Buněčná léčba ischemické choroby srdeční: přehled poznatků, limitace, perspektivy*

Část druhá. Kmenové buňky, perspektivy buněčné léčby

Martin Pěnička, Petr Widimský, Tomasz Siminiak*, Otto Lang**,
Karol Čurila, Kateřina Hesová

III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, **Klinika nukleární medicíny,
Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika,
*Kardiologická klinika, Lékařská fakulta, Krajská nemocnice, Poznaň, Polsko

Pěnička M, Widimský P, Siminiak T*, Lang O**, Čurila K, Hesová K (III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, **Klinika nukleární medicíny, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady a 3. lékařská fakulta Univerzity Karlovy, Praha, Česká republika, *Kardiologická klinika, Lékařská fakulta, Krajská nemocnice, Poznaň, Polsko). **Buněčná léčba ischemické choroby srdeční: přehled poznatků, limitace, perspektivy. Část druhá. Kmenové buňky, perspektivy buněčné léčby.** *Cor Vasa* 2006;48(6):234–241.

Tento přehledný článek pojednává o současném pohledu na buněčnou léčbu ischemické choroby srdeční a možnostech regenerace myokardu. V první části jsme se věnovali úvodu do problematiky, způsobům transplantace buněk do myokardu a kosterním myoblastům. Druhá část se zabývá kmenovými buňkami a perspektivami buněčné léčby.

Klíčová slova: Regenerace myokardu – Kmenové buňky – Myoblasty – Ischemická choroba srdeční

Pěnička M, Widimský P, Siminiak T*, Lang O**, Čurila K, Hesová K (Department of Medicine-Cardiology III, Cardiocenter, **Department of Nuclear Medicine, Královské Vinohrady University Hospital and Charles University Medical School 3, Prague, Czech Republic, *Department of Cardiology, University School of Medical Sciences, District Hospital, Poznań, Poland). **Cellular therapy of coronary heart disease: a review of concepts, limitations, prospects. Part Two. Stem cells, prospects of cellular therapy.** *Cor Vasa* 2006;48(6):234–241.

This review examines the current concepts of cellular therapy of ischemic heart disease and the potential of myocardial regeneration. Part One provided background information and discussed techniques of cell myocardial implantation and skeletal myoblasts. Part Two examines the issue of stem cells and prospects of cellular therapy.

Key words: Myocardial regeneration – Stem cells – Myoblasts – Coronary heart disease

Adresa: MUDr. Martin Pěnička, Ph.D., III. interní-kardiologická klinika, Kardiocentrum, FN KV a 3. LF UK, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10, Česká republika, e-mail: penicka@fnkv.cz

KMENOVÉ A PROGENITOROVÉ BUŇKY ODVOZENÉ Z KOSTNÍ DŘENĚ

Kmenové buňky (KB) reprezentují specifickou populaci buněk, která je charakterizovaná schopností sebeobnovy, multipotencí (schopnost diferenciací do derivátů všech tří zárodečných listů po implantaci do blastocysty) a klonogenitou (schopnost rodit kolonie různých diferencovaných somatických buněk).⁽¹⁾ Transplantace KB byla původně prováděna z hematologických indikací, ale díky potenciálu regenerovat různé tkáně tato metoda zaznamenala obrovský vzestup v řadě oborů současné medicíny. Účinky KB na poškozené tkáně jsou intenzivně studovány například v neurologii (transverzální léze míšni, Parkinsonova nemoc), ortopedii (náhrada kloubní chrupavky)

a samozřejmě v kardiologii. Zájem o KB v kardiologii vzbudila pilotní práce amerických autorů,⁽²⁾ kteří prokázali masivní regeneraci infarktového myokardu u myši, kde 53 % nově tvořených kardiomyocytů vzniklo z transplantovaných KB. Tato studie vzbudila obrovské nadšení, neboť regenerace lidského srdce byla do té doby nesplněným snem mnoha vědců. V současné době se výzkumu KB věnuje značné úsilí a v mnoha vyspělých zemích běží několik projektů zaměřených na tuto problematiku. KB se u dospělého organismu nalézají ve specifických oddílech charakterizovaných vhodným mikroprostředím (tzv. „niches“), jako například kostní dřev.⁽³⁾ V současné době je popsáno několik typů KB; např. KB odvozené z kostní dřev, cirkulující progenitorové buňky, KB z tukové tkáně, KB ze synovie, KB nervové tkáně,

*Tato práce byla podpořena grantem Evropské komise č. LSSM-CT-2004-511992 a Výzkumným záměrem Univerzity Karlovy v Praze č. MSM 00 21620817, uděleným Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

rezidentní kardiální KB, KB hladkého svalu aj. Transplantace většiny typů KB u experimentálního infarktu myokardu vedla ke zlepšení regionální perfuze, kinetiky i globální funkce levé komory srdeční (LKS). To je velice fascinující, ale i zároveň znepokojující fenomén, který vyvolává závažné otázky. Jaký je mechanismus účinku, který spojuje všechny tyto rozdílné buňky? Jedná se o regeneraci myokardu nebo spíše jde o nespecifickou sekreci parakrinně účinných cytokinů?

Nejvíce literárních údajů je dostupných pro kmenové buňky odvozených z kostní dřeně (KBKD). Kostní dřeň dospělého lidského organismu je tvořena jednak podpurnou tkání, jednak populací mononukleárních buněk, která tvoří asi 20 % buněčného obsahu kostní dřeně. Tato mononukleární populace obsahuje i několik typů KB s potenciálem opravit experimentální infarkt myokardu.^(2,4-12) Jsou to zejména hematopoietické KB nesoucí povrchový antigen CD34, mezenchymální (stromální) KB vymezené přítomností antigenu CD44 při chybění CD34 a CD45, KB charakterizované povrchovým antigenem ACC133+ a progenitorové buňky. Přes přítomnost specifických povrchových antigenů se jednotlivé populace KBKD značně překrývají. Zastoupení jednotlivých populací KBKD je obdobné a tvoří pouze 0,5–1 % z mononukleární populace, čili KBKD jsou relativně vzácné. V současnosti není známo, který buněčný typ je nejvhodnější pro klinické aplikace. Řada vědců se dokonce přiklání k názoru, že spolu mohou různé typy KBKD užitečně spolupracovat. Proto se ve většině pilotních klinických studií používá celá nedělená mononukleární populace kostní dřeně.

KBKD se kontinuálně uvolňují do cirkulace, kde dozrávají a stávají se z nich tzv. cirkulující progenitorové buňky, které jsou již specificky předurčené pro jednotlivé tkáně. Podle nejnovějších teorií slouží tyto cirkulující progenitory k náhradě ztrát opotřebovaných buněk jednotlivých tkání organismu, které vznikají běžným denním provozem.⁽¹³⁾ Nejvíce jsou v tomto ohledu prostudovány tzv. endoteliální progenitorové buňky (EPC), které se podílejí fyziologicky na obnově poškozeného endotelu a za patologických podmínek (infarkt myokardu, poranění) spolu s monocytami na neovaskularizaci. Cirkulující EPC brání rozvoji endoteliální dysfunkce, prvnímu stupni aterosklerózy. Jedinci, kteří mají méně EPC, jsou ve větším riziku rozvoje aterosklerotických komplikací. EPC inverzně korelují s Framinghamským skóre kardiovaskulárního rizika a endoteliální funkcí, měřenou reaktivitou brachiální arterie.^(14,15) Nejméně EPC mají jedinci s již rozvinutou ischemickou chorobou srdeční (ICHS). Pravidelné cvičení a statiny vedou k mobilizaci EPC, zlepšení jejich diferenciací i proliferační aktivity a zpomalení jejich stárnutí.^(16,17) Počet cirkulujících EPC je proto nyní považován za nový marker endoteliální dysfunkce a rizikový faktor progrese aterosklerózy. Poškození tkání, např. infarkt myokardu, vede k mnohonásobnému vyplavení progenitorových buněk z kostní dřeně,^(18,19) které pak migrují po specifických gradientech (SDF-1-CXCR4, HGF-c-M, LIF-LIF-R) do místa poškození, kde se podílejí na hojení. Z klinické zkušenosti však víme, že ani zvýšená mobilizace progenitorových buněk nevede k záchraně infarzovaného myokardu.

Preklinické studie

Většina z dnes (již desítek) provedených experimentálních prací popisuje shodně následující účinky po transplantaci KBKD do infarzovaného myokardu: zvýšení krevního průtoku a zmenšení velikosti infarktového ložiska, vzestup ejekční frakce, zmenšení rozsahu a zpomalení remodelace LKS.^(4-6,8,10,11,20,22) Tyto účinky jsou pozorovány i přesto, že se v myokardu úspěšně zachytí a přežívá maximálně 3 % transplantovaných KBKD.^(12,23-25)

MECHANISMUS ÚČINKU

Nejdříve se vědci domnívali, že hlavním mechanismem pozorovaných účinků je regenerace myokardu, tedy transdiferenciace KBKD do funkčních kardiomyocytů. Podklad k těmto domněnkám daly pilotní práce Orlica a spol.⁽²⁾ i jiných,⁽⁸⁾ které prokazovaly tvorbu nových kardiomyocytů z podaných hematopoietických KBKD. Nicméně další studie tyto nadějně výsledky nepotvrdily⁽²⁶⁻²⁸⁾ a naopak ukázaly, že z hematopoietických KBKD vznikají v infarktovém ložisku krvinky a KBKD se tak diferencují cestou svého původního předurčení. Otázka regenerace myokardu je tedy vysoce kontroverzní. Zůstává faktem, že buňky nalézané v okrajových zónách infarktu nesou znaky jak kardiomyocytů, tak KBKD. Tyto buňky však vznikají nejspíše fúzí mezi oběma typy a nikoliv transdiferenciací KBKD do kardiomyocytů. Fúze s KBKD má zřejmě protektivní vliv na kardiomyocyty. Převažuje názor, že k transdiferenciaci do kardiomyocytů dochází jen ve velice zanedbatelné míře, pokud vůbec, a tudíž se na pozorovaných funkčních účincích nepodílejí.

Konzistentním nálezem ve všech studiích je průkaz novotvorby cév (neovaskularizace).^(4,6,11,20,22) Vznikají nejen kapiláry, ale i větší cévy, jako např. arterioly nebo kolaterály. Zlepšuje se perfuze centra infarktu i periinfarktových zón. Avšak hlavním mechanismem účinku KBKD je parakrinní sekrece mnoha cytokinů, které brání apoptóze přežívajících kardiomyocytů v periinfarktových zónách (*obrázek 1*), přispívají k angiogenezi a atrahují další KB do infarktového ložiska.^(29,30) Pro tuto hypotézu hovoří několik dalších faktů:

Obr. 1 Týden starý infarkt myokardu. Bílá šipka ukazuje nekrotické centrum infarktu, žluté šipky ukazují pruh periinfarktové tkáně s přežívajícími, leč ohroženými kardiomyocyty; transplantace KBKD vede k záchraně těchto kardiomyocytů parakrinním účinkem

Tabulka I
Studie BOOST – Ejekční frakce, objemy LKS a velikost infarktu hodnocená magnetickou rezonancí na začátku studie a po 6 měsících

	PCI + KBKD (n = 30)		PCI (n = 30)	
	Začátek	6 měsíců	Začátek	6 měsíců
EF LKS (%)	50	57*	51	52
EDVI LKS (ml/m ²)	84	92	81	85
ESVI LKS (ml/m ²)	43	42	41	43
Velikost infarktu (ml)	33	19	30	20

**p* = 0,0026 – skupina PCI + KBKD vs. skupina PCI

EDVI – enddiastolický objem LKS normalizovaný na povrch těla, EF – ejekční frakce, ESVI – endsystolický objem LKS normalizovaný na povrch těla, KBKD – kmenové buňky kostní dřene, LKS – levá komora srdeční, PCI – perkutánní koronární intervence

1. U středně velkého infarktu myokardu dochází ke ztrátě přibližně 1×10^9 kontraktálních buněk. Průměrný počet transplantovaných mononukleárních buněk se pohybuje právě kolem 1×10^9 . Nicméně v této populaci je pouze 1 % KBKD, tj. asi 10 milionů. Z podaných mononukleárních buněk se v myokardu uchytí maximálně 3 %, tj. 300 000 KBKD. Toto množství je zřejmě dostatečné pro záchranu kardiomyocytů v periinfarktových zónách parakrinním účinkem. Avšak žádná podstatná regenerace myokardu, i kdyby k ní docházelo, se zde nedá očekávat (300 000 zachycených vs. 1 miliarda potřebných).
2. Pozorované funkční účinky nejsou závislé na dávce transplantovaných buněk. Stejně účinky jsou pozorovány po transplantaci 100 milionů i 5 miliard mononukleárních buněk.

Shrnutí. Hlavním mechanismem účinku KBKD je záchrana přežívajících kardiomyocytů v periinfarktové zóně kombinací neovaskularizace a ochrany proti apoptóze. Z výše napsaného je tedy jasné, že od v současnosti používaných naivních KBKD nelze očekávat, že zabrání dilataci LKS po infarktu myokardu a případné funkční účinky budou malé. Výsledky z pilotních randomizovaných studií jsou zcela v souladu s těmito předpoklady.

Klinické studie

Na rozdíl od experimentálních prací, kde se používá více či méně specificky vymezený typ KBKD, v klinických studiích se nejčastěji transplantuje celá nedělená mononukleární populace buněk kostní dřene nebo cirkulující progenitorové buňky. KBKD se získávají z kostní dřene, progenitorové buňky z periferní krve. Dřeňová krev (100–300 ml) se aspiruje z lopat obou kyčelních kostí v kombinaci lokální anestezie a analgosedace. Krev z jednotlivých aspirací (asi 3 ml) se shromažďuje ve speciálních sběrných vacích, poté je bezprostředně převezena do příslušné laboratoře k dalšímu zpracování. Mononukleární buňky se izolují za použití centrifugace podle Ficolla na speciálním mediu. Po promytí se buňky vpraví do 20–30 ml media s přidávkou 10% autologní plazmy a jsou připraveny k transplantaci. Aplikované množství mononukleárních buněk se pohybuje od 1×10^8 až do 5×10^9 . Při přípravě specifických typů KBKD (např. ACC133) je nutná selekce v magnetickém poli pomocí specifických protilátek označených sloučeninami železa. Z 300 ml odebrané dřeňové krve lze

izolovat několik milionů buněk ACC133+. Cirkulující EPC se získávají z venózní krve. Odebírá se asi 250 ml krve. Po separaci výše popsanou technikou podle Ficolla se mononukleární buňky kultivují 3–7 dní v kádinkách potažených fibronektinem v mediu s VEGF, atorvastatinem a autologním sérem. Poté se progenitorové buňky vpraví do 20–30 ml media s autologní plazmou a jsou připraveny k transplantaci.

AKUTNÍ INFARKT MYOKARDU

Pilotní nerandomizované studie^(31,32) s intrakoronární injekcí mononukleárních buněk kostní dřene anebo cirkulujících EPC demonstrovaly zlepšení regionální perfuze, viability a kontraktální funkce infarktového ložiska, rovněž i zlepšení globální ejekční frakce LKS u intervenované skupiny ve srovnání s reprezentativní kontrolní skupinou. Transplantace KBKD se ukázala být léčbou bezpečnou a klinicky jednoduše použitelnou. První randomizovaná studie publikovaná *in extenso* je studie BOOST.⁽³³⁾ V této studii bylo randomizováno 60 pacientů s prvním akutním infarktem myokardu a úspěšnou PCI do skupiny léčené standardní postinfarktovou léčbou a skupiny, která navíc podstoupila intrakoronární transplantaci KBKD v odstupu 4,8 dní od PCI. Primárním ukazatelem byla změna ejekční frakce LKS hodnocená magnetickou rezonancí po 6 měsících. Během sledování nebylo pozorováno žádné úmrtí. U pacientů, kteří dostali KBKD, se zlepšila regionální kontraktilita v periinfarktových zónách (záchrana přežívajících kardiomyocytů), kdežto kontraktální funkce v centru infarktu zůstala nezměněna. Po 6 měsících došlo k významnému vzestupu ejekční frakce LKS v intervenované skupině ve srovnání se skupinou kontrolní (tabulka I). Hlavní kritika této studie byla, že se ejekční frakce zlepšila na úkor dilatace LKS.

Také chybění vzestupu ejekční frakce v kontrolní skupině vzbudilo četné diskuse, neboť po akutním infarktu myokardu ošetřeném primární PCI se ejekční frakce LKS zvyšuje v průměru o 5 %. Infarktové ložisko se na magnetické rezonanci zmenšilo u obou skupin. Zmenšení infarktového ložiska v kontrolní skupině je velice důležité zjištění, protože v pilotních studiích se zmenšení infarktu přisuzovalo účinku KBKD. Nebyl známý přirozený vývoj infarktového ložiska při zobrazení moderními metodami, jako jsou např. pozitronová emisní tomografie nebo magnetická rezonance. Až randomizované studie s KBKD vnesly více světla do této problematiky. Závěr je, že studie

Tabulka II

Studie REPAIR AMI. Klinické výsledky, ejekční frakce a objemy LKS hodnocené levokomorovou ventrikulografií na začátku studie a po 4 měsících

	KBKD (n = 95)		Sérum (n = 92)	
	Začátek	4 měsíce	Začátek	4 měsíce
EF LKS (%)	48	54*	47	50
EDV LKS (ml)	↑		↑	
ESV LKS (ml)	↑		↔	
Úmrtí	2		2	
Opakované revaskularizace	shodné u obou skupin			

* $p < 0,01$ – KBKD vs. sérum

EDV – enddiastolický objem LKS, EF – ejekční frakce, ESV – endsystolický objem LKS, KBKD – kmenové buňky kostní dřeně, LKS – levá komora srdeční

BOOST byla hodnocena jako negativní studie. Nyní je k dispozici i osmnáctiměsíční sledování těchto pacientů,⁽³⁴⁾ které přineslo velice zajímavé výsledky. Zatímco u intervenované skupiny se ejekční frakce již dále neměnila (50 vs. 57 % vs. 56 %, začátek vs. 6 měsíců vs. 18 měsíců), u kontrolní skupiny došlo k vzestupu (51 % vs. 52 % vs. 55 %). Výsledná ejekční frakce se mezi oběma skupinami významně nelišila. Dvě randomizované studie použily placebo, tzn., že i pacienti v kontrolní skupině podstoupili druhou katetrizaci, při které se intrakoronárně aplikovalo autologní sérum.^(35,36) V menší belgické studii⁽³⁵⁾ bylo randomizováno 60 pacientů do aktivní (KBKD) a kontrolní (sérum) skupiny. KBKD byly implantovány druhý den po infarktu myokardu. Po 4 měsících došlo k většímu zlepšení viability hodnocené pozitronovou emisní tomografií u aktivní skupiny ve srovnání s kontrolní skupinou. Změna ejekční frakce byla podobná u obou skupin. Největší dosud publikovaná multicentrická studie REPAIR AMI⁽³⁶⁾ randomizovala 204 pacientů v 17 centrech k intrakoronární infuzi KBKD nebo autologního séra. Primárním ukazatelem byla změna ejekční frakce za 4 měsíce hodnocená levokomorovou ventrikulografií (tabulka II). Ejekční frakce se zlepšila u obou skupin, ale v aktivní skupině významně více. K dilataci levé komory sedeční došlo u obou skupin. Norská randomizovaná studie ASTAMI (52 vs. 49 pacientů) žádné rozdíly v ejekční frakci nebo remodelaci LKS mezi aktivní a kontrolní skupinou nezaznamenala.⁽³⁷⁾ Výsledky randomizovaných studií jsou tedy víceméně rozpačité. Navíc, ve

všech studiích se jedná o pacienty s malým infarktem myokardu. Je sporné, zda 50% ejekční frakce přináší nemocnému jiné prognostické a funkční vyhlídky než 55% ejekční frakce. Údaje u nemocných s velkým infarktem myokardu, kteří by mohli mít teoreticky z transplantace KBKD největší prospěch, chybí. Malé zlepšení viability infarzovaných segmentů a ejekční frakce v aktivní skupině je vysvětlitelné záchranou kardiomyocytů v periinfarktových zónách parakrinním účinkem. Dalším problémem zůstává, stejně jako v případě myoblastů nízký, a v některých případech jen přechodný, záchyt transplantovaných KBKD v infarktovém ložisku. V naší studii zůstalo v myokardu po 20 hodinách pouhé 1 % z transplantovaných KBKD, a to jen u některých pacientů (obrázek 2).⁽³⁸⁾ Tyto výsledky jsou v souladu s experimentálními údaji.^(23–25)

CHRONICKÁ ISCHEMICKÁ CHOROBA SRDEČNÍ

V prvních studiích u chronické ischemické choroby srdeční byla používána přímá injekce KBKD do myokardu v průběhu koronárního bypassu.^(39,40) Autoři pozorovali zlepšení perfuze a novotvorbu kolaterál v transplantovaných segmentech. Jiní se vydali cestou katetrizační a implantovali KBKD do myokardu z dutiny LKS.^(41,42) Tse a spol.⁽⁴²⁾ studovali 8 pacientů s refrakterní námahovou anginou pectoris přes maximální medikamentózní terapii. Po transplantaci došlo ke zlepšení anginy, perfuze a kontraktility v ischemických segmentech. Perin a spol.⁽⁴¹⁾ implantovali

Obr. 2 Příklad orgánové distribuce KBKD označených radioizotopem ^{99m}Tc -HMPAO u pacienta s akutním předním infarktem myokardu. KBKD byly transplantovány intrakoronárně do povodí RIA. Levá část obrázku ukazuje celotělové snímky v přední (A) a zadní (P) projekci za 2 hodiny po injekci. Pravá část obrázku představuje detailní snímek hrudníku v levé šikmé (45°) přední projekci za 20 hodin po injekci. Po dvou hodinách byla významná radioaktivita detekovaná ve slezině, játrech, plicích, močovém měchýři a cirkulující krvi. V myokardu byly KBKD distribuovány v celém povodí RIA (šipka) a celková aktivita srdce činila 4,5 %. Snímek po dvaceti hodinách ukazuje trvalý

záchyt transplantovaných KBKD (1,34 %) v hrotových segmentech LKS (šipka), tj. v místě infarktu a v periinfarktových zónách. Nicméně, většina buněk byla lokalizována ve slezině.

Obr. 3 Příklad orgánové distribuce KBKD označených ^{99m}Tc -HMPAO u pacienta s chronickým ischemickým srdečním selháním. KBKD byly transplantovány intrakoronárně do povodí RIA. Levá část obrázku ukazuje celotělové snímky v přední projekci za 2 hodiny a pravá část obrázku za 20 hodin po injekci. Srdce je označeno šipkou. Po dvou hodinách byl signál z označených KBKD v myokardu detekován v oblasti jak přední, tak i spodní stěny LKS. Po dvaceti hodinách nebyla žádná aktivita pozorována v žádném segmentu myokardu. Velké oblasti radioaktivity byly přítomné v játrech a ve slezině, jak po dvou, tak i po dvaceti hodinách.

KBKD do hibernovaného myokardu u pacientů s těžkým chronickým srdečním selháním. V průběhu sledování došlo k malému zlepšení perfuze a ejekční frakce. Ve dvou studiích byla použita k transplantaci KBKD intrakoronární injekce.^(43,44) Ve studii IACT⁽⁴³⁾ byly KBKD transplantovány 18 pacientům se starým infarktem myokardu. Po třech měsících se ejekční frakce hodnocená levokomorovou ventrikulografií zlepšila z 52 % na 60 %. Jediná randomizovaná studie je TOPCARE-Crossover,⁽⁴⁴⁾ kde byli pacienti s chronickou ischemickou dysfunkcí LKS randomizováni do tří skupin: cirkulující progenitorové buňky ($n = 24$), KBKD ($n = 28$) a kontrolní ($n = 23$). Primárním ukazatelem byla změna ejekční frakce za tři měsíce, hodnocená biplanární ventrikulografií. V průběhu sledování nedošlo k významnému zlepšení ejekční frakce LKS u žádné ze tří skupin (+2,5 % vs. -1 % vs. -1 %). Vysvětlením malých nebo nulových změn ejekční frakce po intrakoronární transplantaci KBKD u chronické ischemické choroby srdeční je nulový záchyt v myokardu, jak ukázala naše skupina (obrázek 3).⁽³⁸⁾

BEZPEČNOST

Všeobecně lze říci, že transplantace KBKD je metoda bezpečná. Nebylo pozorováno zvýšení kardiospecifických enzymů nebo zánětlivých markerů. Nedochozí k tvorbě novotvarů nebo k indukci maligních arytmií. Jsou popsány případy nežádoucí diferenciaci do fibrotické tkáně⁽⁴⁵⁾ nebo neočekávané kalcifikace infarktového ložiska po transplantaci KB.⁽⁴⁶⁾ V pos-

lední době je hodně diskutovanou otázkou, zda může intrakoronární injekce KBKD vést k progresi koronární aterosklerózy. Je třeba si uvědomit, že až 80 % pacientů s akutním koronárním syndromem má v koronárním řečišti přítomné další nestabilní pláty.^(47,48) Akutní koronární syndrom je spojen s pankoronární nestabilitou. Po intrakoronární injekci musí KBKD projít stěnou tepny, tedy přes případné aterosklerotické pláty, aby se dostaly do infarktového ložiska (obrázek 4). KBKD jsou obecně blízké mono-

Obr. 4 Koronarogram pacienta po předním infarktu myokardu ošetřeném PCI proximální ramus interventricularis anterior. Arterie distálně od stentu vykazuje difúzní aterosklerotické změny (šipky). Intrakoronárně transplantované KBKD musí projít přes nemocnou stěnu arterie, aby se dostaly do myokardu. Zánětlivá reakce ve vyvíjejících se aterosklerotických plátech atrahuje KBKD, které se zde zachytí a mohou přispívat k růstu nebo destabilizaci plátu.

cytům, a proto jsou atrahovány do místa zánětu, ať již jde o nestabilní plát nebo infarctovaný myokard. Z tohoto důvodu je velké množství prostupujících KBKD pláty zachyceno. Dále, parakrinně účinné cytokiny produkované KBKD, se účastní jak v procesu hojení infarktového ložiska, tak v patogenezi aterosklerózy. Bartunek a spol.⁽⁴⁹⁾ provedli intrakoronární transplantaci selektovaných ACC133+ KBKD u 19 pacientů s akutním infarktem myokardu, 16 pacientů tvořilo kontrolní skupinu. Na rekonarografi po čtyřech měsících bylo ve skupině s KBKD pozorováno významné zvýšení rezistence v koronární arterii distálně od implantovaného stentu, naznačující progresi aterosklerózy v distálním řečišti. Navíc, dva pacienti měli reokluzi stentu, sedm pacientů restenózu ve stentu a dva pacienti měli signifikantní de novo stenózu v infarktové tepně. V kontrolní skupině se vyskytly čtyři restenózy ve stentu. Podobně byl zvýšený výskyt restenóz ve stentu v intervenované skupině pozorován i ve studii BOOST (tabulka III).⁽³³⁾ Jiní

Tabulka III
Koronarografické nálezy během sledování ve skupině s KBKD a v kontrolní skupině

	PCI + KBKD	PCI
Bartunek (ACC133 + KBKD)		
– Restenóza ve stentu	9/19	4/16
– De novo léze	2/19	0/16
BOOST (mononukleární KBKD)		
– Restenóza ve stentu	7/30	4/30
– De novo léze	1/30	0/30
Janssens, REPAIR AMI, ASTAMI (mononukleární KBKD)	shodné nálezy u obou skupin	

PCI – perkutánní koronární intervence, KBKD – kmenové buňky kostní dřeně

autoři progresi aterosklerózy nepotvrdili.^(35,36) Nicméně jisté riziko bude zřejmě přítomné a malý funkční zisk po transplantaci KBKD může být anulován progresí aterosklerózy v infarktové tepně.

Kosterní myoblasty nebo kmenové buňky?

Přímé srovnání obou nejvíce používaných typů buněk je zatím dostupné pouze ve formě abstraktů nebo je zmíněno průkopníky oboru v přehledných referátech.⁽⁵⁰⁾ V tomto srovnání vycházejí lépe kosterní myoblasty, po kterých jsou pozorovány větší funkční účinky. Klinickému rozšíření kosterních myoblastů brání nemožnost intrakoronárního podání a maligní arytmie po transplantaci. Je však třeba zdůraznit, že ať již se použije jakýkoliv typ buněk, pozorované účinky (zlepšení nebo stabilizace globální funkce LKS) jsou jen přechodné. LKS postupně dilataje a pokusná zvířata nakonec umírají pod obrazem srdečního selhání. Tuto zkušenost potvrdila i zmíněná studie BOOST nebo REPAIR AMI, kde přes zlepšení ejekční frakce došlo k dilataci LKS.

PERSPEKTIVY

Kosterní myoblasty

Čeká se na výsledky první randomizované studie (MAGIC), která by potvrdila nebo vyvrátila výsledky pilotních studií. Několik skupin pracuje na vyřešení problému maligních arytmií. Provádí se například transfekce kosterních myoblastů genem pro connexin 43 (hlavní protein gap junction), aby mohlo dojít k funkčnímu spojení s okolními kardiomyocyty.⁽⁵¹⁾

Kmenové buňky

Na poli KB se usilovně pracuje v několika směrech. Jednak je snaha o zvýšení zachytu a přežívání transplantovaných buněk v ischemicko-fibrotické tkáni nebo v infarktovém ložisku. Intenzivně se studují „homing mechanismy“ do infarzovaného myokardu. Buňky se geneticky modifikují, aby ve zvýšené míře exprimovaly receptory pro chemotaktické faktory a staly se odolnějšími k apoptóze. Jinou možností je transfekce KB geny pro produkci angiopoietických faktorů jako například růstový faktor cévního endotelu (VEGF)⁽⁵²⁾ s cílem zajistit dlouhodobější dodávku těchto cytokinů do myokardu než při přímé injekci VEGF, který má velice krátký poločas. Problémem zůstává nechtěná diferenciací nezralých KB. Například hematopoietické KBKD se v infarktovém ložis-

ku diferencují do krevních buněk, protože jsou zde v kontaktu zejména s živými krevními buňkami a nikoliv odumírajícími kardiomyocyty. Mezenchymální KBKD po transplantaci do jizevnaté tkáně starého infarktu buď zahynou nebo z nich vzniknou fibroblasty. Proto některé laboratoře prediferencují KB do myogenní linie.⁽⁵³⁾ Tyto buňky jsou zralejší, odolnější k ischemii i apoptóze a diferencují se do kardiomyocytů. Problémem je větší velikost prediferencovaných buněk, která vadí při intrakoronárním podání.

Nemalou překážkou je i počet buněk potřebný k účinné regeneraci poškozeného myokardu. U malých infarktů myokardu nemá smysl transplantaci provádět („stačí“ včasná PCI), zatímco u velkých infarktů je třeba nahradit ztrátu zhruba 1×10^9 kardiomyocytů. Je iluzorní se domnívat, že jsme schopni tyto ztráty uhradit v akutní nebo subakutní fázi infarktu myokardu, a to i v případě, že bychom teoreticky měli k dispozici takové množství selektovaných typů KB. Hojící se infarktová tkáň totiž představuje velice nepřátelské prostředí pro diferenciaci málo odolných KB, které z velké části zahynou. Cestou bude spíše náhrada nekrotické tkáně v určitém odstupu 2–3 měsíců od infarktu funkčním autologním srdečním svařem vytvořeným tkáňovým inženýrstvím.⁽⁵⁴⁾ Odstup 2–3 měsíců je zřejmě optimální kompromis mezi hojením infarktu a remodelací LKS. Konečně, je snaha vyvinout méně invazivní techniku pro snadnou a opakovanou transplantaci KB. Optimální se jeví intravenózní podání. Nicméně, podle experimentálních a klinických údajů nevede intravenózní podání naivních KB k účinnému zachytu v postiženém myokardu.

ZÁVĚR

Buněčná léčba srdečních onemocnění je dynamicky se rozvíjející oblast kardiologie. Většina experimentálních studií potvrdila potenciál buněčné léčby zachránit ohrožený myokard. Avšak tato metoda je teprve v úplných začátcích a řadě věcí dosud nerozumíme. Je třeba důkladně studovat biologii používaných buněk a mechanismy jejich účinků. Osud buněčné léčby může napodobovat příběh intervenční kardiologie, kde bylo třeba dvacetiletého úsilí než se metoda dopilovala do klinicky relevantní podoby. Optimisté však věří, že u buněčné léčby bude zmíněná cesta kratší a nakonec získáme prostředek k účinné a bezpečné regeneraci poškozeného myokardu. Tento léčebný postup pak pomůže snížit výskyt srdečního selhání a zlepšit dlouhodobou prognózu nemocných po infarktu myokardu.

LITERATURA

1. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763–76.
2. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;401:701–5.
3. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004;116:769–78.
4. 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.
5. Tomita S, Li R-K, Weisel RD, Micjke DAG, Jia ZQ. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999;100 (Suppl): II247–II256.
 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.
 7. Badorff CC, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107:1024–32.
 8. 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.
 9. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697–705.
 10. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919–25.
 11. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, 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;111:150–6.
 12. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93–8.
 13. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003;107:1247–9.
 14. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *New Engl J Med* 2003;348:593–600.
 15. 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:E1–7.
 16. Assmus B, Urbich C, Aicher A, et al. HMG-CoA reductase inhibitors reduce senescence and increase proliferation of endothelial progenitor cells via regulation of cell cycle regulatory genes. *Circ Res* 2003;92:1049–55.
 17. Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 2004;109:220–6.
 18. Kucia M, Dawn B, Hunt G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2004;95:1191–9.
 19. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:3213–20.
 20. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1210–5.
 21. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003;107:461–8.
 22. 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.
 23. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, body distribution. *Circulation* 2003;108:863–8.
 24. Aicher A, Brenner W, Zuhayra M, et al. Assessment of the tissue distribution of transplanted human endothelial progenitor cells by radioactive labeling. *Circulation* 2003;107:2134–9.
 25. Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: Implications for current clinical trials. *Circulation* 2005;112 (Suppl I):I-150–I-156.
 26. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:664–8.
 27. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischemic myocardium. *Nature* 2004;428:668–73.
 28. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived haematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004;10:494–501.
 29. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, et al. 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.
 30. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocytes/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164–9.
 31. 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.
 32. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009–17.
 33. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141–8.
 34. Drexler H. Přehledná přednáška na workshopu o kmenových buňkách, Valladolid, Španělsko 2005; a na výročním kongresu Evropské kardiologické společnosti, Stockholm, Švédsko 2005.
 35. Janssens S. Přednáška na schůzce pracovní skupiny pro kmenové buňky Belgického červeného kříže. Gent, Belgie 2004; a na workshopu o kmenových buňkách, Valladolid, Španělsko 2005.
 36. Schachinger V, on behalf of REPAIR AMI investigators. Přednáška v sekci Late breaking clinical trials, AHA annual scientific sessions, Dallas, USA 2005.
 37. Lunde K, on behalf of ASTAMI investigators. Přednáška v sekci Late breaking clinical trials, AHA annual scientific sessions, Dallas, USA 2005.
 38. Penicka M, Lang O, Widimsky P, et al. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in human. *Eur Heart J* 2005;26 (Suppl):1458 [Abstract].
 39. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45–6.
 40. Hamano K, Nishida M, Hirata K, et al. Local implantation of autologous bone marrow cells for therapeutic angiogenesis in patients with ischemic heart disease: clinical trial and preliminary results. *Jpn Circ* 2001; 65:845–7.
 41. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation

- for severe, chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2003;107:2294–302.
42. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003;361:47–9.
 43. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, 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;46:1651–8.
 44. Assmus B, Honold J, Fischer-Rasokat U, et al. Intracoronary Cell Transplantation in Patients with Chronic Myocardial Infarction: A Randomized Inpatient Comparison of Bone Marrow-versus Blood-Derived Progenitor Cells (TOPCARE-Crossover Trial). AHA annual scientific sessions, Dallas, USA 2005, poster: 2755.
 45. Wang JS, Shum-Tim D, Galipeau J, et al. Marrow stromal cells for cellular cardiomyoplasty: feasibility and potential clinical advantages. *J Thorac Cardiovasc Surgery* 2000;120:999–1005.
 46. Yoon YS, Park JS, Tkebuchava T, Luedeman C, Losordo DW. Unexpected severe calcification after transplantation of bone marrow cells in acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109:3154–7.
 47. Goldstein JA, Demetriou D, Grines CL, Pica M, Shoukfeh M, O'Neill WW. Multiple complex coronary plaques in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2000;343:915–22.
 48. Rioufol G, Finet G, Ginon I, et al. Multiple atherosclerotic plaque rupture in acute coronary syndrome: a three-vessel intravascular ultrasound study. *Circulation* 2002;106:804–8.
 49. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 2005;112 (9 Suppl):I178–I183.
 50. Menasche P. Cellular transplantation: hurdles remaining before widespread clinical use. *Curr Opin Cardiol* 2004;19:154–61.
 51. Suzuki K, Brand NJ, Allen S, et al. Overexpression of connexin 43 in skeletal myoblasts: relevance to cell transplantation to the heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:759–66.
 52. Yau TM, Fung K, Weisel RD, Fujii T, Mickle DA, Li RK. Enhanced myocardial angiogenesis by gene transfer with transplanted cells. *Circulation* 2001;104:218–22.
 53. Bartunek J, Croissant JD, Kaluzhny Y, et al. Biological ex vivo specified adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cardiac repair in a chronic dog model of myocardial infarction. *Submitted*.
 54. Nugent HM, Edelman ER. Tissue Engineering Therapy for Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2003;92:1068–78.

Došlo do redakce 8. 1. 2006

Přijato k otištění 23. 2. 2006