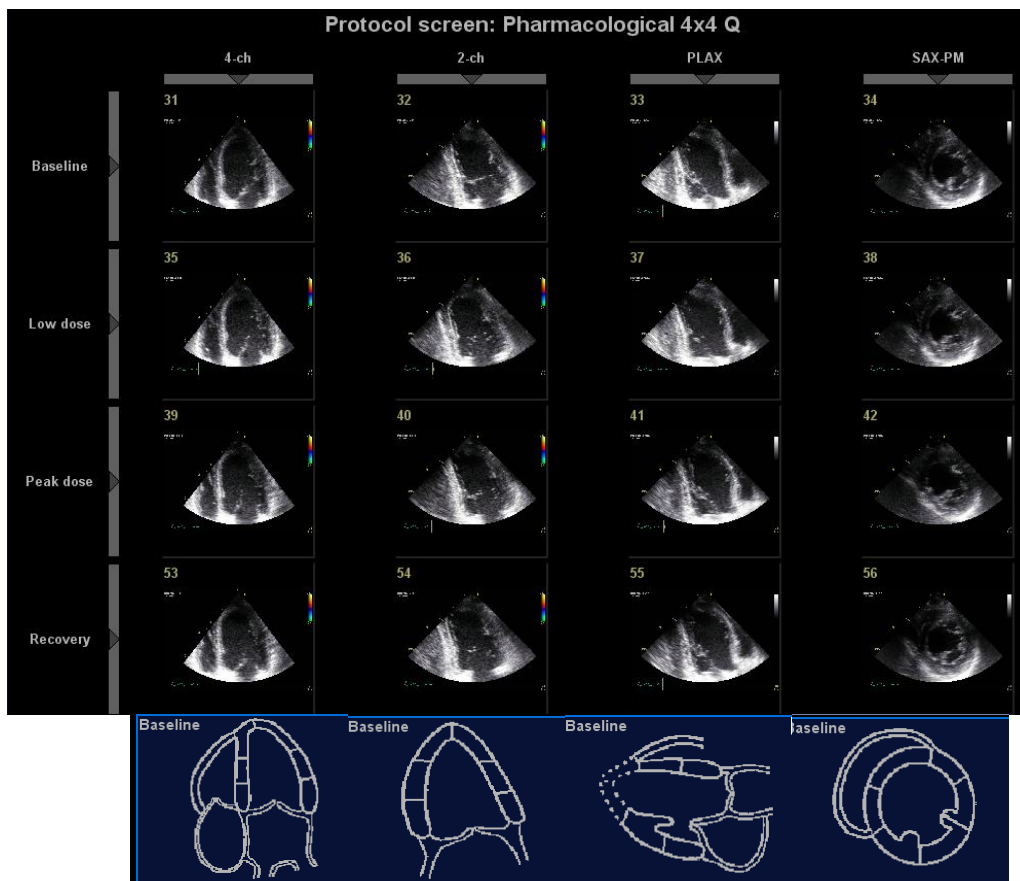
Obr. 21.: Barevné mapování mitrální regurgitace – 4AC projekce (hodnocení délky regurgitačního jetu).



3.13 Dobutaminová echokardiografie

Tato metoda sloužila k detekci viability hibernovaného myokardu, kdy po aplikaci malých dávek dobutaminu (5, 10 ug/kg/min) bylo zjišťováno zda dochází ke zlepšení funkce LK na základě předpokladu potenciace kontraktility LK ¹⁵¹. Echokardiografické sledování kinetiky je prováděné při dvourozměrné echokardiografii a to ve standardních projekcích – PLAX, PSAX, 4AC a 2AC, dále jednorozměrné a dopplerovské hodnocení. Měření a porovnávání bylo zaměřeno na regionální kinetiku s analýzou jednotlivých segmentů myokardu v klidu a po zátěži dobutaminem (16ti segmentový model ¹⁵², viz výše) s otázkou přítomnosti reversibilní ischemie, obr. 22. V případě, že i po max. aplikaci dobutaminu nedošlo k potenciaci kinetiky byl hodnocen nález jako ireversibilní akineza se zničeným myokardem ¹⁵³.

Obr. 22.: Dobutaminová echokardiografie, popis viz výše.



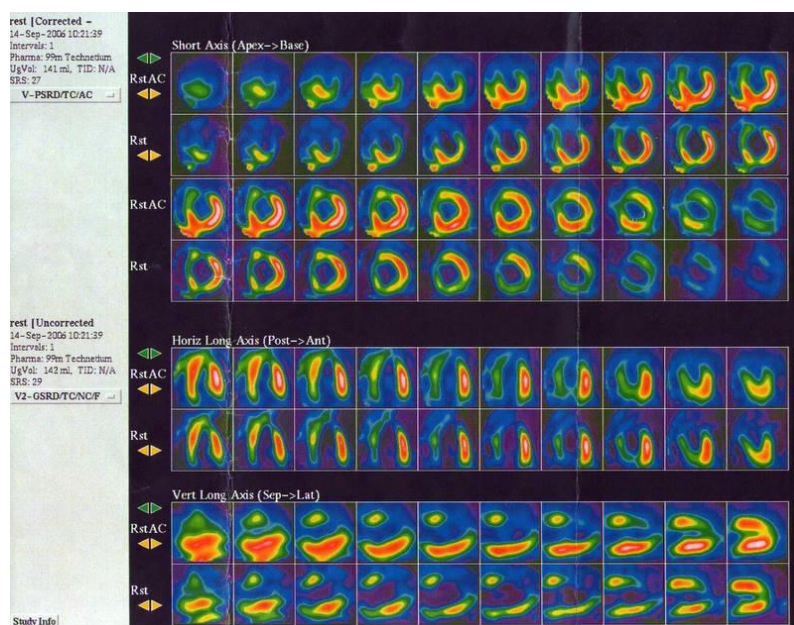
3.14 Kontrolní koronarografie

Vyšetření bylo provedeno s odstupem 4 měsíců od STEMI u všech nemocný (aktivně léčených i v kontrolní skupině). Vyšetření proběhlo v katetrizační laboratoři II. Interní kliniky a nemocnice na Vinohradech, standardním postupem. Vyšetření bylo zaměřeno v první řadě na zhodnocení nálezu na věnčitých tepnách s otázkou restenózy (instent) popř. nově vzniklé významné stenózy.

3.15 Vyšetření myokardiální viability pomocí SPECTu

Scintigrafická objektivizace distribuce perfuze myokardu LK byla realizována metodou hradlované jednofotonové emisní tomografie (GSPECT) ^{154, 155} na dvoudetektorové kameře (Infinia Hawkeye GE) v nemocnici na Homolce při dimisi (recentně po STEMI s odstupem minimálně 5 dní). Vyšetření probíhalo za klidových podmínek s i.v. podáním [^{99m}Tc]-Tetrofosminu (600 MBq). Distribuce perfuzního indikátoru byla hodnocena z jednotlivých řezů a z polárních map vizuálně a pomocí kvantifikačních programů 4D-MSPECT, který umožňuje korekci na zeslabení a rozptyl metodou low-dose CT. Ke specifikaci viability byl použit 16ti segmentový model (viz výše). Oblast poškozeného myokardu byla prostřednictvím scintigrafie porovnávána s ostatním zdravým myokardem LK, obr. 23. Kromě relativní klidové perfuze bylo stanoveno systolické ztluštění a pohyb stěny. Stanovené hodnoty byly po normalizaci porovnány s implementovanou standardní databází normálních pacientů.


Obr. 23.: SPECT myokardu po i.v. podání [^{99m}Tc]-Tetrofosminu (600 MBq) a změny distribuce perfuze v jednotlivých segmentech (barevné rozdíly ukazují na změnu distribuce ve smyslu poruchy perfuze myokardu anterolaterálně).



3.16 Kvalita života

Po 24 měsících od STEMI byla v rámci sledování zjištěna kvalita života. K hodnocení byl použitý standardizovaný dotazník kvality života SF-36¹⁵⁶⁻¹⁵⁸. Hodnoceny byly tyto parametry: 1. fyzické funkce (PF), 2. fyzické omezení rolí (RP), 3. tělesná bolest (BP), 4. celkové vnímání vlastního zdraví (GH), 5. vitalita (VT), 6. fyzické nebo emoční omezení sociálních funkcí (SF), 7. emoční omezení rolí (RE), 8. všeobecné duševní zdraví (MH). Shrnutí jednotlivých domén viz. Obr. 24. Výsledky byly poté srovnávány s kvalitou života běžné populace (hodnoceno dle Oxfordského HRQOL).

Obr. 24.: Kvalita života a její hodnocení.

- 1. fyzické funkce (PF),
 - 2. fyzické omezení rolí (RP),
 - 3. tělesná bolest (BP),
 - 4. celkové vnímání vlastního zdraví (GH).
 - 5. vitalita (VT),
 - 6. fyzické nebo emoční omezení sociálních funkcí (SF),
 - 7. emoční omezení rolí (RE),
 - 8. všeobecné duševní zdraví (MH),
- 
- 8 domén**

3.17 Statistická analýza

Statistické zpracování prezentovaných výsledků bylo provedeno s použitím programu Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft corp) a statistického programu JMP 3.2.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Hodnoty byly uváděny jako průměr \pm standardní odchylka nebo jako procentuální zastoupení. V souhrnu jsme použili tyto metody: Studentův nepárový t-test u kontinuálních proměnných pro srovnání průměrných hodnot jednotlivých vyšetřovaných spojitých parametrů mezi jednotlivými skupinami, pokud byla distribuce Gaussovského typu. U dichotomických proměnných analýza rozptylu ANOVA metoda: pro vzájemné srovnání všech souborů, dále pro diskrétní veličiny byl použit chí-kvadrát² nebo Fischerovým testem. K posouzení korelací mezi proměnnými bylo používáno lineární regresní analýzy se stanovením Pearsonova korelačního koeficientu. Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde p bylo menší než 0,05. Všechny použité testy byly dvoustranné.

4 Výsledky

Do studie bylo zařazeno po splnění vstupních kritérií a podepsání informovaného souhlasu celkem 27 pacientů (22 mužů, 5 žen) průměrného věku 59 ± 12 let. Celková doba sledování nemocných byla 24 měsíců, přičemž byla rozdělena do dvou fází – krátkodobé sledování (4 měsíce) a dlouhodobé (24 měsíců). Ze souboru bylo 17 pacientů zařazeno do aktivně léčené skupiny – skupina pacientů, kterým byly implantované BMNCs (7 do skupiny časně léčby, 10 do skupiny pozdní léčby) a 10 do kontrolní skupiny.

4.1 Vstupní charakteristika souboru

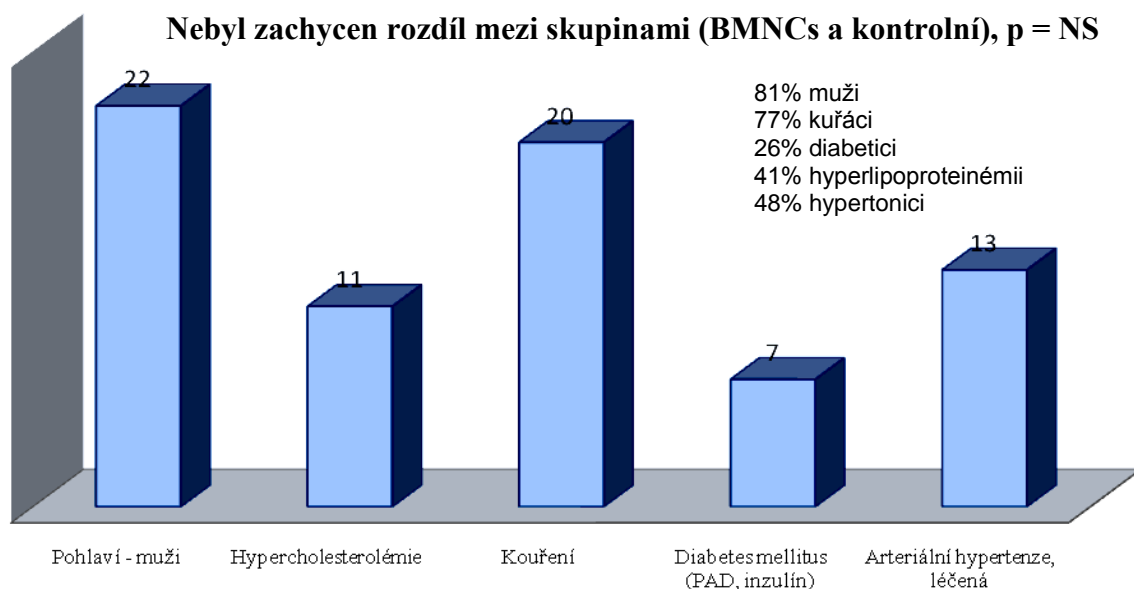
Obě skupiny (aktivně léčení nemocní i kontrolní skupina) se významněji nelišily v základních vstupních parametrech, podrobnosti v tbl. 5.

Tbl. 5.: Vstupní charakteristika souboru (celkový počet pacientů = 27, kontrolní skupina 10 a BMNCs skupina 17 nemocných).

	BMNCs skupina	Kontrolní skupina	<i>p</i> <i>hodnota</i>
	(n=17)	(n=10)	
Pohlaví - muži, n (%)	12 (71)	10 (100)	0,56
Věk (roky)	61 ± 14	54 ± 10	0,18
Hypercholesterolémie (%)	5 (30)	6 (60)	0,87
Kouření (%)	11 (66)	9 (90)	0,69
Diabetes mellitus (%)	5 (29)	2 (20)	0,34
Arteriální hypertenze, léčená (%)	7 (42)	6 (60)	0,79
Systolický tlak, vstupní (mmHg)	129±33	142±21	0,21
Diastolický tlak, vstupní (mmHg)	77±18	82±21	0,39
Tepová frekvence (počet tepů/min)	83±19	78±10	0,48

Mezi skupinami byla prevalence hlavních kardiovaskulárních rizikových faktorů srovnatelná. Jednalo se převážně o muže (81%), kuřáky (77%) s mírnou nadváhou až obezitou I. stupně (průměrný body mass index /BMI/ 28,4 ± 1,9 v aktivně léčené skupině vs. 28,9 ± 2,2 v kontrolní skupině, p=0,89), 26% tvořili diabetici (z toho 44% bylo na dietě, 56% na perorálních antidiabeticích nebo inzulinoterapii). Jak vyplývá z výše uvedených hodnot, soubor zahrnuje pacienty s vysokým rizikem aterosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění, graf 1.

Graf 1.: Prevalence kardiovaskulárních rizikových faktorů v souboru (n=27), čísla znázorňují počet pacientů.



4.2 Akutní katetrizační vyšetření, perkutánní koronární angioplastika při akutním STEMI

Všichni pacienti podstoupili akutně při přijetí koronární angioplastiku (PCI) s implantací stentu v povodí infarktové tepny, kterou byl u všech nemocných ramus interventrikularis anterior. Pacientům byly implantované pouze metalické stenty, průměrný počet stentů na jednoho pacienta byl u aktivně léčených nemocných $1,3 \pm 0,4$ a kontrolní skupiny $1,2 \pm 0,7$, $p=0,72$. Celková doba od vzniku bolesti do PCI (do reperfuze) byla u aktivně léčené skupiny 315 min (rozmezí 300-660min) a kontrolní skupiny 330min (rozmezí 300-630min), $p=0,75$. U pacientů v obou skupinách bylo vstupní TIMI v infarktové tepně 0 do periferie. Po PCI bylo u aktivně léčených nemocných v 77% TIMI III a v 80% u skupiny kontrolní, $p=0,68$. Myocardial blush grade (MBG) byl $1,35 \pm 0,79$ v aktivně léčené skupině vs. $1,7 \pm 0,82$, $p=0,39$. U diabetiků byl pozorovaný horší průtok do periferie po

revaskularizaci, velmi pravděpodobně související s horší mikrocirkulací, kdy dosahovali TIMI II do periferie, oproti tomu ostatní pacienti měli převážně po revaskularizaci TIMI III ($r= 0,56$, $p< 0,001$). Aplikace IIb/IIIa inhibitorů (® Reo-Pro) byla použita u 2 pacientů zařazených do aktivně léčené skupiny. Tři pacienti byli vstupně v plicním edému (2 z aktivně léčené skupiny a 1 v kontrolní skupině). Blíže viz tabulka 6.

Tbl. 6.: Vstupní katetrizační vyšetření, základní charakteristika, koronární angioplastika.

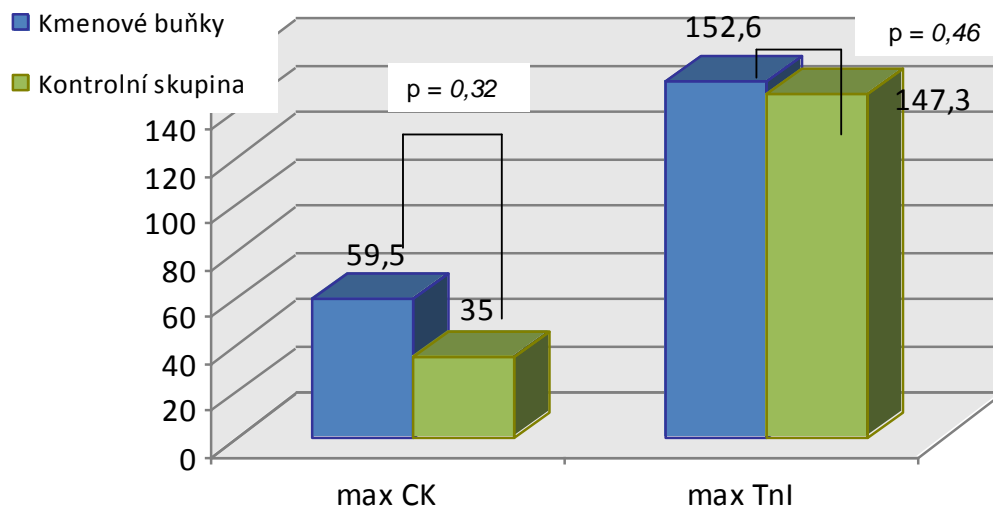
	BMNCs skupina	Kontrolní skupina	<i>p</i> <i>hodnota</i>
	(n=17)	(n=10)	
Postižení koronárních tepen			
SVD, n (%)	7 (41)	6 (60)	0,87
MVD, n (%)	10 (59)	4 (40)	0,34
Doba od vzniku bolesti do PCI (min)	315 (rozmezí 300 - 660)	330 (rozmezí 300–630)	0,75
Vstupní kreatinkináza (MB frakce)	6,38±1,9	2,85±2	0,12
Kardioenzymy			
Maximální kreatinkináza (ukat/l)	59,5 ± 12	35 ±17	0,32
Maximální troponin (ug/l)	152 ± 22	147 ±20	0,46
Killip klasifikace			
I/II, n (%)	15 (88)	9 (90)	0,46
III/IV, n (%)	2 (12)	1 (10)	0,59
TIMI flow po PCI			
Stupeň 2, n (%)	4 (23)	2 (20)	0,64
Stupeň 3, n (%)	13 (77)	8 (80)	0,68
MBG	1,35±0,79	1,7±0,82	0,39
Katecholaminová podpora, n (%)	2 (12)	1(10)	0,41
Aplikace IIb/IIIa inhibitorů, n (%)	2 (12)	0	0,21
Ejekční frakce levé komory, %	39 ± 7	39 ± 4	0,73

Vysvětlivky: BMNCs = bone marrow-derived stem cells, MVD = nemoc více tepen, PCI = perkutánní koronární intervence, SVD = nemoc 1 tepny, MBG= myocardial blush grade, TIMI – timi frame count

Pacienti dle laboratorních hodnot kardiomarkerů prodělali velký infarkt myokardu, celková maximální hodnota vzestupu troponinu byla u aktivně léčené skupiny 152 ± 22 ug/l a kontrolní skupiny 147 ± 20 ug/l, $p=0,46$, maximální hodnota kreatinkinázy byla $59,5 \pm 12$ vs.

35 ± 17 ukat/l, p=0,32. Nebyl zachycen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami (graf 2).

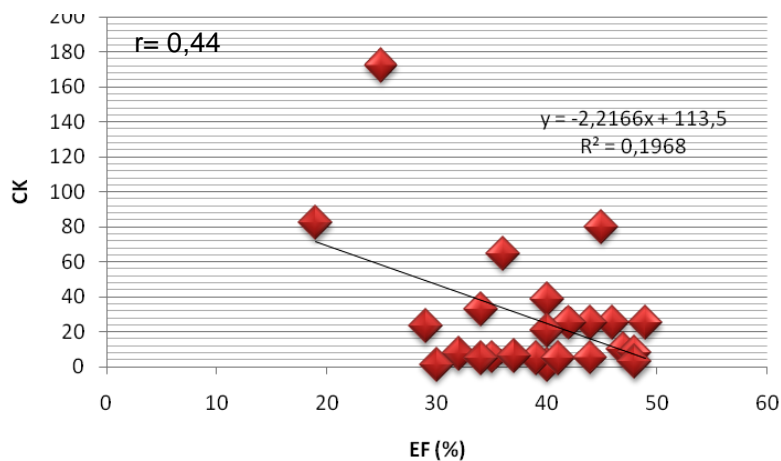
Graf 2.: Maximální hodnota kardiomarkerů za hospitalizace u souboru pacientů (aktivně léčených a kontrolní skupiny, n=27).



max. CK – maximální hodnota kreatinkinázy (ukat/l), max TnI – maximální hodnota troponinu I (ug/l).

Byla pozorovaná významná pozitivní korelace ($r=0,44$) mezi vzestupem kardiomarkerů resp. maximálních hodnot kreatinkinázy a poklesu vstupně naměřené LVEF (vyšetření echokardiograficky 24-48 hodin od PCI), graf 3.

Graf 3.: Graf ukazující na pozitivní korelaci mezi vzestupem CK a vstupní ejekční frakcí levé komory (%).



LVEF= EF(%) Ejekční frakce levé komory, CK kreatinkináza

Po úspěšném katetrizačním výkonu byli všichni pacienti léčeni dle guidelines české a evropské kardiologické společnosti ¹, tbl. 7. Nemocní byli po dobu půl roku léčeni duální antiagregační terapií (kyselina acetylsalicylová ® Anopyrin 100mg, klopidogrel ® Plavix 75mg). Dostávali po celou dobu sledování statiny (atorvastatin v dávce 20 mg). V časné době po infarktu myokardu u čtyř pacientů ze skupiny aktivně léčených a dvou z kontrolní nebyly podávány ACEi vzhledem k tendenci k hypotenzi, do medikace byly přidány až v průběhu následného sledování. Tři pacienti z aktivně léčené skupiny netolerovali betablokátor v první době po STEMI pro tendenci k bradykardii, medikace byla taktéž titrovaná až v následném období.

Tbl. 7: *Medikace po koronární angioplastice u randomizovaných nemocných (n=27), nebyl zachycen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinou nemocných s implantovanými BMNCs a kontrolní skupinou.*

	BMSCs skupina (n=17)	Kontrolní skupina (n=10)	P
Aspirin, n (%)	17 (100)	10 (100)	NS
Clopidogrel, n (%)	17 (100)	10 (100)	NS
ACE inhibitory, n (%)	13 (76)	8 (80)	NS
β-blokátory, n (%)	14 (76)	10 (100)	NS
Statiny, n (%)	15 (88)	10 (100)	NS

4.3 Vývoj v laboratorních nálezech se zaměřením na krevní obraz, biochemii a zánětlivé parametry

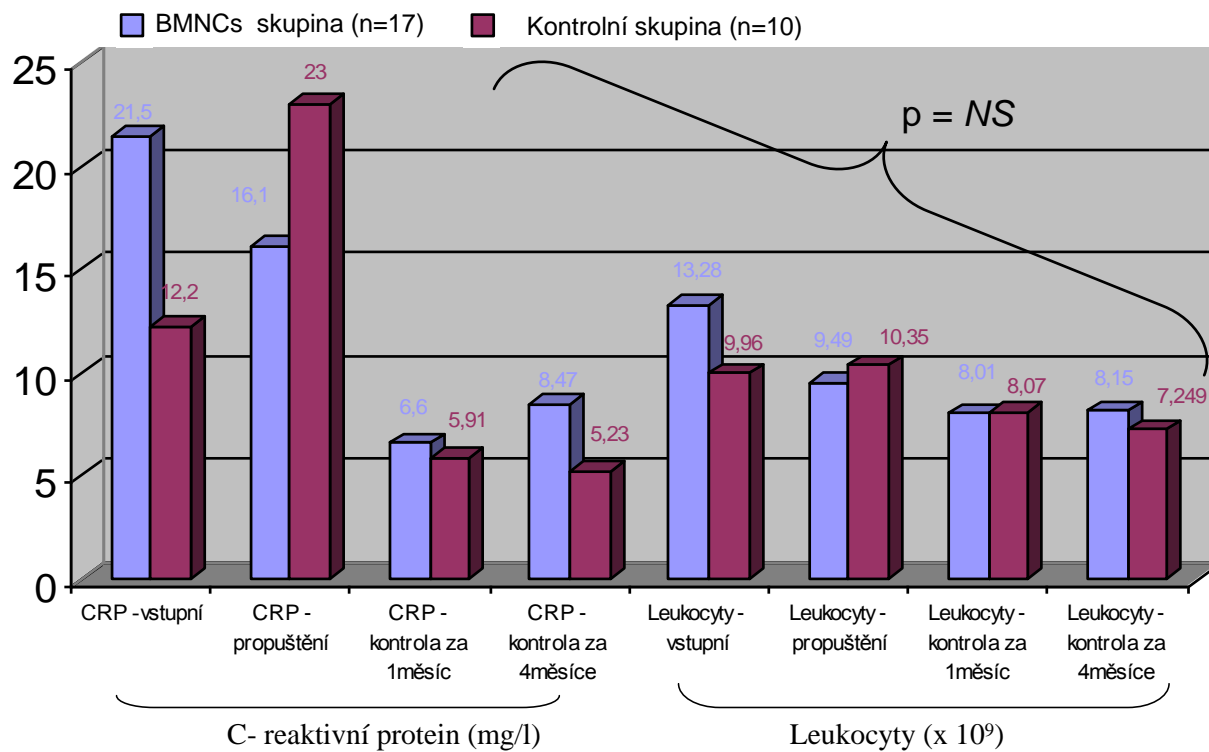
U všech nemocných byl proveden vstupně kompletní laboratorní odběr a byl opakovaný minimálně 3x během vstupní hospitalizace. Nebyl pozorovaný statisticky signifikantní rozdíl ve vstupních základních laboratorních parametrech – krevní obraz, iontogram. U aktivně léčených nemocných jsme pozorovali vyšší hodnoty jaterních enzymů (transamináz) – alaninaminotransferáza - ALT ($1,2 \pm 0,7$ ukat/l v aktivní skupině vs. $0,7 \pm 0,4$ ukat/l, $p=0,04$) a aspartátaminotransferáza - AST ($5,29 \pm 5$ ukat/l vs. $1,17 \pm 1$ ukat/l, $p=0,035$). U tří pacientů z každé skupiny byla verifikovaná vstupně mírná renální insuficience. Nebylo zjištěno pokatetrizačně signifikantní zhoršení renálních parametrů, tbl. 8.

Tbl. 8.: Základní vstupní laboratorní nálezy u sledovaného souboru 27 pacientů.

	BMSCs (n=17)	Kontrolní skupina (n=10)	P hodnota
C – reaktivní protein (mg/l)	21,5±42	12,2±23	0,65
Leukocyty ($10^9/l$)	13,28±4	9,96±4	0,49
Hemoglobin (g/l)	144,3±13	145,5±14	0,87
Erytrocyty ($10^{12}/l$)	4,68±0,4	4,73±0,6	0,83
Urea (mmol/l)	5,96±2	5,04±1,4	0,69
Kreatinin (umol/l)	86,1±33	96,5±16	0,32
ALT (ukat/l)	1,2±0,7	0,7±0,4	0,04
AST (ukat/l)	5,29±5	1,17±1	0,035

Zánětlivé parametry zahrnující leukocyty a C – reaktivní protein (CRP) byly vstupně v obou skupinách mírně zvýšené bez signifikantního rozdílu (leukocytóza vstupně $13,28 \pm 4$ vs. $9,96 \pm 4$ g/l v kontrolní skupině, $p=0,49$, CRP vstupně $21,5 \pm 42$ mg/l vs. $12,2 \pm 23$ mg/l, $p=0,65$), graf 4.

Graf 4.: Změny v zánětlivých parametrech – leukocyty, C- reaktivní protein (CRP) během sledování (vstupní hodnoty, při dimisi z hospitalizace, kontrolní náběry za 1,4 měsíce)



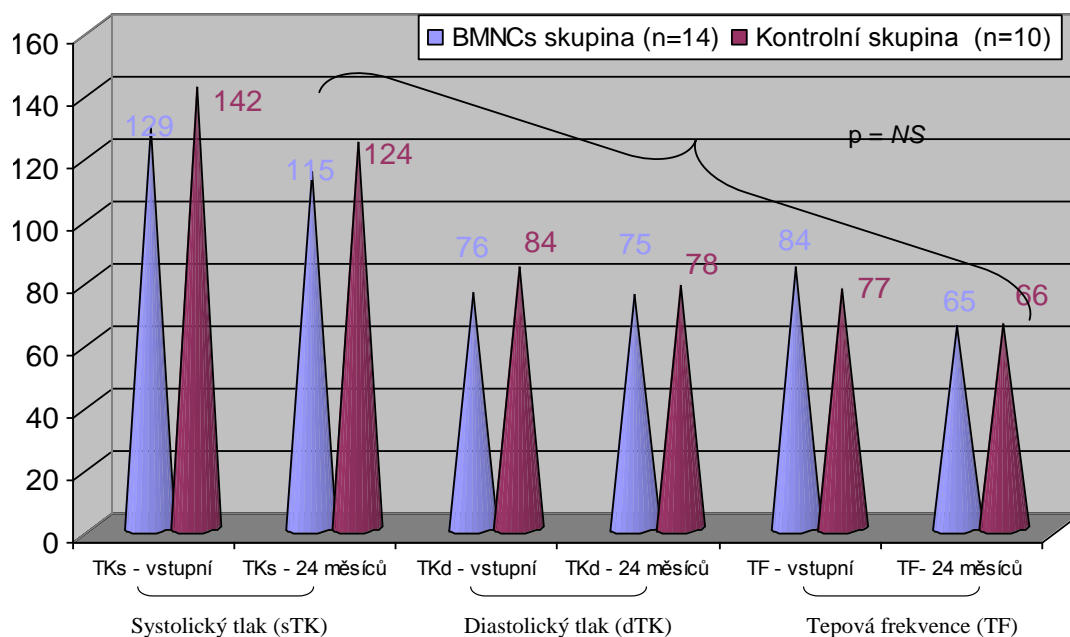
4.4 Hodnoty krevního tlaku a tepové frekvence

Hodnoty krevního tlaku a tepové frekvence v našem souboru pacientů kolísají během 24 měsíčního sledování ve velmi dobrých a uspokojivých rozmezích. U řady nemocných byla pozorovaná spíše tendence k nižším hodnotám krevního tlaku. Podkladem je nejspíše dysfunkce LK v rámci poinfarktové remodelace a poinfarktová konkomitantní antihyperetnznivní medikace (ACEi, betablokátoři), vývoj viz tbl. 9, shrnutí viz graf 5.

Tbl. 9.: Vývoj hodnot systolického tlaku (sTK), diastolického tlaku (dTK) a tepové frekvence (TF) během 24 měsíčního sledování (vstupní hodnoty, při dimisi ze vstupní hospitalizace a během následných kontrolních vyšetření za 1, 2, 4, 12 a 24 měsíců).

	Kmenové buňky (n=14)	Kontrolní skupina (n=10)	p hodnota
TKs (mmHg)			
Vstupní	129±33	142±28	NS
při dimisi	111±10	123±17	NS
za 1 měsíc	118±13	129±17	NS
za 2 měsíce	123±15	128±10	NS
za 4 měsíce	121±15	122±10	NS
za 12 měsíců	117±14	123±16	NS
za 24 měsíců	115±13	124±18	NS
Tkd (mmHg)			
Vstupní	76±18	84±21	NS
při dimisi	72±7	79±10	NS
za 1 měsíc	77±7	79±7,4	NS
za 2 měsíce	78±10	78±8	NS
za 4 měsíce	74±10	79±9,6	NS
za 12 měsíců	75±9	76±10	NS
za 24 měsíců	75±9	78±9,3	NS
TF (min)			
Vstupní	84±19	77±9	NS
při dimisi	75±8,7	75±12	NS
za 1 měsíc	73±7	74±5	NS
za 2 měsíce	70±10	71±5	NS
za 4 měsíce	75±12	67±6,3	NS
za 12 měsíců	68±7	68±11	NS
za 24 měsíců	65±7	66±8	NS

Graf 5.: Porovnání vývoje krevního tlaku – systolického a diastolického, tepové frekvence mezi skupinami v rámci 24 měsíčního sledování.



4.5 Vývoj EKG změn

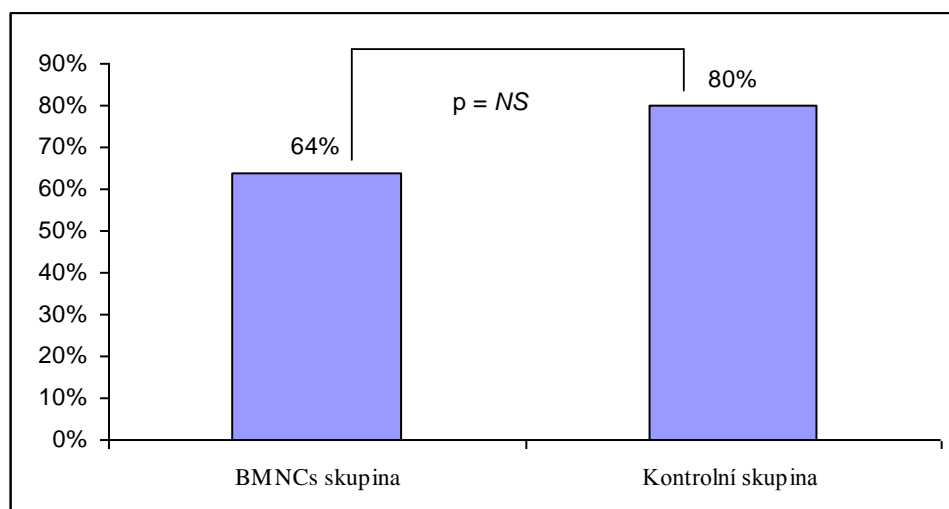
Změny na EKG odpovídaly v první době změnám při akutním anteroextenzivním STEMI. Vstupně byl nález ST elevací ve svodech I, aVL, V1 - V6. Při akutní PCI po otevření infarktové tepny došlo u 9 pacientů z BMNCs skupiny (64%) vs. 8 pacientů (80%) v kontrolní skupině k okamžité kompletní ST rezoluci. U všech nemocných, vzhledem k pozdní reperfuzi se nález na EKG vyvinul do obrazu jizvy (Q infarktu).

Během 4 měsíčního sledování jsme zaznamenali již jen nespecifické změny na EKG (úsek ST) u 1 pacienta v obou skupinách, a dále během 24 měsíců byl EKG nález prakticky stacionární (tbl. 10, graf 6).

Tbl. 10.: Vývoj EKG změn během 24 měsíčního sledování.

	Kompletní ST rezoluce při AIM - intervenci akutní	4 měsíce - změny nespecifické	stacionární nález na EKG za 12 a 24 měsíců
Kmenové buňky (n=17)	9 (64%)	1 (7,1%)	14 (100%)
Kontrolní skupina (n=10)	8 (80%)	1 (10%)	10 (100%)
	p=NS	p=NS	p=NS

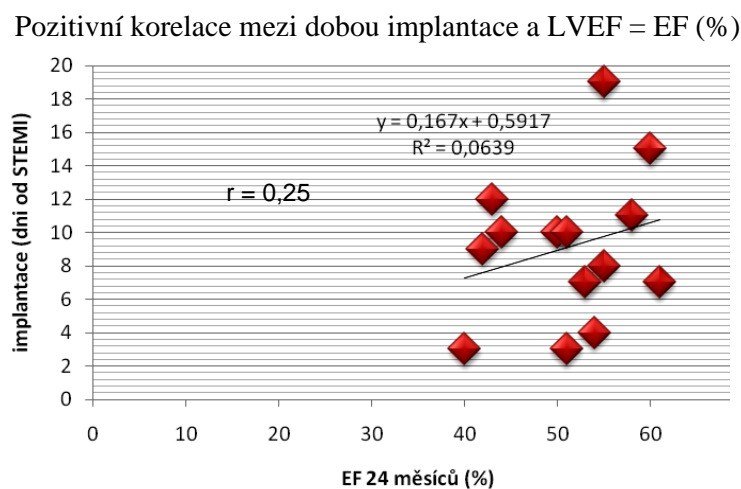
Graf 6.: EKG nález, kompletní ST resoluce při akutním STEMI (%) po primární PCI



4.6 Načasování buněčné aplikace

Intrakoronární aplikace byla provedena ve dvou fázích. Pacienti byli vstupně náhodně rozděleni na dvě skupiny: A) skupinu časnou (7 pacientů) – BMNCs jim byly aplikované 3-5 den od STEMI a B) pozdní skupinu (10 pacientů) – BMNCs jim byly aplikované 7-11 den. Hodnocení načasování je bohužel v naší práci velmi limitované malým počtem pacientů v souboru. Nicméně, byla pozorovaná pozitivní korelace mezi dnem implantace a vzestupem LVEF, viz graf 7, $r = 0,25$. Pravděpodobná optimální doba implantace se zdá na 7 ± 1 den, který byl doprovázen nejefektivnějším vzestupem LVEF.

Graf 7.: Korelace mezi dnem implantace a efektivitou hodnocenou pomocí parametru LVEF.



4.7 Množství aplikovaných buněk

Celkem bylo aplikováno 20-30 ml koncentrátu. Kmenové buňky byly aplikovány ve 2-3 ml krve opakovanými porcemi. Celkový počet kmenových buněk, které byly získané a zpracované dle výše uvedených pravidel (viz metodika) byl v průměru $29 \pm 11 \times 10^8$, počet CD 34+ buněk $22,3 \pm 12 \times 10^6$, poměr CD34+ k celkovému počtu buněk (%) $1,35 \pm 0,45$, CFU-GM byl $505 \pm 359 \times 10^4$, tbl. 11.

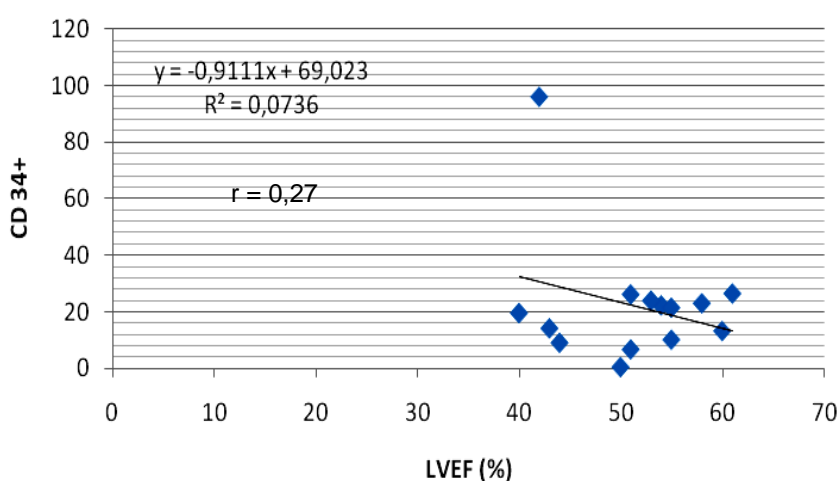
Tbl. 11.: Aplikace kmenových buněk jejich typy a množství intrakoronárně aplikovaných.

Aplikace buněk	
Odběr krve (ml)	110-120
Finální koncentrace (ml)	20-30
Celkový počet buněk ($\times 10^8$)	29 ± 11
CD 34+ buněk ($\times 10^6$)	$22,3 \pm 12$
poměr CD34+/celk.počet (%)	$1,35 \pm 0,45$
CFU-GM ($\times 10^4$)	505 ± 359

CFU-GM - colony forming unit, granulocyte-macrophage progenitor

Celková doba ischemie při implantaci byla 7-18 min (opakované ischemie po dobu 3 min s 3 min. pauzami, viz metodika). Nebyla zjištěna pozitivní korelace mezi celkovým množstvím aplikovaných buněk a LVEF během sledování. Výsledná LVEF však slabě korelovala s počtem CD 34+ buněk v aplikovaném koncentrátu, graf 8.

Graf 8.: Pozitivní korelace mezi implantovanými kmenovými buňkami a výslednou LVEF za 24 měsíců, zpřesnění na vazbu především implantovaných CD 34+ buněk.



4.8 Bezpečnost implantace BMNCs

4.8.1 Krátkodobé sledování (4 měsíce)

Ze 17 pacientů zařazených do aktivně léčené skupiny došlo u dvou k významným komplikacím po odběru kmenových buněk ještě před jejich plánovanou implantací (buněčná terapie tedy nebyla aplikována), které vedly nakonec k jejich úmrtí. U jednoho nemocného k subakutní trombóze ve stentu s reinfarktem, která byla řešena komplikovanou angioplastikou a následně urgentním aortokoronárním bypassesem (CABG), nemocný pak zemřel o 2 týdny později na sepsi a respirační komplikace. U jedné nemocné došlo před plánovanou implantací buněk k ruptuře mezikomorové přepážky, která si vyžádala urgentní chirurgické řešení, nemocná pak zemřela po 3 měsících na srdeční selhání. U jedné nemocné

v aktivně léčené skupině pak byl 6 týdnů po výkonu diagnostikován inoperabilní karcinom žlučových cest (v době infarktu zcela asymptomatický) a nemocná zemřela na toto onemocnění o 2 měsíce později. Celkem tedy dokončilo základní sledovací období 4 měsíců 14 aktivně léčených a 10 pacientů v kontrolní skupině. V každé skupině byla během tohoto intervalu u 1 nemocného nutná re-hospitalizace pro srdeční selhávání, jiné závažné komplikace se nevyskytly. Výskyt restenózy s následnou angioplastikou při kontrolní angiografii po 4 měsících byl obdobný v obou skupinách (po 2 pacientech), kontrolní angiografii odmítl v každé skupině 1 nemocný, tbl. 12.

Tbl. 12.: Bezpečnost implantace kmenových buněk při krátkodobém sledování

(Kardiovaskulární mortalita, rehospitalizace, reintervence, kompozitní faktor), 4 měsíční sledování.

	BMNCs skupina (n=17)	Kontrolní skupina (n=10)
Kardiovaskulární mortalita, n (%)	2 (12)	0
Mortalita - nekardiovaskulární, n (%)	1 (6)	0
Rekurentní infarkt myokardu, n (%)	0	0
Hospitalizace pro srdeční selhání, n (%)	1 (6)	1(10)
Kompozitní faktor - úmrtí, infarkt myokardu a rehospitalizace pro srdeční selhání, n (%)	5 (29)	3 (30)
Restenózy, n (%)	2 (12)	2 (20)
Dokumentované komorové tachykardie popř. synkopy, n (%)	0	0
NYHA I, II, n (%)	8 (57)	7 (70)
Průměrná NYHA třída	1.7 ± 0.8	1.65 ± 0.7

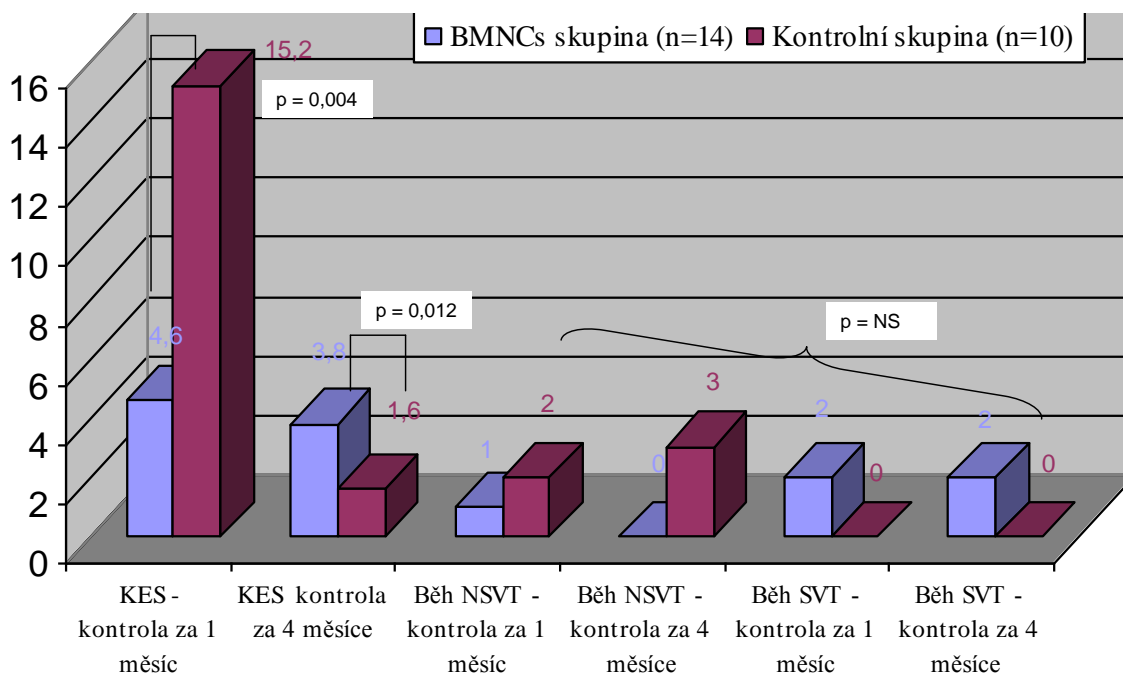
Vzhledem k riziku arytmogenicity BMNCs udávané z experimentálních prací byla této problematice věnovaná větší pozornost. U všech pacientů bylo provedeno holterovské 24 hodinové sledování EKG k vyloučení potenciace závažné maligní pro-arytmogenicity BMNCs při dimisi ze vstupní hospitalizace, za 1 a 4 měsíce od dimise. V aktivně léčené

skupině nebyl zachycen závažnější běh nesetrválé komorové tachykardie. Během prvního měsíce byl větší výskyt KES u nemocných v kontrolní skupině (15,2 v.s. BMNCs skupina 4,6, $p=0,004$), jejich počet již při následné kontrole za 4 měsíce výrazně klesl a naopak v tomto období ve skupině s implantovanými KB jejich počet byl lehce vyšší ($3,8 \pm 1,2$ vs $1,6 \pm 2,3$ v kontrolní skupině, $p=0,12$) – jednalo se o počet nijak závažný, KES byly převážně monomorfnní, izolované, tbl. 13, graf 9.

Tbl. 13.: Počet KES (komorové extrasystolie), běhů NSVT (nesetrválé komorové tachykardie), SVT (supraventrikulární komorové tachykardie).

	Kmenové buňky (n=14)	Kontrolní skupina (n=10)	p- hodnota
KES - kontrola za 1 měsíc	4,6	15,2	0,004
KES kontrola za 4 měsíce	3,8	1,6	0,12
Běh NSVT - kontrola za 1 měsíc	1	2	0,58
Běh NSVT - kontrola za 4 měsíce	0	3	0,08
Běh SVT - kontrola za 1 měsíc	2	0	0,21
Běh SVT - kontrola za 4 měsíce	2	0	0,24

Graf 9.: Srovnání záchytu extrasystolie (komorové a supraventrikulární) a popř. běhů supraventrikulární tachykardie mezi aktivně léčenou a kontrolní skupinou.



Klinická symptomatologie hodnocená dle NYHA během 4 měsíců nebyla rozdílná mezi skupinami ($1,7 \pm 0,8$ vs $1,65 \pm 0,7$, $p=0,55$).

4.8.2 Dlouhodobé sledování (24 měsíců)

Během 24 měsíčního sledování nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ve výskytu nežádoucích klinických příhod po aplikaci BMNCs v porovnání s kontrolní skupinou (shrnutí viz tbl. 14). Kompozitní faktor nežádoucích účinků zahrnující úmrtí, re-infarkt myokardu, rehospitalizaci pro srdeční selhání byl prakticky bez rozdílu mezi skupinami (6 pacientů v aktivně léčené skupině (36%) vs. 5 pacientů (50%), $p=0,54$). V každé skupině pak během pozdního sledování prodělali čtyři nemocní revaskularizaci: 2 pomocí aortokoronárního by-passu a 2 pomocí PCI. V každé skupině byla během 24 měsíčního intervalu u 4 nemocných z kontrolní skupiny vs. 2 pacientů s BMNCs skupiny nutná re-hospitalizace pro srdeční selhávání. Během 24 měsíců nebyla ani v jedné skupině zachycena závažnější komorová tachykardie popř. synkopy.

Tbl. 14.: Bezpečnost implantace kmenových buněk při dlouhodobém sledování – 24měsíců
(Kardiovaskulární mortalita, rehospitalizace, reintervence, kompozitní faktor).

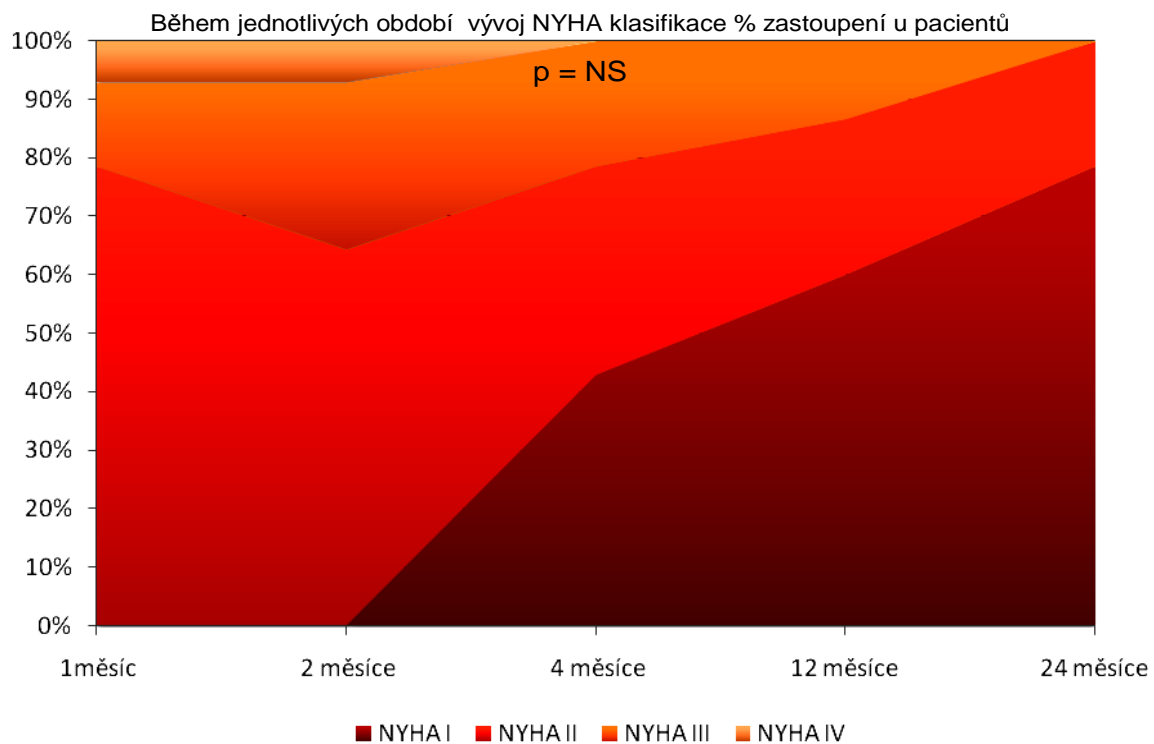
	BMNCs skupina (n=17)	Kontrolní skupina (n=10)	p hodnota
Kardiovaskulární mortalita, n (%)	2 (12)	0	NS
Mortalita - nekardiovaskulární, n (%)	1 (6)	0	NS
Rekurentní infarkt myokardu, n (%)	1 (6)	1(10)	NS
Hospitalizace pro srdeční selhání, n (%)	2 (12)	4 (40)	NS
Kompozitní faktor - úmrtí, infarkt myokardu a rehospitalizace pro srdeční selhání, n (%)	6 (36)	5 (50)	NS
Restenózy, n (%)	2 (12)	4 (40)	NS
Revaskularizace, n (%)	4 (24)	4 (40)	NS
PCI, n (%)	2 (12)	2 (20)	NS

CABG, n (%)	2 (12)	2 (20)	NS
Dokumentované komorové tachykardie popř. synkopy, n (%)	0	0	NS
NYHA I, II, n (%)	14 (100)	7 (70)	NS
Průměrná NYHA třída	1.2 ± 0.42	1.9 ± 0.83	NS

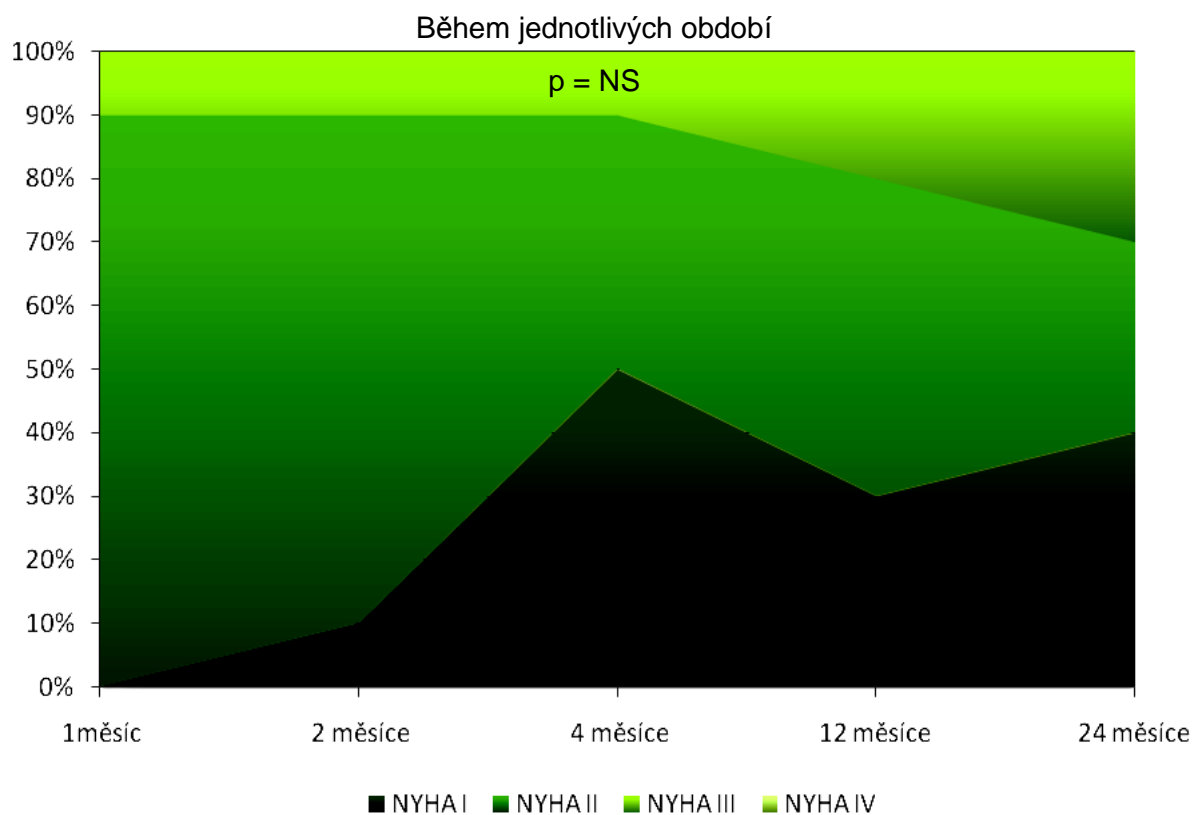
CABG = coronary artery bypass graft, LV = left ventricular, PCI = percutaneous coronary intervention

Klinická symptomatologie (NYHA klasifikace) byla v obou skupinách v celém sledovaném období srovnatelná ($1,2 \pm 0,42$ vs $1,9 \pm 0,83$, $p=0,59$), viz graf 10 a 11.

Graf 10.: Vývoj klinické symptomatologie dušnosti (hodnoceno dle NYHA klasifikace) u skupiny s implantovanými BMNCs (%).



Graf 11.: Vývoj klinické symptomatologie dušnosti (hodnoceno dle NYHA klasifikace) v kontrolní skupině u pacientů (%).



Celkově lze shrnout, že nebyla prokázána signifikantní diference ve výskytu nežádoucích účinků intrakoronární implantace BMNCs u nemocných po rozsáhlém STEMI ve srovnání s kontrolní skupinou. Odběr kostní dřeně však může být v časném období po STEMI provázen závažnými komplikace, i když kauzální vztah mezi zaznamenanými nežádoucími příhodami a použitou léčebnou metodou nebylo možné prokázat.

4.9 Echokardiografické hodnocení remodelačních změn

Echokardiografické hodnocení představuje klíčovou metodu stran možnosti sledování myokardiálních poinfarktových remodelačních změn. Jedná se o vyšetření s poměrně významnou interindividuální variabilitou, proto bylo nutno dodržení přesných metodických postupů (viz výše). Soustředili jsme se především na hodnocení těchto oblastí: velikost LK, objemové změny LK, systolickou funkci (celkovou i segmentární) a diastolickou funkci LK ve stanoveném časovém harmonogramu studie.

4.9.1 Vliv poinfarktové remodelace na změnu velikosti levé komory

Remodelační poinfarktový proces je komplexní děj, probíhající ve dvou fázích (časná a pozdní), vede ke změně prostorové konfigurace LK. Komora dilatuje, získává více sférický tvar a dochází ke ztenčení jejích stěn. Rozšiřováním anulu a oddálením papilárních svalů často vzniká a progreduje mitrální regurgitace, která zhoršuje objemové přetížení myokardu, snižuje efektivní minutový výdej a dochází k dilataci levé síně s rizikem vzniku fibrilace síní s následným zhoršením její plnicí fáze. Proces rozvoje remodelace významně závisí na časnosti zahájení terapie, především na zprůchodnění infarktové tepny (blíže popis viz úvod). Do našeho souboru byli již primárně zahrnuti nemocní se STEMI s pozdní reperfuzí, tedy pacienti s prakticky plně rozvinutým relativně velkým poškozením myokardu, mírně dilatovanou komorou s lehce elevovanou hmotností komory (průměrná vstupní hmotnost LK $224 \pm 32\text{g}$) a alterovanou vstupní systolickou funkcí (LVEF $39,5 \pm 6\%$).

4.9.2 Hodnocení velikosti levé komory

Pro kvantifikaci velikosti LK jsme použili tyto parametry: enddiastolický a endsystolický rozměr (LVEDD, LVESD /mm/), diastolický rozměr interventrikulárního septa (IVSd) a zadní stěny v diastole (ZSd). Dále jsme hodnotili hmotnost LK a objemové

hodnocení pomocí enddiastolického a endsystolického volumu (LVEDV a LVESV /ml). Měření bylo provedeno z parasternální dlouhé osy a 4AC projekce (podrobněji viz metodika).

4.9.3 Rozměrové hodnocení

U všech zařazených nemocných (n=27) jsme prokázali vstupně mírnou dilataci LK s průměrným vstupním diastolickým rozměrem $53,5 \pm 6$ mm (LVEDD $53,9 \pm 7,2$ mm v BMNCs skupině vs. kontrolní skupina $53,1 \pm 4,3$ mm, bez rozdílu mezi skupinami, $p=0,91$). Mírně zvětšený byl také vstupní rozměr LVESD s průměrnou hodnotou 39 ± 8 mm ($40,8 \pm 7,7$ mm vs. $37,1 \pm 8,7$ mm, bez statistické významnosti mezi aktivně léčenými nemocnými a kontrolní skupinou, $p=0,21$). Během následovaných opakovaných kontrolních vyšetření v odstupu od STEMI jsme zjistili mírnou progresi v obou rozměrech (viz tbl. 15).

Tbl. 15.: Změna velikosti diastolického a systolického rozměru levé komory v závislosti na podané léčbě a sledovaném období.

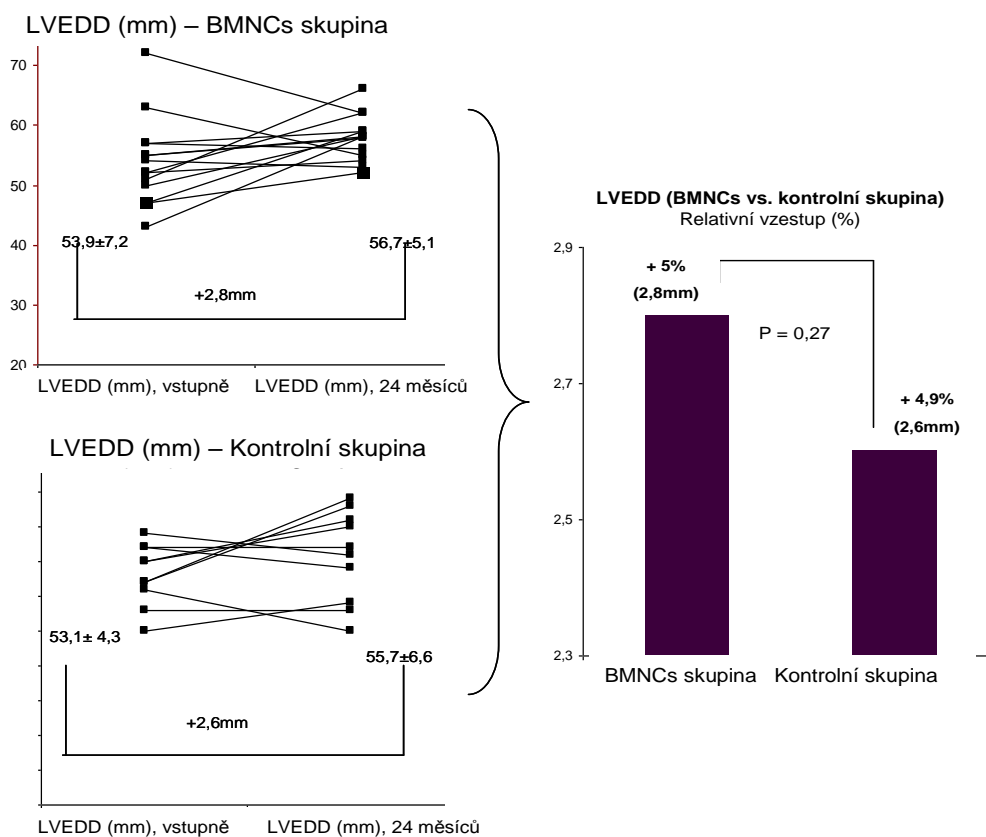
		BMNCs skupina (n=14)			Kontrolní skupina (n=10)			P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
		Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna	
				vs. vstupní hodnota (%)			vs. vstupní hodnota (%)	
LVEDD (mm)	Vstupní hodnota	53,9 ± 7,2			53,1 ± 4,3			0,91
	4 měsíce 24 měsíců	59,7 ± 6,1	+5,8 mm	+10,70%	56,1 ± 6,1	+3 mm	+5,60%	0,23
		56,7 ± 5,1	+2,8 mm	5%	55,7 ± 6,6	+2,6 mm	+4,90%	0,27
LVESD (mm)	Vstupní hodnota	40,8 ± 7,7			37,1 ± 8,7			0,21
	4 měsíce 24 měsíců	42,4 ± 6,2	+1,6 mm	+3,90%	40,4 ± 5,1	+3,3 mm	+8,90%	0,72
		41,1 ± 4,7	+0,3 mm	+0,70%	39,9 ± 7,5	+2,8 mm	+7,50%	0,09

Při 4 měsíční kontrole byl LVEDD u skupiny s BMNCs $59,7 \pm 6,1$ mm vs. $56,1 \pm 6,1$ mm u kontrolní skupiny, přičemž relativní změna byla +10,7% vs. + 5,6%, $p=0,23$).

Obdobně došlo i k mírnému zvětšení endsystolického diametru za 4 měsíce na hodnoty $42,4 \pm 6,2$ mm vs. $40,4 \pm 5,1$ mm (relativní změna byla $+3,9\%$ vs. $+8,9\%$, $p=0,72$).

Při kontrolním vyšetření za dva roky od randomizace byly hodnoty LVEDD bez významné změny a statistického rozdílu mezi skupinami v rámci sledovaného období ($56,7 \pm 5,1$ mm vs. $55,7 \pm 6,6$ mm, $p=0,27$). Absolutní změna představovala hodnotu $+2,8$ mm vs. $2,6$ mm a relativní změna $+5\%$ vs. $+4,9\%$ (viz graf 12).

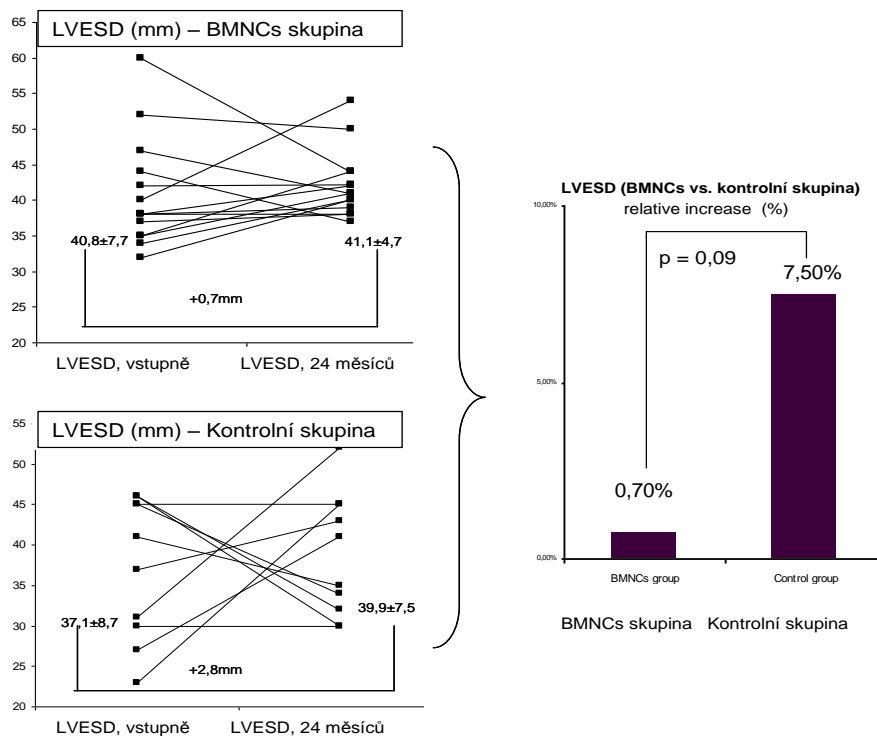
Graf 12.: Změna LVEDD u pacientů s implantovanými BMNCs a v kontrolní skupině během sledování.



Oproti tomu byl zjištěn pozitivní trend ve velikosti systolického rozměru LK ve prospěch aktivně léčené skupiny BMNCs ($41,1 \pm 4,7$ mm vs. $39,9 \pm 7,5$ mm) kdy absolutní změna odpovídala hodnotám $+0,3$ mm vs. $+2,8$ mm (relativní změna $+0,7\%$ vs $+7,5\%$)

s hraniční významností ve prospěch pacientů aktivně léčených kmenovými buňkami, $p=0,09$ (viz graf 13).

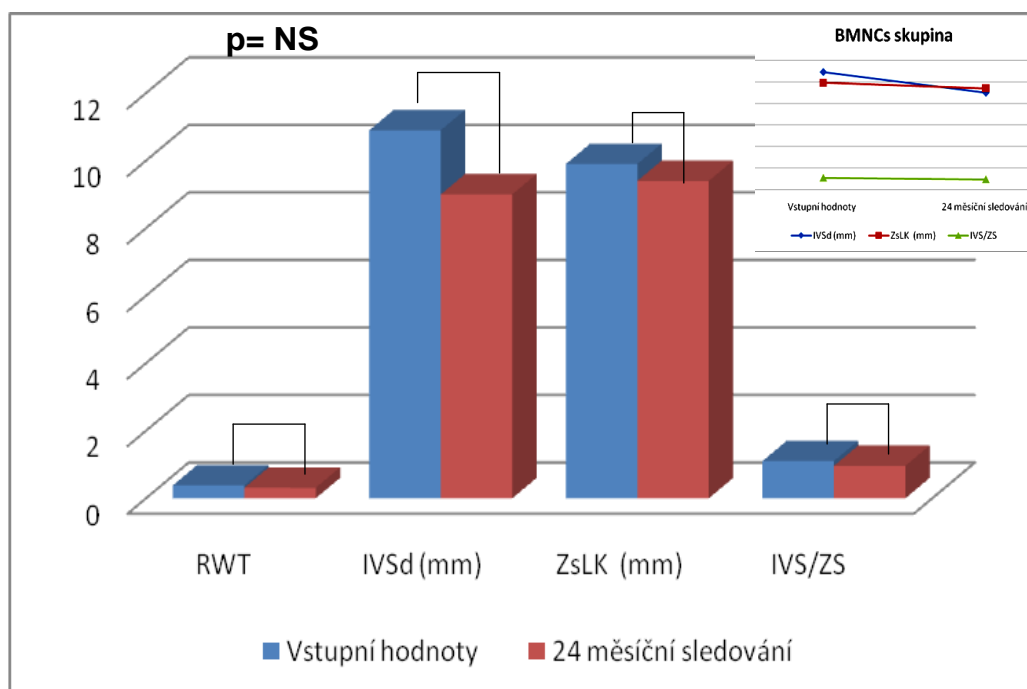
Graf 13.: Změna LVESD u pacientů s implantovanými BMNCs a v kontrolní skupině během sledování.



Průměrná vstupní hodnota rozměru interventrikulárního septa byla v aktivně léčené a kontrolní skupině obdobná $10,9 \pm 1,6\text{mm}$ vs. $12,7 \pm 1,9\text{mm}$, $p=0,48$, stejně tak i šířka zadní stěny $9,9 \pm 1,2\text{mm}$ vs. $9,5 \pm 1,3\text{mm}$, bez statistické signifikance, $p=0,59$. Diference nebyla patrná ani následně při kontrolním echokardiografickém vyšetření za 24 měsíců IVSd $9 \pm 0,6\text{mm}$ vs. $9,9 \pm 0,4\text{mm}$, ZsLK $9,4 \pm 0,5\text{mm}$ vs. $10 \pm 0,6\text{mm}$. Hodnocením poměru IVSd /ZsLK (vstupně $1,1 \pm 0,7$ vs $1,34$, 24 měsíců $0,96 \pm 0,3$ vs $0,99 \pm 0,4$) jsme prokázali prakticky normální hodnoty šířky stěny komory. Relativní tloušťka LK (RWT) se během sledování v obou skupinách také výrazně nezměnila ($0,38 \pm 0,01$ vs. $0,35 \pm 0,02$, 24 měsíců $0,31 \pm 0,02$ vs. $0,36 \pm 0,03$, $p=0,79$), graf 14 a 15.

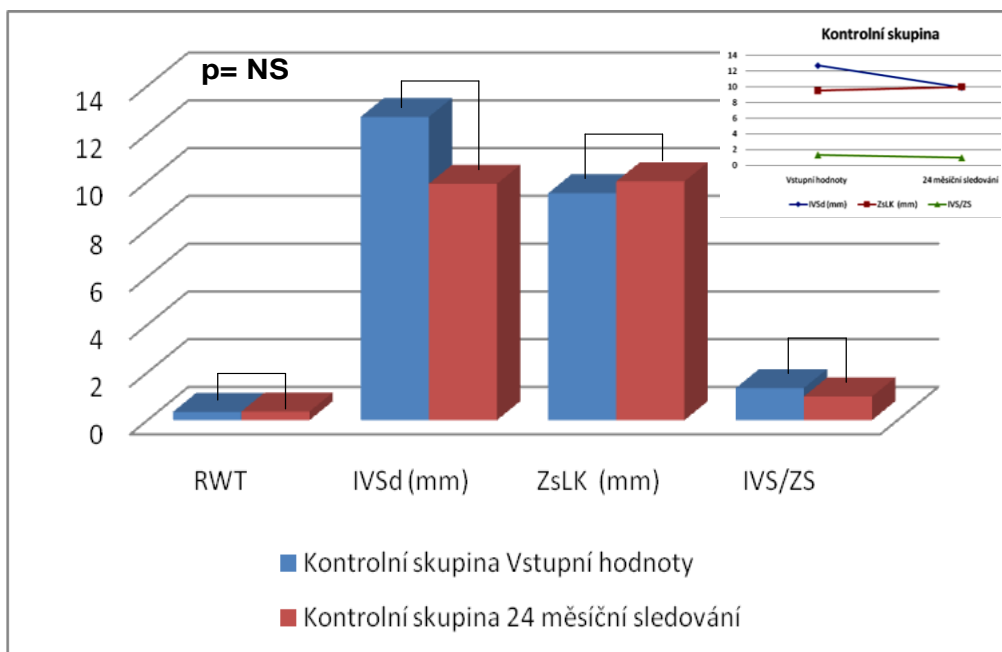
Graf 14.: Změna ve velikosti levé komory a šířky stěn během sledovaného 24 měsíčního období u skupiny nemocných s implantovanými BMNCs.

	Vstupní hodnoty	4 měsíční sledování	p
RWT	0,38±0,01	0,31±0,02	0,41
IVSd (mm)	10,9±1,6	9±0,6	0,48
ZsLK (mm)	9,9±1,2	9,4±0,5	0,73
IVS/ZS	1,1±0,7	0,96±0,3	0,29



Graf 15.: Změna ve velikosti levé komory a šířky stěn během sledovaného 24 měsíčního období u kontrolní skupiny.

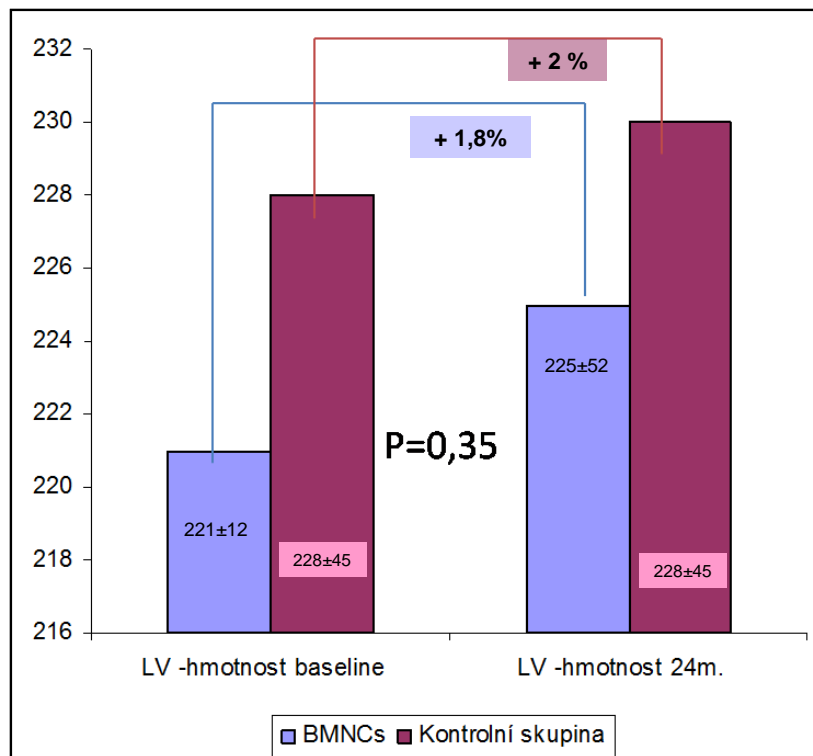
	Vstupní hodnoty	24 měsíční sledování	p
RWT	0,35±0,02	0,36±0,03	0,79
IVSd (mm)	12,7±1,9	9,9±0,4	0,37
ZsLK (mm)	9,5±1,3	10±0,6	0,68
IVS/ZS	1,34±0,6	0,99±0,4	0,24



4.9.4 Hmotnost levé komory

V našem souboru pacientů jsme pozorovali vstupně mírně zvětšenou hmotnost LK oproti normě, průměrná hodnota měření u 27 randomizovaných nemocných byla $224 \pm 32\text{g}$ (skupina s BMNCs ($n=14$) $221 \pm 12\text{g}$ vs. $228 \pm 45\text{g}$ u kontrolní skupiny ($n=10$), $p=0,68$). Během 4 a 24 měsíčního sledování byl zaznamenán pouze mírný statisticky nevýznamný vzestup hmotnosti LK v obou skupinách ($225 \pm 52\text{g}$ vs. $230 \pm 49\text{g}$) odpovídající relativnímu vzestupu + 1,8% v BMNCs skupině vs. 2% ve skupině kontrolní, bez statistické signifikance, $p=0,35$, graf 16.

Graf 16.: Hmotnost levé komory – srovnání kontrolní skupin a skupiny s implantovanými BMNCs.

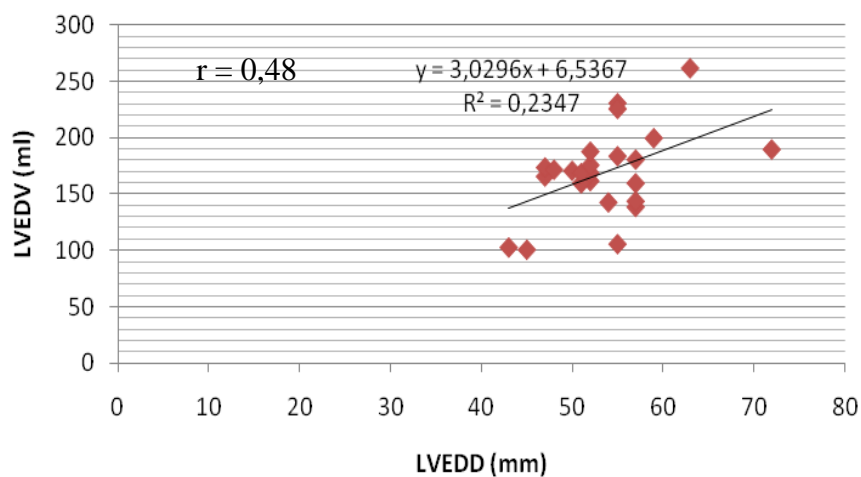


U nemocných vzhledem k poměru hmotnosti a RWT se jednalo převážně o excentrickou hypertrofii.

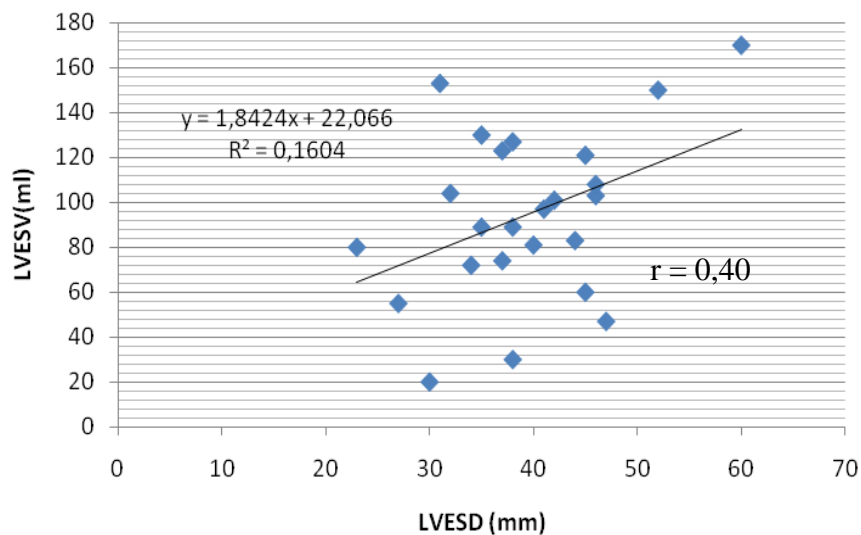
4.9.5 Hodnocení změn objemů levé komory

Vstupní hodnoty LVEDV a LVESV v obou skupinách ($163,3 \pm 10,3\text{ml}$ vs. $162,3 \pm 39,3\text{ml}$, $p=0,71$ u LVEDV, $98 \pm 38,1\text{ml}$ vs. $98 \pm 38,9\text{ml}$, $p=0,79$ u LVESV) odpovídají vstupním hodnotám LVEDD a LVESD a nálezu mírně dilatované LK, graf 17 a 18.

Graf 17.: Korelace mezi vstupními rozměry LVEDD a LVEDV.



Graf 18.: Korelace mezi LVESD a LVESV během 24 měsíčního sledování.

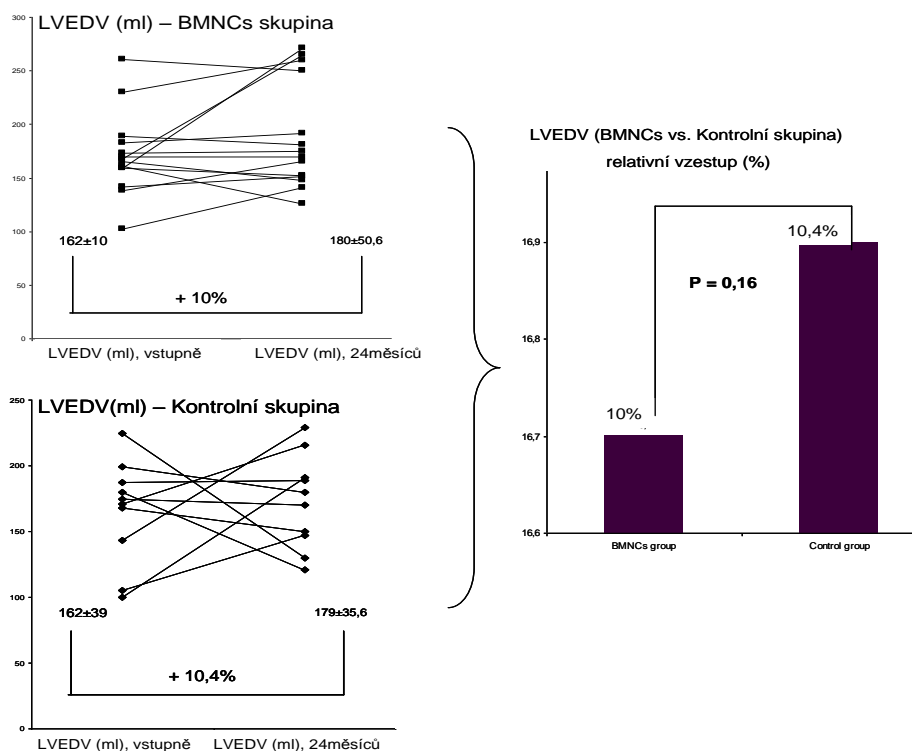


Během 2 letého sledování došlo k nárůstu LVEDV na hodnoty $180 \pm 50,6$ ml ve skupině s implantovanými BMNCs vs. $180,2 \pm 35,6$ ml u kontrolní skupiny, $p=0,16$ (nález odpovídá absolutní změně LVEDV $+16,7$ ml vs $+17,9$ ml, relativní změně $+10\%$ vs. $+10,4\%$), tbl. 16, graf 19.

Tbl. 16.: Shrnutí změn velikosti LVEDV (enddiastolického objemu) a LVESV (endsystolického objem) u pacientů s implantovanými BMNCs a kontrolní skupinou během sledování.

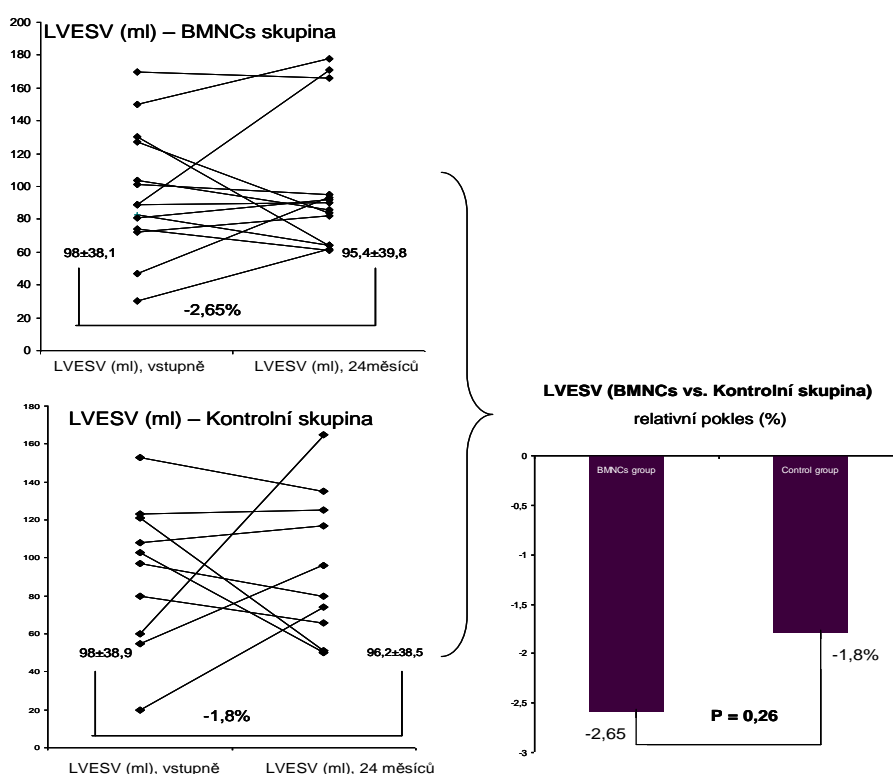
		BMNCs skupina (n=14)			Kontrolní skupina (n=10)			P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
		Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	
LVEDV (ml)	Vstupní hodnota	163,3 ± 10,3			162,3 ± 39,3			0,71
	4 měsíce	172,3 ± 40,5	+9 ml	+5,70%	174,3 ± 59,2	+12 ml	+7,40%	0,33
	24 měsíců	180 ± 50,6	+16,7ml	10%	180,2 ± 35,6	+17,9 ml	10,4%	0,16
LVESV (ml)	Vstupní hodnota	98 ± 38,1			98 ± 38,9			0,79
	4 měsíce	95 ± 28,2	-3 ml	-3,10%	96 ± 41,4	-2 ml	-2%	0,85
	24 měsíců	95,4 ± 39,8	-2,6 ml	-2,65%	96,2 ± 38,5	-1,8 ml	-1,80%	0,26

Graf. 19.: Hodnocení změny LVEDV ve vztahu ke sledovanému období mezi aktivně léčenou a kontrolní skupinou nemocných.



Endsystolický volem se lehce zmenšil u obou skupin bez přesvědčivé statistické významnosti, ale s tendencí ve prospěch aktivně léčené skupině ($95,4 \pm 39,8\text{ml}$ vs. $96,2 \pm 38,5\text{ml}$, absolutní změna za 24 měsíců $-2,6\text{ml}$ vs $-1,8\text{ml}$ relativní změna $-2,65\%$ vs $-1,8\%$, $p=0,26$), graf 20.

Graf 20.: Změna velikosti LVESV u skupiny s implantovanými kmenovými buňkami vs. v kontrolní skupině, relativní změna během 24 měsíčního sledování.



4.9.6 Hodnocení systolické funkce levé komory

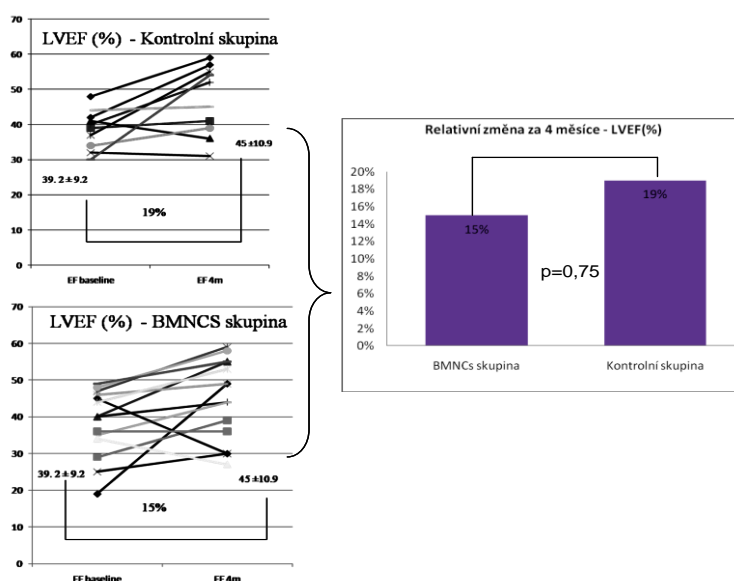
Vlastní hodnocení systolické funkce LK bylo provedeno pomocí parametru ejekční frakce - LVEF. Vstupní hodnoty byly v obou skupinách srovnatelné ($39,2 \pm 9,2\%$ vs. $39,4 \pm 5,6\%$, $p=0,73$), tbl. 17.

Tbl. 17.: Změny funkce levé komory (LK) hodnocené dle Simpsonovy metody, změny během sledovaných období.

		BMNCs skupina (n=14)			Kontrolní skupina (n=10)			P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
		Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	
LVEF (%)	Vstupní hodnota	39,2 ± 9,2			39,4 ± 5,6			0,73
	4 měsíce	45 ± 10,9	+5,8 %	15%	47 ± 9,8	+7,6 %	19%	0,75
	24 měsíců	51,2 ± 6,7	12%	31%	47,9 ± 14	+8,5 %	22,6%	0,03

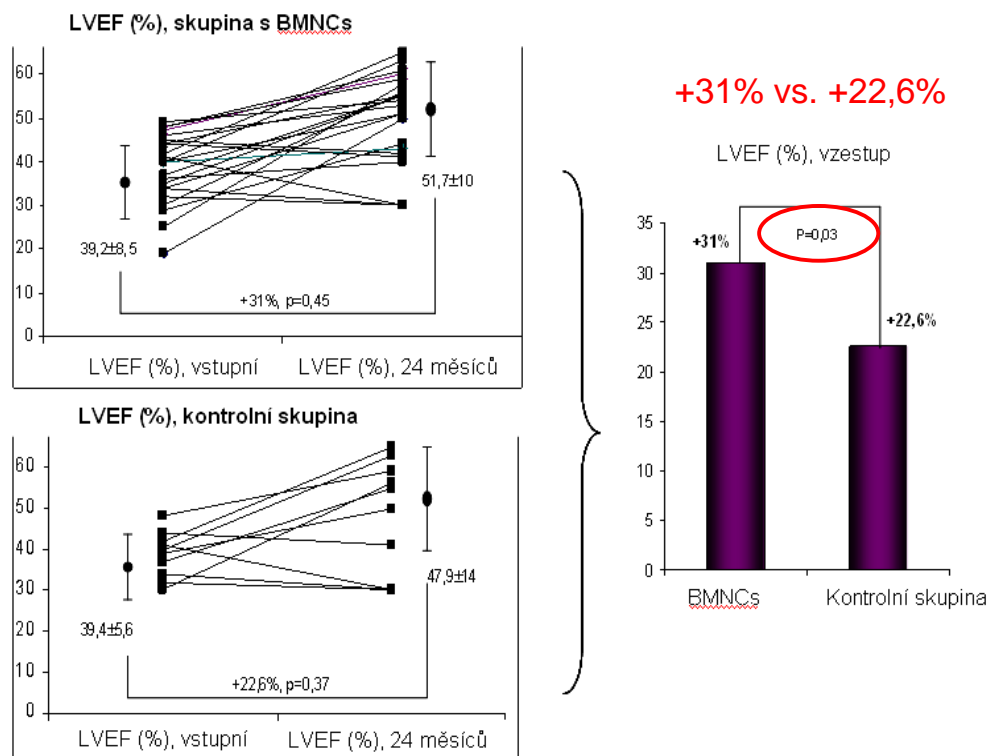
Během 4 měsíční kontroly jsme pozorovali zlepšení systolické funkce. LVEF se zlepšila v obou skupinách, tedy jak v aktivně léčené s implantovanými BMNCs tak i kontrolní (absolutní změna ve skupině aktivně léčených s BMNCs byla +5,8% vs. +7,6% v kontrolní skupině, relativní změna +15% vs. +19%, p=0,75) na hodnoty 45 ± 10,9% vs. 47 ± 9,8%. Nebyl zachycen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami, p=0,75, graf 21.

Graf 21.: Změna velikosti LVEF (%) během 4 měsíčního sledování u nemocných s implantovanými BMNCs a kontrolní skupiny.



Velmi pozitivní bylo zjištění statisticky signifikantního vzestupu systolické funkce LK během 24 měsíční kontroly u pacientů s implantovanými BMNCs oproti kontrolní skupině na hodnoty $51,2 \pm 6,7 \%$ vs. $47,9 \pm 14 \%$. Absolutní změna od vstupních hodnot ve skupině pacientů s implantovanými BMNCs představuje +12%, relativní změna byla +31%, naproti tomu ve skupině kontrolní absolutní změna byla +8.5%, relativní +22,6%, $p=0,03$, graf 22.

Graf 22.: Hodnocení změny velikosti LVEF (%) u aktivně léčených nemocných s implantovanými kmenovými buňkami a kontrolní skupinou během 24 měsíců sledování.



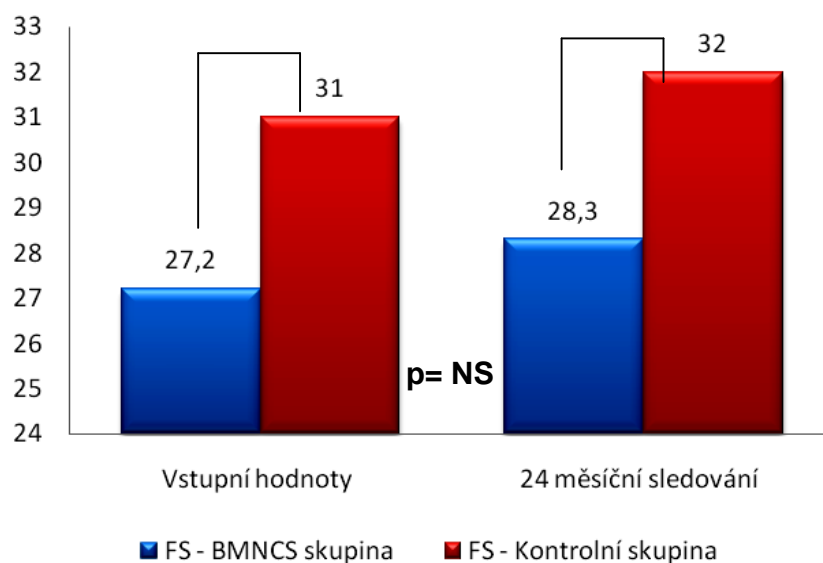
4.9.7 Frakční zkrácení

Hodnocení kinetiky basálních segmentů bylo provedeno pomocí frakčního zkrácení (FS). Vstupní hodnoty byly srovnatelné v obou skupinách ($27,2 \pm 2,4\%$ vs. $31 \pm 2,2\%$, $p=0,87$) s mírným zlepšením během sledovaného období ($28,3 \pm 1,9\%$ vs. $32 \pm 3,1\%$), rozdíl mezi skupinami nebyl statisticky významný ($p=0,59$), tbl. 18, graf 23.

Tbl. 18.: Shrnutí změny frakčního zkrácení u nemocných s implantovanými BMNCs vs. kontrolní skupina.

		BMNCs skupina (n=14)			Kontrolní skupina (n=10)			P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
Frakční zkrácení	Vstupní hodnota	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	0,59
			24 měsíce	27,2 ± 2,4	1,1 ± 0,5	4,04	31 ± 2,2	

Graf 23.: Změna velikosti hodnoty frakčního zkrácení během 24 měsíčního sledování (nemocní s implantovanými BMNCs vs. kontrolní skupina).



4.10 Dobutaminová echokardiografie – hodnocení viability myokardu

Pomocí dobutaminové echokardiografie jsme se snažili o postihnutí zátěžové viability a její změny v jednotlivých segmentech hibernovaného myokardu (popis viz metodika). Cílem bylo hodnocení změny kinetiky po podání dobutaminu v jednotlivých segmentech levé komory (WMSI). Vstupní hodnoty byly v obou skupinách srovnatelné, průměrné hodnoty $1,95 \pm 0,26$ vs. $1,9 \pm 0,24$, $p=0,75$.

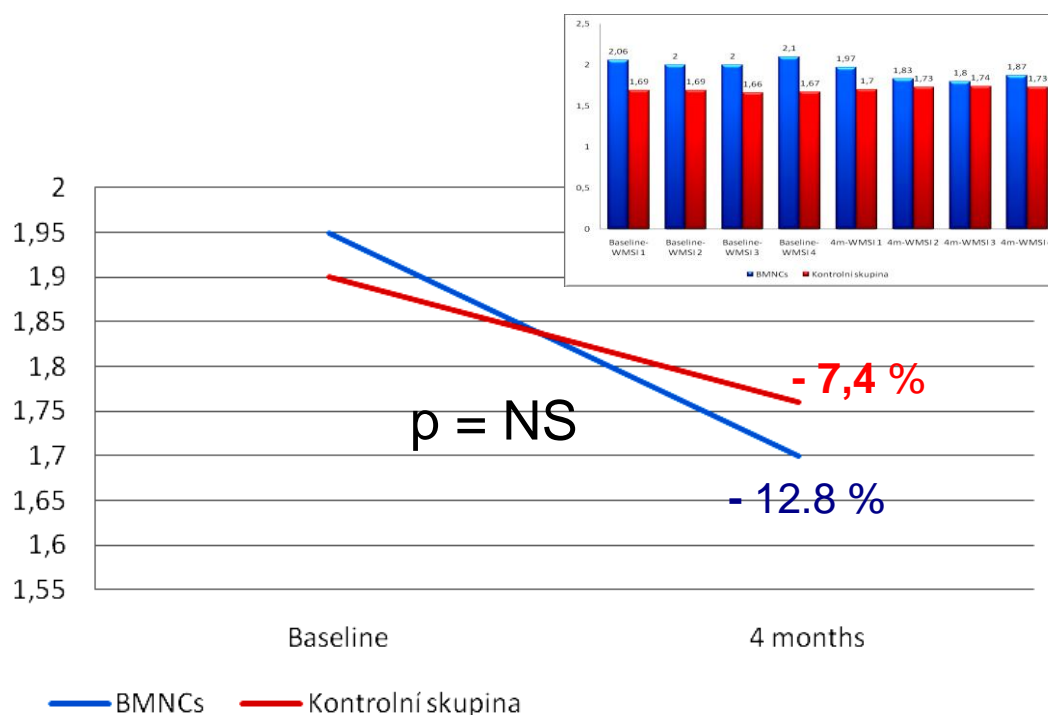
Během 4 měsíčního sledování jsme neprokázali statisticky signifikantní změnu kinetiky ani významnější potenciace hibernovaného myokardu v jednotlivých definovaných segmentech v aktivně léčené skupině oproti skupině kontrolní $1,7 \pm 0,39$ vs. $1,76 \pm 0,33$. Došlo tedy k mírnému zlepšení u obou skupin, relativní pokles hodnoty byl u skupiny s implantovanými BMNCs 12,8% vs. 7,4% ve skupině kontrolní, $p=0,68$, tbl. 19, graf 24.

Tbl. 19.: Změna wall motion score indexu \approx regionální kontraktility myokardu – 4 měsíční sledování.

	BMNCs skupina (n=14)			Kontrolní skupina (n=10)			P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	
WMSI							
<i>Vstupní hodnota</i>	$1,95 \pm 0,26$			$1,90 \pm 0,24$			0,75
<i>4 měsíce</i>	$1,70 \pm 0,39$	↓ 0,25	↓ 12,8 %	$1,76 \pm 0,33$	↓ 0,14	↓ 7,4 %	0,68

WMSI – wall motion score index

Graf 24.: Změna velikosti wall motion score indexu (WMSI) \approx regionální kontraktility během 4 měsíčního sledování.



4.11 Změny chlopenního aparátu (změny morfoloické a hemodynamické)

Změny chlopenního aparátu ve smyslu mírného zesílení chlopiček cípů byly vstupně popsány u 70% nemocných a neměly hemodynamický dopad. Nevýznamná mitrální regurgitace 1+ byla vstupně popsána u 62% pacientů (55% u BMNCs skupiny, 70% u skupiny kontrolní, $p=0,57$). Vstupně nebyla u nemocných zachycena jiná závažná chlopenní vada. Během 24 měsíčního sledování byla popsána málo až středně významná regurgitace 2 stupně u dvou nemocných (v obou skupinách po 1 pacientovi). Nebyl záchyt závažnější progresse jiné chlopenní vady.

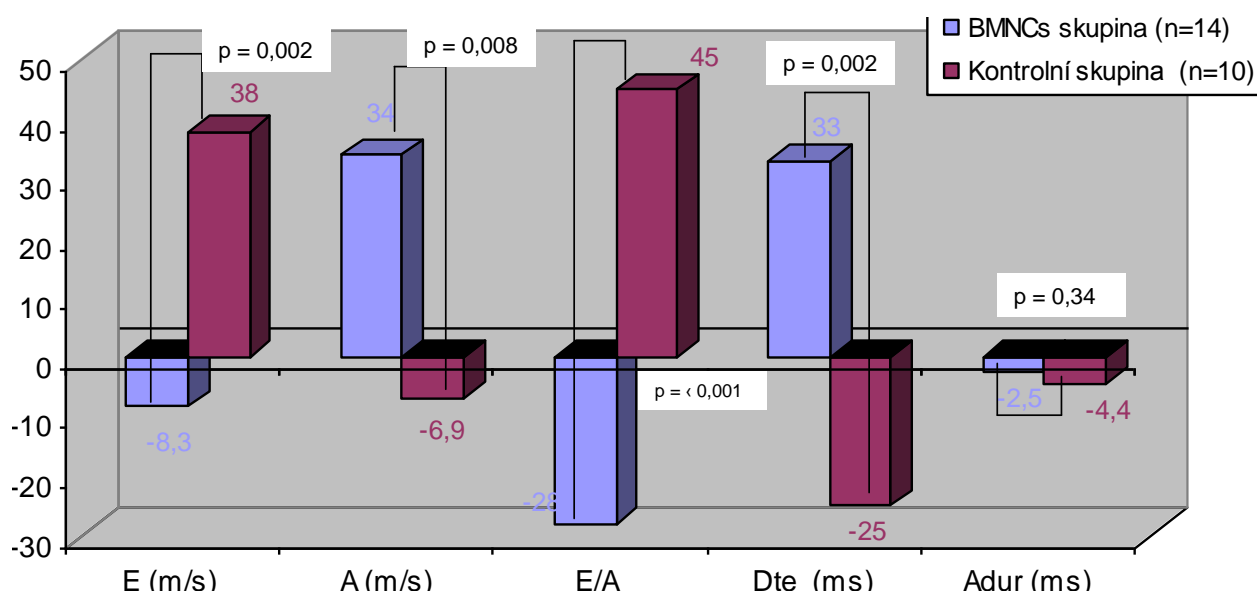
4.12 Diastolická funkce – její charakter a změna během 24 měsíčního sledování

Diastolická funkce představuje aktivní děj daný kompliancí LK během plnicí fáze. V našem souboru nemocných jsme zjistili vstupně mírnou až středně významnou poruchu diastolické funkce (E $0,66 \pm 0,19$ m/s, A $0,56 \pm 0,16$ m/s, E/A $1,21 \pm 0,37$, DTe 162 ± 23 ms, Adur-Ardur 2 ± 8) vzniklou velmi pravděpodobně na podkladě alterace myokardu při akutním STEMI. Nebyl zachycen statisticky signifikantní rozdíl mezi vstupními hodnotami mezi aktivně léčenými a kontrolní skupinou (BMNCs skupina: E $0,72 \pm 0,23$ m/s, A $0,55 \pm 0,16$ m/s, DTe 143 ± 21 ms, Adur 118 ± 19 ms, Ardur 125 ± 47 ms, E/A $1,35 \pm 0,45$, Adur-Ardur -12 ms vs. kontrolní skupina: E $0,6 \pm 0,16$ m/s, A $0,58 \pm 0,17$ m/s, DTe 182 ± 25 ms, Adur 135 ± 6 ms, Ardur 119 ± 30 ms, E/A $1,07 \pm 0,3$, Adur-Ardur 16 ± 11 ms). Během 24 měsíčního sledování jsme u nemocných s implantovanými BMNCs zjistili zlepšení diastolické funkce z převažující změny plnění charakteru pseudonormalizace na lehčí poruchu relaxace (E $0,66 \pm 0,25$ m/s, A $0,55 \pm 0,16$ m/s, Dte 190 ± 25 ms, Adur 115 ± 25 ms, Ardur 141 ± 19 ms, E/A $0,97 \pm 0,45$, Adur-Ardur 27 ± 12 ms) oproti kontrolní skupině kdy převažuje a dokonce lehce progreduje četnost výskytu - pseudonormalizace (E $0,83 \pm 0,11$ m/s, A $0,54 \pm 0,18$ m/s, Dte 136 ± 42 ms, Adur 129 ± 21 ms, Ardur 138 ± 25 ms, E/A $1,56 \pm 0,3$, Adur-Ardur -9), tbl. 20, graf 25 a 26.

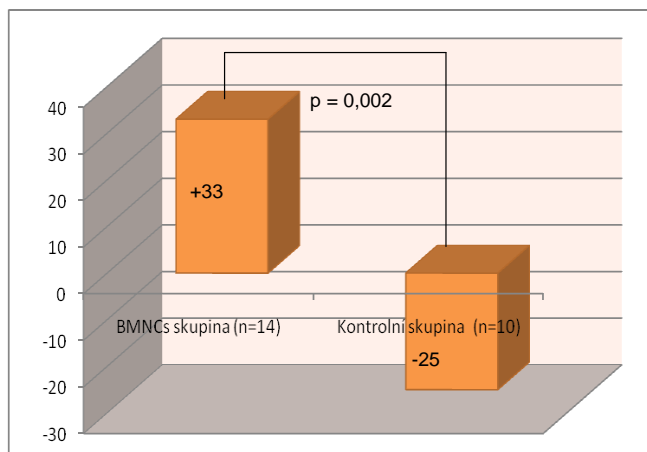
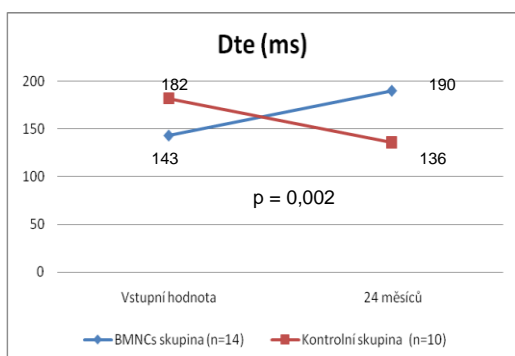
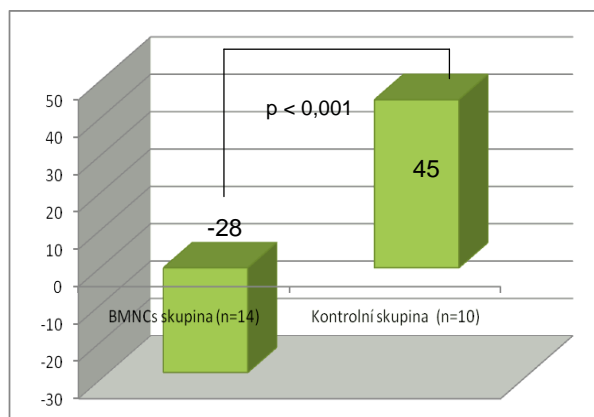
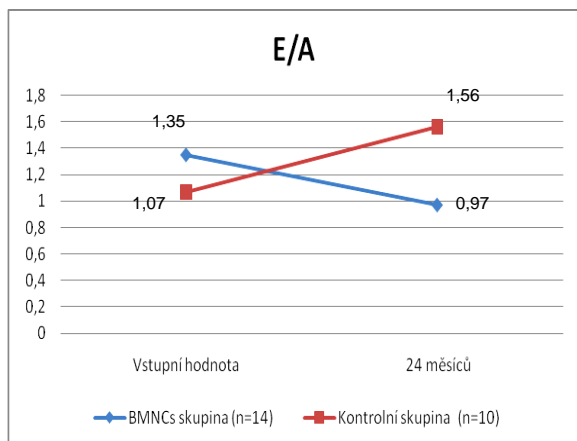
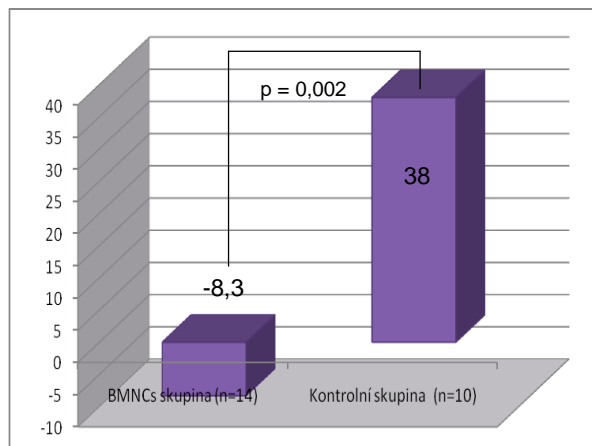
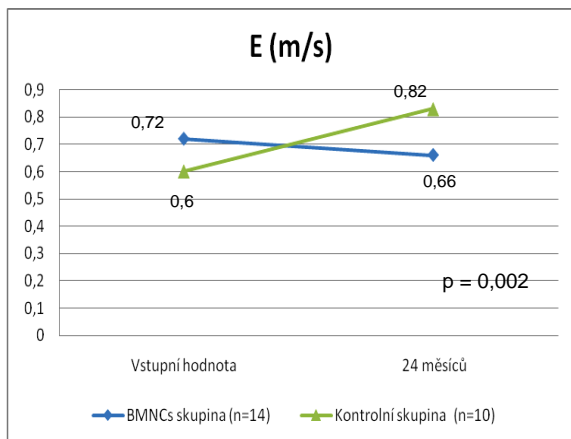
Tbl. 20.: Shrnutí parametrů diastolického plnění LK, sledování jednotlivých parametrů a jejich změn, které určují další průběh změny diastolické funkce.

		BMNCs skupina (n=14)		Kontrolní skupina (n=10)		P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
		Průměrná hodnota	Relativní změna vs.vstupní hodnota (%)	Průměrná hodnota	Relativní změna vs.vstupní hodnota (%)	
E (m/s)	Vstupní hodnota	0,72±0,23		0,6±0,16		
	24 měsíců	0,66±0,25	-8,3	0,83±0,11	38	0,002
A (m/s)	Vstupní hodnota	0,55±0,16		0,58±0,17		
	24 měsíců	0,74±0,3	34	0,54±0,18	-6,9	0,008
E/A	Vstupní hodnota	1,35±0,45		1,07±0,3		
	24 měsíců	0,97±0,45	-28	1,56±0,3	+ 45	< 0,001
Dte (ms)	Vstupní hodnota	143±21		182±25		
	24 měsíců	190±25	33	136±42	-25	0,002
Adur (ms)	Vstupní hodnota	118±19		135±6		
	24 měsíců	115±25	-2,5	129±21	- 4,4	0,34
S (m/s)	Vstupní hodnota	0,58±0,1		0,51±0,08		
	24 měsíců	0,69±0,2	19	0,54±0,06	5,8	0,004
D (m/s)	Vstupní hodnota	0,42±0,11		0,41±0,08		
	24 měsíců	0,46±0,22	9,5	0,35±0,04	- 14,6	0,003
Ardur (ms)	Vstupní hodnota	125±47		119±30		
	24 měsíců	141±19	12,8	138±25	16	0,21
Adur-Ardur (ms)	Vstupní hodnota	-12±5		16±11		
	24 měsíců	27±12		-9±6	39	0,002

Graf 25.: Shrnutí změny diastolické funkce.



Graf 26.: Změna jednotlivých parametrů diastolické funkce – vlny E, poměru E/A, decelerační čas (DTe).



4.13 Změna velikosti levé síně

Levá síň byla dříve často považovaná za pouhý pasivní reservoár. Nicméně v posledním desetiletí se stále více poukazuje na její významný spolupodíl v hemodynamice. Její funkce je velmi úzce spjatá s LK a to především s její diastolickou funkcí. Často v rámci poinfarktové remodelace dochází ke změně jejího tvaru a velikosti vedoucí ke zhoršení plnění LK s negativním vlivem na prognózu pacientů. Hodnocena byla LS z parasternální osy a ze 4 AC projekce ve 2 rozměrech (viz metodika). U nemocných v obou skupinách došlo k mírné dilataci LS (při hodnocení s PLAX a příčného rozměru) během 2 letého sledování, což lze demonstrovat v tabulce 21. U BMNCs skupiny ze vstupní hodnoty 37 ± 9 mm se zvýšil rozměr LS na 43 ± 10 mm a u kontrolní skupiny z 43 ± 9 mm na 45 ± 8 mm, bez statistické signifikance mezi skupinami. Jistá pozitivní změna ve prospěch BMNCs skupiny je patrná z apikální 4AC projekce a to v podélném rozměru LS, kdy jsme během 24 měsíců pozorovali u aktivně léčených nemocných mírnou regresi velikosti z 49 ± 8 mm na 48 ± 6 mm oproti kontrolní skupině, ve které se rozměr zvětšil 48 ± 8 mm na 54 ± 7 mm, $p=0,12$, graf 27.

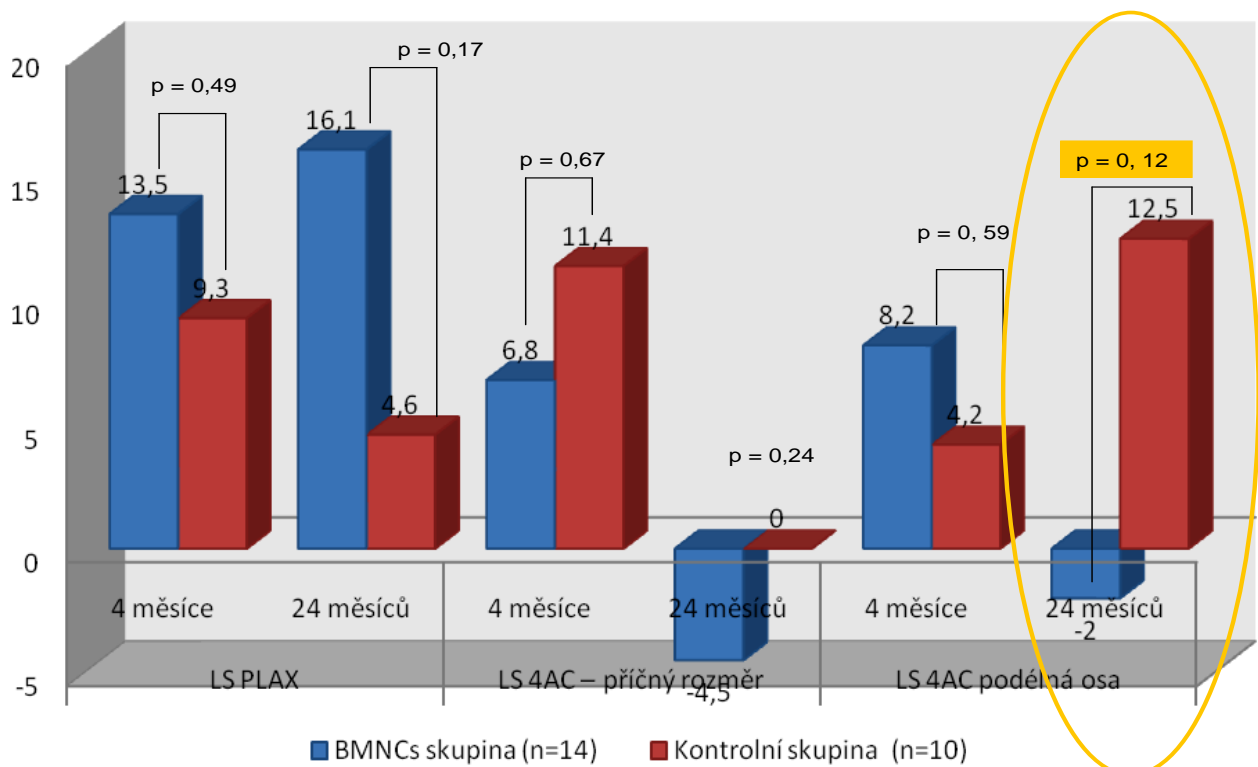
Tbl. 21.: Změna velikosti levé síně (mm) v aktivně léčené skupině (aplikované BMNCs) vs. kontrolní skupině během 24 měsíčního sledování.

		BMNCs skupina (n=14)		Kontrolní skupina (n=10)		P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
		Průměrná hodnota (mm)	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	Průměrná hodnota (mm)	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	
LS PLAX	<i>Vstupní hodnota</i>	37±9		43±9		
	4 měsíce	42±7	13,5	47±13	9,3	0,49
	24 měsíců	43±10	16,1	45±8	4,6	0,17
LS 4AC – příčný rozměr	<i>Vstupní hodnota</i>	44±5		44±16		
	4 měsíce	47±11	6,8	49±11	11,4	0,67
	24 měsíců	42±4	-4,5	44±5	0	0,24

LS 4AC podélná osa	Vstupní hodnota						
	4 měsíce	49±8	8,2	50±12	4,2	0,59	
	24 měsíců	48±6	-2	54±7	12,5	0,12	

LS – levá síň, PLAX – parasternální dlouhá osa, 4AC – 4 dutinová apikální osa

Graf 27.: Relativní změna velikosti levé síně za 24 měsíců oproti vstupní hodnotě (%) u nemožných s implantovanými BMNCs a kontrolní skupině.



4.14 Hodnocení vlivu remodelace levé komory na pravostranné srdeční oddíly

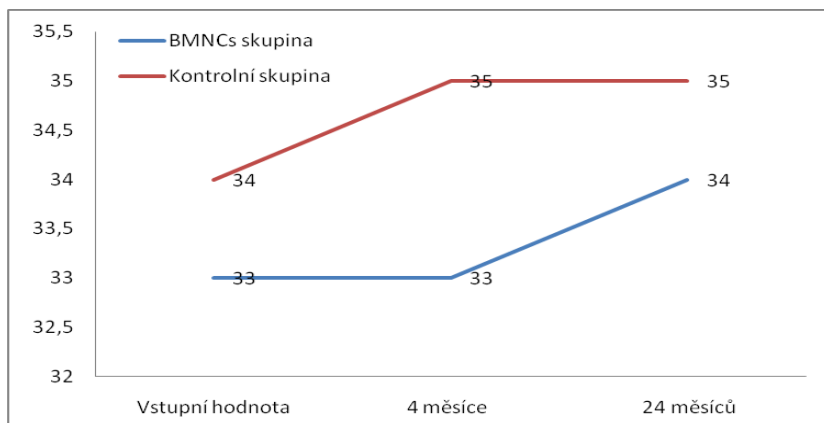
Sledovali jsme vliv postinfarktové remodelace i na pravostranné srdeční oddíly, pravou komoru a pravou síň. Hodnocení bylo provedeno echokardiograficky ze 4AC projekce (blíže viz metodika). Vstupně nebyla zachycena statisticky významná změna v příčném rozměru, velikosti pravé komory mezi skupinami. U skupiny s implantovanými BMNCs vstupně byla hodnota 33 ± 12 mm vs. 34 ± 13 mm, v obou skupinách došlo během 24 měsíčního sledování k mírné progresi její velikosti na hodnoty 34 ± 9 mm v aktivně léčené skupině vs. 35 ± 11 mm ve skupině kontrolní, $p=0,85$. Longitudinální kontraktilita pravé komory, hodnocená dle orientačního rozměru TAPSE, byla zachovaná v obou skupinách (20 ± 2 vs. 19 ± 5 , $p=0,81$). Nebyla zaznamenána ani statisticky signifikantní změna velikosti pravé síně během 24 měsíčního sledování. Primárně při akutním STEMI byla přechodně tendence k mírné dilataci pravé síně - rozměr byl 37 ± 13 mm ve skupině s BMNCs vs. 35 ± 14 mm v kontrolní skupině, $p=0,46$. Tato velikost se ustálila a během následného období se již výrazněji neměnila. Ve skupině s implantovanými BMNCs na rozměry 31 ± 11 mm vs. 37 ± 16 mm, $p = 0,04$, tbl. 22, graf 28.

Tbl. 22.: Změna velikosti pravé komory a pravé síně v závislosti na sledovaném období, nebyl zaznamenaný statisticky signifikantní rozdíl ve velikostech jednotlivých oddílů v závislosti na sledovaném období.

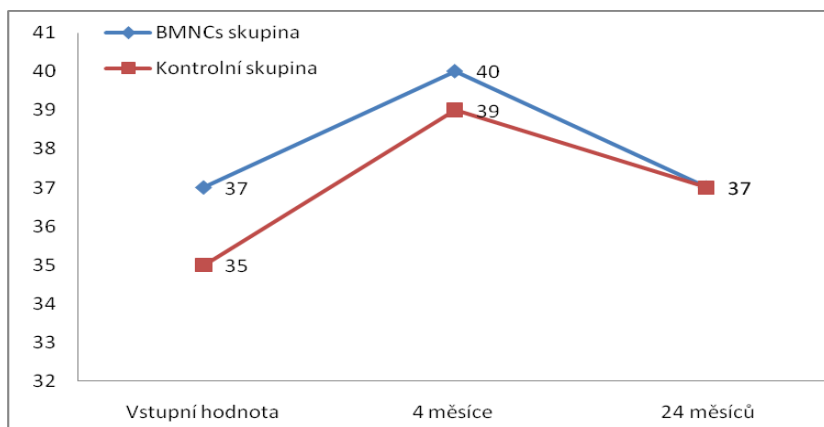
		BMNCs skupina (n=14)	Kontrolní skupina (n=10)	P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
		Průměrná hodnota	Průměrná hodnota	
Pravá síň	Vstupní hodnota	37±13	35±14	
	4 měsíce	40±15	39±17	NS
	24 měsíců	37±11	37±16	NS
Pravá komora	Vstupní hodnota	33±12	34±13	
	4 měsíce	33±8	35±12	NS
	24 měsíců	34±9	35±11	NS

Graf 28.: Srovnání změny velikosti pravé komory a pravé síně u kontrolní skupiny (baseline, 4 měsíce, 24 měsíce).

Pravá komora



Pravá síň



PK – pravá komora, PS pravá síň (velikost hodnocena v mm).

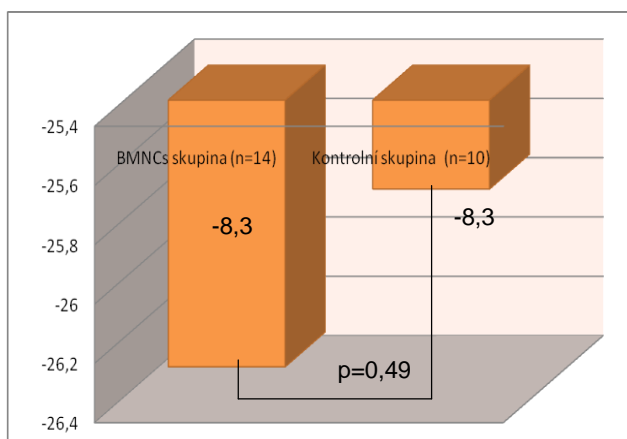
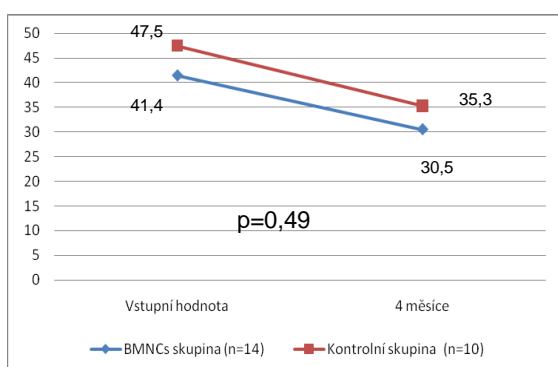
4.15 Hodnocení velikosti infarktového ložiska

Scintigrafické vyšetření myokardu bylo provedeno při dimisi ze vstupní hospitalizace a za 4 měsíce od randomizace. Byla hodnocena změna velikosti infarktového ložiska v jednotlivých skupinách. Během 4 měsíců došlo k redukci infarktového ložiska v obou skupinách (pokles o 26,3% ve skupině s BMNCs vs. 25,7%), bez statisticky signifikantního rozdílu, tbl. 23, graf 29.

Tbl. 23.: Shrnutí změny velikosti infarktového ložiska.

	BMNCs skupina (n=14)			Kontrolní skupina (n=10)			P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs. vstupní hodnota (%)	
Vstupní hodnota	41,4 ± 18,3			47,5 ± 20,8			
4 měsíce	30,5 ± 16,1	36 ± 17,2	↓ 26,3 %	35,3 ± 17,2	41,4 ± 18,9	↓ 25,7 %	0,49

Graf 29.: Změna velikosti infarktového ložiska hodnocená dle SPECTu myokardu.



4.16 Kvalita života

U nemocných jsme provedli v rámci 24 měsíčního sledování hodnocení kvality života dle standardizovaného dotazníku kvality života SF-36. Naši snahou bylo verifikovat efekt intrakoronární aplikace BMNCs a na subjektivně vnímané obtíže. Hodnotili jsme jednotlivé parametry (domény) z dotazníku a jejich změny (verifikace viz metodika).

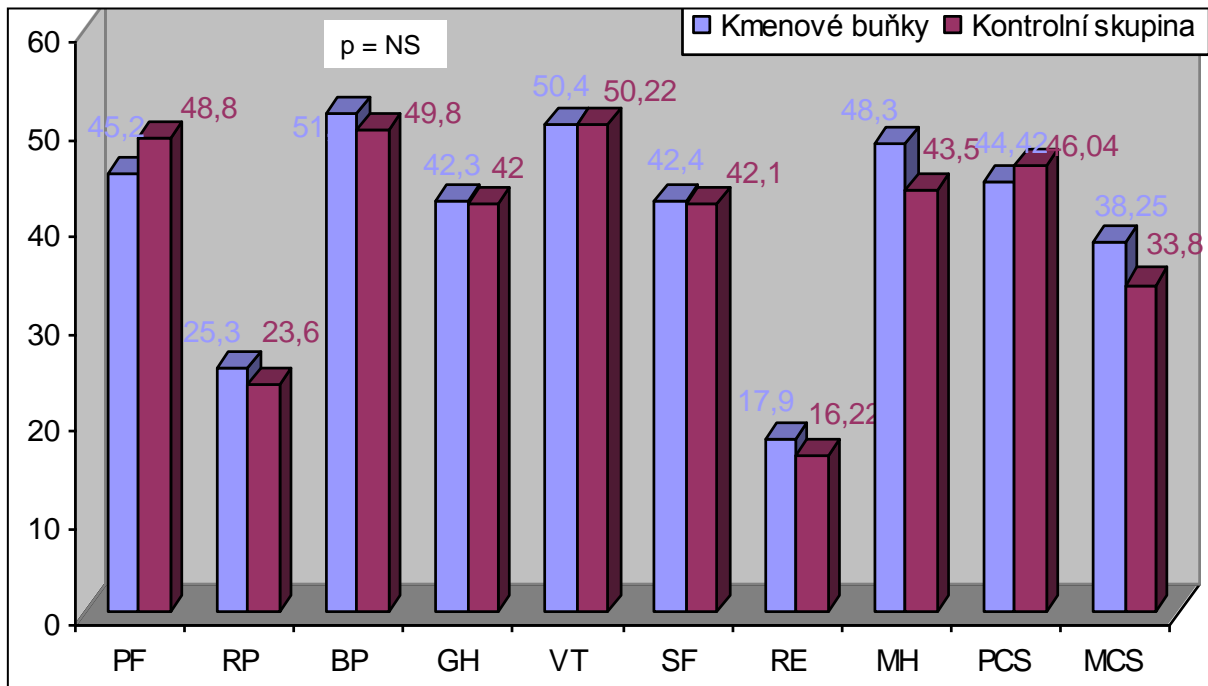
Z výsledků po srovnání s kvalitou života běžné populace (hodnoceno dle Oxfordského HRQOL) vyplývá, že kvalita našich pacientů je významně nižší. Nebyl, ale zachycen statisticky signifikantní rozdíl mezi aktivně léčenými nemocnými a kontrolní skupinou při porovnávání všech domén ($p=0,25$), viz tbl. 24, graf 30.

Tbl. 24.: Hodnocení kvality života – srovnání v jednotlivých doménách kvality života mezi aktivně léčenými pacienty a kontrolní skupinou (24 měsíční kontrola), srovnání s kvalitou života běžné populace.

Doména	zkratky pro doménu	<i>Hypotetické optimum</i>	<i>Index HRQOL Oxford</i>	Index HRQOL BMSCs	Index HRQOL Kontrolní skupina
Fyzické funkce	PF	100	84.2	45,2 ± 11	48,8±8
Fyzické omezení rolí	RP	100	80.9	25,3± 3	23,6±4
Tělesná bolest	BP	100	75.2	51,5± 11	49,8±16
Celkové vnímání vlastního zdraví	GH	100	71.9	42,3± 9	42±13
Vitalita	VT	100	60.9	50,4±9,15	50,2211±
Fyzické nebo emoční omezení sociálních funkcí	SF	100	83.3	42,4±16	42,1±15
Emoční omezení rolí	RE	100	81.3	17,9±3,9	16,22±6
Všeobecné duševní zdraví	MH	100	74.7	48,3±7	43,5±16
Fyzické zdraví	PCS	100	50.0	44,42±9	46,04±9
Mentální zdraví	MCS	100	50.0	38,25±6	33,8±12

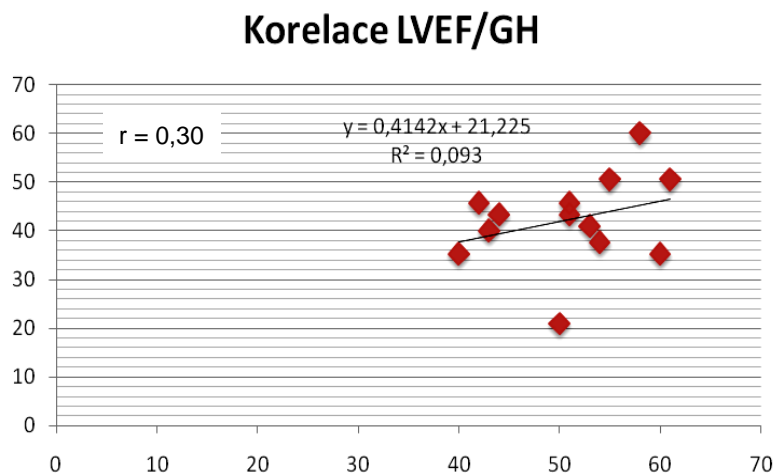
Oxfordský index HRQOL = odpovídá normální zdravé populaci a její kvality života.

Graf 30.: Sledování změn v jednotlivých parametrech kvality života.



V rámci subanalýzy jednotlivých parametrů byla zjištěna pozitivní korelace mezi subjektivně vnímanému vlastnímu zdraví pacienta a systolickou funkcí LK ($r=0,30$, $p<0,001$), graf 31.

Graf 31.: Pozitivní korelace mezi subjektivně vnímanému vlastnímu zdraví pacienta a LVEF za 24 měsíců.



5 Diskuze

Tato randomizovaná studie zkoumala bezpečnost a efektivitu intrakoronární aplikace autologních mononukleárních buněk kostní dřeně u pacientů po velkém AIM s pozdní prezentací, primárně řešeném perkutánní koronární angioplastikou. Tito nemocní jsou vystaveni největšímu riziku negativní poinfarktové remodelace LK s rozvojem srdečního selhání a následné smrti^{14, 16-18}. Dosud není k dispozici žádná efektivní konvenční terapie, která by umožnila prognózu těchto nemocných zlepšit a podílet se tak na zabránění tvorby fibrotické jizvy a nahrazení ztracených CM^{38, 159, 160}. Hlavními klíčovými výsledky naší práce je prokázání bezpečnosti aplikace KB a zjištění, že i když u našich pacientů i.e. aplikace BMNCs nevedla během 4 měsíců k signifikantnímu vzestupu LVEF či redukcí objemů komory a zmenšení velikosti infarktového ložiska, v dlouhodobém sledování u aktivně léčené skupiny nemocných došlo k poklesu LVESV a stabilizaci LVEDV. To se projevilo, i když mírným, ale signifikantním zlepšením systolické funkce LK. Pozitivní a překvapivý byl nálezní příznivého vlivu BMNCs na diastolickou funkci během 2 letého sledování. Tyto výsledky poukazují na možnost ovlivnění především dlouhodobého procesu remodelace buněčnou terapií.

Předpoklady naší studie z hlediska možnosti ovlivnění regenerace myokardu a zlepšení systolické funkce LK vycházely z preklinických experimentálních prací⁵⁹⁻⁶⁶ a z pilotních nerandomizovaných klinických studií. Patří sem především práce publikovaná Aviléssem a spol.⁶⁹. Zde byly pěti pacientům i.e. aplikovány BMNCs 10-15 dní po AIM. Hodnocení bylo provedeno pomocí levografie a bylo zjištěno signifikantní zlepšení kontraktility a systolické funkce LK⁷⁰. Pozitivní vliv aplikace KB vyplýval i ze studie TOPCARE-AMI Trial^{132, 165}. Do této práce bylo zařazeno 20 pacientů. Devíti nemocným byly intrakoronárně implantovány BMNCs, jedenácti nemocným pak EPCs z periferní krve, vždy za 4 dny od AIM. V odstupu 4 a 12 měsíců autoři zaznamenali dle levografie

signifikantní zlepšení globální systolické funkce LK, zmenšení postiženého infarktového ložiska a zlepšení viability myokardu. Efekt terapie přitom byl nezávislý na typu podaných buněk (BMNCs vs. EPC).

Výše uvedené práce výrazně motivovaly další výzkumné záměry zabývající se touto problematikou. Ve všech studiích, včetně naší, byly kladeny obdobné technické otázky z hlediska provedení implantace. Jedná se především o optimální způsob aplikace buněk, načasování implatace a počet KB.

5.1.1 Způsob aplikace

U našich pacientů jsme aplikovali BMNCs intrakoronárně. Metoda byla použita pro svoji jednoduchost a relativně malou invazivitu ¹⁴². Vycházeli jsme z literatury, kde byla účinnost verifikovaná v řadě studií ^{76, 97}. Tato metodika aplikace má mnoho výhod, ale i své limitace. Jednou z hlavních nevýhod je malá cílenost, která je vynikající pokud je např. provedena přímá intramyokardiální implantace KB při kardiochirurgických výkonech ¹⁶⁶. Takto aplikované buňky umožňují zacílené podání do ložiska ischemie. Širší využití této metody je ale limitované především vlastní invazivitou výkonu. Relativní výhody obou způsobů jsou zahrnuty v technice přímého podání BMNCs katetrizační, transendokardiální NOGA technikou ¹³⁹⁻¹⁴¹. Bohužel, v době kdy jsme studii zahájili tato metoda nebyla v České republice dostupná. I nyní je využití limitované pro finanční náročnost. Prozatím je tento postup teprve v začátcích, probíhá několik studií využívající této aplikace, zatím nejsou k dispozici výsledky.

5.1.2 Typ aplikovaných buněk

Výběr správného charakteru buněk pro i.c. aplikaci u pacientů po STEMI je poměrně problematický. V úvodu této práce jsem se zmínila o řadě nabízených potenciálně vhodných typů buněk. Vzhledem k designu naší práce, zahrnující pacienty recentně po AIM jsme použili BMNCs. Vycházeli jsme z dostupné literatury, kde je popisované, že právě podání BMNCs či obecněji kmenových buněk kostní dřeně, může vést ke zlepšení průběhu angiogenezy a možné záchraně hibernovaného myokardu se zlepšením LVEF^{64, 119, 124-126, 138, 167-169}. Mimo to je výhodná i jejich snadnější dostupnost, relativní bezpečnost a menší invazivita aplikace^{76, 121-123, 133, 170, 171}. Prací s různými modifikacemi KB, ale i variabilitou použité aplikace bylo publikováno velké množství (viz. tbl. 25). Jednalo se především o malé nerandomizované studie. Jejich rozdílnost stěžuje výrazně validní porovnání.

Tbl. 25.: Souhrn prací zabývajících se aplikací kmenových buněk – ukázka variability typu podaných buněk a jejich kombinace ve vztahu k rozdílnosti cesty aplikace.

<i>Studie a typy kmenových buněk s rozdílnou aplikací</i>			
<i>Studie</i>	počet pacientů	Typy aplikovaných buněk	Cesta aplikace buněk
<i>Stamm</i> ⁷¹	12	BMNCS	chirurgicky - epikardiálně
<i>Li</i> ¹²⁸	70	CPC-GCSF	chirurgicky - epikardiálně
<i>Galinanes</i> ¹⁷²	14	BMNCS	chirurgicky – epikardiálně
<i>Hendrikx</i> ¹⁷³	20	BMNCS	chirurgicky - epikardiálně
<i>Ozbaran</i> ¹⁷⁴	6	CPC-GCSF	chirurgicky - epikardiálně
<i>Pompilio</i> ¹⁷⁵	4	GCSF-mobilizace CD 133+	chirurgicky - epikardiálně
<i>Tse</i> ¹⁷⁶	8	BMNCS	Endomyokardiální aplikace
<i>Perin</i> ¹⁷⁷	14	BMNCS	Endomyokardiální aplikace
<i>Fuchs</i> ¹³⁹	10	BMNCS	Endomyokardiální aplikace
<i>Losordo</i> ¹⁷⁸	24	GCSF-mobilizace CD 133+	Endomyokardiální aplikace
<i>Strauer</i> ¹⁶⁵	10	BMNCS	Intrakoronální aplikace

<i>REPAIR-AMI</i> ¹⁷⁹	204	BMNCS	Intrakoronální aplikace
<i>ASTAMI</i> ¹³³	100	BMNCS	Intrakoronální aplikace
<i>BOOST</i> ¹³⁴	60	BMNCS	Intrakoronální aplikace
<i>Fernandes-Avilés</i> ⁶⁹	20	BMNCS	Intrakoronální aplikace
<i>IACT study</i> ¹⁸⁰	18	BMNCS	Intrakoronální aplikace
<i>Meluzin</i> ¹⁸¹	60	BMNCS	Intrakoronální aplikace
<i>Ruan</i> ¹⁸²	20	BMNCS	Intrakoronální aplikace
<i>TOPCARE-AMI</i> ^{132, 145, 183}	59	BMNCS/CPC	Intrakoronální a subcutánní aplikace
<i>MAGIC cell</i> ¹⁸⁴	27	CPC-GCSF	Intrakoronální a subcutánní aplikace
<i>MAGIC Cell-3-DES</i> ¹⁸⁵	96	BMNCS/GCSF	Intrakoronální aplikace
<i>Katritsis</i> ¹⁸⁶	11	MSC+EPC	Intrakoronální aplikace
<i>Chen</i> ^{187, 188}	69	MSC	Endomyokardiální aplikace
<i>Bartunek</i> ¹⁸⁹	19	EPC (CD 133+)	Intrakoronální aplikace
<i>Manginas</i> ¹⁹⁰	12	EPC (CD 133+,34+)	Intrakoronální aplikace
<i>Li</i> ¹⁹¹	70	GCSF -mobilizace CPC	Intrakoronální aplikace
<i>Erbs</i> ¹⁹²	26	CPC-GCSF	Intrakoronální aplikace
<i>Boyle</i> ¹⁹³	5	GCSF-mobilizace CD 34+	Intrakoronální aplikace
<i>Janssen</i> ¹⁹⁴	67	BMNCS	Intrakoronální aplikace
<i>FIRSTLINE-AMI</i> ¹⁹⁵	30	GCSF	subkutánní aplikace
<i>REVIVAL-2</i> ¹⁹⁶	114	GCSF	subkutánní aplikace
<i>STEMMI</i> ¹⁹⁷	62	GCSF	subkutánní aplikace

CPC- cirkulující progenitorové buňky, EPC – endoteliální progenitorové buňky, BMNCs – mononukleární buňky kostní dřeně, MSC – mezenchymální buňky

Při hodnocení různých charakterů buněk nelze opomenout zmínku i o dalších variantách aplikovatelných buněk. Mezi prvními použitými KB, již v roce 2000, byly skeletální myoblasty^{77, 81, 117, 198}. Jedná se o buňky snadno dostupné s vysokou afinitou k žizevnaté tkáni. Mají schopnost podporovat myokardiální regeneraci, podílet se na regulaci rozsahu poinfarktové jizvy a inhibici remodelace. Jejich efekt byl popsán spíše u chronických forem ICHS⁷⁷⁻⁸¹. Jejich nevýhodou je především invazivita a složitost podání. Do první publikované studie se skeletálními myoblasty Menascheho a spol.¹⁹⁸ byli zařazeni pacienti (n=10) s významnou ICHS s LVEF < 35 %. Byl u nich popsán pozitivní efekt ve smyslu

signifikantního vzestupu LVEF ($p=0,001$) během jednoho roku sledování. Nežádoucím zjištěním bylo, že u 5 ti nemocných byl zachycen běh NSVT a u tří dokonce arytmogenní bouře s nutností implantace kardioverteru defibrilátoru. Jistý podíl na tomto faktu pravděpodobně má množství podaných buněk a příprava buněk, což vyplývá i z dalších prací. Např. Gavira a spol.¹⁹⁹ nezaznamenal ani jedenkrát běh arytmie po implantaci za 1 rok (rozdíl v ko-kultivaci buněk, v.s. snížení zánětlivého procesu). Ve své práci také pozoroval zlepšení LVEF ($p < 0,01$), regionální kontraktility ($p < 0,0001$). Také další práce měli obdobné výsledky jako Gavira (Simiak et al.^{81, 137}, Dib et al.²⁰⁰). Jednalo se o práce na malém počtu pacientů, nerandomizované. Následně byla provedena studie randomizovaná MAGIC (92 pacientů, EF 15-35%)¹⁰⁶, ve které se potvrdil již významně menší efekt na funkci komory. Pouze ve vysoce dávkované skupině došlo ke zmenšení LVESV. Nebyl zachycen vyšší výskyt arytmogenního potenciálu. Aplikace těchto buněk do širšího klinického využití je vzhledem k těmto rozporuplným závěrům problematická a je nutný podrobnější výzkum.

Dalšími relativně nadějnými buňkami známými od roku 1999 jsou mesenchymální buňky. První významnější práce je presentovaná Chenem a spol.^{187, 188}. Do studie bylo zařazeno 69 pacientů s délkou sledování 6 měsíců. Výsledkem byl nález zlepšení globální systolické funkce (LVEF, $p=0,01$), pokles LVESV, vzestup perfuze a zlepšení regionální motility stěny^{86, 88, 188}. Přesný efekt působení není zcela jasný. Dle experimentálních prací tyto buňky nevedou ke stimulaci angiogenezy, ale mohou podpořit vznik buněčné fúze v periinfarktové zóně se zmenšením velikosti infarktového ložiska^{88, 89}. Také u těchto buněk je nutný další podrobnější tč. spíše experimentální výzkum. Velmi nadějně se zdají do budoucna embryonální pluripotentní KB s dobrou diferenciací plasticitou do CM¹⁰¹⁻¹⁰³. Experimentálně jsou schopné podpory funkce LK se známkami zlepšení kontraktility^{105, 106}. Z etických důvodů zatím nebyla povolena žádná klinická studie s ESC u člověka. Není vyjasněná ani otázka jejich možné teratogenity. I přes tyto limitace se jedná o velmi nadějně

buňky s velkou perspektivou v budoucnu ^{107, 108}. S obdobnými problémy se setkáváme i u fetálních a neonatálních CM, u kterých navíc není jasná otázka imunogenicity ⁷⁹ a geneticky modifikované buňky, které jsou zatím ve stadiu prvopočátků experimentálních testů. Nelze vynechat ani zmínku o KB přítomných přímo v myokardu (residential cardiac stem cells, CSCs) s experimentálně prokázanou schopností intramyokardiální integrace, myokardiální regenerace a regenerace endoteliálních buněk ¹¹⁴⁻¹¹⁶. V posledních letech je do těchto buněk vkládána velká naděje ⁷⁰. V klinické praxi zatím nebyly použity vzhledem k problémům s odběrem a expanzí. Prozatím nejsou dostupná dostatečná data o kinetice proliferace a diferenciace CSCs. Nejsou také dostatečně prozkoumány nežádoucí účinky.

5.1.3 Množství aplikovaných kmenových buněk

Ideální a efektivní množství buněk, vhodných pro i.c. aplikaci nemocným po STEMI, které by přesvědčivě vedlo ke zlepšení funkce LK, viability a regeneraci, není dosud jasně definováno. Od roku 2005 byla použita velká variabilita počtu implantovaných mononukleárních buněk v řadě studií, viz tbl. 26.

Tbl. 26.: Přehled studií a rozdílné množství implantovaných kmenových buněk.

<i>Studie s mononukleárními buňkami</i>	<i>Počet implantovaných buněk</i>
<i>Ge 2006</i> ²⁰¹	4×10^7
<i>Huang, 2006</i> ²⁰²	$1,8 \times 10^8$
<i>Janssens, 2006</i> ²⁰³	$1,7 \times 10^8$
<i>Kang, 2006</i> ¹⁸⁵	$1-2 \times 10^9$
<i>Karpov, 2005</i> ²⁰⁴	$88,5 \times 10^6$
<i>Li, 2007</i> ¹²⁸	$7,25 \times 10^7$
<i>Lunde, 2005</i> ¹³³	$0,68 \times 10^8$
<i>Meluzin, 2006</i> ^{171, 181}	(HD) 10^8 , (LD) 10^7
<i>Meyer, 2006</i> ¹³⁴	$2,46 \times 10^9$
<i>Schachinger, 2006</i> ¹²³	$2,36 \times 10^8$

HD – vysokodávkovaná skupina, LD – nízkodávkovaná skupina

V naší práci jsme podali celkový počet BMNCs v průměru $29 \pm 11 \times 10^8$. Podíváme-li se na shrnutí nejvýznamnějších prací s hodnocením významnosti efektu, v případě podání buněk >

10⁸ můžeme pozorovat signifikantní vliv na systolickou funkci LK (vzestup LVEF, p = 0,006), viz tbl. 27. Toto bylo verifikované metaanalýzou Abdela–Latifa a Martina-Rendona^{76, 170}.

Tbl. 27.: Shrnutí upraveno dle práce Martina-Rendona a Katritise^{170, 186}, vliv počtu mononukleárních buněk kostní dřeně na LVEF.

Vliv počtu mononukleárních buněk kostní dřeně na LVEF ¹⁷⁰	
Počet buněk	p hodnota
< 10 ⁷ buněk	0.48
< 10 ⁸ buněk	0.39
< 10 ⁹ buněk	0.006
< 10 ¹⁰ buněk	0.002

Dosud také není k dispozici další vysvětlení vlivu množství a typu podaných buněk na případnou mobilizaci vlastních záložních BMNCs po AIM v cirkulaci¹³⁴. Je otázkou zda pool vlastních buněk může být podanými buňkami nějakým způsobem aktivovaný, není ale známá doba nástupu mobilizace. Otázkou také je, jakou roli v jejich množství hrají i rizikové faktory aterosklerózy (hypertenze, kouření, diabetes), které se také mohou na snížení buněčné mobilizace podílet⁵⁶. Pro přesnější kvantifikaci je nutný další podrobnější výzkum ve sféře experimentální.

5.1.4 Načasování aplikace BMNCs:

Našim pacientům byly KB v průměru implantovány 7 ± 1 den po STEMI. Nemocní byli rozděleni primárně do dvou skupin – časná s aplikací za 3-5 den, pozdní 7-11 dní po AIM. Naším sekundárním cílem bylo verifikovat ideální načasování (timing) implantace, tedy dobu, kdy je implantace maximálně účinná a bezpečná. Bohužel ale, vzhledem k malému počtu pacientů nebyla validní analýza načasování implantace na výslednou funkci LK možná. Z literatury není dosud přesně určena optimální doba implantace¹²². Z řady publikovaných

prací se ale zdá, že pro i.c. aplikaci s největší efektivitou svědčí optimální rozmezí mezi 7-21 dnem^{133, 181, 182, 191, 194, 204-206}. Tyto závěry podporuje především souhrnná práce Martina-Rendona (7-21 den vs. 0-7 den, p=0,003)¹⁷⁰, viz tbl. 28.

Tbl. 28.: Variabilita doby implantace.

<i>Studie</i>	<i>počet pacientů</i>	<i>doba podání od AIM (dny)</i>	<i>Vzestup LVEF % (basální hodnota/po léčbě) (p v léčené skupině)</i>
<i>Strauer et al, 2002</i> ¹⁶⁵	20	5-9	4 vs. 5 (NS)
<i>TOPCARE-AMI, 2002-2004</i> <i>Assmus</i> ¹⁴⁵ <i>Britten</i> ¹⁸³ <i>Schachinger et al.</i> ¹³²	30	4	2,5 vs. 8,5 (< 0,001)
<i>Fernandes-Avilés et al., 2004</i> ⁶⁹	33	8-19	5,8
<i>Bartunek et al., 2005</i> ¹⁸⁹	35	10,2-13	4,3 vs. 7,1
<i>BOOST I, 2004-2006</i> <i>Woller et al.</i> ¹³¹ <i>Schaefer et al.</i> ²⁰⁷	60	6	0,7 vs. 6,7 (6mės.) 3,1 vs. 5,9 (18 mės., p=0,27)
<i>Janssens et al., 2006</i> ¹⁹⁴	66	24 hodin	2,2 vs. 3,3 (p=0,36)
<i>ASTAMI, 2006-2007 - Lunde et al.</i> ²⁰⁸	97	4-8	6,7 vs. 8 (p=0,07)
<i>REPAIR-AMI, 2006-2007</i> <i>Schachinger et al.</i> ¹²³ <i>Erbs et al.</i> ²⁰⁹	204	3-6	3 vs. 5,5 (p=0,006)
<i>Meluzin et al., 2006-2007</i> ^{171, 181}	66	6-10	3 vs. 6 (3mės., p=NS) 0 vs. 7 (6 mės.,HD, p=0,018) 0 vs. 7 (12 mės.,HD, p=0,027)

HD – vysokodávkovaná skupina, LD – nízkodávkovaná skupina, NS – nesignifikanční statisticky

5.2 Bezpečnost intrakoronární aplikace BMNCs

V naší studii jsme prokázali, že i.c. podání BMNCs u nemocných s akutním STEMI nevede k dlouhodobému vyššímu výskytu nežádoucích událostí a tato metoda je celkově bezpečná. Tento výsledek je pozitivní především i proto, že pacienti v aktivně léčené skupině byli mírně znevýhodněni pro vyšší věk a s tím související pravděpodobností vyššího výskytu nežádoucích příhod. Samotný odběr kostní dřeně však může být v časném období po infarktu myokardu provázen závažnými komplikacemi. Komplikace vychází především z technické složitosti provedení samotného odběru kostní (v poloze na břiše), tendenci k hemodynamické nestabilitě organismu recentně po rozsáhlém STEMI a také nedostatečné zkušenosti s tímto typem výkonu. Tento závěr je podložen i řadou dalších klinických prací^{71, 97, 121, 123, 210-212}, přičemž shrnutí je provedeno v metaanalýze Martina-Rendona¹⁷⁰, který tento nálezní potvrzuje. Z tohoto hlediska je výhodnější odběr mimo časné poinfarktové období, v době úplné stabilizace pacienta, tedy alespoň po 5 dnech od příhody. V obou našich případech také došlo ke komplikaci v časné skupině implantace.

Dalším bodem pozornosti byl výskyt arytmií. Strach pocházel především z prvotních prací s KB^{87, 145, 213}. V naší studii jsme nezaznamenali pro-arytmogenní vliv podaných buněk. Počet extrasystol byl dokonce primárně vyšší ve skupině kontrolní než ve skupině s implantovanými buňkami (15,2 vs. 4,6, $p=0,004$) během 4 měsíční kontroly. Během 24 měsíčního sledování se rozdíl minimalizoval na počet $3,8 \pm 1,2$ vs. $1,6 \pm 2,3$, $p=0,12$. Nález je v souladu s dalšími publikovanými pracemi^{169, 214}.

Snažili jsme se také posoudit pomocí katetrizačního vyšetření za 4 měsíce od randomizace výskyt in-stent restenóz, který po implantaci KB představuje jeden z klíčových bodů sledování v průběhu éry rozvoje buněčné léčby. V naší práci jsme nezaznamenali u aktivně léčené skupiny pacientů vyšší výskyt koronárních příhod během 2 letého sledování a ani záchyt restenózy v intervenované tepně v průběhu 4 měsíců od STEMI pomocí kontrolní

angiografie. Výsledky jsou v souladu s dosud převážnou většinou prací^{133, 134, 181, 182, 191, 192, 194, 204-206, 215, 216}. Shrnutí je provedeno ve větších metaanalýzách^{76, 170, 217}, kde se riziko pro-aterogenního potenciálu nepotvrdilo. Nicméně během posledních 10 let se vyskytly 3 významnější práce, které tímto názorem přechodně otřásly. Za prvé se jednalo o studii Kanga a spol.¹⁸⁴, která proběhla na malém souboru nemocných. Nemocní byli léčeni a stimulováni faktorem G - CSF po dobu 5 dní před intervencí a následně jim byl implantovaný nelékový, metalický stent. U 5 ti pacientů ze 7 byla potvrzena významná restenóza v primárně infarktové a intervenované tepně. Dále se jednalo o práce, ve kterých byly aplikovány nemocným buňky obohacené o CD 133+ (Mansour a spol.²¹⁸, Bartunek a spol.²¹⁹). V obou byl zaznamenán vyšší výskyt instent restenóz a byla zjištěna i větší lumenální ztráta s poklesem koronární průtokové rezervy v infarktové tepně. Upozornily tak na riziko akcelerované aterosklerózy spojené s intrakoronární aplikací BMNC. Kang poté o 3 roky později publikoval další práci²⁰⁶ podobného designu až nato, že byly použity lékové stenty, které nevedly k instent restenóze. Také práce Assmuse a spol. v roce 2006⁹⁷ na 83 nemocných s i.c. aplikací BMNC nevedla k progresi vývoje restenóz a aplikace ani nebyla spojena s nárůstem kardiovaskulárních příhod či nutnosti opakované koronární revaskularizace. Omezení této studie je jejím retrospektivním designem, ve kterém pacienti léčení intrakoronární aplikací BMNCs byli porovnání s kontrolní skupinou historických nemocných. Celkově tyto nálezy naznačují, že riziko urychlené aterosklerózy je třeba vzít v úvahu při výzkumných projektech s buněčnou léčbou u AMI. Toto potencionální riziko je však nejspíše závislé na řadě faktorů (charakter buněk, potenciační faktory, způsob vedení intervence, typ stentu) a ve větších studiích se neprokázalo.

5.3 Krátkodobé sledování

V naší práci jsme nezaznamenali signifikantní efekt buněčné terapie během krátkodobého sledování. Ve srovnání s kontrolní skupinou nedošlo k signifikantní redukci infarktového ložiska

dle SPECTu myokardu. Neprokázali jsme signifikantní zmenšení LVESV ani LVEDV. Systolická funkce LK hodnocená dle LVEF se zlepšila v obou skupinách obdobně. V průběhu posledních 6ti let bylo publikováno mnoho prací zabývajících se problematikou krátkodobého efektu buněčné terapie. Jednalo se o studie s výrazně rozdílným designem. To představuje problém při hodnocení efektivity podání KB, daný především různorodou metodikou hodnocení – echokardiografie, levografie, magnetická resonance (MRI), velmi obtížně srovnatelnou (tbl. 29).

Tbl. 29.: Souhrn nejdůležitějších randomizovaných prací zabývajících se srovnání metod použitých pro verifikaci LVEF.

<i>Nejdůležitější randomizované práce</i>	<i>Metody hodnocení LVEF</i>
<i>Avilés a spol.</i> ⁶⁹	Levografie
<i>TOPCARE-AMI, Assmus</i> ¹⁴⁵ <i>Brütten,</i> ¹⁸³ <i>Schachinger et al.</i> ¹³²	Levografie
<i>Chen a spol.</i> ²¹⁶	Echokardiografie + levografie
<i>Janssens a spol.</i> ¹⁹⁴	Magnetická resonance
<i>REPAIR-AMI</i> ^{123, 179, 192}	Levografie
<i>ASTAMI</i> ¹³³	Levografie
<i>BOOST</i> ¹³¹	Magnetická resonance
<i>BALANCE</i> ²²⁰	Echokardiografie + levografie
<i>Meluzin a spol.</i> ^{171, 181}	Echokardiografie + SPECT

Řada z těchto publikovaných prací jsou studie randomizované, placebem kontrolované^{131, 203, 221}. Jejich primárním cílem bylo, podobně jako v naší práci, sledování bezpečnosti podání KB, změny funkce LK hodnocené dle ejekční frakce, popř. zmenšení infarktového ložiska a zlepšení myokardiální viability. Mezi první významnější větší práce se řadí německá studie *BOOST*^{131, 134}, ve které bylo sledováno 60 pacientů. Krátkodobé šestiměsíční výsledky byly velmi nadějně a ukazovaly na signifikantní zlepšení funkce LK (hodnocení bylo provedeno pomocí MRI) u skupiny pacientů, kterým byly i.c.

podány BMNCs (kontrola vs. BMNCs - vzestup LVEF + 0,7 % vs. 6,7%). Další v pořadí byla belgická klinická studie *Janssense a spol.* ¹⁹⁴ publikovaná v roce 2006, v níž bylo zařazeno 67 pacientů po úspěšné angioplastice pro AIM a KB jim byly aplikovány prakticky ihned (do 24 hodin od přijetí) i.c. Odstupem 4 měsíců dle MRI nebyl zjištěn významný vzestup LVEF (funkce komory byla zlepšena ve skupině s BMNCs o 1,2 % oproti kontrolní skupině). Překvapivě i přes tento negativní výsledek došlo k statisticky významné redukci velikosti infarktového ložiska oproti kontrole (o 28 %). Tuto skutečnost se nám nepodařilo v naší studii potvrdit, nicméně v metaanalýze Abdela se tento nálezný prokázal ⁷⁶. V následné placebem kontrolované, dvojitě zaslepené studii *REPAIR – AMI* ¹⁷⁹ byla hodnocena u 204 pacientů systolická funkce LK (dle levografie), kterým byly v odstupu 5 dnů od AIM intrakoronárně aplikované BMNCs. Autoři prokázali pozitivní efekt ve smyslu potenciace funkce LK (vzestup LVEF + 5,5 % u skupiny s KB vs. kontrolní skupina +3 %). U skupiny pacientů s implantovanými buňkami bylo pozorováno menší množství reinfarktů a rehospitalizací. Naproti tomu norská studie *ASTAMI* ^{133, 208}, velmi podobného designu na 100 pacientech, neprokázala příznivý vliv buněčné terapie. Je nutno ovšem zdůraznit, že v této práci bylo nemocným aplikováno výrazně nižší množství KB než v jiných studiích. Komplexní shrnutí nejdůležitějších klinických prací týkajících se implantace KB a jejich bezpečnosti bylo shrnuto v metaanalýze *Abdela a spol., 2007* ⁷⁶. Do hodnocení bylo zahrnuto celkem 18 studií (999 pacientů), z toho s BMNCs 15 studií, s EPC 3 studie, s mezenchymálními buňkami 1 studie. Všechny práce byly placebem kontrolované, převážně randomizované, 13 studií bylo u nemocných s AIM a 5 s ischemickou kardiomyopatií. Medián sledování nemocných byl 4 měsíce (3-18měsíců). Bylo konstatováno, že existuje velká heterogenita doby implantace KB (1-81 dnů, medián 9,8 dní po AIM). Také počet implantovaných KB byl velmi rozdílný a pohyboval se v rozmezí 2×10^6 až 60×10^9 , median 80×10^6 . Výsledky metaanalýzy naznačují, že implantace KB může vést ke zlepšení

systolické funkce LK (+ 3,66 vs. + 5,4%, $p < 0,01$), zmenšení infarktového ložiska (- 5,49 vs. - 9,1%, $p < 0,03$), zmenšení LVESV (- 4,8ml vs.- 8,2ml, $p < 0,06$) a snížení LVEDV (- 4,8ml vs. - 8,2ml, $p < 0,06$). Závěrem této metaanalýzy bylo, že implantace KB je provázána zlepšením anatomických a hemodynamických parametrů LK srdeční u pacientů s AIM a chronickým srdečním selháním na podkladě ischemické choroby srdeční. Jedno z posledních shrnutí bylo provedeno Rendonem a spol.¹⁷⁰. Jedná se o metaanalýzu týkající se jenom použití mononukleárních kmenových buněk u pacientů s AIM. Snahou práce byla systematická analýza bezpečnosti imlantace a efektu BMNCs založená na klinické evidenci. Do hodnocení bylo zahrnuto 13 studií s množstvím 811 nemocných. KB zlepšily funkci LVEF o 2,9%, signifikantně došlo k redukci LVESV o 4,74 ml a redukce myokardiální léze byla o 3,51%. Efekt buněk byl výraznější v případě vyšší podané dávky (nad 10^8).

Tbl. 30.: Souhrn nejdůležitějších klinických prací, zabývajících se intrakoronární aplikací mononukleárních kmenových buněk. Upraveno dle Abdela, Rendona, Katritis^{76, 170, 186}.

Studie	Typ aplikovaných buněk	počet pacientů	Množství podaných buněk ($\times 10^6$)	dobu podání od AIM (dny)	Sledování	Vzestup LVEF % (basální hodnota/po léčbě) (p v léčené skupině)	LVEF - typ hodnotící metody	Ostatní hodnocení
Nerandomizované studie								
<i>Strauer et al., 2002,¹⁶⁵</i>	BMNCs	20	0,39	5-9	3	4 vs. 5 (NS)	LVG	LVESV↓, LVEDV ≈, regionální motilita stěny↑, velikost infarktového ložiska↓
<i>TOPCARE-AMI, 2002-2004 Assmus,¹⁴⁵ Britten,¹⁸³ Schachinger et al.¹³²</i>	BMNCs /CPC	30	240	4	4, 12	2,5 vs. 8,5 (< 0,001)	LVG, Echo	LVESV↓, LVEDV ≈, regionální motilita stěny↑, velikost infarktového ložiska↓
<i>Fernandes-Avilés et al., 2004,⁶⁹</i>	BMNCs	33	37-119	8-19	6	5,8	MRI	LVESV↓, LVEDV ≈, zesílení stěny v místě infarktového ložiska↑
<i>Bartunek et al., 2005,¹⁸⁹</i>	CD 133+	35	12,6	10,2-13	4	4,3 vs. 7,1	SPECT, Echo	LVEDV ≈, perfuze↑
Randomizované studie								
<i>BOOST I, 2004-2006 Woller et al.,¹³¹ Schaefer et al.²⁰⁷</i>	BMNCs	60	9,5	6	6, 18	0,7 vs. 6,7 (6M) 3,1 vs. 5,9 (18, $p=0,27$)	MRI	velikost infarktového ložiska↓
<i>Chen et al., 04,¹⁸⁸</i>	MSC	69		18	6	6 vs. 8 ($p=0,01$)	LVG	LVESV↓, perfuze ↑, regionální motilita

								stěny↑
<i>Janssens et al., 2006,¹⁹⁴</i>	BMNCs	66	2,8	24 hodin	4	2,2 vs. 3,3 (p=0,36)	MRI	Perfuze ↑, viabilita tkáně ↑, velikost infarktového ložiska ↓
<i>ASTAMI, 2006-2007 - Lunde et al.²⁰⁸</i>	BMNCs	97	0,7	4-8	6	6,7 vs. 8 (p=0,07)	MRI, Echo, SPECT	LVESV ≈, LVEDV ≈ velikost infarktového ložiska ≈, perfuze ≈
<i>REPAIR-AMI, 2006-2007 Schachinger et al.,¹²³ Erbs et al.²⁰⁹</i>	BMNCs	204	3,6	3-6	4, 12	3 vs. 5,5 (p=0,006)	LVG, MRI	LVESV ≈, LVEDV ≈ velikost infarktového ložiska ≈
<i>Meluzin et al., 2006-2007,^{171, 181}</i>	BMNCs	66	100(HD), 10 (LD)	6-10	3, 6, 12	3 vs. 6 (3M., p=NS) 0 vs. 7 (6 M.,HD, p=0,018) 0 vs. 7 (12 M.,HD, p=0,027)	Echo, SPECT	LVESV ↓, LVEDV ≈, perfuze ↑

M – měsíc, HD – vysokodávkovaná skupina, LD – nízkodávkovaná skupina, LVG – levografie, MRI – magnetická resonance, LVESV – endsystolický volum, LVEDV – enddiastolický volum, echo – echokardiografie

5.4 Dlouhodobý efekt terapie kmenovými buňkami

V naší práci jsme pozorovali po 24 měsících výraznější zlepšení funkce LK u nemocných v aktivně léčené skupině oproti skupině kontrolní a to i přes minimální efekt v prvních 4 měsících. Srovnání s literaturou je velmi problematické. Dosud byly publikované pouze 2 významnější práce zabývající se sledováním nemocných po implantaci BMNCs po STEMI – studie Balance a BOOST 2. Ve studii BALANCE²²⁰, teprve nedávno publikované jsou popisované obdobné výsledky jako v naší práci. Do této studie bylo zařazeno celkem 62 pacientů po AIM, u kterých se po i.c. aplikaci BMNCs během 12 měsíců výrazně zlepšila jejich globální i regionální funkce LK a efekt byl pozorován i po 5ti letech. Oproti tomu v kontrolní skupině (tvořená nemocnými, kteří implantaci odmítli) se funkce LK zhoršila. Velmi zajímavé je i to, že po téměř 5ti letech od randomizace se mortalita významně snížila právě v aktivně léčené skupině. Tato studie prakticky jako první prokazuje dlouhodobý pozitivní funkční efekt implantace BMNCs. Autoři této práce spekulují, že výše uvedené účinky mohou způsobit snížení výskytu srdečního selhání pomocí prevence remodelace LK. Pozorovali i nižší výskyt arytmií a poukazují na zlepšení variability srdeční frekvence a nižší výskyt pozdních potenciálů. U našich nemocných jsme ale případný efekt v rozdílnosti v tepové frekvenci nezaznamenali ($83 \pm 19/\text{min}$ vs. $78 \pm 10/\text{min}$, $p=0,48$). Na tepovou frekvenci měla vliv u našich nemocných jistě terapie a to především betablokátory v plně

účinné dávce. Tento fakt vzhledem k nedostatečným údajům studie Balance nelze validně korelovat. Druhou studií je BOOST 2, do které bylo zařazeno 60 nemocných. Probíhala také 5 let a navazovala na BOOST 1, ve které sledovali pacienti během 6 a 18 měsíců (viz výše) ¹³¹.
¹³⁴. Zde výsledky byly výrazně méně pozitivní i přes počáteční naději v prvních 6 ti měsících. Již za 18 měsíců od implantace byla funkce komory prakticky vyrovnaná a nález setrval i při 5ti leté kontrole. Nemáme přesvědčivé vysvětlení pro tuto diskrepanci nálezu. Jednou z možných variant je rozdílné hodnocení, rozdílná vstupní funkce komory a časnost reperfuze s celkově nižším rizikem výraznější progresse remodelace ve studii BOOST.

Tbl. 31.: Přehled studií zabývajících se dlouhodobým účinkem KB u pacientů po STEMI

Přehled nejdůležitějších klinických studií - dlouhodobé sledování						
<i>Studie</i>	<i>časopis/rok publikace</i>	<i>počet nemocných</i>	<i>Délka sledování</i>	<i>Hodnocení</i>		<i>P</i>
BOOST-Wollert	EJH 8/09	60	5 let	MRI	nebyl zachycen profit BMNCs aplikace	0,3
BALANCE	JACC 2/09	62	5 let	Levografie, (echokardiografie)	v BMNCs skupině - redukce mortality (p=0,03), - zlepšení LVEF +7,9%	0,01

BMNCs monoklonální kmenové buňky, LVEF - ejekční frakce levé komory, MRI - magnetická resonance

5.5

Studie se zaměřovala současně na hodnocení dlouhodobé poinfarktové remodelace LK. Tento děj výrazně přispívá k rozvoji srdečního selhání. Je prokázáno z literatury, že ne u každého nemocného, který prodělá akutní koronární příhodu, dochází k rozvoji remodelace, existuje zde značná variabilita ²²⁴. Pravděpodobným hlavním faktorem, který se podílí na tomto procesu je velikost infarktového ložiska. Zdá se, že nejvážněji postižení nemocní jsou ti, kteří prodělali velký anteroextenzivní infarkt myokardu s výraznou vstupní alterací funkce LK. Ti by mohli teoreticky také nejvíce z buněčné terapie profitovat. Ve velké randomizované studii REPAIR-AMI ¹²³, do které byli zařazeni pacienti s těžkou poruchou funkce LK, bylo

zaznamenáno signifikantní zlepšení LVEF po aplikaci BMNSc ve srovnání s ostatními studii¹⁷⁹. Zatím se populace pacientů ve většině studií skládala převážně z nemocných s relativně mírným omezením vstupní funkce LK. Dlouhodobý vývoj objemů LK v naší studii je příznivější pro aktivně léčenou skupinu ve srovnání s ostatními studii.

5.5.1 Diastolická funkce levé komory po akutním infarktu myokardu

Akutní infarkt myokardu je charakterizovaný regionální ztrátou myokardu, která může vést k systolické i diastolické dysfunkci a představuje rizikový faktor pro rozvoj remodelace LK²²⁵⁻²²⁷. Patofyziologie a prognóza pacientů se systolickou dysfunkcí po AMI byla předmětem výzkumu již několik desetiletí²²⁸. Poznatky z těchto studií vedly k optimalizaci terapie, která má za následek lepší možnosti terapeutických zásahů^{229, 230}. Hodnocení diastolické funkce se dostává do popředí spíše až v posledních 10-15ti letech²³¹. Poskytuje nám možnost zjištění dalších významných prognostických údajů^{229, 232}. Na vlastním rozvoji diastolické dysfunkce se podílí strukturální změny při ischemii myokardu (regionální abnormality pohybu stěn), mikrovaskulární dysfunkce s následkem ztráty poddajnosti komory (distanzibility) a schopnosti relaxace – tedy aktivní i pasivní složky. Je asociovaná se zhoršením plnění komory a zvýšenými plnicími tlaky v diastole^{233, 234}. Diastolická dysfunkce může přispívat a podílet se na rozvoji srdečního selhání a to i při zachovalé systolické funkci^{235, 236}. Experimentální práce na zvířatech poukazují na to, že by mohly mít podané BMNCs a progenitorové buňky efekt na zlepšení nejenom systolické, ale i diastolické funkce po AIM^{57, 88, 237-240}. Na základě těchto poznatků jsme se snažili v naší práci zhodnotit jak samotnou systolickou funkci (viz výše), tak i funkci diastolickou. Pro její analýzu jsme použili dopplerovskou echokardiografii, která je považovaná za standardní neinvazivní metodu, umožňující relativně přesné stanovení diastolické dysfunkce po AIM²⁴¹. K hodnocení diastolické funkce jsme použili tyto parametry: transmitrální tok (E/A), trvání

deceleračního času vlny E, hodnocení vln S a D v plicních žilách (blíže viz metodika). V posledních letech prostá metodika pulzním dopplerovským hodnocením byla obohacena o mnoho dalších různorodých variant měření, včetně přispění tkáňové dopplerovské echokardiografie, která ale v době naší práce nebyla k dispozici ²³². To jistě představuje jistou limitaci i ve srovnání s jinými pozdějšími publikacemi.

V naší práci jsme prokázali pozitivní vliv buněčné terapie na diastolickou funkci LK. Prokázali jsme její zlepšení za 24 měsíců od randomizace, kdy v aktivně léčené skupině jsme zjistili pouze mírnou alteraci diastolické funkce ve smyslu poruchy relaxace (poměr E/A klesl, prodloužil se DTe). Oproti tomu ve skupině kontrolní došlo ve větší míře k progresi do poruchy středně významné (pseudonormalizace). Tyto výsledky přisuzujeme pozitivnímu efektu léčby BMNCs. V multivariační analýze jsme nenalezli faktor, který by se podílel na změně (skupiny byly prakticky homogenní, nebyl rozdíl v hodnotách arteriálního krevního tlaku, ani ve výskytu diabetu mellitu). Skupina s implantovanými BMNCs byla navíc lehce znevýhodněna vyšším věkovým průměrem, který by se na progresi zhoršení poddajnosti komory mohl podílet ²³¹. Dosud byla publikovaná prakticky jediná studie zabývající se hodnocením diastolické funkce u pacientů po AIM s implantovanými KB a to studie BOOST (n=60, sledování 6 a 18 měsíců) ²⁰⁷. V této práci se hodnotily obdobné parametry jako v naší studii (E/A, DTe) a byly obohaceny ještě o měření isovolumického relaxačního času /IVRT/ a parametry tkáňové dopplerovské echokardiografie (poměr E/Em, Ea/Aa). Z výsledků této studie vyplývá také jistý pozitivní závěr pro skupinu s BMNCs, u kterých došlo prakticky k normalizaci diastolické funkce s pouze lehkým prodloužením IVRT, kdežto u kontrolní skupiny byla zjištěna lehká porucha relaxace. Rozdíl v míře postižení diastolické funkce oproti naší práci může souviset s tím, že naši pacienti měli vyšší věkový průměr a při akutním infarktu myokardu došlo k větší alteraci systolické funkce levé komory s LVEF < 40% (BOOST vstupní LVEF 50%).

Závěrem lze říci, že intrakoronární aplikace autologních BMNCs zlepšuje v dlouhodobém sledování echokardiografické parametry diastolické funkce u pacientů po AMI. Jedná se však o prvotní nálezy a je nutné doplnění dalších větších randomizovaných studií se zahrnutím komplexní vyšetřovací techniky. Optimální by byla popř. další korelace s nálezem pomocí jiných metodik, jako je magnetická rezonance^{119, 242}.

5.5.2 Změna velikosti levé síně a mitrální regurgitace

Levá síň je jistým markerem diastolické dysfunkce^{231, 243}. Při zvýšeném plnicím tlaku LK dochází k přenosu tlaku a tím i zatížení levé síně (stav byl pozorovaný ať již u samostatné diastolické dysfunkce tak i u kombinované systolicko-distolické dysfunkce). V řadě studií byla prokázána souvislost mezi dilatací levé síně (hodnoceno volumetricky) a mortalitou nemocných po akutním AMI^{243, 244}. Z tohoto hlediska jsme se také snažili zhodnotit možnost ovlivnění změn levé síně implantací BMNCs (dosud v žádné publikované práci s BMNCs se k této změně nevyjadřují). V našem souboru byla pozorovaná pouze mírná tendence k progresi dilatace LS v obou skupinách nemocných během dvouletého sledování bez statistické významnosti ($48 \pm 6\text{mm}$ vs. $54 \pm 7\text{mm}$, $p=0,12$). Analýza byla provedena z měření M-modu v PLAX projekci a měření ze 4AC projekce. Bohužel jsme neprovedli měření volumetrické, které v době vzniku naší práce nepařilo ke standardům. Hodnocení je tedy nedostatečné. Korelaci mezi změnou velikosti LS ve výše popsáných rozměrech a diastolickou funkcí jsme nepozorovali. Relativně nevýznamná progresse její dilatace odpovídá i nálezu mírné mitrální regurgitace bez záchyty větší progresse během dvou letého sledování.

5.6 Efekt na kvalitu života

Nepozorovali jsme statisticky signifikantní rozdíl ve zlepšení subjektivně vnímaného stavu dušnosti dle NYHA klasifikace mezi oběma skupinami. Pro objektivizaci subjektivních

obtíží jsme se snažili korelovat tyto výsledky s hodnocením kvality života pomocí dotazníku SF-36 při 24 měsíční kontrole. Ani zde jsme neprokázali statistický rozdíl mezi aktivně léčenou a kontrolní skupinou. Efekt nebyl pozorovaný v žádném ze sledovaných osmi parametrů. To odpovídá i výsledkům jediných dvou prací, které se hodnocením kvality života ve vztahu k implantaci KB zabývaly^{204, 208}. Jediným pozitivním nálezem z těchto hodnocení bylo v rámci subanalýzy zjištění významné korelace mezi subjektivně vnímaným vlastním zdravím pacienta a systolickou funkcí LK ($p < 0,001$). Vysvětlení však není úplně přesvědčivé vzhledem k ostatním negativním korelacím (subj. vnímanou dušností a jiným parametrům dotazníku SF 36). Pravděpodobně zde hraje výraznou roli především limitace malým množstvím zařazených pacientů ve studii. Do úvahy je nutno i to, že dotazník byl rozdán pacientům až na konci sledování a nebylo tedy možné provést korelace se vstupními hodnotami. Pro případnou dostatečnou objektivizaci a kvantifikaci parametrů by byl potřebný větší soubor nemocných s opakovanými kontrolami kvality života během sledování. Stran hodnocení stupně dušnosti je otázkou, zda by nebyl výhodný do dalších prací nejenom klinický korelát, ale i popř. kvantifikace pomocí 6 minutového testu chůze^{245, 246}, který také nebyl v době vzniku naší práce u nás považovaný za běžný standard.

5.7 Limitace studie

Hlavní limitací naší práce je velikost souboru představující pouze 27 nemocných. Pro možnosti hodnocení efektu buněčné terapie případná kvantifikace v závislosti na časovém podání KB by bylo potřeba minimálně dvoj až trojnásobné množství pacientů. Studie nebyla zaslepená a placebem kontrolovaná. Její víceméně experimentální charakter v době zahájení nám však nedovolil podrobit kontrolní skupinu pacientů další invazivní proceduře. Další limitací představuje hodnocení funkce LK pomocí echokardiografie. Toto vyšetření, má určitou interindividuální variabilitu (provedení probíhalo na dvou pracovištích) a je zatíženo jistou chybou. To může představovat u takto malého souboru pacientů a relativně malých

změn LVEF významnou roli. Do budoucna by bylo potřeba korelovat tyto nálezy například s magnetickou rezonancí, která se v posledních letech stává standardem pro přesné hodnocení nálezu na LK a je více objektivní. Tento problém se může také promítat do stanovení velikosti LS. To limituje stanovení jednoho z významných prognostických faktorů u pacientů po STEMI. Samotné hodnocení diastolické funkce jsme prováděli dle zvyklostí v době vzniku naší práce, tedy pulzní dopplerovskou echokardiografií. Ta nám základní údaje může poskytnout, nicméně pro přesnější hodnocení by bylo potřeba obohatit tato stanovení o tkáňovou echokardiografii. Stran hodnocení komplexní remodelace komory by byl v dnešní době také výrazně efektivnější 3 D echokardiografie, MRI a popř. Specl-tracking. Snažili jsme se postihnout za 2 roky od randomizace kvalitu života nemocných pomocí dotazníku SF-36, bohužel hodnocení bylo provedeno pouze na konci studie a nebyla jiná kontrola s dřívějšími nálezy.

6 Závěr

V naší randomizované studii jsme prokázali, že metoda intrakoronární aplikace mononukleárních buněk kostní dřeně u pacientů po prodělaném akutním anteroextenzivním infarktu myokardu s pozdní reperfuzí je v dlouhodobém průběhu bezpečná. Nebyl zaznamenaný vyšší záchyť nežádoucích událostí ve srovnání s kontrolní skupinou. Nepotvrdili jsme sice významnější benefit buněčné léčby během krátkodobého sledování (4 měsíce) na systolickou funkci či velikost objemů levé komory a zmenšení infarktového ložiska oproti standardní reperfuzní terapii. Naproti tomu jsme však prokázali, že v delším časovém horizontu 24 měsíců může aplikace BMNCs vést ke zlepšení jak systolické funkce a ukazatelů remodelace levé komory tak i funkce diastolické.

I přesto, že aktuální údaje o klinické efektivitě buněčné léčby jsou nejednotné a informace o její účinnosti a mechanismech působení rozporuplné, důkazy o možných pozitivních vlivech na funkci a remodelaci LK přibývají. Nejistota ohledně celkového klinického významu implantace kmenových buněk po akutním infarktu myokardu však nadále přetrvává. Vzhledem k řadě dosud nedořešených otázek včetně mechanismů působení, nejednoznačnému průkazu klinické efektivity a také náročnosti pro nemocné a klinická pracoviště, není ještě tato metoda standardně použitelná v klinické praxi. Před rozšířením do běžného klinického užívání bude nutné dořešit řadu základních problémů především dalším výzkumem v experimentální oblasti se zaměřením na biologii reparačních procesů tak, abychom mohli naše terapeutické snahy lépe cílit a potenciál v této nové oblasti klinické medicíny efektivně využít. Nicméně, již dnes je zřejmé, že léčba kmenovými buňkami po infarktu myokardu nabízí do budoucnosti určitou naději pro ty nemocné, které nejsme schopni účinně léčit konvenčními metodami.

7 Literatura

1. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008;29(23):2909-45.
2. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000;101(25):2981-2988.
3. Yamagishi M, Terashima M, Awano K, Kijima M, Nakatani S, Daikoku S, et al. Morphology of vulnerable coronary plaque: insights from follow-up of patients examined by intravascular ultrasound before an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2000;35(1):106-11.
4. Ambrose JA, D'Agate DJ. Plaque rupture and intracoronary thrombus in nonculprit vessels: an eyewitness account. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(5):659-60.
5. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation* 2000;102(10):1193-209.
6. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2000;36(3):970-1062.
7. Ferreira J, Monteiro P, Mimoso J. National Registry of Acute Coronary Syndromes: results of the hospital phase in 2002. *Rev Port Cardiol* 2004;23(10):1251-72.
8. Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Baldi A. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J Cell Physiol* 2002;193(2):145-53.
9. Oral H, Sivasubramanian N, Dyke DB, Mehta RH, Grossman PM, Briesmiester K, et al. Myocardial proinflammatory cytokine expression and left ventricular remodeling in patients with chronic mitral regurgitation. *Circulation* 2003;107(6):831-7.
10. Olivetti G, Cigola E, Maestri R, Corradi D, Lagrasta C, Quaini F. [Does apoptosis participate in heart failure?]. *Cardiologia* 1999;44 Suppl 1(Pt 2):859-61.
11. Cheng W, Kajstura J, Nitahara JA, Li B, Reiss K, Liu Y, et al. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats. *Exp Cell Res* 1996;226(2):316-27.
12. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979;40(6):633-44.
13. Widimsky P. Reperfusion damage or no-reflow damage in primary coronary interventions in acute myocardial infarction? *Eur Heart J* 2002;23(14):1076-8.
14. Wollert KC, Drexler H. Carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) trial: carvedilol as the sun and center of the beta-blocker world? *Circulation* 2002;106(17):2164-6.

15. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nurzynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8692-7.
16. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81(4):1161-72.
17. Widimsky P, Zelizko M, Jansky P, Tousek F, Holm F, Aschermann M. The incidence, treatment strategies and outcomes of acute coronary syndromes in the "reperfusion network" of different hospital types in the Czech Republic: results of the Czech evaluation of acute coronary syndromes in hospitalized patients (CZECH) registry. *Int J Cardiol* 2007;119(2):212-9.
18. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006;367(9507):356-67.
19. Vaughan DE, Pfeffer MA. Post-myocardial infarction ventricular remodeling: animal and human studies. *Cardiovasc Drugs Ther* 1994;8(3):453-60.
20. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985;57(1):84-95.
21. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, et al. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol* 1996;271(3 Pt 2):H1215-28.
22. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, et al. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986;74(4):693-702.
23. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E. Progressive ventricular remodeling in rat with myocardial infarction. *Am J Physiol* 1991;260(5 Pt 2):H1406-14.
24. Anversa P, Olivetti G, Capasso JM. Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1991;68(14):7D-16D.
25. Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res* 1990;67(1):23-34.
26. Hutchins GM, Bulkley BH. Infarct expansion versus extension: two different complications of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1978;41(7):1127-32.
27. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74(1):86-107.
28. Baldi A, Abbate A, Bussani R, Patti G, Melfi R, Angelini A, et al. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34(2):165-74.
29. Sabbah HN. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 2000;45(3):704-12.
30. Antonio Abbate GGLB-ZAB. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *Journal of Cellular Physiology* 2002;193(2):145-153.
31. Erlebacher JA, Weiss JL, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Early dilation of the infarcted segment in acute transmural myocardial infarction: role of infarct expansion in acute left ventricular enlargement. *J Am Coll Cardiol* 1984;4(2):201-8.
32. Pfeffer JM, Fischer TA, Pfeffer MA. Angiotensin-converting enzyme inhibition and ventricular remodeling after myocardial infarction. *Annu Rev Physiol* 1995;57:805-26.
33. Woodiwiss AJ, Tsotetsi OJ, Sprott S, Lancaster EJ, Mela T, Chung ES, et al. Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction. *Circulation* 2001;103(1):155-60.

34. Torella D, Indolfi C, Goldspink DF, Ellison GM. Cardiac stem cell-based myocardial regeneration: towards a translational approach. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem* 2008;6(1):53-9.
35. Rosenthal N. High hopes for the heart. *N Engl J Med* 2001;344(23):1785-7.
36. Anversa P, Leri A, Rota M, Hosoda T, Bearzi C, Urbanek K, et al. Concise review: stem cells, myocardial regeneration, and methodological artifacts. *Stem Cells* 2007;25(3):589-601.
37. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC, Jr., Kormos R, et al. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130(6):1631-8.
38. Lichtman JH, Spertus JA, Reid KJ, Radford MJ, Rumsfeld JS, Allen NB, et al. Acute Noncardiac Conditions and In-Hospital Mortality in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2007;116(17):1925-1930.
39. Widimsky P, Budesinsky T, Vorac D, Groch L, Zelizko M, Aschermann M, et al. Long distance transport for primary angioplasty vs immediate thrombolysis in acute myocardial infarction. Final results of the randomized national multicentre trial--PRAGUE-2. *Eur Heart J* 2003;24(1):94-104.
40. Pfeffer MA. ACE inhibitors in acute myocardial infarction: patient selection and timing. *Circulation* 1998;97(22):2192-4.
41. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, DiCarli MF, Leeser MA, Browne KF, et al. Adenosine as an adjunct to thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: results of a multicenter, randomized, placebo-controlled trial: the Acute Myocardial Infarction STudy of ADenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999;34(6):1711-20.
42. Pfeffer MA. Angiotensin-converting enzyme inhibition in congestive heart failure: benefit and perspective. *Am Heart J* 1993;126(3 Pt 2):789-93.
43. Rouleau JL, de Champlain J, Klein M, Bichet D, Moye L, Packer M, et al. Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 1993;22(2):390-398.
44. Pfeffer MA. Enhancing cardiac protection after myocardial infarction: rationale for newer clinical trials of angiotensin receptor blockers. *Am Heart J* 2000;139(1 Pt 2):S23-8.
45. Silvestre J-S, Heymes C, Oubenaissa A, Robert V, Aupetit-Faisant B, Carayon A, et al. Activation of Cardiac Aldosterone Production in Rat Myocardial Infarction : Effect of Angiotensin II Receptor Blockade and Role in Cardiac Fibrosis. *Circulation* 1999;99(20):2694-2701.
46. Pitt B, Williams G, Remme W, Martinez F, Lopez-Sendon J, Zannad F, et al. The EPHEBUS trial: eplerenone in patients with heart failure due to systolic dysfunction complicating acute myocardial infarction. *Eplerenone Post-AMI Heart Failure Efficacy and Survival Study. Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15(1):79-87.
47. Pitt B, White H, Nicolau J, Martinez F, Gheorghide M, Aschermann M, et al. Eplerenone reduces mortality 30 days after randomization following acute myocardial infarction in patients with left ventricular systolic dysfunction and heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(3):425-31.
48. Meier DJ, Pitt B, Rajagopalan S. Eplerenone: will it have a role in the treatment of acute coronary syndromes? *Curr Cardiol Rep* 2004;6(4):259-63.
49. Pfeffer MA. New treasures from old? EPHEBUS. *Eplerenone Post-AHI Heart Failure Efficacy and Survival Study. Cardiovasc Drugs Ther* 2001;15(1):11-3.

50. Singh BN. CIBIS, MERIT-HF, and COPERNICUS trial outcomes: do they complete the chapter on beta-adrenergic blockers as antiarrhythmic and antifibrillatory drugs? *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2001;6(2):107-10.
51. Deedwania PC, Giles TD, Klibaner M, Ghali JK, Herlitz J, Hildebrandt P, et al. Efficacy, safety and tolerability of metoprolol CR/XL in patients with diabetes and chronic heart failure: experiences from MERIT-HF. *Am Heart J* 2005;149(1):159-67.
52. Tendera M, Ochala A. Overview of the results of recent beta blocker trials. *Curr Opin Cardiol* 2001;16(3):180-5.
53. Remme WJ, Riegger G, Hildebrandt P, Komajda M, Jaarsma W, Bobbio M, et al. The benefits of early combination treatment of carvedilol and an ACE-inhibitor in mild heart failure and left ventricular systolic dysfunction. The carvedilol and ACE-inhibitor remodelling mild heart failure evaluation trial (CARMEN). *Cardiovasc Drugs Ther* 2004;18(1):57-66.
54. Hayashidani S, Tsutsui H, Shiomi T, Suematsu N, Kinugawa S, Ide T, et al. Fluvastatin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitor, attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 2002;105(7):868-73.
55. Pfeffer MA. Statins: a brief summary. *Clin Cardiol* 2001;24(7 Suppl):II-18.
56. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001;103(24):2885-90.
57. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.
58. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(18):10344-9.
59. Kawachi Y, Watanabe A, Uchida T, Yoshizawa K, Kurooka N, Setsu K. Acute arterial thrombosis due to platelet aggregation in a patient receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 1996;94(2):413-6.
60. Kuethe F, Krack A, Fritzenwanger M, Herzau M, Opfermann T, Pachmann K, et al. Treatment with granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. Evidence for a stimulation of neovascularization and improvement of myocardial perfusion. *Pharmazie* 2006;61(11):957-61.
61. Kurdi M, Booz GW. G-CSF-based stem cell therapy for the heart-unresolved issues part A: paracrine actions, mobilization, and delivery. *Congest Heart Fail* 2007;13(4):221-7.
62. Li Y, Fukuda N, Yokoyama S, Kusumi Y, Hagikura K, Kawano T, et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;549(1-3):98-106.
63. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, 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):355-64.
64. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001;103(5):634-7.
65. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, 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(6):1726-32.

66. Yin CQ, Chen JL, Wang YF, Cao F, Cheng R, Pei XT. [Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells intracoronary delivery after acute myocardial infarction in miniature pig]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2005;27(6):696-9.
67. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107(7):1024-32.
68. Tse HF, Yiu KH, Lau CP. Bone marrow stem cell therapy for myocardial angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;5(2):103-12.
69. Aviles FF, San Roman JA, Garcia Frade J, Valdes M, Sanchez A, de la Fuente L, et al. [Intracoronary stem cell transplantation in acute myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol* 2004;57(3):201-8.
70. Madonna R, Willerson JT, Geng YJ. Myocardin a enhances telomerase activities in adipose tissue mesenchymal cells and embryonic stem cells undergoing cardiovascular myogenic differentiation. *Stem Cells* 2008;26(1):202-11.
71. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361(9351):45-6.
72. Urbich C, Rossig L, Dimmeler S. Restoration of cardiac function with progenitor cells. *Novartis Found Symp* 2006;274:214-23; discussion 223-7, 272-6.
73. Yoon YS, Wecker A, Heyd L, Park JS, Tkebuchava T, Kusano K, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005;115(2):326-38.
74. Marzullo P. Nuclear imaging after cell implantation. *Int J Cardiol* 2004;95 Suppl 1:S53-4.
75. Rosenstrauch D, Poglajen G, Zidar N, Gregoric ID. Stem celltherapy for ischemic heart failure. *Tex Heart Inst J* 2005;32(3):339-47.
76. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167(10):989-97.
77. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(5):879-88.
78. Smits JF, Passier RC, Nelissen-Vrancken HJ, Cleutjens JP, Kuizinga MC, Daemen MJ. Does ACE inhibition limit structural changes in the heart following myocardial infarction? *Eur Heart J* 1995;16 Suppl N:46-51.
79. Menasche P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg* 2003;75(6 Suppl):S20-8.
80. Herreros J, Prosper F, Perez A, Gavira JJ, Garcia-Velloso MJ, Barba J, et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003;24(22):2012-20.
81. Siminiak T, Kalawski R, Fiszler D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, 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):531-7.
82. Leobon B, Garcin I, Menasche P, Vilquin JT, Audinat E, Charpak S. Myoblasts transplanted into rat infarcted myocardium are functionally isolated from their host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(13):7808-11.

83. Reinecke H, MacDonald GH, Hauschka SD, Murry CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000;149(3):731-40.
84. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103(5):697-705.
85. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003;126(1):124-32.
86. Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 2005;68(5):1940-3.
87. Perin EC, Silva GV. Stem cell therapy for cardiac diseases. *Curr Opin Hematol* 2004;11(6):399-403.
88. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9(9):1195-201.
89. Yang GX, Liu TW, Zhong GQ, Wu XH, Deng Y. [Effect of mesenchymal stem cells transplantation on heart function after acute myocardial infarction]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2007;19(7):428-30.
90. Gallo P, Condorelli G. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: inducing strategies. *Regen Med* 2006;1(2):183-94.
91. Limbourg FP, Ringes-Lichtenberg S, Schaefer A, Jacoby C, Mehraein Y, Jager MD, et al. Haematopoietic stem cells improve cardiac function after infarction without permanent cardiac engraftment. *Eur J Heart Fail* 2005;7(5):722-9.
92. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10(5):494-501.
93. Iso Y, Spees JL, Serrano C, Bakondi B, Pochampally R, Song YH, et al. Multipotent human stromal cells improve cardiac function after myocardial infarction in mice without long-term engraftment. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354(3):700-6.
94. Karra R, Wu SM. Multipotent stem cells in cardiac regenerative therapy. *Regen Med* 2008;3(2):189-98.
95. Ward MR, Stewart DJ, Kutryk MJ. Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007;70(7):983-98.
96. Balbarini A, Barsotti MC, Di Stefano R, Leone A, Santoni T. Circulating endothelial progenitor cells characterization, function and relationship with cardiovascular risk factors. *Curr Pharm Des* 2007;13(16):1699-713.
97. Assmus B, Walter DH, Lehmann R, Honold J, Martin H, Dimmeler S, et al. Intracoronary infusion of progenitor cells is not associated with aggravated restenosis development or atherosclerotic disease progression in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27(24):2989-95.
98. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005;353(10):999-1007.
99. Wojakowski W, Kucia M, Kazmierski M, Ratajczak MZ, Tendera M. Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism? *Heart* 2008;94(1):27-33.

100. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996;98(1):216-24.
101. Collins SD, Baffour R, Waksman R. Cell therapy in myocardial infarction. *Cardiovascular Revascularization Medicine* 2007;8(1):43-51.
102. Capi O, Gepstein L. Myocardial regeneration strategies using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Control Release* 2006;116(2):211-8.
103. Xu C, Lebkowski J, Gold JD. Growth and differentiation of human embryonic stem cells for cardiac cell replacement therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2006;1(2):173-87.
104. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002;91(6):501-8.
105. Hodgson DM, Behfar A, Zingman LV, Kane GC, Perez-Terzic C, Alekseev AE, et al. Stable benefit of embryonic stem cell therapy in myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(2):H471-9.
106. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008;117(9):1189-200.
107. Ott HC, Matthiesen TS, Brechtken J, Grindle S, Goh SK, Nelson W, et al. The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4 Suppl 1:S27-39.
108. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-7.
109. Scorsin M, Hagege A, Vilquin JT, Fiszman M, Marotte F, Samuel JL, et al. Comparison of the effects of fetal cardiomyocyte and skeletal myoblast transplantation on postinfarction left ventricular function. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;119(6):1169-75.
110. Zhang M, Methot D, Poppa V, Fujio Y, Walsh K, Murry CE. Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33(5):907-21.
111. Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, Oyama T, Nishi J, Wada H, et al. Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2004;279(12):11384-91.
112. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussen V, Mishina Y, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12313-8.
113. Chin BB, Nakamoto Y, Bulte JW, Pittenger MF, Wahl R, Kraitchman DL. ¹¹¹In oxine labelled mesenchymal stem cell SPECT after intravenous administration in myocardial infarction. *Nucl Med Commun* 2003;24(11):1149-54.
114. Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev* 2005;85(4):1373-416.
115. Barile L, Chimenti I, Gaetani R, Forte E, Miraldi F, Frati G, et al. Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4 Suppl 1:S9-S14.
116. Dawn B, Stein AB, Urbanek K, Rota M, Whang B, Rastaldo R, et al. Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(10):3766-71.

117. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, et al. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4(8):929-933.
118. Ott HC, Davis BH, Taylor DA. Cell therapy for heart failure--muscle, bone marrow, blood, and cardiac-derived stem cells. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2005;17(4):348-60.
119. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, 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):430-6.
120. Villa A, Sanchez PL, Fernandez-Aviles F. Ventricular arrhythmias following intracoronary bone marrow stem cell transplantation. *Europace* 2007;9(12):1222-3.
121. Bartunek J, Vanderheyden M, Wijns W, Timmermans F, Vandekerckhove B, Villa A, et al. Bone-marrow-derived cells for cardiac stem cell therapy: safe or still under scrutiny? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4 Suppl 1:S100-5.
122. Bartunek J, Wijns W, Heyndrickx GR, Vanderheyden M. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 Suppl 1:S52-6.
123. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355(12):1210-21.
124. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, 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;104(9):1046-52.
125. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107(11):1395-402.
126. Itescu S, Kocher AA, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Heart Fail Rev* 2003;8(3):253-8.
127. Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* 2006;98(8):1002-13.
128. Li CJ, Gao RL, Yang YJ, Song LF, Ruan YM, Hu FH, et al. [Autologous bone marrow mononuclear cells and peripheral endothelial progenitor cells differentiation in myocardial ischemia reperfusion injury region in swine]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2007;35(4):350-3.
129. Penicka M, Widimsky P, Kobylka P, Kozak T, Lang O. Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation* 2005;112(4):e63-5.
130. Wojakowski W, Tendera M, Zebzda A, Michalowska A, Majka M, Kucia M, et al. Mobilization of CD34(+), CD117(+), CXCR4(+), c-met(+) stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27(3):283-9.
131. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):141-8.
132. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, 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(8):1690-9.
133. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 2005;39(3):150-8.
 134. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, 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;113(10):1287-94.
 135. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428(6983):664-8.
 136. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, Desnos M, Abergel E, Pouzet B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41(7):1078-83.
 137. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, Jerzykowska O, Rzezniczak J, Rozwadowska N, et al. [Autologous transplantation of skeletal myoblasts in the treatment of postinfarction left heart dysfunction: three-month follow-up]. *Kardiol Pol* 2004;60 Suppl 1:I-71-6.
 138. Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, Ngoy S, Teller P, Edge AS, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001;103(14):1920-7.
 139. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, Okubagzi P, Weisz G, Baffour 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):1721-4.
 140. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, 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(11 Suppl 1):II213-8.
 141. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, Rowlings P, Bellamy G, McCrohon J, et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J* 2007;28(24):2998-3005.
 142. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr* 2001;126(34-35):932-8.
 143. Krupicka J, Gregor P, Budesinsky T, Widimsky P, Dvorak J. [Echocardiographic quantification of changes in left ventricular kinetics in patients during hospitalization for a first myocardial infarct and treated with direct angioplasty]. *Vnitr Lek* 2002;48(5):368-72.
 144. Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, et al. ACC/AHA/ASE 2003 guideline update for the clinical application of echocardiography--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *J Am Coll Cardiol* 2003;42(5):954-70.

145. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106(24):3009-17.
146. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Schmidt H, Rehders T, Korber T, 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). *Circulation* 2005;112(20):3097-106.
147. Nyolczas N, Gyongyosi M, Beran G, Dettke M, Graf S, Sochor H, et al. Design and rationale for the Myocardial Stem Cell Administration After Acute Myocardial Infarction (MYSTAR) Study: a multicenter, prospective, randomized, single-blind trial comparing early and late intracoronary or combined (percutaneous intramyocardial and intracoronary) administration of nonselected autologous bone marrow cells to patients after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 2007;153(2):212 e1-7.
148. Tatsumi T, Ashihara E, Yasui T, Matsunaga S, Kido A, Sasada Y, et al. Intracoronary transplantation of non-expanded peripheral blood-derived mononuclear cells promotes improvement of cardiac function in patients with acute myocardial infarction. *Circ J* 2007;71(8):1199-207.
149. Rakowski H, Appleton C, Chan KL, Dumesnil JG, Honos G, Jue J, et al. Canadian consensus recommendations for the measurement and reporting of diastolic dysfunction by echocardiography: from the Investigators of Consensus on Diastolic Dysfunction by Echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 1996;9(5):736-60.
150. Vahanian A, Baumgartner H, Bax J, Butchart E, Dion R, Filippatos G, et al. Guidelines on the management of valvular heart disease: The Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2007;28(2):230-68.
151. Widimsky P, Gregor P, Cervenka V, Visek V. [Significance of 2-dimensional and Doppler echocardiography in the diagnosis of complications in myocardial infarct]. *Vnitr Lek* 1984;30(1):1-12.
152. Campos AM, da Cunha AB. Dobutamine stress echocardiography as a predictor of coronary lesion severity on coronary angiography. *Rev Port Cardiol* 2007;26(5):505-18.
153. Wei K. Assessment of myocardial viability using myocardial contrast echocardiography. *Echocardiography* 2005;22(1):85-94.
154. Iskandrian AS, Heo J, Schelbert HR. Myocardial viability: methods of assessment and clinical relevance. *Am Heart J* 1996;132(6):1226-35.
155. Lapeyre AC, 3rd, Klodas E, Rogers PJ, Sinak LJ, Hammell TC, O'Connor MK, et al. Quantitation of regional ejection fractions using gated tomographic imaging with ^{99m}Tc-sestamibi. *Chest* 2005;127(3):778-86.
156. Jenkinson C. Quality of life measurement: does it have a place in routine clinical assessment? *J Psychosom Res* 1994;38(5):377-81.
157. Fitzpatrick R, Jenkinson C, Peto V, Hyman N, Greenhall R. Desirable properties for instruments assessing quality of life: evidence from the PDQ-39. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62(1):104.
158. Jenkinson C. Death by questionnaire: quality of life measurement could seriously damage your health. *J Health Serv Res Policy* 1999;4(3):129-30.
159. Poloczek M, Kala P, Neugebauer P, Brychta T, Bocek O, Jerabek P, et al. [ST-segment resolution as a simple tool for the assessment of successful primary coronary intervention at a microvascular level]. *Vnitr Lek* 2004;50(10):740-5.

160. Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, Cerisano G, Buonamici P, Santoro GM, et al. Left Ventricular Remodeling After Primary Coronary Angioplasty: Patterns of Left Ventricular Dilation and Long-Term Prognostic Implications. *Circulation* 2002;106(18):2351-2357.
161. Orlic D. Stem cell repair in ischemic heart disease: an experimental model. *Int J Hematol* 2002;76 Suppl 1:144-5.
162. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114(6):763-76.
163. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiaty LC, Allidina Y, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123(6):1132-40.
164. Moelker AD, Baks T, van den Bos EJ, van Geuns RJ, de Feyter PJ, Duncker DJ, et al. Reduction in infarct size, but no functional improvement after bone marrow cell administration in a porcine model of reperfused myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27(24):3057-64.
165. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106(15):1913-8.
166. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73(6):1919-25; discussion 1926.
167. Tse HF, Lau CP. Therapeutic angiogenesis with bone marrow--derived stem cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007;12(2):89-97.
168. Kajstura J, Leri A, Bolli R, Anversa P. Endothelial progenitor cells: neovascularization or more? *J Mol Cell Cardiol* 2006;40(1):1-8.
169. Assmus B, Schachinger V, Zeiher AM. [Regenerative therapy in cardiology: how distant is it from reality?]. *Internist (Berl)* 2006;47(11):1177-82.
170. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008;29(15):1807-18.
171. Meluzin J, Janousek S, Mayer J, Groch L, Hornacek I, Hlinomaz O, et al. Three-, 6-, and 12-month results of autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2007.
172. Galinanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell PR. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant* 2004;13(1):7-13.
173. Hendrikx M, Hensen K, Clijsters C, Jongen H, Koninckx R, Bijnens E, et al. Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation* 2006;114(1 Suppl):I101-7.
174. Ozbaran M, Omay SB, Nalbantgil S, Kultursay H, Kumanlioglu K, Nart D, et al. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004;25(3):342-50; discussion 350-1.
175. Pompilio G, Cannata A, Peccatori F, Bertolini F, Nascimbene A, Capogrossi MC, et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg* 2004;78(5):1808-12.

176. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361(9351):47-9.
177. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;107(18):2294-302.
178. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, et al. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007;115(25):3165-72.
179. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006;27(23):2775-83.
180. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, et al. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol* 2005;46(9):1651-8.
181. Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornacek I, Hlinomaz O, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006;152(5):975 e9-15.
182. Ruan W, Pan CZ, Huang GQ, Li YL, Ge JB, Shu XH. 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 (Engl)* 2005;118(14):1175-81.
183. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, 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):2212-8.
184. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, 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(9411):751-6.
185. Kang HJ, Lee HY, Na SH, Chang SA, Park KW, Kim HK, 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;114(1 Suppl):I145-51.
186. Katriotis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E, Karabinos I, Korovesis S, Perez SA, et al. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005;65(3):321-9.
187. Chen SL, Fang WW, Qian J, Ye F, Liu YH, Shan SJ, et al. Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction. *Chin Med J (Engl)* 2004;117(10):1443-8.
188. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, 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(1):92-5.

189. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, 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(9 Suppl):I178-83.
190. Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, et al. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv* 2007;69(6):773-81.
191. Li ZQ, Zhang M, Jin YZ, Zhang WW, Liu Y, Yuan L, et al. [Safety and efficacy of intracoronary transplantation of G-CSF mobilized autologous peripheral blood stem cells in patients with acute myocardial infarction]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2006;34(2):99-102.
192. Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, 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(8):756-62.
193. Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S, Krum H, Kocher A, Nandurkar H, et al. Intracoronary high-dose CD34+ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up. *Int J Cardiol* 2006;109(1):21-7.
194. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367(9505):113-21.
195. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, Eckard H, Rehders T, Burska D, 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(9 Suppl):I73-80.
196. Zohlhofer D, Ott I, Mehilli J, Schomig K, Michalk F, Ibrahim T, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *Jama* 2006;295(9):1003-10.
197. Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y, Thune JJ, Nilsson JC, Sondergaard L, et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation* 2006;113(16):1983-92.
198. Menasche P. Myoblast-based cell transplantation. *Heart Fail Rev* 2003;8(3):221-7.
199. Gavira JJ, Herreros J, Perez A, Garcia-Velloso MJ, Barba J, Martin-Herrero F, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation in patients with nonacute myocardial infarction: 1-year follow-up. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131(4):799-804.
200. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* 2005;112(12):1748-55.
201. Ge J, Li Y, Qian J, Shi J, Wang Q, Niu Y, et al. Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI). *Heart* 2006;92(12):1764-7.
202. Huang RC, Yao K, Zou YZ, Ge L, Qian JY, Yang J, et al. [Long term follow-up on emergent intracoronary autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for

- acute inferior-wall myocardial infarction]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006;86(16):1107-10.
203. Janssens S, Theunissen K, Boogaerts M, Van de Werf F. Bone marrow cell transfer in acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 Suppl 1:S69-72.
 204. Karpov RS, Popov SV, Markov VA, Suslova TE, Ryabov VV, Poponina YS, et al. Autologous mononuclear bone marrow cells during reparative regeneration after acute myocardial infarction. *Bull Exp Biol Med* 2005;140(5):640-3.
 205. Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. [Stem cells after myocardial infarction]. *Herz* 2006;31(2):127-36; quiz 142-3.
 206. Kang HJ, Kim YS, Koo BK, Park KW, Lee HY, Sohn DW, et al. Effects of Stem Cell Therapy with G-CSF on Coronary Artery after Drug-Eluting Stent Implantation in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Heart* 2007.
 207. Schaefer A, Meyer GP, Fuchs M, Klein G, Kaplan M, Wollert KC, et al. Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial. *Eur Heart J* 2006;27(8):929-35.
 208. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Moum T, Abdelnoor M, et al. Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) randomized controlled trial. *Am Heart J* 2007;154(4):710 e1-8.
 209. Erbs S, Linke A, Schachinger V, Assmus B, Thiele H, Diederich KW, et al. Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation* 2007;116(4):366-74.
 210. Janssens S. Stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Acta Clin Belg* 2007;62(5):342-7.
 211. Strauer BE, Brehm M, Schannwell CM. The therapeutic potential of stem cells in heart disease. *Cell Prolif* 2008;41 Suppl 1:126-45.
 212. Brehm M, Strauer BE. Stem cell therapy in postinfarction chronic coronary heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 Suppl 1:S101-4.
 213. Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, Parcham-Azad K, Keane M, Hamamdzc D, et al. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29(2):251-9.
 214. Mendonca ML, Freitas GR, Silva SA, Manfrim A, Falcao CH, Gonzales C, et al. [Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke]. *Arq Bras Cardiol* 2006;86(1):52-5.
 215. Schachinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, et al. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol* 2006;95(1):13-22.
 216. Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, et al. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* 2006;18(11):552-6.
 217. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute

- myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(18):1761-7.
218. Mansour S, Vanderheyden M, De Bruyne B, Vandekerckhove B, Delrue L, Van Haute I, et al. Intracoronary delivery of hematopoietic bone marrow stem cells and luminal loss of the infarct-related artery in patients with recent myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(8):1727-30.
 219. Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, Fernandez-Aviles F, Galinanes M, Janssens S, et al. The consensus of the task force of the European Society of Cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for repair of the heart. *Eur Heart J* 2006;27(11):1338-40.
 220. Yousef M, Schannwell CM, Kosterling M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(24):2262-9.
 221. Cleland JG, Freemantle N, Coletta AP, Clark AL. Clinical trials update from the American Heart Association: REPAIR-AMI, ASTAMI, JELIS, MEGA, REVIVE-II, SURVIVE, and PROACTIVE. *Eur J Heart Fail* 2006;8(1):105-10.
 222. Sutton MSJ, Pfeffer MA, Moye L, Plappert T, Rouleau JL, Lamas G, et al. Cardiovascular Death and Left Ventricular Remodeling Two Years After Myocardial Infarction : Baseline Predictors and Impact of Long-term Use of Captopril: Information From the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) Trial. *Circulation* 1997;96(10):3294-3299.
 223. Sheiban I, Fragasso G, Rosano GM, Dharmadhikari A, Tzifos V, Pagnotta P, et al. Time course and determinants of left ventricular function recovery after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(2):464-71.
 224. Giannuzzi P, Temporelli PL, Bosimini E, Gentile F, Lucci D, Maggioni AP, et al. Heterogeneity of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico-3 Echo Substudy. *Am Heart J* 2001;141(1):131-8.
 225. Killip T, 3rd, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol* 1967;20(4):457-64.
 226. Pozzoli M, Capomolla S, Sanarico M, Pinna G, Cobelli F, Tavazzi L. Doppler evaluations of left ventricular diastolic filling and pulmonary wedge pressure provide similar prognostic information in patients with systolic dysfunction after myocardial infarction. *Am Heart J* 1995;129(4):716-25.
 227. Garcia-Rubira JC, Garcia-Martinez JT, Hidalgo R, Gomez-Barrado JJ, Rodriguez Revuelta M, Rodriguez Banos J, et al. Doppler transmitral flow pattern is an independent prognostic factor in acute myocardial infarction. *Cardiology* 1997;88(2):203-6.
 228. Jugdutt BI. Identification of patients prone to infarct expansion by the degree of regional shape distortion on an early two-dimensional echocardiogram after myocardial infarction. *Clin Cardiol* 1990;13(1):28-40.
 229. Moller JE, Brendorp B, Ottesen M, Kober L, Egstrup K, Poulsen SH, et al. Congestive heart failure with preserved left ventricular systolic function after acute myocardial infarction: clinical and prognostic implications. *Eur J Heart Fail* 2003;5(6):811-9.
 230. Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, et al. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines

- (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). *J Am Coll Cardiol* 2001;38(7):2101-13.
231. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II: causal mechanisms and treatment. *Circulation* 2002;105(12):1503-8.
 232. Moller JE, Pellikka PA, Hillis GS, Oh JK. Prognostic importance of diastolic function and filling pressure in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2006;114(5):438-44.
 233. Nishimura RA, Abel MD, Hatle LK, Tajik AJ. Assessment of diastolic function of the heart: background and current applications of Doppler echocardiography. Part II. Clinical studies. *Mayo Clin Proc* 1989;64(2):181-204.
 234. Nishimura RA, Housmans PR, Hatle LK, Tajik AJ. Assessment of diastolic function of the heart: background and current applications of Doppler echocardiography. Part I. Physiologic and pathophysiologic features. *Mayo Clin Proc* 1989;64(1):71-81.
 235. Flather MD, Yusuf S, Kober L, Pfeffer M, Hall A, Murray G, et al. Long-term ACE-inhibitor therapy in patients with heart failure or left-ventricular dysfunction: a systematic overview of data from individual patients. ACE-Inhibitor Myocardial Infarction Collaborative Group. *Lancet* 2000;355(9215):1575-81.
 236. Carrabba N, Valenti R, Parodi G, Santoro GM, Antoniucci D. Left ventricular remodeling and heart failure in diabetic patients treated with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110(14):1974-9.
 237. Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004;364(9429):183-92.
 238. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005;96(2):151-63.
 239. Limbourg FP, Drexler H. Bone marrow stem cells for myocardial infarction: effector or mediator? *Circ Res* 2005;96(1):6-8.
 240. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111(2):150-6.
 241. Balgith M, Jugdutt BI. Assessment of diastolic dysfunction after acute myocardial infarction using Doppler echocardiography. *Can J Cardiol* 2002;18(1):69-77.
 242. Nagaya N, Fujii T, Iwase T, Ohgushi H, Itoh T, Uematsu M, et al. Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287(6):H2670-6.
 243. Moller JE, Hillis GS, Oh JK, Seward JB, Reeder GS, Wright RS, et al. Left atrial volume: a powerful predictor of survival after acute myocardial infarction. *Circulation* 2003;107(17):2207-12.
 244. Beinart R, Boyko V, Schwammenthal E, Kuperstein R, Sagie A, Hod H, et al. Long-term prognostic significance of left atrial volume in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(2):327-34.
 245. Johnson MJ, Oxberry SG. The management of dyspnoea in chronic heart failure. *Curr Opin Support Palliat Care*;4(2):63-8.
 246. Johnson MJ, Oxberry SG, Cleland JG, Clark AL. Measurement of breathlessness in clinical trials in patients with chronic heart failure: the need for a standardized approach: a systematic review. *Eur J Heart Fail*;12(2):137-47.

8 Seznam zkratek

- ACD - Arteria coronaria dextra (pravá koronární tepna)*
ACEi - Inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu
AIM – Akutní infarkt myokardu
ALT - Alaninaminotransferáza
ANF – Atrial natriuretic factor (atriální natriuretický faktor)
AST - Aspartátaminotransferáza
ATP - Adenosintrifosfát
BMI - Body mass index
BMNCs – Mononukleární buňky kostní dřene (bone marrow stem cells)
BNP – Brain natriuretic peptide (B- natriuretický peptid)
BSA - Body surface area (velikost tělesného povrchu)
CABG - Coronary artery bypass graft (aorto-koronární bypass)
CD - Cluster disease
CFU-GM - Colony forming unit, granulocyte-macrophage progenitor
CK - Kreatinkináza
CK-MB - Kreatinkináza MB frakce
CM – Cardiomyocyte (kardiomyocyt)
CSCs - Cardiac stem cells (naivní kardiomyocyty)
Dte - Decelerační čas
dTK - Diastolický arteriální krevní tlak
EKG - Elektrokardiografie
EPCs – Endothelial progenitor cells (endoteliální progenitorové kmenové buňky)
ESCs - Embryonic stem cells (embryonální kmenové buňky)
ET - 1 - Endotelin 1
FNKV - Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
FS - Fractional shortening (frakční zkrácení)
G-CSF - Granulocyty colony-stimulating factor (granulocytární stimulující faktor)
HGF - Hepatocyt growth factor (hepatocytární růstový faktor)
i.c. - Intrakoronární
i.v. – Intravenózní
ICT - Intracelulární
IL - Interleukin
IVRT - Isovolumický relaxační čas
IVS - Interventrikulární septum
IVSd - Rozměr interventrikulárního septa v diastole
KB – Kmenové buňky
KD - Kostní dřeň
KES - Komorové extrasystoly
LK- Levá komora
LS - Levá síň
LVEDD (LKd) - Left ventricular enddiastolic diameter (enddiastolický rozměr levé komory)

LVEDV - Left ventricular enddiastolic volum (enddiastolický objem levé kmory)
LVEF (EF) - Left ventricular ejection fraction (ejekční frakce levé komory)
LVESD (LKs) - Left ventricular endsystolic diametr (endsystolický rozměr levé komory)
LVESV - Left ventricular endsystolic volum (endsystolický rozměr levé komory)
MAPCs - Multipotentní progenitorové buňky dospělých jedinců
MBG - Myocardial blush grade
MMP - Matrix metaloproteináza
MRI - Magnetická resonance
MSCs – Mesenchymal stem cells (mesenchymální kmenové buňky)
MVD - Multi vessel disease (nemoc více tepen)
NS - Nesignifikantní (statisticky)
NSVT - Nesetrvalá komorová tachykardie
NYHA - Klasifikace dušnosti - New York Heart (I-IV)
PCI - Perkutánní koronární intervence
PDGF – Platelet-derived growth factor (destičkový růstový faktor)
PK - Pravá komora
PS - Pravá síň
RIA - Ramus interventricularis anterior
RWT – Relative wall thickness (relativní tloušťka stěny levé komory)
s.c. – Subkutánní
SM - Sceletal myoblast (skeletální myoblasty)
STEMI - Akutní infarkt myokardu s ST elevacemi
sTK - Systolický arteriální krevní tlak
SVD - Single vessel disease (nemoc jedné tepny)
SVT - Supraventrikulární tachykardie
TAPSE - Tricuspid annulus plane systolic excursion (amplituda pohybu trikuspidálního anulu)
TF – Tepová frekvence
TGF beta - Tumor growth factor beta
TIMI – The thrombolysis in myocardial infarction, klasifikace rekanalizace (0-3)
TNF alfa - Tumor necrosis factor alfa (Tumor nekrotizující faktor alfa)
TnI - Troponin I
VEGF – Vascular endothelial growth factor (vaskulární endotelový růstový faktor)
VFN - Všobecná fakultní nemocnice
WMSI - Wall motion score index
ZsLK - Rozměr zadní stěny levé komory v diastole
2, 3, 4, 5AC - echokardiografické projekce (2, 3, 4, 5 dutinová apikální projekce)

9 Seznam tabulek

Tbl. 1.: Neurohumorální faktory podílející se na poinfarktové remodelaci levé komory a srdečního selhání.

Tbl. 2.: Rozdělení a typy kmenových buněk.

Tbl. 3.: Vstupní a vylučovací kritéria zařazení do studie (shrnutí).

Tbl. 4.: Schéma klasifikace diastolické funkce levé komory (LK) podle Canadian Consensus on diastolic dysfunction.

Tbl. 5.: Vstupní charakteristika souboru (celkový počet pacientů = 27, kontrolní skupina 10 a BMNCs skupina 17 nemocných).

Tbl. 5.: Vstupní katetrizační vyšetření, základní charakteristika, koronární angioplastika.

Tbl. 6.: Medikace po koronární angioplastice u randomizovaných nemocných (n=27), nebyl zachycen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinou nemocných s implantovanými BMNCs a kontrolní skupinou.

Tbl. 7.: Základní vstupní laboratorní nálezy u sledovaného souboru 27 pacientů

Tbl. 8.: Vývoj hodnot systolického tlaku (sTK), diastolického tlaku (dTK) a tepové frekvence (TF) během 24 měsíčního sledování (vstupní hodnoty, při dimisi ze vstupní hospitalizace a během následných kontrolních vyšetření za 1, 2, 4, 12 a 24 měsíců).

Tbl. 9.: Vývoj EKG změn během 24 měsíčního sledování.

Tbl. 10.: Aplikace kmenových buněk jejich typy a množství intrakoronárně aplikovaných.

Tbl. 11.: Bezpečnost implantace kmenových buněk při krátkodobém sledování (Kardiovaskulární = KVO mortalita, rehospitalizace, reintervence, kompozitní faktor), 4 měsíční sledování.

Tbl. 12.: Počet KES (komorové extrasystolie), běhů NSVT (nesetrvalé komorové tachykardie), SVT (supraventrikulární komorové tachykardie).

Tbl. 13.: Bezpečnost implantace kmenových buněk při dlouhodobém sledování – 24měsíců (KVO mortalita, rehospitalizace, reintervence, kompozitní faktor).

Tbl. 14.: Změna velikosti diastolického a systolického rozměru levé komory v závislosti na podané léčbě a sledovaném období.

Tbl. 15.: Shrnutí změn velikosti LVEDV (enddiastolického objemu) a LVESV (endsystolického objemu) u pacientů s implantovanými BMNCs a kontrolní skupinou během sledování.

Tbl. 16.: Změny funkce levé komory (LK) hodnocené dle Simpsonovy metody, změny během sledovaných období.

Tbl. 17.: Shrnutí změny frakčního zkrácení u nemocných s implantovanými BMNCs vs. kontrolní skupina.

Tbl. 18.: Změna wall motion score indexu \approx regionální kontraktility myokardu – 4 měsíční sledování.

Tbl. 19.: Shrnutí parametrů diastolického plnění LK, sledování jednotlivých parametrů a jejich změn, které určují další průběh změny diastolické funkce.

Tbl. 20.: Změna velikosti levé síně (mm) v aktivně léčené skupině (aplikované BMNCs) vs. kontrolní skupině během 24 měsíčního sledování.

Tbl. 21.: Změna velikosti pravé komory a pravé síně v závislosti na sledovaném období, nebyl zaznamenaný statisticky signifikantní rozdíl ve velikostech jednotlivých oddílů v závislosti na sledovaném období.

Tbl. 22.: Shrnutí změny velikosti infarktového ložiska.

Tbl. 23.: Hodnocení kvality života – srovnání v jednotlivých doménách kvality života mezi aktivně léčenými pacienty a kontrolní skupinou (24 měsíční kontrola), srovnání s kvalitou života běžné populace.

Tbl. 24.: Souhrn prací zabývajících se aplikací kmenových buněk – ukázka variability typu podaných buněk a jejich kombinace ve vztahu k rozdílnosti cesty aplikace.

Tbl. 25.: Přehled studií a rozdílné množství implantovaných kmenových buněk.

Tbl. 26.: Shrnutí upraveno dle práce Martina-Rendona a Katritise^{170, 186}, vliv počtu mononukleárních buněk kostní dřeně na LVEF.

Tbl. 27.: Variabilita doby implantace.

Tbl. 28.: Souhrn nejdůležitějších randomizovaných prací zabývajících se srovnání metod použitých pro verifikaci LVEF.

Tbl. 29.: Souhrn nejdůležitějších klinických prací, zabývajících se intrakoronární aplikací mononukleárních kmenových buněk. Upraveno dle Abdela, Rendona, Katritis^{76, 170, 186}.

Tbl. 30.: Přehled studií zabývajících se dlouhodobým účinkem KB u pacientů po STEMI

10 Seznam grafů

Graf 1.: Prevalence kardiovaskulárních rizikových faktorů v souboru (n=27), čísla znázorňují počet pacientů.

Graf 2.: Maximální hodnota kardiomarkerů za hospitalizace u souboru pacientů (aktivně léčených a kontrolní skupiny, n=27).

Graf 3.: Graf ukazující na pozitivní korelaci mezi vzestupem CK a vstupní ejekční frakcí levé komory (%).

Graf 4.: Změny v zánětlivých parametrech – leukocyty, C- reaktivní protein (CRP) během sledování (vstupní hodnoty, při dimisi z hospitalizace, kontrolní náběry za 1,4 měsíce).

Graf 5.: Porovnání vývoje krevního tlaku – systolického a diastolického, tepové frekvence mezi skupinami v rámci 24 měsíčního sledování.

Graf 6.: EKG nález, kompletní ST resoluce při akutním STEMI (%) po primární PCI

Graf 7.: Korelace mezi dnem implantace a efektivitou hodnocenou pomocí parametru LVEF.

Graf 8.: Pozitivní korelace mezi implantovanými kmenovými buňkami a výslednou LVEF za 24 měsíců, zpřesnění na vazbu především implantovaných CD 34+ buněk.

Graf 9.: Srovnání záchytu extrasystolie (komorové a supraventrikulární) a popř. běhů supraventrikulární tachykardie mezi aktivně léčenou a kontrolní skupinou.

Graf 10.: Vývoj klinické symptomatologie dušnosti (hodnoceno dle NYHA klasifikace) u skupiny s implantovanými BMNCs (%).

Graf 11.: Vývoj klinické symptomatologie dušnosti (hodnoceno dle NYHA klasifikace) v kontrolní skupině u pacientů (%).

Graf 12.: Změna LVEDD u pacientů s implantovanými BMNCs a v kontrolní skupině během sledování.

Graf 13.: Změna LVESD u pacientů s implantovanými BMNCs a v kontrolní skupině během sledování.

Graf 14.: Změna ve velikosti levé komory a šířky stěn během sledovaného 24 měsíčního období u skupiny nemocných s implantovanými BMNCs.

Graf 15.: Změna ve velikosti levé komory a šířky stěn během sledovaného 24 měsíčního období u kontrolní skupiny.

Graf 16.: Hmotnost levé komory – srovnání kontrolní skupin a skupiny s implantovanými BMNCs.

Graf 17.: Korelace mezi vstupními rozměry LVEDD a LVEDV.

Graf 18.: Korelace mezi LVESD a LVESV během 24 měsíčního sledování.

Graf 19.: Hodnocení změny LVEDV ve vztahu ke sledovanému období mezi aktivně léčenou a kontrolní skupinou nemocných.

Graf 20.: Změna velikosti LVESV u skupiny s implantovanými kmenovými buňkami vs. v kontrolní skupině, relativní změna během 24 měsíčního sledování.

Graf 21.: Změna velikosti LVEF (%) během 4 měsíčního sledování u nemocných s implantovanými BMNCs a kontrolní skupiny.

Graf 22.: Hodnocení změny velikosti LVEF (%) u aktivně léčených nemocných s implantovanými kmenovými buňkami a kontrolní skupinou během 24 měsíců sledování.

Graf 23.: Změna velikosti hodnoty frakčního zkrácení během 24 měsíčního sledování (nemocní s implantovanými BMNCs vs. kontrolní skupina).

Graf 24.: Změna velikosti wall motion score indexu (WMSI) \approx regionální kontraktivity během 4 měsíčního sledování.

Graf 25.: Shrnutí změny diastolické funkce.

Graf 26.: Změna jednotlivých parametrů diastolické funkce – vlny E, poměru E/A, decelerační čas (DTe).

Graf 27.: Relativní změna velikosti levé síně za 24 měsíců oproti vstupní hodnotě (%) u nemocných s implantovanými BMNCs a kontrolní skupině.

Graf 28.: Srovnání změny velikosti pravé komory a pravé síně u kontrolní skupiny (baseline, 4 měsíce, 24 měsíce)- PK – pravá komora, PS pravá sín (velikost hodnocena v mm).

Graf 29.: Změna velikosti infarktového ložiska hodnocená dle SPECTu myokardu.

Graf 30.: Sledování změn v jednotlivých parametrech kvality života.

Graf 31.: Pozitivní korelace mezi subjektivně vnímanému vlastnímu zdraví pacienta a LVEF za 24 měsíců.

11 Seznam obrázků

Obr. 1.: EKG nález - akutní anteroextenzivní infarkt myokardu s ST elevacemi.

Obr. 2.: Infarkt myokardu přední stěny při aterosklerotickém postižení koronární tepny (ramus interventricularis anterior \approx RIA), nekróza kardiomyocytů za místem uzávěru tepny.

Obr. 3.: Remodelace struktury levé komory. Dochází ke změně geometrie komory, kdy se zvětšuje její příčný rozměr a současně zmenšuje rozměr podélný.

Obr. 4.: Patofyziologie remodelace LK po akutním infarktu myokardu s rozvojem srdečního selhání (popis viz výše).

Obr. 5.: Degradace kolagenu prostřednictvím působení MMP (serinové proteázy – matrix metaloproteinázy). Děj je ovlivněn mechanickými a růstovými faktory (PDGF, interleukiny, TNF alfa, TGF beta), popis blíže viz text.

Obr. 6.: Typy kmenových buněk – rozdělení dle potence pluripotentní, multipotentní a unipotentní buňky.

Obr. 7.: Hypotéza výběru kmenových buněk vzhledem k jejich diferenciací schopnosti. Upraveno dle Taylora a spol. ^{117, 118} Vysvětlivky: BMNCs – mononukleární buňky kostní dřeně, EPCs – endoteliální progenitorové buňky kostní dřeně.

Obr. 8.: Pravděpodobné mechanismy působení kmenových buněk na zlepšení funkce levé komory (LK).

Obr. 9.: Souhrn metod aplikace kmenových buněk, popis blíže viz text výše.

Obr. 10.: Intrakoronární implantace kmenových buněk do ramus interventrikularis anterior (RIA) metodou “over the wire PCI“ katetrem s balónkem o průměru 3,5mm. Aplikace 5 ml buněčného koncentrátu během 2 minutové okluze tepny.

Obr. 11.: Struktura studie.

Obr. 12.: Odběr kostní dřeně na kardiologickém sále v poloze na břiše ze spina iliaca posterior superior opakovanými vpichy kostní dřeně s následným injikováním do sběrného vaku.

Obr. 13.: Katetr s balónkem - Maveric, Boston Scientific, France.

Obr. 14.: Ukázka echokardiografického jednorozměrného záznamu (M-mode) struktur levé komory (LK) získaného v PLAX projekci (IVSd – interventrikulární septum v diastole, LVEDD – diastolický rozměr levé komory, LVESD – systolický rozměr levé komory, ZsLK – zadní stěna).

Obr. 15.: Echokardiografické hodnocení funkce levé komory dle Simpsonova pravidla (EFLK – ejekční frakce levé komory).

Obr. 16.: Pulzně dopplerovský záznam transmitrálního průtoku získaný ze 4AC projekce (E – vlna časného transmitrálního průtoku, A – vlna pozdního transmitrálního průtoku, DTe – decelerační čas vlny E).

Obr. 17.: Pulsně dopplerovský záznam průtoku přes plicní žíly ze 4AC projekce: hodnocení vlny S a D.

Obr. 18.: Rozměrové hodnocení velikosti levé síně ze 4 AC projekce a z PLAX projekce.

Obr. 19.: Hodnocení TAPSE (tricuspid annulus plane systolic excursion) ze 4 AC projekce.

Obr. 20.: Hodnocení velikosti pravé síně a pravé komory ze 4AC projekce.

Obr. 21.: Barevné mapování mitrální regurgitace ze 4AC projekce (hodnocení délky regurgitačního jetu).

Obr. 22.: Dobutaminová echokardiografie.

Obr. 23.: SPECT myokardu po i.v. podání [^{99m}Tc]-Tetrofosminu (600 MBq) a změny distribuce perfúze v jednotlivých segmentech (barevné rozdíly ukazují na změnu distribuce ve smyslu poruchy perfúze myokardu anterolaterálně).

Obr. 24.: Kvalita života a její hodnocení.

12 Seznam publikací autora

12.1 Publikace s IF in extenso, které jsou ve vztahu k tématu dizertační práce

- **Hana Skalická**, MD, Jan Horak, MD, PhD, Petr Kobyłka, MD†, PhD, Tomas Palecek, MD; Ales Linhart, MD, PhD; Michael Aschermann, MD, PhD, Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: A 24-month follow up study, **přijato do BMJ, IF 0,317**
- Penicka M, Horak J, Kobyłka P, Pytlik R, Kozak T, Belohlavek O, Lang O, **Skalická H**, Simek S, Palecek T, Linhart A, Aschermann M, Widimsky P. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. J Am Coll Cardiol. 2007 Jun 19; 49(24): 2373-4, **IF 9,2**

12.2 Publikace bez IF in extenso, které jsou ve vztahu k tématu dizertační práce

- **Skalická H Jr**, Horák J, Aschermann M, Linhart A, Palecek T, Kobyłka P. [Myocardial infarction, left ventricle remodeling and cellular therapy]. Vnitr Lek. 2009 Jan; 55(1): 37-44.
- **Skalická H jr.**, Horák J, Aschermann M, Linhart A, Kobyłka P. Intrakoronární aplikace kmenových buněk u nemocných s akutním infarktem myokardu, dosavadní klinické zkušenosti a perspektiva. Cor Vasa 2009; 51(7-8): 513-519.

12.3 Publikace s IF in extenso, bez vztahu k tématu dizertační práce

- Hubacek JA, Stanek V, Gebauerová M, Pilipincová A, Dlouhá D, Poledne R, Aschermann M, **Skalická H**, Matousková J, Kruger A, Penicka M, Hrabáková H, Veselka J, Hájek P, Lánská V, Adámková V, Pitha J. A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. Clin Chim Acta. 2010 Aug 5; 411(15-16): 1069-72, **IF 2,535**
- Hubáček JA, Poledne R, Pitha J, Aschermann M, **Skalická H**, Stanek V. Apolipoprotein E Arg136 -> Cys in individuals with premature myocardial infarction. Folia Biol (Praha). 2009; 55(3): 116-8, **IF 0,924**

- Kovarnik T, Mintz GS, Karetova D, Horak J, Bultas J, Skulec R, **Skalicka H**, Aschermann M, Elleder M, Linhart A. Intravascular ultrasound assessment of coronary artery involvement in Fabry disease. *J Inherit Metab Dis.* 2008 Dec; 31(6): 753-60, **IF 2,691**
- Widimsky P, Motovská Z, Simek S, Kala P, Pudil R, Holm F, Petr R, Bílková D, **Skalická H**, Kuchynka P, Poloczek M, Miklík R, Maly M, Aschermann M; PRAGUE-8 Trial Investigators. Clopidogrel pre-treatment in stable angina: for all patients > 6 h before elective coronary angiography or only for angiographically selected patients a few minutes before PCI? A randomized multicentre trial PRAGUE-8. *Eur Heart J.* 2008 Jun; 29(12): 1495-503, **IF 7.924**

12.4 Publikace bez IF in extenso, bez vztahu k tématu dizertační práce

- Skulec R, Cermak O, **Skalicka H**, Kolar J. Variability of aortic blood flow predicts fluid responsiveness in spontaneously breathing healthy volunteers. *Kardiol Pol.* 2009 Mar; 67(3): 265-71.
- **H. Skalická**, P. Jansa, T. Paleček, D. Ambrož, M. Aschermann, A. Linhart, Levostranný pleurální výpotek u nemocného s plicní arteriální hypertenzí – diferenciální diagnostika, *Stud. Pneumol.Phthiseol* 2008; 68: 143-146
- Bani Hani A, **Skalická H**, Karetová D, Šimek S, Havránek Š, Aschermann M, Linhart A Takayasu's arteritis *Cor Vasa* 2008; 50(3): 117-122

12.5 Abstrakta

- H. Skalicka, J. Horak, M. Aschermann, M. Penicka, J. Kobyłka. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: 24 month follow up. *Euroecho* 2009; 491, 61
- H. Skalicka, J. Horak, M. Penicka, P. Kobyłka, R. Pytlik, M. Aschermann, A. Linhart, P. Widimsky. Echocardiography assessments of left ventricular function and remodeling after intracoronary bone marrow mononuclear cell implantation in patients with a large anterior myocardial infarction. *Euroecho* 2009; 480, 60

- H. Skalická, J. Horák, A. Linhart, M. Aschermann, M. Pěnička, P. Kobyłka, T. Paleček. Hodnocení efektivity a bezpečnosti intrakoronární aplikace mononukleárních buněk kostní dřeně u pacientů s anteroextenzivním infarktem myokardu s dysfunkcí levé komory. Výsledky dvouletého sledování, 16. výroční sjezd České kardiologické společnosti, 2008; Brno, 30-31.
- Jan Horák, Martin Pěnička, Michael Aschermann, Aleš Linhart, Hana Skalická, Petr Widimský, Effectivity And Safety Of Intracoronary Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation In Large Anterior Myocardial Infarction – A Randomized Study, ACC, 2007
- R Skulec, J Belohlavek, A Linhart, O Cermak, T Kovarnik, H Skalicka, J Kolar and M Aschermann. Respiratory variability of aortic blood velocity: predictor of preload responsiveness in healthy spontaneously breathing volunteers, Critical Care 2005; 9 Suppl 1: 3117
- Kovárník, Tomáš; Horák, Jan; Skalická, Hana; Dostál, Ondřej; Aschermann, Michael; Linhart, Aleš: Studie HEAVEN (Virtual Histology Evaluation of Atherosclerosis Regression During Atorvastatin and Ezetimibe Administration). První výsledky. 16. výroční sjezd České kardiologické společnosti, 2008; Brno, 30-31.
- S. Simek, P. Kuchynka, J. Horak, V. Danzig , V. Mrazek, J. Vojacek, L. Golan, H. Skalicka, A. Linhart. Why do the patients with myocardial infarction due to the left circumflex artery occlusion not receive reperfusion therapy? European Heart Journal 2007; 28: Abstract Supplement, 827
- S. Simek, P. Widimsky, Z. Motovska, P. Kala, R. Pudil , H. Skalicka, P. Kuchynka, R. Petr , F. Holm, M. Aschermann . Women undergoing coronary angiography have increased risk of bleeding compared to men European Heart Journal 2009; 30: Abstract Supplement, 530

13 Přílohy

Klíčové práce publikované in extenso, tvořící podklad dizertační práce

1. Hana Skalicka, MD, Jan Horak, MD, PhD, Petr Kobylka, MD†, PhD, Tomas Palecek, MD; Ales Linhart, MD, PhD; Michael Aschermann, MD, PhD, Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: A 24- month follow up study
2. Penicka M, Horak J, Kobylka P, Pytlik R, Kozak T, Belohlavek O, Lang O, Skalicka H, Simek S, Palecek T, Linhart A, Aschermann M, Widimsky P. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Jun 19; 49(24): 2373-4
3. Skalická H Jr, Horák J, Aschermann M, Linhart A, Palecek T, Kobylka P.[Myocardial infarction, left ventricle remodeling and cellular therapy]. *Vnitr Lek.* 2009 Jan; 55(1): 37-44.
4. Skalická H jr., Horák J, Aschermann M, Linhart A, Kobylka P. Intrakoronární aplikace kmenových buněk u nemocných s akutním infarktem myokardu, dosavadní klinické zkušenosti a perspektiva. *Cor Vasa* 2009; 51(7–8): 513–519.

Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: A 24- month follow up study

Hana Skalicka, MD, Jan Horak, MD, PhD, Petr Kobylka, MD†, PhD, Tomas Palecek, MD; Ales Linhart, MD, PhD; Michael Aschermann, MD, PhD

2nd Department of Internal Medicine (J.H., H.S., S.S., T.P., A.L., M.A.), General University Hospital in Prague, Czech Republic, † Institute of Hematology and Blood Transfusion, Prague, Czech Republic (P.K.)

Brief title: BMNCs in large acute myocardial infarction- a 24- month follow up study

This study was supported by the research grant IGA 8225-3 and by the Charles University Prague Research Project MSM 0021620817.

ClinicalTrials.gov number, NCT00389545

There are no relationships to disclose or conflicts of interests related to the paper.

Address for correspondence:

Hana Skalická, MD

Cardiocenter, 2nd Department of Internal Medicine – Cardiology,

General University Hospital in Prague, Czech Republic

U nemocnice 2, 128 08, Prague, Czech Republic

Phone / Fax: +420 2 2496 2605

email: skaldah@seznam.cz

Abstract:

Objective and background: Despite the use of reperfusion therapies, outcomes in patients with large myocardial infarction (MI), late reperfusion and left ventricular (LV) dysfunction are poor. We investigated longterm safety and efficacy of intracoronary injections of autologous bone marrow-derived mononuclear cells (BMNCs).

Methods: 27 patients with anterior MI (age 59 ± 12 yrs, mean baseline LV ejection fraction (LVEF) $39 \pm 5\%$), who underwent percutaneous coronary intervention 4-24 hours after the onset of symptoms, were randomly assigned either to intracoronary BMNCs injection (n = 17, BMNCs group, out of which 14 underwent longterm follow-up), or to standard therapy (n = 10, Control group). The LVEF, the LV end-diastolic and end-systolic volumes (LVEDV, LVESV) were assessed by echocardiography at discharge, Month 4 and 24. Myocardial perfusion was assessed using SPECT at baseline and Month 4.

Results: At 24-month, there was no difference in rates of serious clinical events (36% vs.50%, $p=0.54$). At Month 4 LVEF improved to similar extent in both groups (absolute change $+5.8\%$ vs. $+7.6\%$, $p=0.75$), with similar infarct size reductions (-10.9% vs. -12.2% , $p=0.47$). However, at Month 24, LVEF further improved in BMNCs patients ($+12\%$ v.s $+8.5\%$, $p=0.03$). This effect resulted from a more pronounced reduction in LVESV (-2.6 ml vs. -1.8 ml, $p=0.26$) and a smaller increase in LVEDV ($+16.7$ ml vs. $+17.9$ ml, $p=0.27$) suggesting beneficial long-term effects on LV remodeling.

Conclusions: BMNCs injections in patients with MI and LV dysfunction was associated with a significant improvement of global LVEF during longterm follow-up compared to standard therapy.

Key Words: bone marrow-derived mononuclear cells, myocardial infarction, remodeling, left ventricular ejection fraction, stem cells

Introduction:

Currently, up to 30% of patients with ST segment elevation myocardial infarction, usually those presenting later, show ongoing left ventricular (LV) remodeling with poor clinical outcomes, despite primary percutaneous coronary intervention (PCI) ^{1,2}. Cardiac transfer of bone marrow-derived stem and progenitor cells has been investigated as an adjunctive therapy to promote regeneration of the infarcted myocardium ³⁻⁵. Pilot clinical studies suggested that infusion of bone marrow or progenitor cells into the infarct-related coronary artery is feasible and may enhance recovery of the LV contractile function^{6,7}. However, in randomized trials, the effects of BMNCs on LVEF and remodeling were controversial ⁸⁻¹¹, some studies reporting enhanced recovery of LVEF ¹²⁻¹⁴, which was not confirmed in other studies ^{11,14}. Since the LVEF reduction remains the major predictor of a poor outcome even in the era of PCI ¹⁵, enhanced recovery of the LV contractile function resulting from the bone marrow cells implantation might be beneficial especially in patients with large infarctions. Therefore, we designed a randomized study to assess the safety and efficacy of intracoronary injection of autologous BMNCs in patients with large acute anterior myocardial infarctions who presented late and who were successfully treated with primary PCI. The short-term results of our study were not encouraging ¹⁶, showing no additional effects of the cellular therapy on the left ventricular function compared to the standard treatment, and lead to early termination of the study. However, little is known about potential long-term effects of this treatment modality. This report presents results of the 24-month follow up study in our patients.

Methods:

Patients. The study population consisted of 27 consecutive patients (age 59 ± 12 yrs; 81% were males, the mean baseline LVEF was 39 ± 5 %, range 19 – 45 %) with their first ST-segment elevation acute anterior myocardial infarction resulting from occlusion of the proximal left anterior descending coronary artery (LAD) and with TIMI flow grades 0-1 at presentation, who were successfully treated with primary PCI with stent implantation. The patients were eligible for the study provided they had undergone the primary PCI 4 to 24 hours after the onset of symptoms and their echocardiogram performed 24 hours after the PCI procedure confirmed reduced LVEF (LVEF $\leq 50\%$) with at least 3 akinetic segments in the LAD perfusion territory. The following were the exclusion criteria : age ≥ 80 years, severe multivessel coronary artery disease requiring surgery, wall motion abnormalities in non-LAD territory, serious renal or hepatic disease, blood cells disorders, documented cancer or terminal illness. The study protocol was approved by Medical Ethical Committees of all the involved institutions and informed consents were obtained from all patients included in the study. The eligible patients were randomly, at a 2: 1 ratio, assigned either to a group with intracoronary BMNCs injection 4 to 11 days after PCI (BMNCs group) or to a standard medical therapy group (Control group). No bone marrow aspirations or sham injections were performed in the control group.

Protocol. The LV ejection fraction and volumes were assessed on echocardiography at discharge, at Month 4 and Month 24. In order to allow for recovery of the stunned myocardium, echocardiographic examinations performed at discharge served as baseline measurements for comparison with the follow-up echocardiographic examinations. Myocardial perfusion and glucose uptake was assessed by single photon emission computed tomography (SPECT) at patients discharge and at Month 4, using technetium-99m tetrofosmin and F18-fluorodeoxyglucose. Coronary angiography was repeated at Month 4. Cardiac troponin I, creatine kinase (CK) and its isoenzyme (CK-MB), as well as the white bloodcell count and C-reactive protein levels were assessed before and serially after the BMNCs transfer and at Month 4. In addition, Holter monitoring was performed before and after the BMNCs transplantation, at Month 1 and Month 4. The quality of life was assessed at Month 24 using a standard SF-36 questionnaire.

BMNCs isolation and intracoronary injections. In the BMNCs group, aspiration of BMNCs was performed by a staff hematologist 4 to 11 days after the index PCI. Bone marrow (BM) was harvested from the posterior superior iliac crest through multiple aspirations under analgesia sedation. Each BM aspiration was performed using a pre-filled syringe containing 1 ml of an anticoagulant, to which 3 ml of the bone marrow were harvested. The aspirates were transferred into the Bone Marrow Collection Kit with a Pre-Filter and Inline Filters (Baxter R4R2107, USA) and further processed in a closed blood bag system. Erythrocytes were separated through sedimentation with Gelofusine (Braun

Melsungen, Germany) in the closed blood bag system . After the BMNCs isolation, the remaining plasma was removed, producing a BMNCs concentrate. The final BMNCs preparation was immediately transferred to a cath lab for intracoronary injection. The number of CD34⁺ cells was determined by a flow cytometry analysis. Intracoronary transplantation of BMNCs was performed on the day of the harvest, as described above ⁶. In brief, 4 to 6 ml portions of the BMNCs suspension were injected into the LAD through a central lumen of an inflated over-the-wire balloon catheter. Low-pressure balloon inflations were performed within the stented segment for up to 3 minutes or up to the maximum tolerated time, and were followed by 3minute reperfusion. This step was repeated 5 to 7 times, depending on the BMNCs suspension volume.

Echocardiography. All the studies were performed with a commercially available system (Vivid 7, Vingmed-General Electric, Horten, Norway). The LV volumes (end-diastolic and end-systolic) and ejection fractions were assessed on apical 4-chamber and 2-chamber views using the biplane Simpson's method, the dimensions were measured along a standard parasternal long axis ¹⁷. All studies were stored in a digital (raw data) format, as well as on a S-VHS videotape for an off-line analysis. All the measurement data were the mean values of the data obtained for three consecutive beats . Digital baseline and follow-up echocardiographic recording were analyzed by echocardiographers blinded to the patient group assignment.

Assessment of myocardial viability by SPECT. Technetium-99m sestamibi (600 MBq) was injected intravenously to evaluate rest perfusion. After an intravenous injection of glucose and insulin (0.2 g of 40% glucose solution and 0.2 units of short- acting insulin), F18-fluorodeoxyglucose (400 MBq) was injected intravenously to assess a myocardial glucose uptake. Dual-isotope simultaneous image acquisition was performed 60 minutes after the F18-fluorodeoxyglucose injection, using high-energy 511-keV collimators. A symmetrical 15% energy window was preset on each side of the 140-keV photon peak of technetium-99m sestamibi and 511-keV photon peak of F18-fluorodeoxyglucose. The data were acquired over 180° and stored in a 64x64 computer matrix. The images were displayed in polar maps, which were normalized to a maximum activity (set at 100%). To assess myocardial viability, the polar maps were divided into 16 segments ¹⁷. Segments with normal technetium-99m tetrofosmin myocardial perfusion and segments with perfusion defects but preserved or increased F18-fluorodeoxyglucose (perfusion-metabolism mismatch) perfusion were considered viable. Segments with a match (concurrently reduced perfusion and metabolism) were considered unviable.

Statistical analysis. Clinical results were analyzed based on the intention-to-treat principle. The continuous data are presented as the mean ± standard deviation or the median and the interquartile range. The categorical data are presented as counts and percentages. The two-sided paired and unpaired Student's t-test or the Fisher's exact test were used as appropriate. The repeated measures ANOVA model was used to test for responses of the examined parameters (measured at Month 0, 4 and 24). For all the tests, p<0.05 was considered significant. All the statistical analyses were performed with the JMP statistical package.

Results:

Baseline characteristics. A total of 27 patients were randomly assigned to either the BMNCs (n=17) or the control (n=10) group. Table 1 shows the baseline characteristics in the both groups. The median time from the onset of pain to PCI was more than 5 hours. The majority of patients (89%) were in the Killip I and II class at admission. The BMNCs group patients were insignificantly older and had slightly higher prevalence of multivessel coronary artery disease than the controls. Other baseline characteristics including a degree of LV dysfunction were well comparable between the both groups. Similar percentages of patients in the both groups showed the TIMI flow grade 3 after their PCI. The median time from PCI to the bone marrow harvest and intracoronary injection was 9 days (range, 4 to 11). On average, 171 ± 48 ml of bone marrow blood was harvested and processed to a final volume of 27 ± 7 ml. The median number of injected BMNCs was 26.4×10^8 (range, 19.6×10^8 to 33.0×10^8). The viability of BMNCs ranged from 94 to 99 %. The median number of CD34+ cells was 1.3×10^6 (range, 1.1×10^6 to 1.4×10^6). The median total time of ischemia during repeated intracoronary BMNCs injections was 15 min (range, 11 to 18). Two patients, originally assigned to the BMNCs group, didn't receive active treatment because of complications, which occurred before the planned cell transfer. The both patients died during an early follow-up. One patient from the BMNCs group died for non-cardiac reasons 3 months later. Therefore, a total of 14 patients from the BMNCs group were available for the long-term outcome analysis.

Functional outcome. Table 2 shows baseline, Month 4 and Month 24 echocardiographic indices of the LV systolic function, the LV volumes and diameters according to the treatment assignment. LVEF improved to a similar extent in the both groups at Month 4 (the absolute change was +5.8% in the BMNCs group vs. +7.6% in the control group, the relative change was +15% vs. +19%, p=0.75). Similarly, at Month 4, the infarct size was reduced to the same extent (the absolute change was minus 10.9% vs. minus 12.2%, the relative change was minus 26.3% vs. minus 25.7%, p=0.47) in the both groups. However, at Month 24, the left ventricular function continued to improve significantly in the BMNCs patients (the absolute change from the baseline was +12%, the relative change was +31%), while there was no further change in the control group (the absolute change was +8.5%, the relative change was +21%), p=0.03. This effect resulted from a more pronounced decrease in LVESV (the absolute change was -2.6ml vs. -1.8ml, the relative change was -2.65% vs. -1.80%, p=0.26) with a minor change in LVESD (the absolute change was +0.3mm vs. +2.8mm, the relative change was +0.7% vs. +7.5%, p=0.09) and a smaller increase in LVEDV (the absolute change was +16.7ml vs. +17.9ml, the relative change was +10% vs. +10.4%, p=0.16) and no change in LVEDD (the absolute change was +2.8mm vs +2.6mm, the relative change was +5% vs +4.9%, p=0.27) in the BMNCs group, suggesting a possible beneficial long-term effect on LV remodeling.

Safety and clinical outcome (Table 3). The intracoronary BMNCs transfer was successful in all the enrolled patients. During the 24-month follow up, there was no significant difference in rates of serious clinical events between the both groups (6 pts. in the BMNCs group (36%) vs. 5 pts. (50%) in the control group, p=0.54). Two patients developed serious complications before the cell transfer, which ultimately resulted in death. One patient had a ventricular septal rupture prior to the BMNCs harvest and was urgently operated. She died 3 months later because of severe heart failure. The other patient suffered from stent thrombosis with reinfarction before the BMNCs transfer. He underwent a complicated PCI procedure

followed by CABG, and died of sepsis and ARDS 2 weeks later.. Early during the follow up period, 6 weeks after the BMNCs transfer, inoperable biliary carcinoma was diagnosed in 1 patient (asymptomatic at the time of index myocardial infarction) and who died 2 months later. There was no difference in restenosis rates at Month 4 and in rates of late ischemic events, as well as in rates of late revascularization (4 patients in both groups). At Month 24, the mean NYHA class was better in the treated group (1.2 ± 0.42 vs. 1.9 ± 0.83 , $p=0.04$), however, there were no significant differences in QOL SF 36 parameters between the groups.

Discussion. This randomized study evaluated safety and efficacy of intracoronary injections of autologous BMNCs in patients with large acute anterior myocardial infarction and late presentation, who were successfully treated with primary PCI. Despite the prior successful PCI of the infarct-related artery, such patients are at greatest risk of unfavorable post-infarction LV remodeling, which is a major cause of late, infarct-related heart failure events and death¹⁸. The principal outcome of this study is the finding, that, although at Month 4 the intracoronary infusion of BMNCs did not appear to enhance recovery of the LVEF nor to reduce the LV volumes and the infarct size in the treatment group, compared to the control group, the long-term follow up analysis of the LV function demonstrated favorable changes in the BMNCs group, including a more pronounced decrease in LVESV and reduced LV dilatation, which resulted in significant ejection fraction improvements. These findings suggest a possible long-term beneficial effect on the LV remodeling.

Clinical effects of BMNCs in acute myocardial infarction. The possibility of improved myocardium regeneration and improvement of its function after the SCs application has been demonstrated in a number of experimental settings on various animal models^{5, 19-22}. Early, non-randomised clinical studies showed enhanced recovery of the LV contractile function after intracoronary infusion of BMNCs²³⁻²⁶. However, results of randomised studies are more controversial. Whereas some studies showed a minor positive effect on recovery of the LV contractile function^{6,27-29}, other studies failed to confirm these results^{11,30}. Similarly, there were no consistent outcomes to demonstrate infarct size reduction effects^{9,30-32}. In the largest study so far³³, patients assigned to the BMNSc group showed a moderate, but significant gain in the LV ejection fraction, compared to the controls. The results and conclusions of these studies are difficult to interpret, because of heterogeneity of the patient populations and the study designs used. The meta-analysis by Martin-Randon et al.³⁴ can be considered the most comprehensive summary of all important studies with intracoronary BMNCs implantation in AMI patients. Only larger randomized studies with similar study designs were included (13 studies, with a total of 811 patients involved). The median follow up time was 4 months. Two substantial results arise from this analysis: 1. intracoronary application of BMSCs in patients with ST-segment elevation myocardial infarction is safe. The combined clinical indicator including rates of deaths, rates of re-infarctions, hospitalisations due to heart failure and the need for revascularisation were similar between the actively treated groups and the controls and there were no records of higher rates of arrhythmias in patients who were given BMSCs. 2. Administration of BMSCs results in a moderate, but statistically significant LV systolic ejection fraction improvement by 2.99 % ($p = 0.0007$). Furthermore, a significant decrease in the left ventricular end-systolic volume by 4.74ml ($p = 0.003$) was demonstrated at the same time. A minor, insignificant decrease in the end-diastolic volume by 2.47 ml ($p = 0.13$) also occurred. Compared to the control group, reduction in the infarct size by 3.51 % , was

detected on SPECT. This was consistent with a previous meta-analysis of all studies, dealing with stem cells implantations in various cardiac clinical indications¹⁴, as well as with a prior meta-analysis by Lipinski et al.³⁵.

Long-term results of the BMNCs therapy. There are limited data on the long-term effects of the BMNCs therapy.

According to one randomised study³⁶, initial positive effects on the LV function in the actively treated group receded in 18 months. In another study, after two years, the clinical course in terms of rates of hospitalisations for heart failure appeared better in patients who underwent intracoronary cell implantation³³. In a recent publication³⁷, analyzing long-term effects of the BMNCs transfer after MI in 62 patients, global as well as regional LV function was significantly improved at 12 months and a significant improvement was observed even after 5 years, while the LV function deteriorated in a non-randomised control group of 62 patients, who refused the procedure. This was consistent with a marked decrease of the infarct size in the treated patients, compared to the controls. Most interestingly, after almost 5 years of the follow-up, mortality was significantly lower in the treatment group. This is the first evidence that an initial functional effect of the BMNCs transfer could translate into a long-term benefit in hard clinical endpoints. The authors speculate that the above effects could result from decreased occurrence of heart failure through prevention of LV remodeling, as well as from lower incidence of arrhythmias, suggested by improvements in the heart rate variability and lower incidence of late potentials. In our study, the treatment group patients, although slightly disadvantaged by their older age and higher multi-vessel disease incidence rates, showed a tendency towards a lower incidence of the combined clinical endpoint, and a better subjective status according to NYHA classification.

Remodeling after myocardial infarction. Although difficult to quantify, the LV remodeling is a major factor, contributing to the development of infarct-related heart failure and death. It affects a substantial proportion of MI patients³⁸⁻⁴⁰.

However, among the post-MI patients, there is considerable heterogeneity considering responses to the LV remodeling⁴¹. The infarct size seems to be the major determinant for unfavourable late remodeling⁴². Therefore, it appears that the most severely affected patients with large infarctions and severe LV impairment could, theoretically, benefit from cellular therapy the most. Indeed, in the large REPAIR-AMI study, patients with the most severely impaired LV function showed the greatest improvement in LVEF following BMNSc infusion³³. The long-term left ventricular response to injury in patients with large necroses may differ from that in patients with small infarcts, as well as in patients with different MI locations and times to reperfusion. Differences in patient populations could be the reason for disparities in many of the reported study results. So far, in most of the studies the study populations consisted predominantly of patients with relatively mild LV impairments at baseline. Our study comprised a very homogenous group of patients with large first anterior MI, late reperfusion and significant LV impairment with LVEF which was considerably reduced compared to the previously published trials. Contrary to other studies, there were no significant differences in the course of the LV volume and functional changes by Month 4 between the actively treated patient group and the control group, however the long-term course was more favourable in the treated group. Early improvement in the LV function in both groups may reflect spontaneous healing and recovery, which occurs in more than 50% of post-MI patients in the "reperfusion era"⁴³. However, the late functional improvement is suggestive of a long-term favourable effect of the BMNCs implantation on the LV

remodeling, which is known to be a longstanding process⁴⁴. The mechanisms, through which the BMNCs transfer could enhance LV recovery and prevent or even reverse its remodeling, are poorly understood. Primary myocardial regeneration of new contractile tissue does not seem to be a likely mechanism, considering the small amount of cells [1-5%] retained within the myocardium for 24-48 hours after their implantation⁴⁵. Although it has been advocated that adult peripheral CD34+ cells can transdifferentiate into cardiomyocytes, endothelial and smooth muscle cells *in vivo*⁴⁶, this potential was not confirmed by other studies^{47,48}. Other mechanisms, possibly mediated by paracrine action of the implanted BMNCs, were proposed⁴⁹. These could include increased angiogenesis leading to improved blood supply to the ischemic region⁵⁰ or inhibition of cardiomyocyte apoptosis in the infarction border zone⁵. Our data suggest that the effects of BMNCs implantation on LV remodeling could extend far beyond the immediate post- infarction period, possibly through improved healing and scar formation, as well as through effects on contractile and vascular elements alone.

Study limitations

The present study has several limitations. Because no functional effects were demonstrated at Month 4 and because some early fatal cardiac complications were recorded in the actively treated patients, the study had been stopped early by the steering committee before the target number of patients was reached. Therefore, the number of patients in our study is too small to be able to draw definitive conclusions on the BMNCs therapy long-term effects .

Although no casual relationship between the early complications in the actively treated patients and the BMNCs harvest was demonstrated, inherent risks of this procedure in hemodynamically fragile, post-MI patients can not be completely ruled out.

The control group patients were not administered sham BMNCs infusions and sole effects of intermittent infarct-related artery occlusions on LV remodeling can not be completely excluded. Finally, neither patients, nor their physicians were blinded to the treatment modality, therefore the clinical status assessments with respect to cell implantation were unreliable.

Conclusion:

In our randomized study, we did not observe any additional benefits of the BMNCs intracoronary infusion compared to the current reperfusion strategy in patients with large acute anterior myocardial infarction and late presentation, during the short- term follow up period. However, the long-term follow-up study of the BMNCs transplantation was associated with significant improvements in global LVEF. Although there were no differences in the early LV volume and function changes between the treatment group and the spontaneous healing control group, the long- term follow up outcomes suggest possible long-term protective effects against unfavorable LV remodeling. Although current data on the method's clinical efficacy are ambiguous and information on its mechanisms of action are controversial, the evidence of potential short- term and long- term positive effects on LV remodeling and repair is growing. The persisting uncertainty concerning clinical relevance of the stem cells

implantation after MIs can only be resolved by large randomised clinical trials with hard clinical endpoints, which are currently conducted. Further progress in our understanding of the basic mechanisms of action, as well as further refinements in the cell selection and modes of application are clearly needed to enhance efficacy of the reparation process following cellular therapy, before the method can be recommended for widespread clinical use.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the research grant IGA 8225-3 and by the Charles University in Prague Research Project MSM 0021620817 awarded by the Czech Ministry of Education, Youth and Physical Education.

Conflict of Interest Disclosures

There are no conflicts of interests or relationships to disclose.

Table 1. Baseline characteristics.

	BMNCs group (n=17)	Control group (n=10)	<i>p value</i>
Male sex, n (%)	12 (71)	10 (100)	NS
Age, years	61 ± 14	54 ± 10	NS
Hyperlipidemia, n (%)	5 (30%)	6 (60%)	NS
Smokers, n (%)	11 (66)	9 (90%)	NS
Diabetes mellitus, n (%)	5 (29)	2 (20)	NS
Hypertension, n (%)	7 (42%)	6 (60%)	NS
Systolic arterial blood pressure, baseline (mmHg)	129±33	142±21	NS
Diastolic arterial blood pressure, baseline (mmHg)	77±18	82±21	NS
Heart rate, baseline (bpm)	83±19	78±10	NS
Extent of CAD			
SVD, n (%)	7 (41)	6 (60)	NS
MVD, n (%)	10 (59)	4 (40)	NS
Time from the onset of pain to PCI, (min)	315 (range 300 - 660)	330 (range 300 – 630)	NS
Maximum creatine kinase (ukat/l)	59.5 ±12	35 ±17	NS
Maximum troponin (ug/l)	152 ± 22	147 ±20	NS
Killip class			
I/II, n (%)	15 (88)	9 (90)	NS
III/IV, n (%)	2 (12)	1 (10)	NS
TIMI flow after PCI			
Grade 2, n (%)	4 (23)	2 (20)	NS
Grade 3, n (%)	13 (77)	8 (80)	NS
Catecholamines, n (%)	2 (12)	1(10)	NS
Left ventricular ejection fraction, %	39 ± 7	39 ± 4	NS
Medication after PCI			
Aspirin, n (%)	17 (100)	10 (100)	NS
Clopidogrel, n (%)	17 (100)	10 (100)	NS
ACE inhibitors/ AT1 blockers, n (%)	13 (76)	8 (80)	NS
β-blockers, n (%)	14 (76)	10 (100)	NS
Statins, n (%)	15 (88)	10 (100)	NS

Abbreviations BMNCs = bone marrow-derived mononuclear cells, CAD = coronary artery disease, MVD = multivessel disease, PCI = percutaneous coronary intervention, SVD = single vessel disease, ACE inhibitors – angiotenzin converting enzyme inhibitors

Table 2. Left ventricular global and regional systolic function, LV volumes, dimension and infarct size at baseline, Month 4 and Month 24 .

		BMNCs group			Control group			p value
		(n=14)			(n=10)			BMNCs vs Control group
		<i>The mean value</i>	<i>Absolute change from baseline</i>	<i>Relative change from baseline (%)</i>	<i>The mean value</i>	<i>Absolute change from baseline</i>	<i>Relative change from baseline (%)</i>	<i>Relative change</i>
LVEDV (ml)	baseline	163.3 ± 10.3			162.3 ± 39.3			0.71
	<i>Month 4</i>	172.3 ± 40.5	+9 ml	+5.70%	174.3 ± 59.2	+12 ml	+7.40%	0.33
	<i>Month 24</i>	180 ± 50.6	+16.7ml	+10%	180.2 ± 35.6	+17.9 ml	+11%	0.16
LVESV (ml)	baseline	98 ± 38.1			98 ± 38.9			0.79
	<i>Month 4</i>	95 ± 28.2	-3 ml	-3.10%	96 ± 41.4	-2 ml	-2%	0.85
	<i>Month 24</i>	95.4 ± 39.8	-2.6 ml	-2.65%	96.2 ± 38.5	-1.8 ml	-1.80%	0.26
LVEDD (mm)	baseline	53.9 ± 7.2			53.1 ± 4.3			0.91
	<i>Month 4</i>	59.7 ± 6.1	+5.8 mm	+10.70%	56.1 ± 6.1	+3 mm	+5.60%	0.23
	<i>Month 24</i>	56.7 ± 5.1	+2.8 mm	+5%	55.7 ± 6.6	+2.6 mm	+4.90%	0.27
LVESD (mm)	baseline	40.8 ± 7.7			37.1 ± 8.7			0.21
	<i>Month 4</i>	42.4 ± 6.2	+1.6 mm	+3.90%	40.4 ± 5.1	+3.3 mm	+8.90%	0.72
	<i>Month 24</i>	41.1 ± 4.7	+0.3 mm	+0.70%	39.9 ± 7.5	+2.8 mm	+7.50%	0.09
LVEF (%)	baseline	39.2 ± 9.2			39.4 ± 5.6			0.73
	<i>Month 4</i>	45 ± 10.9	+5.8 %	+15%	47 ± 9.8	+7.6 %	+19%	0.75
	<i>Month 24</i>	51.2 ± 6.7	+12 %	+31%	47.9 ± 14	+8.5 %	+21%	0.03
Infarct size SPECT. %	baseline	41.4 ± 18.3			47.5 ± 20.8		-25.7%	0.68
	<i>Month 4</i>	30.5 ± 16.1	-10.9%	-26.3%	35.3 ± 17.2	-12.2%	+7.40%	0.47

Abbreviations: LVEDV = left ventricular end-diastolic volume, LVESV = left ventricular end-systolic volume, LVEDD = left ventricular end-diastolic diameter, LVESD = left ventricular end-systolic diameter, LVEF = left ventricular ejection fraction, BMNCs - bone marrow-derived mononuclear cells, SPECT - Single photon emission computed tomography

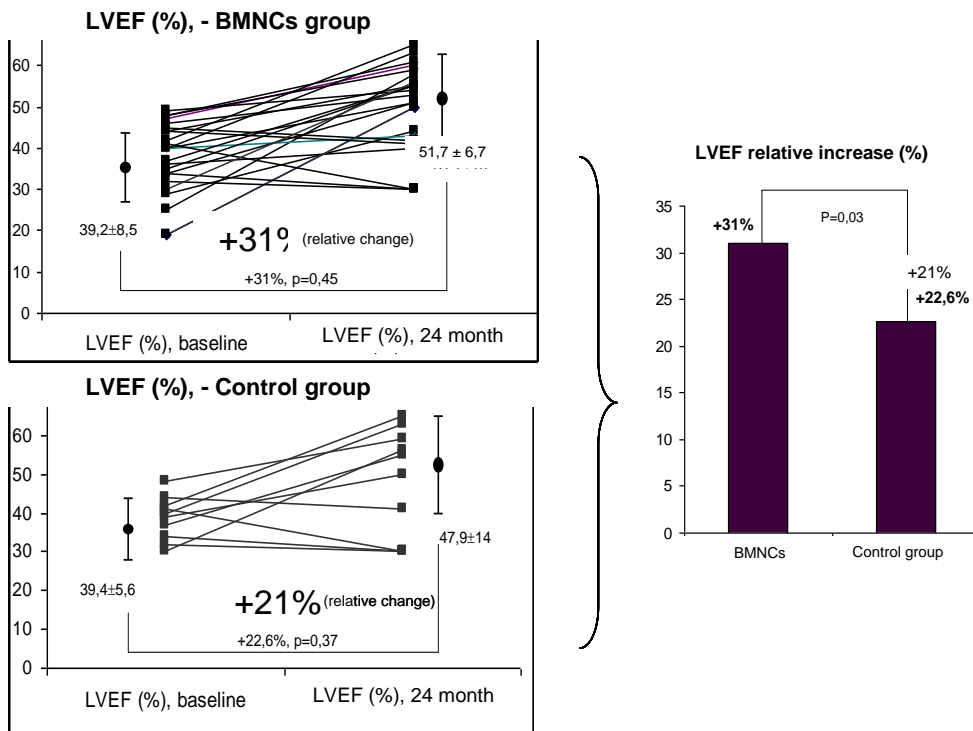
Table 3. Safety and clinical outcome

	BMNCs group (n=17)	Control group (n=10)
Cardiovascular mortality, n (%)	2 (12)	0
Mortality - non cardiovascular, n (%)	1 (6)	0
Recurrent myocardial infarction, n (%)	1 (6)	1 (10)
Heart failure hospitalization, n (%)	2 (12)	4 (40)
Composite of death, myocardial infarction and heart failure hospitalization, n (%)	6 (36)	5 (50)
Restenosis, n (%)	2 (12)	4 (40)
Revascularization, n (%)	4 (24)	4 (40)
PCI, n (%)	2 (12)	2 (20)
CABG, n (%)	2 (12)	2 (20)
Documented ventricular tachycardia or syncope, n (%)	0	0
NYHA I, II, n (%)	14 (100)	7 (70)
Mean NYHA class	1.2 ± 0.42	1.9 ± 0.83

Abbreviations CABG = coronary artery bypass graft, PCI = percutaneous coronary intervention

NYHA – New York Heart Association classification

Figure 1. Increase in the left ventricular ejection fraction in the BMNCs and the control group, a 24- month follow up study



Abbreviations LVEF = left ventricular ejection fraction, BMNCs = bone marrow-derived mononuclear cells

References

1. Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, Cerisano G, Buonamici P, Santoro GM, Antoniucci D. Left Ventricular Remodeling After Primary Coronary Angioplasty: Patterns of Left Ventricular Dilation and Long-Term Prognostic Implications. *Circulation* 2002;106:2351-2357.
2. Pfeffer MA, McMurray JJ, Velazquez EJ, Rouleau JL, Kober L, Maggioni AP, Solomon SD, Swedberg K, Van de Werf F, White H, Leimberger JD, Henis M, Edwards S, Zelenkofske S, Sellers MA, Califf RM. Valsartan, captopril, or both in myocardial infarction complicated by heart failure, left ventricular dysfunction, or both. *N Engl J Med* 2003;349:1893-906.
3. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
4. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, Silver M, Ma H, Kearney M, Isner JM, Asahara T. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001;103:634-7.
5. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7:430-6.
6. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913-8.
7. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-17.
8. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
9. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-21.
10. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210-21.
11. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 2005;39:150-8.
12. Ge J, Li Y, Qian J, Shi J, Wang Q, Niu Y, Fan B, Liu X, Zhang S, Sun A, Zou Y. Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI). *Heart* 2006;92:1764-7.
13. Caplice NM. The future of cell therapy for acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 Suppl 1:S129-32.

14. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, Zuba-Surma EK, Al-Mallah M, Dawn B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167:989-97.
15. Halkin A, Singh M, Nikolsky E, Grines CL, Tchong JE, Garcia E, Cox DA, Turco M, Stuckey TD, Na Y, Lansky AJ, Gersh BJ, O'Neill WW, Mehran R, Stone GW. Prediction of mortality after primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: the CADILLAC risk score. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1397-405.
16. Penicka M, Horak J, Kobylka P, Pytlik R, Kozak T, Belohlavek O, Lang O, Skalicka H, Simek S, Palecek T, Linhart A, Aschermann M, Widimsky P. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2373-4.
17. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, Gutgesell H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989;2:358-67.
18. Araszkievicz A, Lesiak M, Grajek S, Prech M, Cieslinski A. Relationship between tissue reperfusion and postinfarction left ventricular remodelling in patients with anterior wall myocardial infarction treated with primary coronary angioplasty. *Kardiol Pol* 2006;64:383-8; discussion 389-90.
19. Orlic D. Stem cell repair in ischemic heart disease: an experimental model. *Int J Hematol* 2002;76 Suppl 1:144-5.
20. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-76.
21. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiati LC, Allidina Y, Liu P, Li RK. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123:1132-40.
22. Moelker AD, Baks T, van den Bos EJ, van Geuns RJ, de Feyter PJ, Duncker DJ, van der Giessen WJ. Reduction in infarct size, but no functional improvement after bone marrow cell administration in a porcine model of reperfused myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:3057-64.
23. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, Fleming I, Busse R, Zeiher AM, Dimmeler S. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107:1024-32.
24. Tse HF, Yiu KH, Lau CP. Bone marrow stem cell therapy for myocardial angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;5:103-12.
25. Aviles FF, San Roman JA, Garcia Frade J, Valdes M, Sanchez A, de la Fuente L, Penarrubia MJ, Fernandez ME, Tejedor P, Duran JM, Hernandez C, Sanz R, Garcia Sancho J. [Intracoronary stem cell transplantation in acute myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol* 2004;57:201-8.
26. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45-6.
27. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, Kim YJ, Soo Lee D, Sohn DW, Han KS, Oh BH, Lee MM, Park YB. 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;363:751-6.

- 28.** Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornacek I, Hlinomaz O, Kala P, Panovsky R, Prasek J, Kaminek M, Stanicek J, Klabusay M, Koristek Z, Navratil M, Dusek L, Vinklarkova J. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006;152:975 e9-15.
- 29.** Janssens S, Theunissen K, Boogaerts M, Van de Werf F. Bone marrow cell transfer in acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 Suppl 1:S69-72.
- 30.** Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tio RA, van der Giessen WJ, Marques KM, Doevendans PA, Waltenberger J, Ten Berg JM, Aengevaeren WR, Biemond BJ, Tijssen JG, van Rossum AC, Piek JJ, Zijlstra F. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction treated with primary PCI: Pilot study of the multicenter HEBE trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008;71:273-81.
- 31.** Charwat S, Gyongyosi M, Lang I, Graf S, Beran G, Hemetsberger R, Nyolczas N, Sochor H, Glogar D. Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art. *Exp Hematol* 2008;36:672-80.
- 32.** Janssens S. Stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Acta Clin Belg* 2007;62:342-7.
- 33.** Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Werner N, Haase J, Neuzner J, Germing A, Mark B, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006;27:2775-83.
- 34.** Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008;29:1807-18.
- 35.** Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, Vanderheyden M, Kim HS, Kang HJ, Strauer BE, Vetrovec GW. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:1761-7.
- 36.** Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. 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;113:1287-94.
- 37.** Yousef M, Schannwell CM, Kostering M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2262-9.
- 38.** Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161-72.
- 39.** Sutton MSJ, Pfeffer MA, Moye L, Plappert T, Rouleau JL, Lamas G, Rouleau J, Parker JO, Arnold MO, Sussex B, Braunwald E. Cardiovascular Death and Left Ventricular Remodeling Two Years After Myocardial Infarction : Baseline Predictors and Impact of Long-term Use of Captopril: Information From the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) Trial. *Circulation* 1997;96:3294-3299.
- 40.** Sheiban I, Fragasso G, Rosano GM, Dharmadhikari A, Tzifos V, Pagnotta P, Chierchia SL, Trevisani G. Time course and determinants of left ventricular function recovery after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38:464-71.

41. Giannuzzi P, Temporelli PL, Bosimini E, Gentile F, Lucci D, Maggioni AP, Tavazzi L, Badano L, Stoian I, Piazza R, Heyman I, Levantesi G, Cervesato E, Geraci E, Nicolosi GL. Heterogeneity of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico-3 Echo Substudy. *Am Heart J* 2001;141:131-8.
42. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000;101:2981-2988.
43. Solomon SD, Glynn RJ, Greaves S, Ajani U, Rouleau JL, Menapace F, Arnold JM, Hennekens C, Pfeffer MA. Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: the healing and early afterload reducing therapy study. *Ann Intern Med* 2001;134:451-8.
44. Hole T, Vegsundvag JA, Morstol TH, Skaerpe T. Early changes in left ventricular volume and function are predictors for long-term remodeling in patients with acute transmural myocardial infarction and preserved systolic function. *J Am Soc Echocardiogr* 2003;16:630-7.
45. Penicka M, Widimsky P, Kobylka P, Kozak T, Lang O. Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter coronary transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation* 2005;112:e63-5.
46. Yeh ET, Zhang S, Wu HD, Korbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 2003;108:2070-3.
47. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668-73.
48. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JI, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664-8.
49. Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T, Brinkmann E, Fischer P, Meyer GP, Ganser A, Drexler H, Wollert KC. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29:2851-8.
50. Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S, Krum H, Kocher A, Nandurkar H, Bergmann S, Daniell M, O'Day J, Skerrett D, Haylock D, Gilbert RE, Itescu S. Intra-coronary high-dose CD34+ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up. *Int J Cardiol* 2006;109:21-7.

Bratislava Medical Journal

Editor-in-Chief

Hulin I, Bratislava, Slovakia

Vice Editors

Bartunek J, Aalst, Belgium
Bernadic M, Bratislava, Slovakia
Buckingham TA, St. Louis, USA
Durackova Z, Bratislava, Slovakia
Galbavy S, Bratislava, Slovakia
Hatala R, Bratislava, Slovakia
Kral A, Hannover, Germany
Labas P, Bratislava, Slovakia
Mirossay L, Kosice, Slovakia
Mladosevicova B, Bratislava, Slovakia
Murin J, Bratislava, Slovakia
Nosalova G, Martin, Slovakia
Novak M, Bratislava, Slovakia
Simko F, Bratislava, Slovakia
Stanko P, Bratislava, Slovakia
Steno J, Bratislava, Slovakia
Ujhazy P, Boston, USA

Assistant Editor

Bernadicova H, Bratislava, Slovakia

Editorial Board

Ablin RJ, Park Ridge, USA
Bauer V, Bratislava, Slovakia
Blahos J, Prague, Czech Republic
Breza J, Bratislava, Slovakia
Bruhat MA, Clermont, France
Cattaneo A, Trieste, Italy
Chaitman BR, St. Louis, USA
Duris I, Bratislava, Slovakia
Ferencik M, Bratislava, Slovakia
Galvanek EG, Boston, USA
Goehler LE, Charlottesville, USA
Hiraoka M, Tokyo, Japan
Iqbal K, New York, USA
Klimes I, Bratislava, Slovakia
Kodama I, Nagoya, Japan
Kovacs L, Szeged, Hungary
Kutalek SP, Philadelphia, USA
Lauterbur PC, Urbana, USA
Macfarlane PW, Glasgow, UK
Mraz P, Bratislava, Slovakia
Musso E, Parma, Italy
Nadeau R, Montreal, Canada
Slezak J, Bratislava, Slovakia
Schubert E, Berlin, Germany
Schulz JI, Montreal Canada
Steinbach K, Vienna, Austria
Titomir LI, Moscow, Russia
Toyama J, Nagoya, Japan
Traubner P, Bratislava, Slovakia

Bratislavské Lekárske Listy

<http://www.bmj.sk>

bjl@fmed.uniba.sk ivan.hulin@fmed.uniba.sk

Phone Fax 004212/52965400

P.T.

MUDr. Hana Skalická

V Bratislave 17.9.2010

Vážená pani kolegyňa!

Dovoľujem si Vám oznámiť, že po preštudovaní Vášho rukopisu **No. 234/2010**

Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: A 24- month follow up study

(Hana Skalicka, Jan Horak, Petr Kobylka, Tomas Palecek, Ales Linhart, Michael Aschermann)

a po zhodnotení jeho významu je zaradený medzi akceptované rukopisy a bude uverejnený v našom časopise.

S pozdravom

Ivan Hulin

(šéfredaktor)

Intracoronary Injection of Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in Patients With Large Anterior Acute Myocardial Infarction: A Prematurely Terminated Randomized Study

Martin Penicka, Jan Horak, Petr Kobylka, Robert Pytlik, Tomas Kozak, Otakar Belohlavek, Otto Lang, Hana Skalicka, Stanislav Simek, Tomas Palecek, Ales Linhart, Michael Aschermann, and Petr Widimsky

J. Am. Coll. Cardiol. 2007;49:2373-2374; originally published online Jun 1, 2007;
doi:10.1016/j.jacc.2007.04.009

This information is current as of September 18, 2010

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://content.onlinejacc.org/cgi/content/full/49/24/2373>

JACC

JOURNAL *of the* AMERICAN COLLEGE *of* CARDIOLOGY



CORRESPONDENCE

Research
Correspondence

Intracoronary Injection of Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in Patients With Large Anterior Acute Myocardial Infarction A Prematurely Terminated Randomized Study

To the Editor: One-third of patients with ST-segment elevation myocardial infarction, usually those presenting late, show ongoing left ventricular (LV) remodeling and poor clinical outcome despite primary percutaneous coronary intervention (PCI) (1). Cardiac transfer of bone marrow-derived stem cells has been investigated as an adjunctive therapy to promote the repair of infarcted myocardium (2–5). Therefore, we designed a randomized study to test the safety and efficacy of intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells (BMNCs) in patients with large acute anterior myocardial infarction and late presentation who were treated with successful primary PCI.

The study population consisted of 27 consecutive patients (age 59 ± 12 years; 81% males) with the first ST-segment elevation acute anterior myocardial infarction due to occlusion of the proximal left anterior descending artery (LAD) who had undergone successful primary stented PCI. Patients were eligible if they had primary PCI from 4 to 24 h after symptoms onset and showed a reduced LV ejection fraction $\leq 50\%$ with at least 3 akinetic segments in the LAD territory. The study protocol was approved by the Medical Ethical Committees from all involved institutions, and informed consent was obtained from all patients.

Eligible patients were randomly assigned in a 2:1 ratio either to intracoronary BMNCs injection ($n = 17$) or standard medical therapy ($n = 10$). In the BMNCs group, aspiration of BMNCs was performed 4 to 11 days after PCI. After isolation, mononuclear BMNCs concentrate was infused in the LAD using a stop-flow technique through an over-the-wire balloon catheter (2). At baseline and 4-month follow-up, LV ejection fraction and volumes were assessed by echocardiography with the biplane Simpson methods, infarct size with single-photon emission computed tomography combining perfusion by technetium-99m sestamibi and glucose uptake by F-18-fluorodeoxyglucose. Coronary angiography was repeated at 4 months. All statistical analyses were conducted according to the intention-to-treat principle. Two-sided paired and unpaired Student *t* test or Fisher exact test was used as appropriate. For all tests, $p < 0.05$ was considered significant.

Baseline characteristics, including infarct size (maximum creatine kinase $2,995 \pm 1,975$ U/l vs. $2,751 \pm 789$ U/l, $p = \text{ns}$), degree of LV dysfunction (ejection fraction $38 \pm 7\%$ vs. $39 \pm 4\%$, $p = \text{NS}$) and proportion of patients with Thrombolysis In Myocardial Infarction flow grade 3 after PCI (77% vs. 80%, $p = \text{NS}$) were comparable between groups. The median time from pain onset to PCI was >5 h (interquartile range [IQR] 5 to 11) in both groups ($p = \text{NS}$). The median time from PCI to BMNCs intracoronary injection was 9 days (range 4 to 11 days). On average, 171 ± 48 ml

of bone marrow blood was harvested and processed to a final volume of 27 ± 7 ml. The median number of injected BMNCs and CD34+ cells was 26.4×10^8 (IQR 19.6×10^8 to 33.0×10^8) and 1.3×10^6 (IQR 1.1×10^6 to 1.4×10^6), respectively. The viability of BMNCs ranged from 94% to 99%. Intracoronary transfer of BMNCs was successful in all patients, and no serious periprocedural complications or increase in cardiac markers were observed.

At 4-month follow-up (Table 1), infarct size decreased, and LV ejection fraction improved to a similar extent in both groups whereas LV volumes did not change significantly. In the BMNCs group, insignificantly more dysfunctional segments showed improvement in contractile function as compared with the control group.

Regarding the safety, 2 patients developed serious complications during or after bone marrow harvest. One patient had a ventricular septal rupture before the injection of BMNCs, underwent emergency surgery, and died 3 months later as the result of severe heart failure. The other patient suffered a stent thrombosis with reinfarction immediately after we harvested the BMNCs. He had a complicated PCI followed by coronary artery bypass grafting and died 2 weeks later from sepsis and acute respiratory distress syndrome. Another patient had diagnosed biliary carcinoma 6 weeks after BMNCs' transfer and died 2 months later. One BMNC patient suffered from reinfarction due to LAD occlusion distally to the implanted stent 9 months after randomization.

One patient in each group was hospitalized for worsening heart failure. The rate of revascularization was similar in both groups (24% in the BMNCs group and 40% in the control group; $p = \text{NS}$). At 12-month follow-up, LV ejection fraction ($46 \pm 7\%$ vs. $49 \pm 13\%$; $p = \text{NS}$) improved to a similar extent. No patient developed malignant arrhythmias. The original intention was to enroll a total of 40 patients in the BMNCs group and 20 patients in the Control group. After enrollment of the initial 27 patients, the trial was terminated prematurely because of the unexpected occurrence of serious complications in the BMNCs group and no incremental functional effects of BMNCs as compared with control patients.

This randomized study showed that, in patients with large acute anterior myocardial infarction and late presentation, intracoronary infusion of BMNCs in the infarct-related coronary artery at a median of 9 days after primary PCI does neither increase recovery of LV ejection fraction nor reduce LV volumes and infarct size at 4 months, as compared with control subjects. Four randomized trials (2–5) have been conducted so far to investigate the functional

Table 1 LV Systolic Global and Regional Function, LV Volumes, and Infarct Size at Baseline and 4-Month Follow-Up

	BMNCs Group (n = 14)*		Control Group (n = 10)		p Value Follow-Up BMNCs vs. Control Group
	Value	Change From Baseline	Value	Change From Baseline	
LV end-diastolic volume (ml)					NS
Baseline	163 ± 30		162 ± 30		
4 months	172 ± 34	↑ 5.5%	174 ± 29	↑ 7.4%	
LV end-systolic volume (ml)					NS
Baseline	98 ± 25		98 ± 23		
4 months	95 ± 28	↓ 3.1%	96 ± 28	↓ 2.0%	
LV ejection fraction (%)					NS
Baseline	39 ± 6		39 ± 4		
4 months	45 ± 9†	↑ 15.4%	47 ± 7†	↑ 20.5%	
Akinetic and severely hypokinetic segments in the LAD perfusion territory					NS
Baseline	5.9 ± 1.6		5.8 ± 1.8		
4 months	3.5 ± 2.6‡	↓ 40.7%	3.8 ± 2.4‡	↓ 34.5%	
Infarct size at SPECT (%)					NS
Baseline	41.4 ± 18.3		47.5 ± 20.8		
Follow-up	30.5 ± 16.1‡	↓ 26.3%	35.3 ± 17.2‡	↓ 25.7%	

*The 4-month functional follow-up data are reported in 14 patients in the BMNCs group who survived the first 4 months after randomization. †p < 0.05, ‡p < 0.01 baseline versus follow-up. BMNC = bone marrow-derived mononuclear cell; LAD = left anterior descending; LV = left ventricular; NS = not significant; SPECT = single-photon emission computed tomography.

effects of BMNCs intracoronary injection in patients with smaller acute myocardial infarction with controversial results. Only 1 trial (4) reported enhanced and sustained recovery of LV ejection fraction in the BMNCs group as compared with control patients. In the present study, we enrolled a homogenous population of patients with extensive anterior myocardial infarction with an ejection fraction 6.7% to 11.3% lower than in all previous trials. Nevertheless, corroborating data from previous trials (3,5), did not observe any improvement in ejection fraction by BMNCs over primary PCI alone. Low regenerative potential (6) and low engraftment in the heart after intracoronary injection (7) may be the major explanations for lack of functional effects of BMNCs.

The present study has several limitations. The number of enrolled patients was small, and the study was terminated prematurely. Hence, the potential treatment effect could be missed. Yet, inclusion of more patients would have not been likely to change the results. In contrast to previous studies, we included patients with poor LV function, late revascularization, and late BMNCs injections. It may be possible that this subset of patients does not benefit from the transplantation of BMNCs. Hence, our results are not necessarily in contradiction with positive results of larger trials (4). It should be pointed out that adverse events observed in the study do not seem to be directly related to the BMNCs procedure. No complications were observed during the injection of BMNCs.

Given the laborious nature of BMNC harvest and intracoronary transfer, small, if any, functional effects, and lack of prognostic data, the routine use of BMNCs after acute myocardial infarction cannot be recommended at the present time.

*Martin Penicka, MD, PhD

*Cardiocenter, Department of Cardiology
3rd Faculty of Medicine
Charles University and University Hospital Kralovske Vinohrady
Srobarova 50, 100 34 Prague
Czech Republic
E-mail: penicka@fnkv.cz

Jan Horak, MD, PhD
Petr Kobyłka, MD, PhD
Robert Pytlik, MD
Tomas Kozak, MD, PhD
Otokar Belohlavek, MD, PhD
Otto Lang, MD, PhD
Hana Skalicka, MD
Stanislav Simek, MD, PhD
Tomas Palecek, MD
Ales Linhart, MD, PhD
Michael Aschermann, MD, PhD
Petr Widimsky, MD, PhD

doi:10.1016/j.jacc.2007.04.009

(Intracoronary Stem Cells in Large Myocardial Infarction; <http://clinicaltrials.gov/ct/show/NCT00389545?order=1>; NCT00389545)

Please note: Supported by the research grant IGA 8225-3 and by the Charles University Prague Research Project MSM 0021620817.

REFERENCES

- Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G, et al. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty: patterns of left ventricular dilation and long-term prognostic implications. *Circulation* 2002;106:2351-7.
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113-21.
- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210-21.
- Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1199-209.
- Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664-8.
- Penicka M, Lang O, Widimsky P, et al. One day kinetics of myocardial engraftment after intracoronary injection of bone marrow mononuclear cells in patients with acute and chronic myocardial infarction. *Heart* 2007 Feb 19;[E-pub ahead of print].

Intracoronary Injection of Autologous Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells in Patients With Large Anterior Acute Myocardial Infarction: A Prematurely Terminated Randomized Study

Martin Penicka, Jan Horak, Petr Kobylka, Robert Pytlik, Tomas Kozak, Otakar Belohlavek, Otto Lang, Hana Skalicka, Stanislav Simek, Tomas Palecek, Ales Linhart, Michael Aschermann, and Petr Widimsky

J. Am. Coll. Cardiol. 2007;49:2373-2374; originally published online Jun 1, 2007; doi:10.1016/j.jacc.2007.04.009

This information is current as of September 18, 2010

Updated Information & Services	including high-resolution figures, can be found at: http://content.onlinejacc.org/cgi/content/full/49/24/2373
References	This article cites 6 articles, 1 of which you can access for free at: http://content.onlinejacc.org/cgi/content/full/49/24/2373#BIBL
Citations	This article has been cited by 5 HighWire-hosted articles: http://content.onlinejacc.org/cgi/content/full/49/24/2373#otherarticles
Rights & Permissions	Information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at: http://content.onlinejacc.org/misc/permissions.dtl
Reprints	Information about ordering reprints can be found online: http://content.onlinejacc.org/misc/reprints.dtl

Infarkt myokardu, remodelace levé komory a buněčná terapie

H. Skalická jr.¹, J. Horák¹, M. Aschermann¹, A. Linhart¹, T. Paleček¹, P. Kobylka²

¹ II. interní klinika kardiologie a angiology 1. lékařské fakulty UK a VFN Praha, přednosta prof. MUDr. Aleš Linhart, DrSc.

² Oddělení buněčné terapie Ústavu klinické a experimentální hematologie 1. lékařské fakulty UK a ÚHKT Praha, přednosta prof. MUDr. Pavel Klener, DrSc.

Souhrn: V tomto sdělení je uveden přehled výsledků nejdůležitějších a nejvýznamnějších klinických studií zabývajících se problematikou implantace kmenových buněk kostní dřeně u nemocných s akutním infarktem myokardu. Celosvětově je výzkum na tuto oblast soustředěn již několik let. Naděje je vkládána především do možností zabránění procesu progresivní remodelace levé komory, nahrazení nekrotického či fibrotické tkáně, a tím odvrácení vzniku a rozvoje srdečního selhání. Středem pozornosti jsou především pacienti, jejichž dlouhodobá prognóza je dosud i přes pokroky v současné medicíně často velmi nepříznivá.

Klíčová slova: akutní infarkt myokardu – kmenové buňky – remodelace levé komory – mononukleární buňky kostní dřeně – ejekční frakce levé komory

Myocardial infarction, left ventricle remodeling and cellular therapy

Summary: The paper brings an overview of results of the most important and significant clinical studies dealing with the issues of bone marrow stem cell implantation in patients with acute myocardial infarction. On the world scale, research has been focused on this area for several years. Much hope is put primarily on the possibility to prevent the process of progressive remodelling of the left ventricle, the substitution of necrotic or fibrotic tissue and the resulting prevention of development and progression of heart failure. In the centre of attention are especially patients whose long-term prognosis is often very poor in spite of progress in contemporary medicine.

Key words: acute myocardial infarction – stem cells – remodelling of the left ventricle – bone marrow mononuclear cells – left ventricular ejection fraction

Úvod

Při akutním infarktu myokardu (AIM) dochází ke vzniku ireverzibilní ischemické nekrózy srdečního svalu, která je provázena ztrátou kontraktilních elementů, kardiomyocytů. Rozsah postižení je v první řadě závislý na velikosti povodí infarktové tepny, délce trvání ischemie a dále na přítomnosti kolaterální cirkulace, předchozího ischemického zatížení myokardu [1] a v nezanedbatelné míře i na podané léčbě. Bez terapeutického zásahu je u pacientů s AIM udávána mortalita kolem 30% [2,3]. Díky rozvoji reperfuzní terapie, tj. trombolýzy [4] a perkutánní koronární angioplastiky [5,6], došlo v posledních 20 letech k poklesu hospitalizační mortality u AIM na 6–10% [7]. Ani rychle navozená rekanalizace infarktové tepny ale nemusí vždy docílit záchrany myokardu [8]. Efekt je limitovaný možnou přítomností defektu na úrovni mikrocirkulace a časným nebo pozdním is-

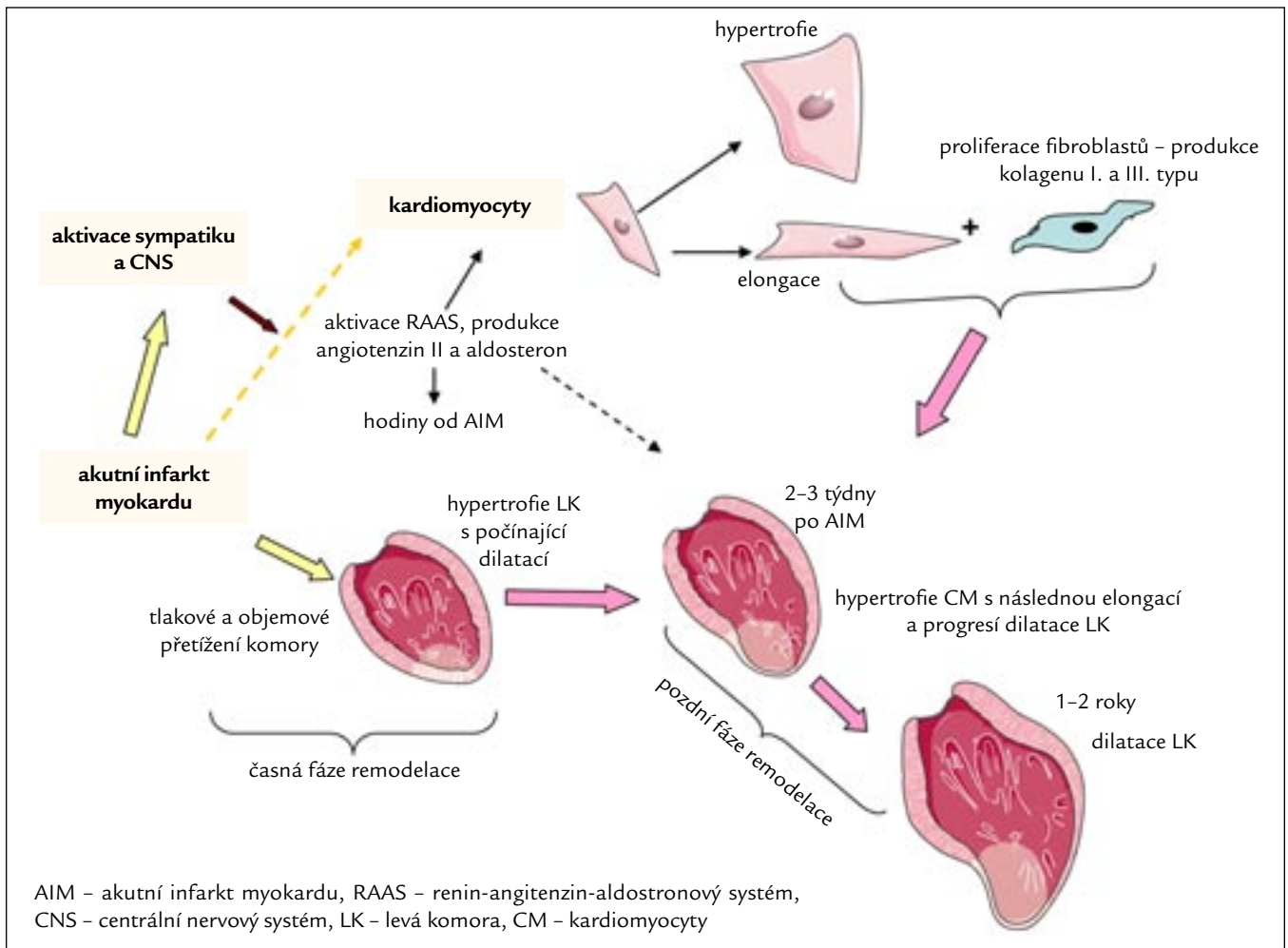
chemicko-reperfuzním poškozením [1,9,10]. Následná ztráta většího množství kontraktilních kardiomyocytů [11] má za následek rozvoj dlouhodobého procesu patologické remodelace levé komory (LK) [12,13]. Dochází k progresivní dilataci dutiny LK a ke změně její geometrie s postupným poklesem systolické funkce nad rámec akutního poškození při vlastním infarktu s výsledným rozvojem chronického srdečního selhání [12,14,15] (obr. 1).

Lze tedy říci, že současná strategie léčby AIM se zaměřuje především na snížení akutní ztráty myokardiálních buněk dosažením co nejdříve a nejdokonalejší reperfuze myokardu [9]. Prozatím žádná konvenční léčba nebo klinicky používaná procedura neumožňuje nahradit nekrotický myokard nebo již zformovanou jizvu funkční kontraktilní tkáně. Naději do této sféry vnesly v posledním desetiletí až první experimentální a klinické práce zabývající se

aplikací kmenových buněk s regeneračním a reparačním potenciálem přímo do myokardu [16,17].

Kmenové buňky, typy, rozdělení

Kmenové buňky (KB) jsou definované jako nediferencované progenitorové buňky s vysokou mitotickou a proliferativní aktivitou [18,19]. Mají schopnost sebeobnovy, klonogenicity [20] a multipotence v závislosti na prostředí a charakteru stimulačních a růstových faktorů [21]. Jejich základní rozdělení je velmi komplikované vzhledem k jejich heterogenitě [22,23]. Klinicky i experimentálně pro lepší orientaci a identifikaci vhodných buněk se zdá být nejpřehlednější dělení dle zdroje buněk (tab. 1). Vzhledem k tomu, že ve všech publikovaných studiích s KB je klíčovým momentem výběr typu implantovaných buněk [22], bylo hledáno i rozdělení, které by umožňovalo rychlou orientaci v problému a vychá-



Obr. 1. Patofyziologie remodelace levé komory po AIM s rozvojem srdečního selhání. Částečně upraveno podle [15].

Tab. 1. Základní rozdělení kmenových buněk dle zdroje.

Rozdělení a typy kmenových buněk

1. dospělé kmenové buňky

- A. skeletální myoblasty – získávají se biopsií kosterního svalstva
- B. buňky kostní dřeně – tvoří 20% buněčného obsahu kostní dřeně
 - mezenchymální buňky
 - multipotentní progenitorové buňky
 - hematopoetické kmenové buňky
 - endoteliální progenitorové buňky (EPCs)
 - monoklonální buňky kostní dřeně (BMSCs)

2. embryonální kmenové buňky, fetální a neonatální KB

3. ostatní typy buněk organismu (potenciální zdroj KM)
např. naivní kardiomyocyty, adipocyty

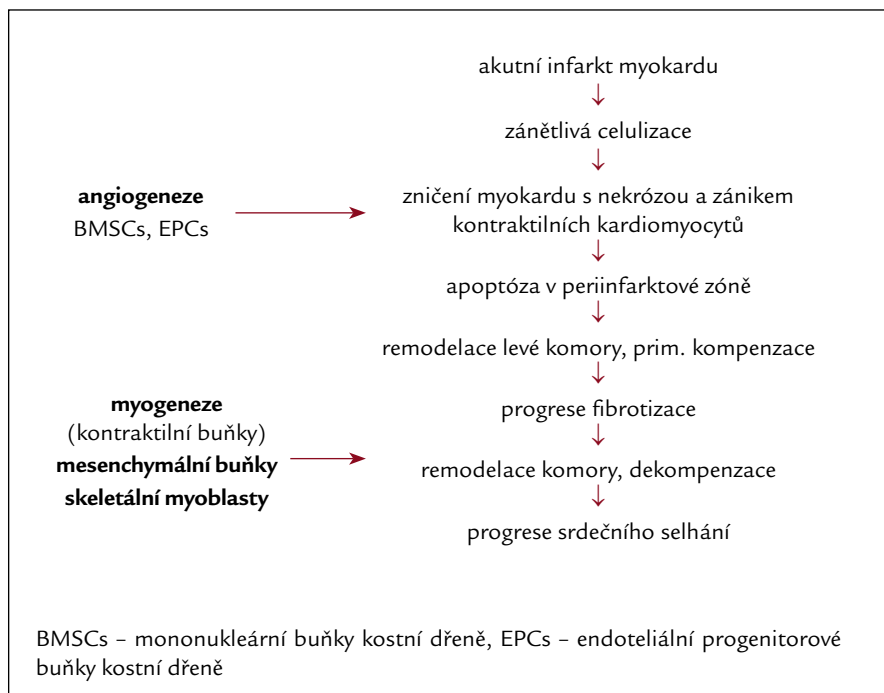
KB – kmenové buňky, KM – kardiomyocyty, EPCs – endoteliální progenitorové buňky, BMSCs – mononukleární buňky kostní dřeně

zelo z jejich dostupnosti, afinity k myokardu a endotelu cév a schopnosti mitotického dělení. Ott et al a Taylor et al [24,25] vycházeli z fyziologických a patofyziologických dějů, ztráty specifického typu elementů a nutnosti je-

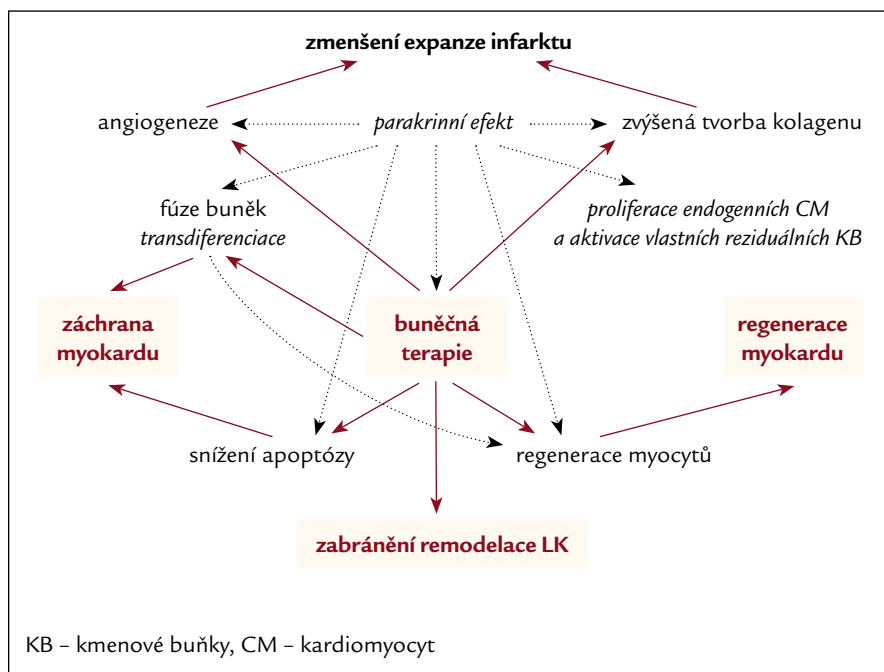
jich náhrady (obr. 2). Popisují, že při plně rozvinutém srdečním selhání jsou pro zrestaurování myokardu vhodné buňky, které jsou schopné aktivovat kontraktilitu a myogenezu, tedy mezenchymální buňky [26–28] i skeletální

myoblasty [25,29–31]. Recentně po AIM, pro zlepšení průběhu angiogenezy a záchraně hibernovaného myokardu [17,32–37], se jeví jako mnohem vhodnější podání kmenových buněk kostní dřeně, ke kterým jsou řazeny endotelo-ové progenitorové buňky (EPCs), mononukleární buňky kostní dřeně (BMSCs) a multipotentní buňky.

Z hlediska klinického použití je nejslibnější aplikace BMSCs [23]. Jedná se totiž o buňky relativně snadno dostupné, které lze získat v dostatečném množství trepanobiopsií ve smíšených populacích (obr. 3). Z experimentálních studií také vyplývá jejich relativně dobrá schopnost diferenciaci v kardiomyocyty a endotelo-ové buňky, uspokojivá integrace v místě poškozeného myokardu a bezpečnost podání [22,23,38–42]. Potencují jak myokardiální regeneraci, tak neoangiogenezi [33,34,37,43,44].



Obr. 2. Hypotéza výběru kmenových buněk vzhledem k jejich diferenciační schopnosti. Upraveno podle [24,25].



Obr. 4. Pravděpodobné mechanismy působení KB na zlepšení funkce levé komory.

Mechanismus účinku kmenových buněk

Současný názor stran mechanismu účinku KB není zcela jednotný, pravděpodobně se jedná o jejich multifaktoriální působení [21,45].

Jedna z hypotéz regenerace myokardu pomocí KB je založena na jejich schopnosti transdiferenciace na

kardiomyocyty [21,46] a začlenění do syntetia s následným vytvořením plně funkční složky myokardu [47]. Velkou roli zde hraje nejenom samotný proces buněčné integrace, ale velmi pravděpodobně i neoangiogeneza [35–37] a především parakrinní stimulace tvorby různých typů růstových faktorů a cytokinů, které se následně podílí na para-



Obr. 3. Ukázka odběru mononukleárních kmenových buněk z lopaty kosti kyčelní.

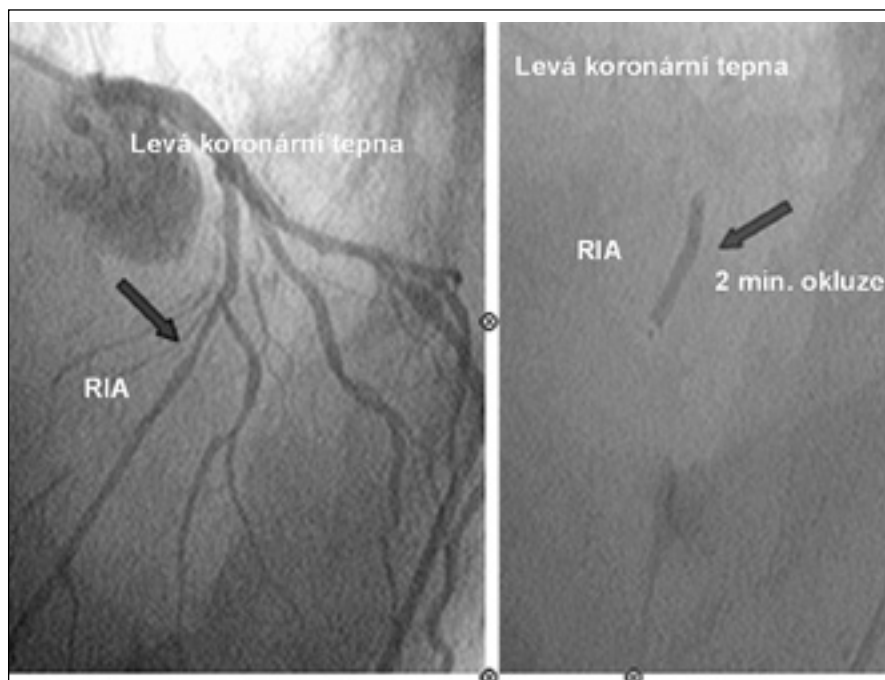
krinní a autokrinní aktivaci intra- a intercelulárních dějů [48–51]. Po AIM je hlavním místem působení KB především oblast periinfarktové zóny [10], kde se podílí na inhibici rozvoje apoptózy [52–54], stimulaci diferenciace a migrace myocytů [55,56] (obr. 4).

Metody aplikace kmenových buněk

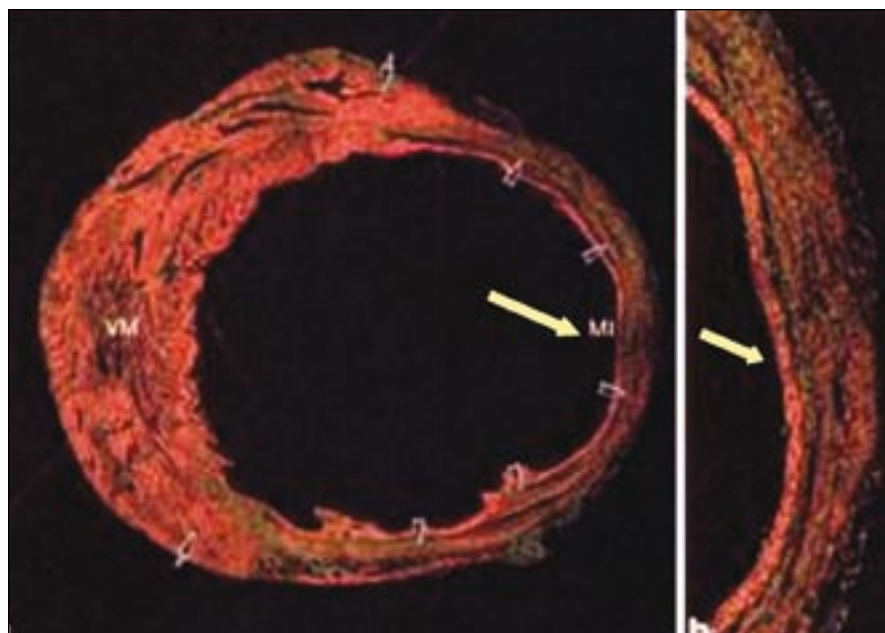
Způsob, jakým jsou KB do myokardu implantovány, může hrát důležitou roli z hlediska jejich efektivity a ovlivnění myokardiální regenerace. V průběhu posledních let byla vyzkoušena řada různorodých metod aplikace.

Intrakoronární aplikace

Jedná se o metodu, kdy se KB aplikují katetizační metodou, s využitím balónkového katétru typu „over the wire“, který je zaveden standardní technikou do koronární tepny. V místě původního uzávěru tepny při AIM je balónek naplněn na nízký tlak, při kterém je tepna již plně okludovaná. Luminem balónku jsou KB aplikovány za místo uzávěru tepny (obr. 5). Tato metoda byla použita pro svou relativní jednoduchost a minimální invazivitu ve velkém množství experimentálních i klinických studií [22,40–42,57–60]. Otázkou však je, zda



Obr. 5. Intrakoronární implantace kmenových buněk do ramus interventrikularis anterior (RIA) metodou „over the wire PCI“ katétre s balónkem o průměru 3,5 mm. Aplikace 5 ml buněčného koncentrátu během 2minutové okluze tepny.



Obr. 6. Regenerace myokardiální fibrotické jizvy u myších modelů po podání KB. Převzato z [16] se svolením D. Orlica.

takto aplikované KB jsou myokardem dostatečně vychytány. V řadě prací [61], z nichž nejvýznamnější je studie Meyera et al [62], bylo prokázáno pouhé 1–2% zachycení buněk v myokardu za 24 hod po podání. Nicméně pravděpodobně i toto malé množství buněk může hrát jistou roli v navození myokardiální regenerace a neoangiogenezi [33,37].

Přímá intramyokardiální aplikace chirurgickou cestou

Využívá se při kardiochirurgických výkonech [30,63–65]. Výhodou je přímá cesta aplikace do ischemicky postiženého místa a následná potenciace především myogeneze. Mezi nevýhody patří nízké množství aplikovaných buněk, potenciální arytogenicita

[66] a vlastní invazivita chirurgické intervence.

Přímá injekce katetrizační a transendokardiální technikou

Jedná se o transendomyokardiální injekci KB z dutiny LK nebo o intrakardiální injekci transvenózním přístupem s použitím tzv. NOGA techniky, která umožňuje lokalizované elektromechanické mapování infarktového ložiska. Kmenové buňky jsou implantovány do ischemických oblastí myokardu pomocí specifického Myostar katétru [67,68]. Nevýhodou je velká finanční nákladnost a specializované technické zázemí. V současnosti probíhá několik studií využívajících tento způsob aplikace, prozatím však nejsou k dispozici výsledky.

Množství aplikovaných kmenových buněk

Doposud nebylo jasné, jaký počet aplikovaných KB je pro ovlivnění funkce levé komory „ideální“. V publikovaných klinických studiích se počty aplikovaných buněk pohybují v řádu od 10^7 do 10^9 [22,38,41,69,70]. Závěr metaanalýzy, publikovaný v roce 2008 v srpnu v časopise *European Heart Journal* [23], upozorňuje, že skutečně existuje těsná vazba mezi množstvím podaných buněk a ovlivněním funkce levé komory. Studie, u kterých bylo podané množství aplikovaných kmenových buněk nad 10^8 [40,50,62,71,72], vykazovaly signifikantní zlepšení ejekční frakce a kinetiky levé komory. Pravděpodobně se jedná o vztah mezi špatnou endogenní mobilizací BMSCs po AIM v kombinaci s některými komorbiditami (diabetici, hypertonici a kuřáci) [73].

Experimentální a klinické studie

Zájem o využití KB v kardiologii vyvolala experimentální studie amerických autorů Orlic et al, publikovaná v časopise *Nature* v roce 2001 [16], která prokázala na myších modelech regeneraci posts ischemicky poškozeného myokardu po intrakoronární aplikaci KB o 53% (obr. 6).

Toto zjištění představovalo převratnou změnu myšlení ve vědecké sféře a vedlo k rozmachu výzkumu v tomto směru. Následovalo množství dalších experimentálních prací [48,74–77] a časně se objevily i první malé, nerandomizované klinické práce, které experimentální pozorování částečně, ale ne zcela přesvědčivě potvrdily [21,78]. Již v počátcích však byla v oblasti implantace KB do myokardu řada nejasností a obav. Limitující byl především strach z dlouhodobých nežádoucích účinků léčby. Jistá skepse také souvisí s nedostatečnou znalostí všech patofyziologických dějů reparace, remodelace LK a s nejasným podkladem působení KB.

Klinických studií s KB bylo provedeno v posledních 10 letech již několik desítek. Jejich závěry jsou ovšem kontroverzní. Lze to demonstrovat již na výsledcích prvních pilotních studií. V práci publikované Aviléssem et al [79], ve které byly 5 pacientům intrakoronárně aplikovány BMSCs 10–15 dní po AIM, bylo popsáno signifikantní zlepšení kontraktility a systolické funkce LK. Oproti tomu v prakticky současně publikované studii Stamma et al [80] nebyla efektivita KB na 6 pacientech přímou intramyokardiální cestou potvrzena. Jednalo se však o studie s rozdílným designem, ve kterých byly buňky aplikovány odlišným způsobem (intrakoronárně vs perioperačně) a bylo použito i rozdílné množství a typ KB. Další významnější studií byla TOPCARE-AMI [70] na 20 pacientech. 9 nemocným byly implantovány BMSCs, 11 nemocným pak EPCs z periferní krve, vždy za 4 dny po AIM. V odstupu 4–12 měsíců autoři zaznamenali signifikantní zlepšení globální systolické funkce LK, zmenšení postiženého infarktového ložiska a zlepšení viability myokardu. Efekt terapie byl přitom nezávislý na typu podaných buněk.

V průběhu následných let byly publikovány výsledky ještě řady dalších studií. Jednalo se již převážně o randomizované studie provedené na větším počtu pacientů s použitím implantace

BMSCs odebraných z kostní dřeně recentně po AIM. Jejich primárním cílem bylo zlepšení funkce LK, popř. zmenšení infarktového ložiska a zlepšení myokardiální viability. Hodnocena byla i bezpečnost podání KB. Práce publikovaná roku 2004 Chenem et al [26] sledovala 69 nemocných po AIM primárně řešeném koronární angioplastikou. BMSCs jim byly aplikovány do 18 dnů po koronární angioplastice. Po šestiměsíčním sledování bylo zjištěno významné zmenšení infarktového ložiska a současně došlo ke zlepšení systolické funkce LK a k redukci jejího enddiastolického objemu. Německá studie BOOST [62] sledovala 60 pacientů. Primární šestiměsíční výsledky byly velmi nadějně a ukazovaly na signifikantní zlepšení funkce LK u skupiny pacientů, kterým byly intrakoronárně podány BMSCs [kontrola vs BMSCs – vzestup ejekční frakce (EF) +0,7%/6,7%]. Bohužel efekt nebyl trvalý, při kontrolním vyšetření po 18 měsících od implantace se rozdíl ve funkci komory v obou skupinách prakticky vyrovnal. Následovala belgická studie Janssense et al [59], publikovaná v roce 2006, v níž bylo zařazeno 67 pacientů po úspěšné angioplastice pro AIM. KB jim byly aplikovány intrakoronárně do 24 hod po AIM. S odstupem 4 měsíců nebyl zjištěn významný vzestup EF LK, došlo však k signifikantní redukci velikosti infarktového ložiska oproti kontrole (o 28%).

V následné placebem kontrolované, dvojité zaslepené studii REPAIR-AMI [81] byla hodnocena systolická funkce LK u 204 pacientů, kterým byly v odstupu 5 dnů od AIM intrakoronárně aplikovány BMSCs. Autoři prokázali mírný pozitivní efekt ve smyslu potenciace funkce LK (EF vzrostla +5,5% u skupiny s KB vs kontrolní skupina +3%). U skupiny pacientů s implantovanými buňkami bylo také pozorováno menší množství reinfarktů a rehospitalizací. Naproti tomu norská studie ASTAMI [41,82] velmi podobného designu, provedená na 100 pacientech, neprokázala příznivý vliv efektivitu buněčné terapie. Je však nutno zdůraznit,

že v této studii bylo nemocným aplikováno výrazně nižší množství KB než v jiných studiích.

Komplexní shrnutí nejdůležitějších klinických studií týkajících se implantace KB bylo publikováno v metaanalýze Abdela-Latifa et al [22] v roce 2007. Do hodnocení bylo zahrnuto celkem 18 studií (999 pacientů), z toho BMSCs – 15 studií, sEPC – 3 studie, mezenchymální buňky – 1 studie. Všechny studie byly placebem kontrolované, převážně randomizované, 13 studií bylo u nemocných po AIM a 5 u nemocných s chronickou ischemickou kardiomyopatií. Medián sledování nemocných byl 4 měsíce (3–18 měsíců). Bylo konstatováno, že existuje velká heterogenita doby implantace KB (1–81 dnů, medián 9,8 dní po AIM). Také počet implantovaných KB byl velmi rozdílný a pohyboval se v rozmezí 2×10^6 až 60×10^9 , medián 80×10^6 . Výsledky metaanalýzy naznačují, že implantace KB může vést ke zlepšení systolické funkce LK (+3,66 %/+5,4%, $p < 0,01$), zmenšení infarktového ložiska (-5,49 %/-9,1%, $p < 0,03$), zmenšení ESV (-4,8 ml/-8,2 ml, $p < 0,06$) a snížení endsystolického volumu LK (-4,8 ml/-8,2 ml, $p < 0,06$). Významná je skutečnost, že nebyly prokázány závažné nežádoucí účinky léčby. Závěrem této metaanalýzy bylo, že implantace KB je provázena zlepšením anatomických a hemodynamických parametrů LK srdeční u pacientů s AIM a chronickým srdečním selháním na podkladě ischemické choroby srdeční (tab. 2).

Závěr

Léčba KB u nemocných po AIM nabízí do budoucna naději pro nemocné, které nejsme schopni účinně léčit konvenčními metodami. Jedná se především o pacienty po velkém infarktu myokardu s těžkou systolickou dysfunkcí LK a o nemocné s chronickým srdečním selháním. V těchto případech se nabízí možnost použití KB, ať již jako primární terapeutickou metodu, tak např. v rámci přemostění období do srdeční transplantace.

Tab. 2. Souhrn nejdůležitějších klinických prací zabývajících se intrakoronární aplikací mononukleárních kmenových buněk. Upraveno podle Abdela-Latifa [22].

Přehled nejdůležitějších klinických studií

Studie	Počet nemocných ve skupině s KB	Kontrolní skupina	Timing implantace		Způsob aplikace	Výsledek	p
<i>Strauer et al</i> Circulation 2002	10	10	5–9 dní	nerando- mizovaná	intra- koronární	vzestup regionální kinetiky a zmenšení infarktového ložiska	
<i>Aviles et al</i> Cardiologia 2004	5	0	10–15 dní	nerando- mizovaná	intra- koronární	není potvrzen signifikantní benefit KB	
<i>TOPCARE-AMI</i> Circulation 2002, JACC 2004	59	0	4,9 dne ± 1,1	nerando- mizovaná	intra- koronární	zlepšení EF, zmenšení infarktového ložiska	0,001
<i>Chen et al</i> American Journal of Cardiology	34	35	18,4 ± 0,5	rando- mizovaná	intra- koronární	zlepšení EF, zmenšení infarktového ložiska	0,003
<i>Janssens et al</i> Lancet 2006	33	34	1 den	rando- mizovaná	intra- koronární	zmenšení infarktového ložiska, není popsáno zlepšení EF	0,36
<i>ASTAMI</i> AHA Scientific Sessions 2005	50	50	6 ± 1,3 dne	rando- mizovaná	intra- koronární	za 6 měsíců sledování není prokázán signifikantní benefit	0,05
<i>REPAIR-AMI</i> AHA Scientific Sessions 2005	101	103	3–6 dní	rando- mizovaná	intra- koronární	vzestup EF za 4 měsíce sledování	0,021
<i>BOOST-Wollert</i> Lancet 2004	30	30	4,8 ± 1,3 dne	rando- mizovaná	intra- koronární	signifikantní benefit za 6 měsíců nebyl potvrzen (sledování 18 měsíců)	0,026
<i>Bartůněk et al</i> Circulation 2005	19	16	11,6 ± 1,4 dne	nerando- mizovaná	intra- koronární	zlepšení EF, zmenšení infarktového ložiska	0,05

BMSCs – monoklonální kmenové buňky, EF – ejekční frakce levé komory

Dosud provedené klinické práce s KB uvádějí ne zcela přesvědčivé důkazy o jejich efektivitě na zlepšení funkce LK a myokardiální perfuze. Jedná se však o práce s velkým rozptylem jednotlivých klíčových proměnných (typ a množství KB, typ a způsob implantace, načasování od AIM) vedoucím k obtížím ve srovnávání jednotlivých studií.

Vzhledem k řadě dosud nedořešených otázek mechanismu účinku i nejednoznačnému průkazu klinické efektivity není ještě nyní možné tuto metodu standardně používat v klinické praxi. Před rozšířením do klinického užívání bude nutné dořešit řadu základních problémů, především dalším výzkumem v oblasti experimentální, se zaměřením na mechanismy účinku KB

a biologii reparačních procesů, zprostředkovaných KB myokardu tak, aby chom mohli naše terapeutické snahy lépe cílit a potenciálně v této nové oblasti klinické medicíny efektivně využít.

Literatura

1. Widimsky P. Reperfusion damage or no-reflow damage in primary coronary interventions in acute myocardial infarction? *Eur Heart J* 2002; 23: 1076–1078.
2. Schomig A, Ndrepepa G, Mehili J et al. Therapy-Dependent Influence of Time-to-Treatment Interval on Myocardial Salvage in Patients With Acute Myocardial Infarction Treated With Coronary Artery Stenting or Thrombolysis. *Circulation* 2003; 108: 1084–1088.
3. Stone GW, Brodie BR, Griffin JJ et al. Prospective, multicenter study of the safety and feasibility of primary stenting in acute myocardial infarction: in-hospital

and 30-day results of the PAMI stent pilot trial. Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Stent Pilot Trial Investigators. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 23–30.

4. Aschermann M, Horak J, Reznicek V et al. Fibrinolytic therapy in acute myocardial infarct. *Čas Lék Čes* 2003; 142: 582–585.
5. Widimsky P, Gregor P, Dvorak J et al. The optimal diagnostic approach in myocardial infarct. *Vnitř Lék* 1993; 39: 160–165.
6. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomized trials. *Lancet* 2003; 361: 13–20.
7. Lichtman JH, Spertus JA, Reid KJ et al. Acute Noncardiac Conditions and In-Hospital Mortality in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2007; 116: 1925–1930.
8. Poloczek M, Kala P, Neugebauer P et al. ST-segment resolution as a simple tool for the assessment of successful primary coro-

- nary intervention at a microvascular level. *Vnitř Lék* 2004; 50: 740–745.
9. Widimsky P, Zelizko M, Jansky P et al. The incidence, treatment strategies and outcomes of acute coronary syndromes in the „reperfusion network“ of different hospital types in the Czech Republic: results of the Czech evaluation of acute coronary syndromes in hospitalized patients (CZECH) registry. *Int J Cardiol* 2007; 119: 212–219.
10. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146–1149.
11. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44: 503–512.
12. Bolognese L, Neskovic AN, Parodi G et al. Left Ventricular Remodeling After Primary Coronary Angioplasty: Patterns of Left Ventricular Dilation and Long-Term Prognostic Implications. *Circulation* 2002; 106: 2351–2357.
13. Krupicka J, Gregor P, Budesinsky T et al. Echocardiographic quantification of changes in left ventricular kinetics in patients during hospitalization for a first myocardial infarct and treated with direct angioplasty. *Vnitř Lék* 2002; 48: 368–372.
14. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161–1172.
15. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ et al. Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 2006; 367: 356–367.
16. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701–705.
17. Jain M, DerSimonian H, Brenner DA et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 1920–1927.
18. Gulati R, Simari RD. Cell therapy for acute myocardial infarction. *Med Clin North Am* 2007; 91: 769–785.
19. Wollert KC. Cell therapy for acute myocardial infarction. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 202–210.
20. Yoon YS, Wecker A, Heyd L et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; 115: 326–338.
21. Badorff C, Brandes RP, Popp R et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107: 1024–1032.
22. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; 167: 989–997.
23. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ et al. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008; 29: 1807–1818.
24. Ott HC, Matthiesen TS, Brechtken J et al. The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells. *Nat Clin Pract* 2007; 4 (Suppl 1): S27–S39.
25. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P et al. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929–933.
26. 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: 92–95.
27. Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 2005; 68: 1940–1943.
28. Mangi AA, Noiseux N, Kong D et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003; 9: 1195–1201.
29. Menasche P. Myoblast-based cell transplantation. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 221–227.
30. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 879–888.
31. 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: 531–537.
32. 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.
33. 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: 430–436.
34. 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.
35. Tse HF, Lau CP. Therapeutic angiogenesis with bone marrow-derived stem cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2007; 12: 89–97.
36. Kajstura J, Leri A, Bolli R et al. Endothelial progenitor cells: neovascularization or more? *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40: 1–8.
37. Itescu S, Kocher AA, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 253–258.
38. Bartunek J, Vanderheyden M, Wijns W et al. Bone-marrow-derived cells for cardiac stem cell therapy: safe or still under scrutiny? *Nature clinical practice* 2007; 4 (Suppl 1): S100–S105.
39. Bartunek J, Wijns W, Heyndrickx GR et al. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *Nat Clin Pract* 2006; 3 (Suppl 1): S52–S56.
40. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1210–1221.
41. Lunde K, Solheim S, Aakhus S et al. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 2005; 39: 150–158.
42. Meluzin J, Janousek S, Mayer J et al. Three-, 6-, and 12-month results of autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2007; 128: 185–192.
43. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T 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; 104: 1046–1052.
44. Assmus B, Schachinger V, Zeiher AM. Regenerative therapy in cardiology: how distant is it from reality? *Internist (Berl)* 2006; 47: 1177–1182.
45. Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* 2006; 98: 1002–1013.
46. Li CJ, Gao RL, Yang YJ et al. Autologous bone marrow mononuclear cells and peripheral endothelial progenitor cells differentiation in myocardial ischemia reperfusion injury region in swine. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi (Chinese Journal of Cardiovascular Diseases)* 2007; 35: 350–353.
47. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 2002; 91: 1092–1102.

48. Li Y, Fukuda N, Yokoyama S et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 549: 98–106.
49. Pannitteri G, Petrucci E, Testa U. Coordinate release of angiogenic growth factors after acute myocardial infarction: evidence of a two-wave production. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 2006; 7: 872–879.
50. Kang HJ, Lee HY, Na SH 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; 114: 1145–1151.
51. Fazel S, Cimini M, Chen L et al. Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest* 2006; 116: 1865–1877.
52. Antonio Abbate GGLB-ZAB. Pathophysiological role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *J Cell Physiol* 2002; 193: 145–153.
53. Kajstura J, Cheng W, Reiss K et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86–107.
54. Baldi A, Abbate A, Bussani R et al. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 165–174.
55. Orlic D. Stem cell repair in ischemic heart disease: an experimental model. *Int J Hematol* 2002; 76 (Suppl 1): 144–145.
56. Arnesen H, Lunde K, Aakhus S et al. Cell therapy in myocardial infarction. *Lancet* 2007; 369: 2142–2143.
57. Assmus B, Walter DH, Lehmann R et al. Intracoronary infusion of progenitor cells is not associated with aggravated restenosis development or atherosclerotic disease progression in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27: 2989–2995.
58. Meluzin J, Mayer J, Groch L et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006; 152: 975.
59. Janssens S, Dubois C, Bogaert J et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367: 113–121.
60. Penicka M, Horak J, Kobyłka P et al. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 2373–2374.
61. Penicka M, Widimsky P, Kobyłka P et al. Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation* 2005; 112: e63–e65.
62. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J 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; 113: 1287–1294.
63. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078–1083.
64. Herreros J, Prosper 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.
65. Siminiak T, Kalawski R, Fiszler D et al. Autologous transplantation of skeletal myoblasts in the treatment of postinfarction left heart dysfunction: three-month follow-up. *Kardiologia Pol* 2004; 60 (Suppl 1): I-71–I-76.
66. Villa A, Sanchez PL, Fernandez-Aviles F. Ventricular arrhythmias following intracoronary bone marrow stem cell transplantation. *Europace* 2007; 9: 1222–1223.
67. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transcatheter injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110: II213–II218.
68. Tse HF, Thambar S, Kwong YL et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J* 2007; 28: 2998–3005.
69. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141–148.
70. Schachinger 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.
71. Huang RC, Yao K, Zou YZ et al. Long term follow-up on emergent intracoronary autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute inferior-wall myocardial infarction. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006; 86: 1107–1110.
72. Suarez de Lezo J, Herrera C, Pan M et al. Regenerative therapy in patients with a revascularized acute anterior myocardial infarction and depressed ventricular function. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60: 357–365.
73. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A et al. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 2001; 89: E1–E7.
74. Kuethe F, Krack A, Fritzenwanger M et al. Treatment with granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. Evidence for a stimulation of neovascularization and improvement of myocardial perfusion. *Pharmazie* 2006; 61: 957–961.
75. Kurdi M, Booz GW. G-CSF-based stem cell therapy for the heart-unresolved issues part A: paracrine actions, mobilization, and delivery. *Congest Heart Fail* 2007; 13: 221–227.
76. 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: 355–364.
77. Yin CQ, Chen JL, Wang YF et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells intracoronary delivery after acute myocardial infarction in miniature pig. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2005; 27: 696–699.
78. Tse HF, Yiu KH, Lau CP. Bone marrow stem cell therapy for myocardial angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 2007; 5: 103–112.
79. Aviles FF, San Roman JA, Garcia Frade J et al. Intracoronary stem cell transplantation in acute myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57: 201–208.
80. Stamm C, Westphal B, Kleine HD et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45–46.
81. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006; 27: 2775–2783.
82. Lunde K, Solheim S, Aakhus S et al. Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) randomized controlled trial. *Am Heart J* 2007; 154: 710–718.

MUDr. Hana Skalická

www.vfn.cz

e-mail: skaldah@seznam.cz

Doručeno do redakce: 2. 8. 2008

Přijato po recenzi: 16. 9. 2008

Intrakoronární aplikace kmenových buněk u nemocných s akutním infarktem myokardu, dosavadní klinické zkušenosti a perspektiva

Hana Skalická jr., Jan Horák, Michael Aschermann, Aleš Linhart, Petr Kobyłka*

2. interní klinika kardiologie a angiologie, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy,

*Oddělení buněčné terapie, Ústav klinické a experimentální hematologie, 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy a Ústav hematologie a krevní transfuze, Praha, Česká republika

Skalická H jr, Horák J, Aschermann M, Linhart A, Kobyłka P. **Intrakoronární aplikace kmenových buněk u nemocných s akutním infarktem myokardu, dosavadní klinické zkušenosti a perspektiva.** *Cor Vasa* 2009;51(7–8): ...

Sdělení uvádí přehled výsledků nejdůležitějších a nejvýznamnějších klinických studií, zabývajících se problematikou implantace mononukleárních kmenových buněk kostní dřeně u nemocných s velkým akutním infarktem myokardu s poinfarktovou těžkou systolickou dysfunkcí levé komory. Celosvětově se výzkum zaměřuje na tuto oblast již několik let. Naděje se vkládá především do možnosti zabránit procesu progresivní remodelace levé komory nahrazením nekrotického či fibroticky změněného myokardu kontraktilní tkání, a tím zabránit vzniku a rozvoji srdečního selhání. Středem pozornosti jsou především ti pacienti, u kterých k obnově kontraktilní funkce bezprostředně po příhodě nedošlo; jejich dlouhodobá prognóza je dosud, i přes pokroky v současné medicíně, často velmi nepříznivá.

Klíčová slova: Akutní infarkt myokardu – Kmenové buňky – Remodelace levé komory – Mononukleární buňky kostní dřeně – Ejekční frakce levé komory.

Skalická H jr, Horák J, Aschermann M, Linhart A, Kobyłka P. **Intracoronary delivery of stem cells in patients with acute myocardial infarction. The clinical experience obtained to date and prospects.** *Cor Vasa* 2009;51(7–8): ...

The paper is an overview of results of landmark clinical trials addressing the issue of mononuclear bone marrow stem cell implantation in patients with a major acute myocardial infarction and severe post-MI left ventricular dysfunction. Worldwide research has focused on this topic for a couple of years. Most importantly, it is hoped to be able to block the process of progressive left ventricular remodeling by replacing the necrotic or fibrotic myocardium by contractile tissue thereby precluding the development of heart failure. Attention has particularly centered on patients not resuming contractile function immediately after the event; despite all recent advances in medicine, their long-term prognosis is often fairly poor.

Key words: Acute myocardial infarction – Stem cells – Left ventricular remodeling – Mononuclear bone marrow cells – Left ventricular ejection fraction

Adresa: MUDr. Hana Skalická, 2. interní klinika Kardiologie a angiologie, VFN a 1. LF UK, 128 00 Praha 2, Česká republika, e-mail: skal-dah@seznam.cz

Přehled zkratk

BMSCs	Mononukleární buňky kostní dřeně (bone marrow-derived mononuclear cells)	ICHS	Ischemická choroba srdeční
CM	Kardiomyocyt (cardiomyocyt)	KB	Kmenové buňky
EF	Ejekční frakce	LK	Levá komora
EPCs	Endoteliální progenitorové kmenové buňky (endoteliální progenitor stem cells)	RIA	Ramus interventricularis anterior
		STEMI	Akutní infarkt myokardu s elevacemi ST

Úvod

Akutní infarkt myokardu s elevacemi ST (STEMI) je dynamický, komplexně probíhající proces, při kterém dochází k omezení až přerušení perfuze myokardu, a s tím související irreverzibilní ztrátě kontraktálních elementů – kardiomyocytů (CM).^(1,2) Současná strategie léčby STEMI se zaměřuje hlavně na snížení ztráty CM dosažením co nejčasnější reperfuze myokardu,⁽³⁾ především díky perkutánní koronární angioplastice.^(4,5) Využití této metody k obnovení perfuze myokardu, jako metody volby, vedlo k poklesu mortality u těchto nemocných na 6–10 %.⁽⁶⁾ I přesto u nemocných s velkým infarktem myokardu (ztráta kolem 25–40 % CM) dochází často k rozvoji dysfunkce levé komory (LK) – s postupným poklesem ejekční frakce (EF) – a následnou progresí onemocnění do chronického srdečního selhání se všemi jeho důsledky pro kvalitu života i prognózu nemocného.^(3,7-9) Prozatím žádná konvenční medikamentózní léčba nebo klinicky používaná procedura neumožňuje nahradit nekrotický či fibroticky změněný myokard kontraktální tkání. Naději do této oblasti vnesly v posledním desetiletí první experimentální a klinické práce, které se zabývají aplikací kmenových buněk (KB) do myokardu.⁽¹⁰⁾ Předpokládáný účinek vychází z pluripotence KB, tedy schopnosti diferencovat se v různé typy buněk včetně CM.⁽¹¹⁻¹³⁾ Reparační a regenerační procesy v myokardu za účasti KB jsou fyziologickým mechanismem zachování jeho dlouhodobé homeostázy. Při masivním poškození jako u STEMI je ale kapacita těchto mechanismů za přirozených podmínek zanedbatelná. Tato skutečnost však tvoří teoretickou bázi pro pokusy o buněčnou léčbu akutních a chronických forem ischemické choroby srdeční (ICHS). Cílem je zvýšit počet KB v myokardu, schopných diferenciaci v infarktovém ložisku natolik, aby byl navozen proces novotvorby kontraktálních a cévních struktur, nebo alespoň zabránit pokračující ztrátě buněčných elementů, a tím podpořit stabilizaci celkové funkce levé komory.⁽¹⁴⁾ Možnost regenerace poškozeného myokardu a zlepšení jeho funkce po aplikaci rozdílných typů KB již byla prokázána v řadě experimentálních prací na různých zvířecích modelech.⁽¹⁵⁻²²⁾

Pro využití KB je nezbytné vyřešit následující klíčové problémy

1. Výběr vhodných KB pro regeneraci myokardu.
2. Určit množství KB nezbytných pro účinnou léčbu.
3. Výběr metody aplikace KB.
4. Načasování podání KB po STEMI.
5. Mechanismus působení KB v infarktovém ložisku.

1. Výběr vhodných kmenových buněk pro regeneraci myokardu

Kmenové buňky jsou nediferencované progenitorové buňky s vysokou mitotickou a proliferační aktivitou.⁽²³⁾ Mají schopnost sebeobnovy, klonogenicity a multipotence.^(24,25) Jednot-

livé KB jsou charakterizovány svými povrchovými antigeny – markery určujícími schopnost kumulace a diferenciaci.^(26,27) Představují heterogenní skupinu pluripotentních, multipotentních a unipotentních buněk,⁽²⁸⁾ viz *obrázek 1*.

Vzhledem k velkému množství různých typů buněk a s ohledem na množnost jejich separace je klíčovým momentem výběr typu implantovaných buněk.⁽²⁸⁾ Nejjednodušší a nejpřehlednější je dělení podle zdroje KB (viz *tabulka 1*).

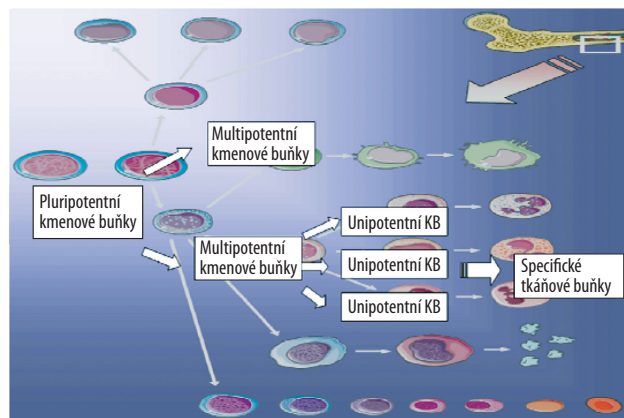
Pro experimentální a klinické využití je spíše vhodné rozdělení vycházející z jejich dostupnosti, afinity k myokardu a endotelu cév a schopnosti mitotického dělení. Vychází z fyziologických a patofyziologických dějů poškození myokardu, ztráty specifického typu elementů a nutnosti jejich náhrady,^(29,30) viz *obrázek 2*.

V pozdní fázi plně rozvinutého srdečního selhání jsou pro zrestaurování myokardu vhodné buňky potenciálně schopné aktivovat kontraktilitu a myogenezi myokardu, tedy mezenchymální buňky a skeletální myoblasty. Časně po STEMI je pro zlepšení průběhu angiogeneze a pro zachranu hibernovaného myokardu výhodnější podat kmenové buňky kostní dřene, ke kterým jsou řazeny endoteliální progenitorové buňky (EPC), mononukleární buňky kostní dřene (BMSCs) a multipotentní buňky.^(20,32) Z hlediska klinického použití je nejslibnější aplikace BMSCs. Jde totiž o buňky relativně snadno dostupné, které lze získat v dostatečném množství trepanobiopsií z lopaty kosti kyčelní ve směsných populacích buněk (viz *obrázek 3*).

Z experimentálních studií vyplývá jejich relativně dobrá schopnost diferenciaci v CM a endotelové buňky,⁽³³⁾ uspokojivá integrace v místě poškozeného myokardu a bezpečnost aplikace.^(26,34-36) Potencují jak myokardiální regeneraci, tak neoangiogenezi.⁽³⁷⁻⁴¹⁾

2. Množství aplikovaných buněk

Doposud nebylo jasné, jaký počet aplikovaných KB je pro ovlivnění funkce LK „ideální“. V publikovaných klinických studiích se počty aplikovaných buněk pohybují v řádu od 10^7 – do 10^9 .^(28,34,42-44) Závěr metaanalýzy⁽¹⁴⁾ ukazuje na významné zlepšení funkce levé komory při podání KB v množství minimálně 10^8 .^(36,45-48)



Obrázek 1 Typy kmenových buněk – rozdělení dle potence (pluripotentní, multipotentní a unipotentní buňky)

Tabulka 1 Rozdělení a typy kmenových buněk

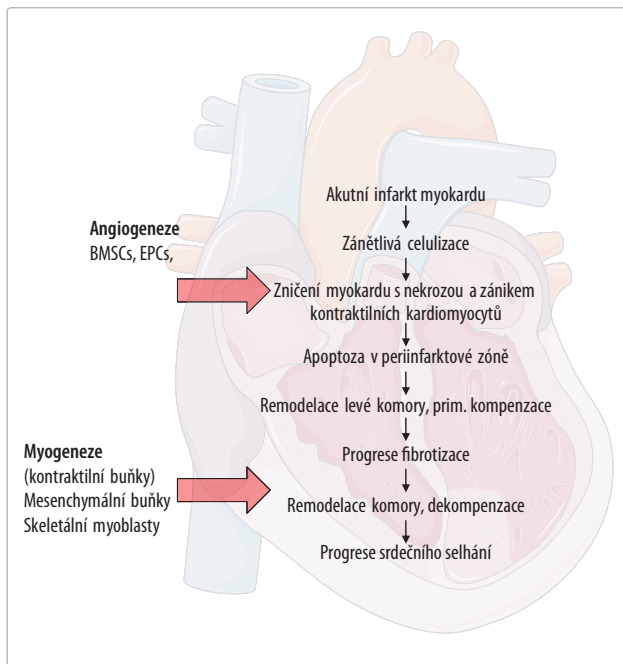
1. Dospělé kmenové buňky	<p>A. skeletální myoblasty – získávají se biopsií kosterního svalstva</p> <p>B. buňky kostní dřeně – tvoří 20 % buněčného obsahu kostní dřeně</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ mezenchymální buňky ■ multipotentní progenitorové buňky ■ hematopoetické kmenové buňky ■ endoteliální progenitorové buňky (EPCs) ■ monoklonální buňky kostní dřeně (BMSCs)
2. Embryonální kmenové buňky, fetální a neonatální KB	
3. Ostatní typy buněk organismu (potencionální zdroj KB)	naivní kardiomyocyty, adipocyty
KB – kmenové buňky, EPCs – endoteliální progenitorové buňky, BMSCs – mononukleární buňky kostní dřeně	

3. Výběr metody aplikace kmenových buněk

Způsob, jakým jsou KB do myokardu implantovány, může hrát důležitou roli z hlediska jejich integrace a ovlivnění myokardiální regenerace. Byla vyzkoušena řada různých metod aplikace (viz obrázek 4):

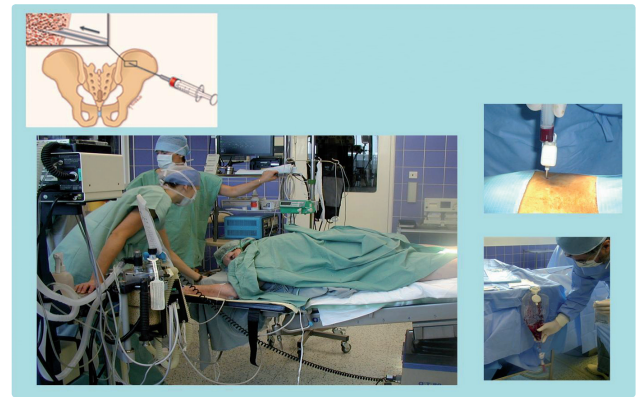
A. Intrakoronární aplikace

KB se aplikují katetrizační metodou s využitím balonkového katetru typu „over the wire“, který je zaveden standard-



Obrázek 2 Hypotéza výběru kmenových buněk vzhledem k jejich diferenciační schopnosti. Upraveno podle citací^(29,31)

BMSCs – mononukleární buňky kostní dřeně, EPCs – endoteliální progenitorové buňky kostní dřeně



Obrázek 3 Odběr kostní dřeně z lopaty kosti kyčelní

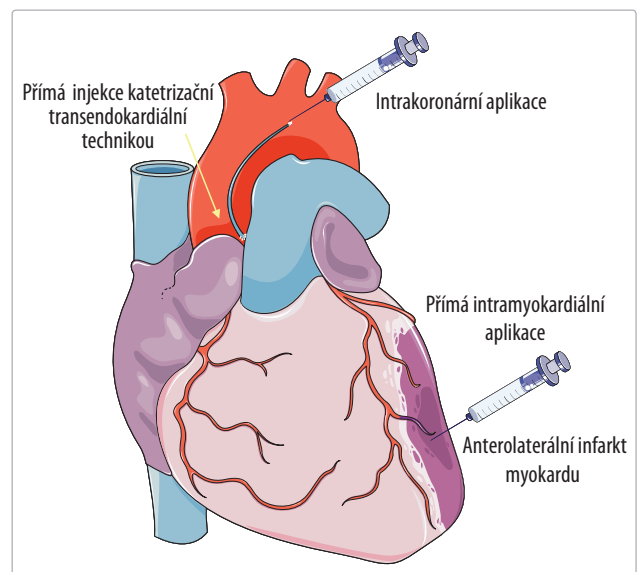
ní technikou do koronární tepny, kde na přechodnou dobu tepnu uzavírá. Luminem balonku jsou poté KB aplikovány za místo uzávěru tepny (viz obrázek 5). Tato metoda byla použita pro svoji relativní jednoduchost a minimální invazivitu ve velkém množství experimentálních i klinických studií.^(28,49)

B. Přímá intramyokardiální aplikace chirurgickou cestou menší písmo

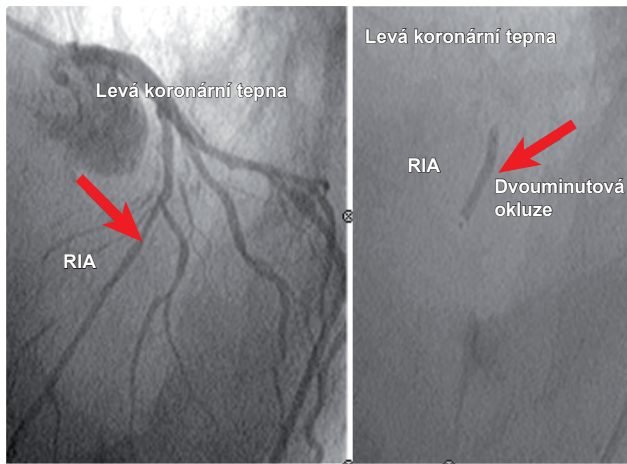
Tohoto postupu se využívá při kardiologických výkonech u nemocných indikovaných k chirurgické revaskularizaci myokardu – bypassové operace.^(45,50-58) Výhodou je možnost cílené přímé aplikace do ischemicky postiženého myokardu. Mezi nevýhody patří nízké množství aplikovaných buněk, potencionální arytmogenicita a vlastní invazivita chirurgické intervence.⁽⁵⁹⁾

C. Přímá injekce katetrizační transendokardiální technikou menší písmo

Jde o transendomyokardiální injekci KB z dutiny LK⁽⁵⁸⁾ s použitím tzv. techniky NOGA, která zároveň umožňuje



Obrázek 4 Metody aplikace kmenových buněk



Obrázek 5 Intrakoronární implantace kmenových buněk do ramus interventricularis anterior (RIA) metodou „over the wire PCI“ katetrem s balonkem o průměru 3,5 mm; aplikace 5 ml buněčného koncentráту během dvouminutové okluze tepny

elektromechanické mapování infarktového ložiska. Kmer-nové buňky jsou implantovány do ischemických oblastí myokardu pomocí speciálního katetru.^(60,61) Nevýhodou je finanční nákladnost a nutnost specializovaného technického zázemí. Probíhá několik studií využívajících tohoto způsobu aplikace; výsledky zatím nejsou k dispozici.

4. Načasování podání kmenových buněk po STEMI

Dosud není přesně znám optimální časový interval mezi STEMI a potenciačním nejdůležitějším účinkem podání buněčné terapie. Z metaanalýzy Martina-Rendona a spol.⁽¹⁴⁾ vyplývá lepší ovlivnění funkce komory, pokud byly buňky podány do sedmi dnů od STEMI. Podání KB v tomto časovém intervalu vedlo k signifikantnímu zlepšení EF LK ($p = 0,003$).

5. Mechanismus účinku kmenových buněk, potenciace myokardiální regenerace růstovými faktory

Současný názor na mechanismus účinku KB není zcela jednotný, pravděpodobně jde o jejich multifaktoriální působení.^(62,63) Jedna z hypotéz regenerace myokardu pomocí KB je založena na jejich schopnosti transdiferenciace v kardiomyocyty a integraci do myokardu.^(63,64) Velmi pravděpodobně tento mechanismus není stěžejní. Podle publikovaných prací⁽⁶²⁾ v myokardu zůstává za 20 hodin od aplikace pouze asi 1–2 % i.c. podaných buněk, což bylo prokázáno i ve studii provedené v České republice.⁽⁶⁵⁾

Druhou možností působení KB je parakrinní intercelulární stimulace regenerace myokardu chemokiny, které jsou produkovány jak vlastními buňkami organismu, tak jejich uvolněním podanými KB. Experimentálně byl potvrzen regulační účinek některých cytokinů: vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (vascular endothelial growth factor – VEGF), růstového faktoru hepatocytů (hepatocyte

growth factor – HGF) a faktoru stimulujícího kolonie (granulocyte-colony stimulating factor – G-CSF) u STEMI.⁽⁶⁶⁾ Dalším možným mechanismem je zabránění apoptotickému zániku kardiomyocytů v periinfarktové zóně, a tím zpomalení remodelace LK (viz obrázek 6).

Účinnost buněčné terapie, klinické studie

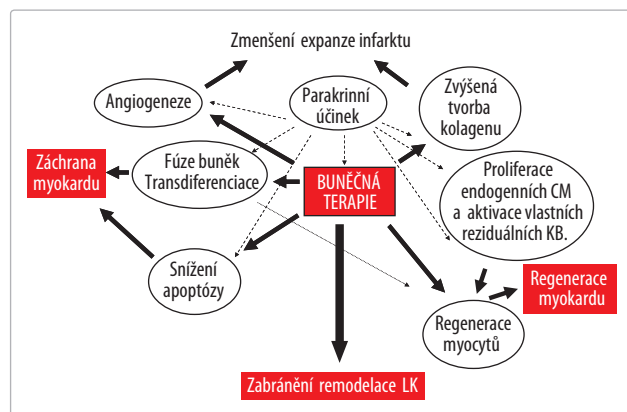
Experimentální studie prokazující určitou možnost regenerace myokardu přinesly převratnou změnu myšlení i v klinické sféře a vedly velmi brzy i k zahájení klinického výzkumu.

Studií bylo publikováno relativně velké množství, často však byly provedeny na malém souboru nemocných a mají velmi rozdílné uspořádání (rozdílné množství KB, způsob aplikace, načasování aplikace a také i variabilní indikace aplikace KB – STEMI, chronická ICHS, kardiomyopatie, terminální chronické srdeční selhání). Tento fakt výrazně limituje možnosti porovnat studie a provést jednoznačné závěry.

Z hlediska účinnosti buněčné terapie na zlepšení funkce LK jsou závěry studií rozporuplné. Některé prokázaly nevelký příznivý účinek,⁽⁶⁷⁻⁷⁰⁾ v jiných případech příznivý účinek nebyl prokázán.^(44,71) Přehled nejvýznamnějších randomizovaných studií uvádí *tabulka 2*.

V naší republice se této problematice věnovala dvě centra, a to v Praze (Všeobecná fakultní nemocnice ve spolupráci s nemocnicí na Vinohradech)^(65,72) a Brno (**kteřé pracoviště?**).^(65,69,72,73) Závěry jejich prací byly v souladu s výsledky zahraničních studií.

Výsledky a závěry všech těchto studií jsou velmi obtížně interpretovatelné pro velkou heterogenitu souborů. Za nejprehlednější komplexní shrnutí nejdůležitějších randomizovaných klinických prací týkajících se implantace KB u nemocných se STEMI, řešeným primárně koronární angioplastikou, lze považovat metaanalýzu Martina-Rendona a spol.⁽¹⁴⁾ Do této analýzy jsou zahrnuty větší randomizované studie s podobnou strukturou (13 studií, celkem zahrnuto 811 nemocných, BMSCs byly aplikovány po STEMI intrakoronárně). Medián sledování byl čtyři měsíce.



Obrázek 6 Pravděpodobné mechanismy působení KB na zlepšení funkce levé komory

KB – kmenové buňky, CM – kardiomyocyt, LK – levá komora

Tabulka 2 Souhrn nejdůležitějších randomizovaných studií, které se zabývají intrakoronární aplikací mononukleárních kmenových buněk

Studie	Počet nemocných	Efektivita aplikace BMSCs – zlepšení EF LK	Bezpečnost
Chen et al. ⁽⁷⁸⁾	n-69	+++	+++
Janssens et al. ⁽⁷⁹⁾	n-67	+/-	+++
ASTAMI ⁽⁴⁴⁾	n-100	-	+++
REPAIR-AMI ⁽⁷⁶⁾	n-201	++	+++
BOOST ⁽⁴²⁾	n-60	++/+	+++
HEBE-trial ^(71,80)	n-200	-	+++
SWISS-AMI	n-90	++	+++
FINCELL ⁽⁸¹⁾	n-80	++	+++
REGENT ⁽⁸²⁾	n-107	++/+++	+++

BMSCs – mononukleární kmenové buňky, EF LK – ejekční frakce levé komory

Z metaanalýzy Martina-Rendona vyplývají dva podstatné závěry

1. Intrakoronární aplikace BMSCs u nemocných se STEMI je bezpečná. Nebyl zachycen rozdíl v množství nežádoucích účinků v souvislosti s buněčnou terapií. Kombinovaný klinický ukazatel zahrnoval počet úmrtí, výskyt re-infarktů, nutnost hospitalizace pro srdeční selhání, nutnost revaskularizační terapie (koronární angioplastiky, srdečního bypassu), srovnání mezi aktivně léčenou skupinou (po aplikaci BMSCs) a skupinou kontrolní. Nebyl zaznamenán vyšší výskyt arytmií u pacientů, kterým byly BMSCs aplikovány.
2. Aplikace BMSCs vedla ke statisticky významnému zlepšení systolické funkce LK o 2,99 % (95% confidence interval [CI], 1,26–4,72 %, $p = 0,0007$). Zároveň byl prokázán signifikantní pokles end-systolického objemu levé komory o 4,74 ml (95% CI, -7,84 až -1,64 ml, $p = 0,003$). Došlo i k mírnému nevýznamnému poklesu end-diastolického objemu o 2,47 ml (95% CI, 5,65–0,71, $p = 0,13$). Podle SPECT bylo popsáno zmenšení rozsahu poškození o 3,51 % (95% CI, -5,91 až -1,11 %) ve srovnání s kontrolní skupinou. Tato metaanalýza dala i řadu dalších odpovědí na výše zmíněné základní otázky: potvrdila důležitost dostatečného množství aplikovaných buněk (nad 10^8) a nutnost správného načasování implantace buněk po STEMI (do sedm dní od STEMI).

Tolerance zátěže a kvalita života nemocných byla hodnocena pouze ve dvou studiích^(74,75) – s pozitivním trendem ve prospěch léčené skupiny BMSCs ve srovnání se skupinou kontrolní. Nicméně jde o příliš malou skupinu nemocných pro vyslovení jasných závěrů.

Kromě této relativně nové práce nelze opomenout další významnou metaanalýzu Abdela-Latifa a spol.⁽²⁸⁾ Je to práce, která shrnuje kompletně všechny klinické studie zabývající se implantací kmenových buněk u nemocných nejen se STEMI, ale také s jinými srdečními onemocněními (využi-

tí KB u chronického srdečního selhání, dilatační kardiomyopatie). Do hodnocení bylo zařazeno celkem 18 studií (999 pacientů – z toho s BMSCs 15 studií, s endoteliálními progenitorovými kmenovými buňkami tři studie, s mezenchymálními buňkami jedna studie), včetně studií z České republiky. Medián sledování nemocných byl čtyři měsíce (3–18 měsíců). V této práci se poukazuje na velkou heterogenitu studií; lišily se především dobou implantace KB (1–81dnů, medián 9,8 dnů po STEMI) a počty implantovaných KB (medián 80×10^6). Výsledky metaanalýzy naznačují, že implantace KB může vést ke zlepšení systolické funkce levé komory v průměru o 3,66 % (95% CI, 1,93 % až 5,40 %, $p = 0,001$); vede ke zmenšení infarktového ložiska o 5,49 % (95% CI, -9,10 % až -1,88 %, $p = 0,003$); poklesu end-systolického objemu o 4,80 ml (95% CI, -8,20 až -1,41 ml, $p = 0,006$). Také tato metaanalýza potvrdila bezpečnost aplikace KB. **Jsou zde správně ty minusové hodnoty?** Podrobnější analýza některých studií napověděla, že významnější užitek z implantace KB by mohli mít nemocní s těžkou systolickou komorovou dysfunkcí po IM, u kterých nedošlo k obnově kontraktilní funkce bezprostředně po příhodě. Zdá se také, že nemocní po implantaci KB mají příznivější dlouhodobý klinický průběh v časovém období dvou let.⁽⁷⁶⁾

O dlouhodobém účinku buněčné terapie jsou jen sporadické zprávy. Pozitivní primární účinek na systolickou funkci levé komory zjištěný ve studii BOOST⁽⁴²⁾ neměl po 18 měsících při srovnání s kontrolami již významný účinek.⁽⁴⁵⁾ Recentně byly publikovány výsledky pětiletého sledování 62 nemocných ve studii BALANCE⁽⁷⁷⁾ (kontrolní skupina tvořena nemocnými, kteří buněčnou terapii odmítli – jednalo se tedy o nerandomizovanou studii), ve které bylo popsáno zlepšení systolické funkce levé komory v aktivně léčené skupině a přetrvávalo i po pětiletém sledování; zatímco u kontrol se funkce během sledované doby zhoršila (56,9 vs. 46,9 %). Byla popsána i signifikantní redukce infarktového ložiska v aktivně léčené skupině (-8,2 % vs. -5,3 %). Nemocní v aktivně léčené skupině měli také po pěti letech statisticky výrazně nižší mortalitu (13 % vs. 24 %, $p = 0,03$). Je to tedy první studie, která naznačuje, že nevelké zlepšení systolické funkce levé komory po aplikaci se v dlouhodobé perspektivě mohlo pozitivně promítnout do zásadních klinických ukazatelů průběhu onemocnění.

Definitivní odpověď na přetrvávající nejistotu o klinické účinnosti implantace kmenových buněk po infarktu myokardu mohou dát jen velké randomizované studie s počtem pacientů dostatečným na sledování klinických cílových ukazatelů. Takové studie v současné době probíhají (BOOST 2, REPAIR – AMI 2) a jejich výsledky lze očekávat v nejbližších dvou letech.

Závěr

Výsledky dosud provedených klinických studií, zabývajících se implantací KB u pacientů po STEMI, jsou poněkud rozporuplné. Jde o práce s velkým rozptylem jednotlivých klíčových proměnných (typ a množství KB, typ a způsob implantace, doba načasování od STEMI), což vede k obtížím

ve srovnávání. Vzhledem k řadě dosud nedořešených otázek, pokud jde o mechanismu účinku i nejednoznačnému průkazu klinické účinnosti, nelze ještě v současné době tuto metodu standardně používat v klinické praxi. Před rozšířením do klinického užívání bude nutné dořešit řadu základních problémů, především dalším výzkumem v experimentální oblasti. V první řadě je nezbytné zaměřit se na mechanismy účinku KB a biologii reparačních procesů, zprostředkovaných kmenovými buňkami myokardu. Definitivní možnosti případného klinického využití mohou ukázat jen velké randomizované studie; některé v současné době probíhají, jiné se plánují.

Literatura

- Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation* 2000;102:1193–209.
- Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2000;36:970–1062.
- Widimsky P, Zelizko M, Jansky P, Tousek F, Holm F, Aschermann M. The incidence, treatment strategies and outcomes of acute coronary syndromes in the „reperfusion network“ of different hospital types in the Czech Republic: results of the Czech evaluation of acute coronary syndromes in hospitalized patients (CZECH) registry. *Int J Cardiol* 2007;119:212–9.
- Widimsky P, Gregor P, Dvorak J, et al. [The optimal diagnostic approach in myocardial infarct]. *Vnitř Lék* 1993;39:160–5.
- Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003;361:13–20.
- Lichtman JH, Spertus JA, Reid KJ, et al. Acute Noncardiac Conditions and In-Hospital Mortality in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2007;116:1925–30.
- Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81:1161–72.
- Wollert KC, Drexler H. Carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) trial: carvedilol as the sun and center of the beta-blocker world? *Circulation* 2002;106:2164–6.
- Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006;367:356–67.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701–5.
- Anversa P, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Leri A. Primitive cells and tissue regeneration. *Circ Res* 2003;92:579–82.
- Antonio Abbate GGLB-ZAB. Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling. *Journal of Cellular Physiology* 2002;193:145–53.
- Dimmeler S, Burchfield J, Zeiher AM. Cell-Based Therapy of Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:208–16.
- Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008;29:1807–18.
- Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 2002;91:1092–102.
- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 2001;105:829–41.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001;105:369–77.
- Goodell MA, Jackson KA, Majka SM, et al. Stem cell plasticity in muscle and bone marrow. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:208–18; discussion 218–20.
- Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763–76.
- 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;7:430–6.
- 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;123:1132–40.
- Moelker AD, Baks T, van den Bos EJ, et al. Reduction in infarct size, but no functional improvement after bone marrow cell administration in a porcine model of reperfused myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:3057–64.
- Urbich C, Rossig L, Dimmeler S. Restoration of cardiac function with progenitor cells. *Novartis Found Symp* 2006;274:214–23; discussion 223–7, 272–6.
- Yoon YS, Wecker A, Heyd L, et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005;115:326–38.
- Marzullo P. Nuclear imaging after cell implantation. *Int J Cardiol* 2004;95 (Suppl 1):S53–4.
- Rosenstrauch D, Poglajen G, Zidar N, Gregoric ID. Stem celltherapy for ischemic heart failure. *Tex Heart Inst J* 2005;32:339–47.
- Oral H, Sivasubramanian N, Dyke DB, et al. Myocardial proinflammatory cytokine expression and left ventricular remodeling in patients with chronic mitral regurgitation. *Circulation* 2003;107:831–7.
- Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167:989–97.
- Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998;4:929–33.
- Ott HC, Matthies TS, Brechtken J, et al. The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4 (Suppl 1):S27–39.
- Ott HC, Davis BH, Taylor DA. Cell therapy for heart failure—muscle, bone marrow, blood, and cardiac-derived stem cells. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2005;17:348–60.
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001;103:634–7.
- Villa A, Sanchez PL, Fernandez-Aviles F. Ventricular arrhythmias following intracoronary bone marrow stem cell transplantation. *Europace* 2007;9:1222–3.
- Bartunek J, Vanderheyden M, Wijns W, et al. Bone-marrow-derived cells for cardiac stem cell therapy: safe or still under scrutiny? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4 (Suppl 1):S100–5.
- Bartunek J, Wijns W, Heyndrickx GR, Vanderheyden M. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cell transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 (Suppl 1):S52–6.
- Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210–21.
- Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, 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;104:1046–52.
- Jackson KA, Majka SM, Wang H, et al. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395–402.
- Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, 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;37:1726–32.
- Itescu S, Kocher AA, Schuster MD. Myocardial neovascularization by adult bone marrow-derived angioblasts: strategies for improvement of cardiomyocyte function. *Heart Fail Rev* 2003;8:253–8.
- Kueth F, Krack A, Fritzenwanger M, et al. Treatment with granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. Evidence for a stimulation of neovascularization and improvement of myocardial perfusion. *Pharmazie* 2006;61:957–61.
- Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141–8.
- Schachinger 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;44:1690–9.

44. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 2005;39:150–8.
45. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, 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;113:1287–94.
46. Kang HJ, Lee HY, Na SH, 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;114 (Suppl):145–51.
47. Huang RC, Yao K, Zou YZ, et al. [Long term follow-up on emergent intracoronary autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute inferior-wall myocardial infarction]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2006;86:1107–10.
48. Suarez de Lezo J, Herrera C, Pan M, et al. [Regenerative therapy in patients with a revascularized acute anterior myocardial infarction and depressed ventricular function]. *Rev Esp Cardiol* 2007;60:357–65.
49. Assmus B, Walter DH, Lehmann R, et al. Intracoronary infusion of progenitor cells is not associated with aggravated restenosis development or atherosclerotic disease progression in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:2989–95.
50. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10344–9.
51. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428:664–8.
52. Stamm C, Westphal B, Klein HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45–6.
53. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078–83.
54. Herreros J, Prosper 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;24:2012–20.
55. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, et al. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:879–88.
56. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, et al. [Autologous transplantation of skeletal myoblasts in the treatment of postinfarction left heart dysfunction: three-month follow-up]. *Kardiol Pol* 2004;60 (Suppl 1):1–71–6.
57. Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:1920–7.
58. Fuchs S, Satler 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;41:1721–4.
59. Fukuda K, Fujita J. Mesenchymal, but not hematopoietic, stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction in mice. *Kidney Int* 2005;68:1940–3.
60. Perin EC, Dohmann HF, 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 1):II213–8.
61. Tse HF, Thambar S, Kwong YL, et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J* 2007;28:2998–3005.
62. Fukuda K, Yuasa S. Stem cells as a source of regenerative cardiomyocytes. *Circ Res* 2006;98:1002–13.
63. Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107:1024–32.
64. Li CJ, Gao RL, Yang YJ, et al. [Autologous bone marrow mononuclear cells and peripheral endothelial progenitor cells differentiation in myocardial ischemia reperfusion injury region in swine]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2007;35:350–3.
65. Penicka M, Widimsky P, Kobylka P, Kozak T, Lang O. Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation* 2005;112:e63–5.
66. Wojakowski W, Tendera M, Zebzda A, et al. Mobilization of CD34(+), CD117(+), CXCR4(+), c-met(+) stem cells is correlated with left ventricular ejection fraction and plasma NT-proBNP levels in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27:283–9.
67. 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;363:751–6.
68. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106:1913–8.
69. Meluzin J, Mayer J, Groch L, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006;152:975:e9–15.
70. Janssens S, Theunissen K, Boogaerts M, Van de Werf F. Bone marrow cell transfer in acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 (Suppl 1):S69–72.
71. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, et al. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction treated with primary PCI: Pilot study of the multicenter HEBE trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008;71:273–81.
72. Penicka M, Horak J, Kobylka P, et al. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2373–4.
73. Meluzin J, Janousek S, Mayer J, et al. Three-, 6-, and 12-month results of autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2007. **chybí ročník a strany**
74. Karpov RS, Popov SV, Markov VA, et al. Autologous mononuclear bone marrow cells during reparative regeneration after acute myocardial infarction. *Bull Exp Biol Med* 2005;140:640–3.
75. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) randomized controlled trial. *Am Heart J* 2007;154:710:e1–8.
76. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006;27:2775–83.
77. Yousef M, Schannwell CM, Kostering M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:2262–9.
78. 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;94:92–5.
79. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367:113–21.
80. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, et al. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells or peripheral mononuclear blood cells after primary percutaneous coronary intervention: rationale and design of the HEBE trial—a prospective, multicenter, randomized trial. *Am Heart J* 2006;152:434–41.
81. Huikuri HV, Kervinen K, Niemela M, et al. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29:2723–32.
82. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, 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. **chybí ročník a strany**

Došlo do redakce?????

Přijato po úpravách 23. 6. 2009