

Kmenové buňky v kardiologii: minulost, současnost a budoucnost celulórní terapie poškozeného myokardu

doc. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.¹, Mgr. Josef Skopalík¹, prof. MUDr. Jaroslav Meluzín, CSc.²

¹ Laboratoř flow cytometrie a celulórní terapie, Interní hematologická klinika, LF MU a FN Brno

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

Kmenové buňky pro své unikátní vlastnosti sebeobnovy a diferenciacie představují naději pro léčbu celé řady závažných onemocnění, včetně kardiologických (zejména infarktu myokardu a srdečního selhání). Kmenové buňky lze rozdělit na dva základní typy definované svým původem: embryonální a somatické. Zatímco využití prvního typu je v klinické medicíně blokováno řadou problémů etických, náboženských, právních, ale i technických, aplikace druhého typu buněk nenaráží na tyto potíže. Zejména v posledních pěti letech bylo možné sledovat narůstající počet klinických studií zabývajících se aplikací somatických kmenových buněk při poškození myokardu. Většina studií sice prokázala signifikantní benefit celulórní terapie pro pacienta, avšak výsledky nebyly zpravidla natolik přesvědčivé, aby vedly ke klinické aplikaci těchto technologií. Příčinou zřejmě byl pokus o rychlé klinické využití metody, jejíž patofyziologický mechanismus není dosud znám. A tak nám nezbývá, než se vrátit do oblasti experimentální medicíny a krok po kroku analyzovat principy regenerace myokardu pomocí kmenových buněk. Současné experimenty *in vitro* a na zvířecích modelech dávají naději, že využití kmenových buněk v kardiologii bude brzy reálné.

Klíčová slova: celulórní terapie, infarkt myokardu, kmenové buňky.

Stem cells in cardiology: past, present and future of cellular therapy of heart disease

Stem cells hold the promise – because of their unique properties of self-renewal and differentiation – of treating many severe illnesses, including heart diseases (especially myocardial infarction and heart failure). Stem cells could be divided into two basic categories: embryonic stem cells and adult stem cells. While the use of the first type in clinical medicine is restricted because of ethical, legal, religious and technical issues, the use of the other cell type is not limited by these problems. It could be followed that many clinical studies, which used various cell types for treatment of myocardial damage, emerged during last five years. Although most studies showed significant benefit of cellular therapy for the patient, the results were not persuading enough to introduce the cellular therapy into clinical medicine. Probably a demand for rapid development of clinical applications without proper knowledge of physiological principles led to this partial failure. Thus, there is no other way than to go back to *in vitro* experiments and animal models and analyze the basic principles of myocardial regeneration with the help of stem cells step by step. The results of recent experiments give us hope that the use of stem cells in cardiology may become true in near future.

Key words: cellular therapy, myocardial infarction, stem cells.

Interní Med. 2009; 11(10): 452–457

Úvod

Srdeční selhání po infarktu myokardu patří stále – přes významné pokroky ve farmakologické i intervenční léčbě – mezi nejčastější příčiny úmrtí ve vyspělých zemích. Ischemií navozená nekróza kardiomyocytů a následná fibróza myokardu vede k remodelaci srdečních stěn a zhoršení kontraktility, která může vyústit v srdeční nedostatečnost a selhání srdečního svalu jako pumpy. Jedinou možnou prevencí je včasný intervenční výkon, který rekanalizací koronárního řečiště zabrání nekróze buněk nebo alespoň omezí její rozsah, a časový faktor zde samozřejmě hraje klíčovou roli.

Regeneraci zničených kardiomyocytů nelze klasickými metodami navodit a farmakologicky lze ovlivnit pouze funkční srdeční tkáň. Jedinou

kauzální léčbou pokročilého srdečního selhání tak zůstává ortotopická transplantace srdce, která samozřejmě nikdy nebude dostupná všem pacientům, kteří ji potřebují. Nadějí se proto stal objev embryonálních kmenových buněk (ESC – embryonic stem cells), které se mohou za určitých podmínek potenciálně diferencovat ve všechny buněčné typy, včetně kardiomyocytů. Bohužel reálné využití embryonálních kmenových buněk stále naráží na celou řadu etických, legislativních i religiozích problémů, ale rovněž na závažné komplikace biologické a technické (např. nedostatečná kontrola buněčné diferenciacie a indukce nádorového růstu, imunologické bariéry, elektromechanická inkorporace generované tkáně), a proto si jeho dostupnost lze stěží představit v brzké době. Proto

se pozornost většiny experimentátorů zaměřila na somatické kmenové buňky (ASC – adult stem cells), které se přirozeně vyskytují v řadě tkání dospělého člověka a u nichž se zjistilo, že vykazují tzv. fenomén plasticity, tedy schopnosti transdiferenciacie do jiných tkáňových struktur než jsou ty, z nichž pocházejí. Použití těchto buněk s sebou nese žádné etické či legislativní překážky a v podmínkách autologní aplikace nenaráží rovněž na žádné imunologické bariéry. Problém představuje jejich nižší diferenciací potenciál ve srovnání s ESC, který však, jak ukázaly práce z minulého roku, lze překonat vhodným reprogramováním. V experimentech se prokázalo, že některé typy těchto buněk se dokáží uchytit v ischemicky poškozené tkáni a indukovat její reparaci.

Terapie ischemického poškození myokardu kmenovými (či jinými) buňkami, ať už v pokusu na zvířeti nebo při léčbě pacienta, zahrnuje vždy čtyři konkrétní kroky: (i) volbu typu buněk a jejich odběr, (ii) jejich inkubaci, kultivaci či indukovanou diferenciaci se zvolenými růstovými faktory (resp. kokultivaci s podpůrnými typy buněk), (iii) aplikaci buněk do poškozeného myokardu, (iv) sledování implantace (homing) buněk v myokardu, hodnocení jejich vlivu na zlepšení lokálních či globálních parametrů srdeční funkce a identifikaci nežádoucích účinků léčby.

Typy kmenových buněk a jejich odběr

(A) Lidské embryonální kmenové buňky (hESC) jsou jednoznačně definovány svým původem a pocházejí z blastocysty. Jsou totipotentní, mohou produkovat specializované buňky diferencované ze všech tří zárodečných listů. Ačkoliv linie hESC jsou dnes dostupné včetně České republiky a jejich výzkum není na rozdíl od situace v USA v principu legislativně blokován, dodnes nebyla zahájena žádná klinická studie regenerace myokardu pomocí tohoto typu kmenových buněk. Podstatnou komplikací při transplantaci hESC – kromě v úvodu zmíněných problémů – je totiž nedostatečná kontrola jejich diferenciaci a tvorba teratomů a teratokarcinomů (1).

(B) Somatické kmenové buňky (ASC) představují druhou variantní skupinu buněk, které se přirozeně vyskytují v řadě diferencovaných tkání dospělého organismu (namátkou v CNS, kostní dřeni, cévách, kůži, střevě, játrech a mnoha dalších). Somatické kmenové buňky sdílejí s ostatními typy nejméně dvě základní charakteristiky: 1. schopnost sebeobnovy po dlouhé časové úseky, často po celý život organismu (long-term self-renewal), 2. schopnost diferenciaci do zralých typů buněk s charakteristickou morfologií a specializovanou funkcí. Kmenové buňky typicky generují částečně diferencované buňky (progenitorové a prekurzorové buňky), které pak dávají vzniknout buňkám terminálně diferencovaným.

Somatické kmenové buňky jsou vzácné. Například odhadem méně než 1 z 10 000 buněk kostní dřene vykazují vlastnosti hematopoetické pluripotentní kmenové buňky. Navíc ASC kromě biologického chování nejsou jednoznačně definovány svým fenotypem. Proto je velmi obtížné je identifikovat, izolovat a kultivovat. K ASC s potenciálním využitím v regeneraci myokardu patří zejména:

Resident cardiac stem cells (CSC) jsou relativně nedávno popsané buňky vykazující regenerativní potenciál, které se nacházejí přímo v srdci. Jejich získání není jednoduché. Z tkáně srdečního svalu po inkubaci s kolagenázou je lze získat pomocí FACS (fluorescence activated cell sorting) nebo imunomagnetické separace jako *c-kit*⁺ frakci. Patrnou nevýhodou těchto buněk je tedy jejich omezený zdroj, na druhou stranu jejich uplatnění by nevyžadovalo mechanismy transdiferenciaci. Výzkum tohoto typu buněk je však v počátcích.

Hematopoetické pluripotentní kmenové buňky (HSC – hematopoietic stem cells) jsou jediným typem kmenových buněk rutinně využívaným v klinické medicíně, a to při léčbě hematologických malignit pomocí transplantace kostní dřeně. HSC dává vznik všem typům krevních buněk (leukocytů, erytrocytům, trombocytům). Jak bylo prokázáno v experimentu na zvířeti, jediná HSC může regenerovat kompletní krevetvorbu. HSC se nacházejí v populaci CD34⁺ buněk, čehož se využívá při hodnocení kvality transplantátu. Popis transdiferenciaci HSC obrátil pozornost kardiologů k těmto buňkám, a proto byla řada klinických studií regenerace myokardu zaměřena právě na tento typ. Jak však ukázaly následné experimenty na zvířecích modelech a jak vyplývá i z našich vlastních experimentálních dat, CD34⁺ buňky vykazují relativně nízkou míru dlouhodobé implantace v myokardu a nekorelují signifikantně se zlepšením funkce myokardu po implantaci.

Endoteliální progenitorové buňky (EPC) se záhy po jejich objevu (2) staly velmi populární. Představují totiž potenciál k regeneraci cévního řečiště a jsou klíčem k neoangiogenezi v regulaci nádorového růstu. EPC byly prokázány v kostní dřeni, z níž je lze získat. Tyto buňky jsou obohaceny ve frakci fenotypu CD133⁺34⁺. Je zřejmé, že tento typ buněk se může uplatnit významně v regeneraci poškozeného myokardu mechanismem angioneze a vaskulogeneze. Naproti tomu jejich vlastní transformace v kardiomyocyty je málo pravděpodobná.

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) se rovněž vyskytují v kostní dřeni. Jak již vyplývá z jejich názvu, mohou se diferencovat zejména do pojivových tkání – kosti, chrupavky a tukové tkáně. MSC lze izolovat na základě jejich adherence: mononukleární buňky kostní dřene, které se přichytí k plastu kultivační nádoby, jsou ponechány v kultuře s přidavkem fetálního séra. Za dva až tři týdny kultivace vytvoří konfluentní monolayer mezenchymálních buněk, které lze dále pasážovat. Definici lidských

mezenchymálních buněk stanovila Society for Cellular Therapy právě na základě kritérií adherence v buněčné kultuře, možnost *in vitro* diferenciaci do buněk tukových, kostních a buněk chrupavky a fenotyp CD105⁺, CD73⁺ a CD90⁺ (>95 %). Významným zdrojem MSC je rovněž tuková tkáň, což lze prakticky využít při získání buněk z tkáně zanechané plastickými chirurgy po liposukci. Mesenchymální buňky mají teoretický potenciál regenerovat myokard, proto na jejich použití bylo zaměřeno několik studií. Ačkoliv většina studií označila jejich aplikaci jako bezpečnou, Vulliet a kol. (3) popsali nežádoucí účinky ve smyslu okluze koronárních tepen, tedy přesně opačného než žádoucího efektu, což je patrně dáno jejich odlišnou velikostí a morfologií. Relativní výhodou MSC je nepřítomnost MHC-II a B-7 komplexu na jejich povrchu, a tedy možnost i jejich alogenní transplantace bez nutnosti imunosuprese.

(C) „Non-stem cells“ s regenerativním potenciálem nepatří do skupiny vlastních kmenových buněk, neboť nesplňují dvě podmínky pro definici ASC.

Skeletální myoblasty byly získány biopsií z kosterního svalu (odběr asi 10 g tkáně v lokální anestezii). I u těchto buněk bylo testováno, zda umožní regeneraci poškozené srdeční tkáně. Problémem při jejich použití je výskyt tachykardie a arytmií, což zřejmě souvisí s fyziologií zdrojových buněk. Nežádoucí účinky lze částečně farmakologicky ovlivnit (4).

Neonatální myoblasty – elegantní práce Ott a kol. (5) poukázala na možnost kompletní a funkční regenerace myokardu pomocí neonatálních myoblastů na modelu potkana. Revitalizované srdce vykazovalo spontánní kontraktilní aktivitu, ačkoliv jeho mechanická funkce byla pouze zlomkem potřebného srdečního výkonu. Práce je průlomová pro experimentální kardiologii, avšak je zřejmé, že tento model nelze přímo uplatnit u člověka.

(D) Buněčné suspenze obohacené o kmenové buňky představují ve skutečnosti nejčastější zdroj buněk využívaných v experimentu i klinických studiích. Proto je popisujeme ve zvláštním odstavci. Jejich předností je jednoduchost získání a přítomnost zpravidla více než jednoho typu kmenových buněk. Na druhé straně jde o biologické preparáty, jejichž složení je velmi špatně definovatelné. Kmenové buňky nejsou přítomny v čisté formě, ale preparát je o ně pouze ve větší či menší míře obohacen. Heterogenita buněk bohužel neumožňuje

vypracovat reprodukovatelné protokoly pro kultivaci těchto suspenzí *in vitro* a je pravděpodobnou příčinou často nízké signifikance experimentálních výsledků.

Mononukleární buňky kostní dřeně (BM MNC – bone marrow mononuclear cells) BMC se získávají odběrem dřeňové krve z kostí pánevních nebo sterna pomocí aspirační jehly (výkon je shodný s odběrem kostní dřeně pro účely její transplantace) a následnou centrifugací na hustotním gradientu, kde se oddělí nežádoucí frakce erytrocytů a granulocytů a zůstanou mononukleární buňky (MNC). Mononukleární buňky lze stejnou metodou získat i z periferní krve, avšak BM MNC na rozdíl od buněk periferní krve obsahují kromě lymfocytů a monocytů i klíčové frakce kmenových buněk kostní dřeně. Jde především o tři již výše zmíněné typy: hematopoetické kmenové buňky (HSC), mesenchymální buňky (MSC) a endoteliální progenitorové buňky (EPC). Velkou výhodou je vysoká výtěžnost přes 10^8 buněk i z malého množství kostní dřeně (100 ml). Další nespornou výhodou je jednoduchost zpracování a kompatibilita s přísnými evropskými GMP protokoly (lze využít techniky uzavřeného systému). Zastoupení jednotlivých populací kmenových buněk ve vzorku lze pak zjistit flowcytometrickou analýzou a následnými kultivačními testy.

Kmenové buňky periferní krve (PBSC – peripheral blood stem cells) si získaly svou popularitu pro svou analogii s transplantací kmenových buněk kostní dřeně. PBSC se získávají z periferní krve pacientů či dárců po stimulaci kostní dřeně růstovými faktory (G-CSF) jako preferovaný zdroj HSC pro autologní či alogenní transplantaci krvetvorby. Účinkem G-CSF dochází k vyplavování $CD34^+$ buněk z kostní dřeně do periferní krve, z níž jsou pak MNC obohaceny o tuto frakci sbírány z femorální žíly pomocí separátoru krviněk. Typický transplantát PBSC obsahuje 0,5–2 % $CD34^+$ buněk. Na rozdíl od buněk z kostní dřeně PBSC neobsahuje frakci mesenchymálních buněk (MSC).

Kmenové buňky pupečnickové krve (UCB – umbilical cord blood cells) obsahují rovněž více typů kmenových buněk (jak hematopoetické, tak mesenchymální). UCB jsou rovněž využívány jako zdroj transplantátu, zejména v pediatrické onkologii. Vzorky UCB jsou uchovávány ve speciálně zřízených bankách pupečnickové krve. Oproti buňkám z kostní dřeně mají řadu výhod, včetně nižší incidence reakce štěpu proti hostiteli po alogenní transplantaci. Jejich nevýhodou je malé množství kmenových buněk. Vlastnosti kmenových buněk pupečnickové krve nejsou

dosud zcela popsány, jejich potenciál pro generaci tkání je bezpochyby značný. Zjevnou nevýhodou je nízká dostupnost zdrojového materiálu pro experimentální účely.

V posledních dvou letech bylo představeno několik dalších potenciálních zdrojů kmenových buněk. Za uvedení jistě stojí objev „stem cell reprogramming“ (6), kdy pomocí genového transferu čtyř klíčových transkripčních faktorů do kožních fibroblastů byla indukována „kmenovost“ srovnatelná s chováním embryonálních kmenových buněk. Použití těchto nových přístupů v oblasti regenerativní medicíny je nesmírně atraktivní, bude však vyžadovat mnoho další experimentální práce.

Jak je patrné, kmenové buňky lze rozdělit do řady typů a podtypů. Současně se ale objevují teorie, že některé podtypy kmenových buněk jsou příbuzné nebo víceméně identické, např. resident cardiac stem cell a mesenchymální buňky. Je to dáno zejména obtížnou definicí kmenových buněk na podkladě jejich fenotypu, jejich složitou izolací, a tedy i obtížným studiem jejich vlastností.

Inkubace a kultivace buněk

V řadě klinických studií nebyla inkubace použita a buňky byly použity přímo po jejich získání („fresh cell“). Nicméně z různých důvodů (selektce buněk, expanze počtu buněk, časový odstup od invazivního zákroku, logistika) je však většinou vhodná nebo nutná. Zásadní rozdíl je, zda pracujeme s definovanými kmenovými buňkami nebo směsnou populací.

Experimenty na zvířatech

U zvířecích modelů lze pro kultivaci nefrakcionovaných mononukleárních buněk použít standardní kultivační média (například RPMI medium). Pro obohacení vzorku o adherentní MSC, eventuálně jejich expanzi a pasážování lze použít speciální média (Mesencult, Stem Cell Technologies) nebo RPMI s obsahem FBS (fetal bovine serum). Pro ostatní typy buněk existuje široká škála komerčně dostupných médií.

Pro kultivace jednotlivých typů kmenových buněk je k dispozici celá řada růstových faktorů, interleukinů, cytokinů a kostimulačních molekul. Právě otázka kultivace a diferenciac kmenových buněk *in vitro* před jejich aplikací byla ve většině experimentálních modelů nedoceněna.

Klinické studie

Použití kultivací buněk v klinických experimentech je v současnosti regulováno velmi striktními pravidly. Pouze několik médií splňuje

podmínky GMP a je certifikováno pro humánní použití (např. X-VIVO medium (Cambrex), CellGro (CellGenix)). Nelze rovněž používat FBS jako součást média. *Ex vivo* manipulace dále vyžadují použití tzv. čistých prostor. Z toho vyplývá řada omezení pro kultivace buněk k humánní aplikaci. Variantou je náhrada FBS autologním sérem pacienta.

Obdobná limitace platí pro použitelné růstové faktory, a tak je jejich škála zatím bohužel příliš úzká. Nicméně v brzké době lze očekávat významně širší dostupnost těchto látek certifikovaných pro humánní použití.

Dále uvádíme několik příkladů, jak lze cíleně diferencovat kmenové buňky pomocí vybraných biologicky aktivních látek. Pro indukci diferenciac do cardiomyocyte-like cells byl použit TGF-beta1 2,5 ng/ml, PDGF-BB 0–100 ng/ml (7) nebo VEGF 5 ng/ml, PDGF-AB 10 ng/ml (8). Svěráznou kapitolou jsou experimenty s přidávkou 5-azacytidinu do kultivačního média. Ojedinelé prvotní studie byly velmi nadějně, dnes se však zdá, že 5-azacytidin neusměrňuje vývoj buněk podle původních představ. Kokultivace může probíhat i přímo s určitými typy buněk: Plotnikov a kol. (9) dosáhli u MSC zvýšené exprese kardioproteinů při kokultivaci s cardiomyocyty.

Způsob aplikace buněk

V literatuře jsou prezentovány čtyři typy aplikace buněk do infarktové tkáně:

- První „systemic therapy method“ využívá jednoduše podání infuze buněk intravenózně. Vychází z předpokladu aktivního homing buněk v ischemické tkáni.
- Druhou metodou není aplikace buněk, ale jejich zvýšení v cirkulaci z fyziologických poolů pomocí aplikace vybraného růstového faktoru (zpravidla G-CSF).
- Třetí je metoda intrakoronárního podání buněk. V klinických studiích využívá techniky katetrizace srdce a koronárních tepen Seldingerovou technikou.
- Čtvrtou metodou je lokální přímá srdeční injekce buněk do srdečního svalu. Zde lze využít dva přístupy: přímý chirurgický postup (transepikardiální aplikace při otevřeném hrudníku) či katetrizační přístup cestou koronárního sinu nebo transendokardiálně pomocí speciálních katetrů.

Intrakoronární aplikace je nejpoužívanější technikou v klinických studiích. Přímá intramyokardiální injekce je naopak nejpoužívanější u zvířecích modelů v preklinických experimentech. Efektivita těchto způsobů aplikace se liší podle

použitého modelu a typu buněk. Freymann a kol. (10) na prasečím modelu ukázali, že přímá myokardiální injekce MSC je efektivnější než intravenózní aplikace, ale méně efektivní než aplikace intrakoronární. Naopak Hou a kol. (11) popisují retenci MNC buněk periferní krve v myokardu po intramyokardiálních injekcích 11 %, po intrakoronárním podání jen 2,6 %. Pro skeletální myoblasty se jeví jako nejefektivnější intramyokardiální injekce (4).

Studie s BM MNC ukázaly, že nejvhodnější čas pro podání je mezi 4. a 7. dnem po IM (12). Na zvířecích modelech (potkana, prasete i psa) jsou dokumentovány efektivní aplikace 3 resp. 4 týdny po IM. Infuze buněk intrakoronárně několik měsíců nebo i let po IM byla zkoušena Strauerem a kol. (13) a kupodivu též bylo zjištěno zlepšení funkce levé komory. U této studie je však kritizována krátká doba sledování po aplikaci. Autoři této práce preferovali intrakoronární aplikaci, a to z logického důvodu. Proces implantace buněk v myokardu je proces aktiv-

ní. Buňky se tedy dostanou do cílového místa z koronárního řečiště velmi efektivně. Naopak injekce do místa nekrózy, kde není žádná krevní cirkulace, nevede k úspěšné implantaci přímo aplikovaných buněk.

Homing buněk a jejich vliv na funkci myokardu

Homing je proces migrace buněk do dané tkáně a jejich uchycení, respektive adaptace. Molekulární mechanismus migrace obsahuje řadu kroků. Fox a kol. (14) uvádí, že makromolekuly uvolňované ze zánětu jsou hlavním „naváděcím systémem“ pro aplikované MSC, které pak přednostně migrují do těchto míst. Zajímavé je, jak malá část aplikovaných buněk se v myokardu uchytlí (potkan 1 % po 42 dnech, člověk méně než 5 %). V této souvislosti je zřejmé, že adhezní molekuly hrají v tomto složitém procesu klíčovou roli a v prováděných klinických studiích nebyly zatím dostatečně brány v potaz.

Proběhl-li homing buněk, zbývá již „jen“ pozorně sledovat, jaký bude krátkodobý nebo dlouhodobý efekt na postižený myokard. Přehled hlavních výsledků z minulých let uvádíme níže a shrnujeme v tabulkách. Abychom se vůbec orientovali v této široké škále výsledků studií celulórní terapie IM, rozdělujeme výsledky podle typu modelu či studie a typu podaných buněk. Evidentní je rozdíl možností zvířecích modelů a klinických studií. Zatímco na modelech jsme schopni sledovat přímo homing buněk v myokardu i jejich další osud (pomocí metod histologie, imunocytoologie, molekulární biologie a dalších), v klinických studiích jsme odkázáni na nepřímé metody, které nás informují o funkci myokardu (sonografie, SPECT, PET).

Výsledky experimentů na zvířatech

Nefrakciované BMC se používaly hned od prvních pilotních experimentů. MSC v in vitro experimentech prokazují expresi kardiomyocytárních proteinů i schopnost vytvořit vodivé spo-

Tabulka 1. Studie s nefrakciovanými mononukleárními buňkami kostní dřeně (BM MNC) a mezenchymální buňkami derivovanými z kostní dřeně (MSC)

Studie	Nemoc / pro- dleva do apli- kace buněk	Průměrné množství odebrané kostní dřeně/ aplikovaných buněk	Počty pacientů v jednotlivých ramenech	Doba sledování/ změna LVEF (v %)	Signifikance Pozn.
BOOST	AMI 5 dní	128 ml dřeně 2,46 x 10 ⁸	C 30 MNC 30	6 měsíců + 6,7 %	P < 0,01
	AMI 5 dní	128 ml dřeně 2,46 x 10 ⁸	C 30 MNC 30	18 měsíců +5,9 %	NS
TOPCARE-CHD	CIHD 3 měsíce	50 ml dřeně 2,14 x 10 ⁸	MNC 121	+2 %	P < 0,001 jízva zmenšena (P < 0,05)
TOP-CARE AMI	AMI 4 dny	250 ml krve 1,8 x 10 ⁸ nebo 50 ml dřeně 1,5–3 x 10 ⁸	28 pacientů	4 měsíce + 5 %	P < 0,01
REPAIR-AMI	AMI 3–6 dní	50 ml dřeně 2,36 x 10 ⁸	C 101 MNC 103	3 roky průměr neuveden	prokázáno snížení mortality
ASTAMI	AMI 3–5 dní	10 ml dřeně	C 57 MNC 58	4 měsíce +3,1 %	NS
Jansens 2006	AMI 3–5 dní	neuvedeno 17 x 10 ⁷	C 33 BMC 34	4 měsíce +3,6 %	NS
Meluzín 2006	AMI 5–9 dní	100–200 ml (nízká dávka) 1 x 10 ⁷	C 22 BMC 22	3 měsíce +3 %	NS
	AMI 5–9 dní	100–200 ml (vysoká dávka) 1 x 10 ⁸	C 22 BMC 22	3 měsíce +5 %	P < 0,05
TCT-STAMI	AMI do 7 dní	neuvedeno 4 x 10 ⁷	C 10 BMC 10	6 měsíců +4,8 %	P < 0,05
Mezenchymální buňky					
Chen 2004	AMI 18 dní	neuvedeno 24–30 x 10 ⁷	C 35 MSC 34	6 měsíců +18 %	P < 0,01
Katritsis 2005	AMI i CIHD 7–1500 dní	15 ml dřeně 2,4 x 10 ⁶	C 11 MSC 34	1,3 %	NS

V tabulce postupně vždy uvádíme název studie nebo autora a rok, typ koronárního onemocnění, množství odebrané kostní dřeně a aplikovaných buněk, počty pacientů v jednotlivých skupinách, dobu sledování, změnu LVEF a dosaženou statistickou významnost (P value) oproti kontrolní skupině nebo souboru pacientů před podáním buněk (není-li použita kontrolní skupina).
Zkratky: AMI – akutní infarkt myokardu, CIHD – chronická ischemická nemoc srdeční, C – kontrolní skupina, MNC – skupina s aplikací MNC, MSC – skupina s aplikací MSC, P – dosažená signifikance, NS – nesignifikantní výsledek.

jení s kardiomyocyty (15). Při podání BMC i MSC je již dobře podloženým faktem jejich schopnost adherovat k srdeční tkáni. Jednoznačná transdiferenciace buněk však *in vivo* pozorována nebyla. Plná koexprese kardiomyocytárních znaků v buňkách kostní dřeně je tedy nadále nedořešená (16). U zvířecích modelů s IM aplikace je prokázána po podání BMC a MSC indukce angiogeneze, která patrně zprostředkuje signifikantní zlepšení funkce levé komory.

I EPC mohou přispět k signifikantní regeneraci myokardu. Zlepšení srdeční funkce po podání EPC je připisováno jejich angiogennímu potenciálu, avšak v *in vitro* studii Bardoffa a kol. (17), kde byly lidské EPC kokultivovány s potkaními neonatálními kardiomyocyty, byla podložena i možnost částečné transdiferenciace (synchronizace oscilací vápníku, exprese kardiospecifických proteinů). Zajímavé je, že míra diferenciace do kardiomyocytů však byla vyšší u buněk získaných od zdravých dárců než od dárců s CAD (coronary artery disease).

U skeletálních myoblastů je z experimentů na zvířatech známá jejich odolnost vůči ischemii a schopnost zlepšit kontraktilní vlastnosti levé komory, vysvětlované spíše jako vliv na post-infarktovou jizvu a remodelaci, než aktivní silové působení pulzujících buněk (Jain 2001). Po počátečních komplikacích s arytmiemi bylo zjištěno, že inkorporace genu pro connexin43 do skeletálních myoblastů před transplantací vedla k eliminaci arytmie (18).

Výsledky klinických studií

První klinické studie odstartovaly před 7 lety. Vyhodnocených nebo probíhajících klinických studií je v současnosti přes pět desítek. Připravit systematický přehled je tedy poměrně těžké pro velkou variabilitu přístupů jednotlivých autorů k designu studií. Nicméně velkých studií je pouze kolem patnácti a patří k nim i studie našeho týmu (19).

Největší studie pro BM a MSC jsou uvedeny v přehledu (tabulka 1). Autoři sledovali většinou řadu parametrů, pro srovnání jednotlivých studií je ale nejvhodnější srovnání ejekčních frakcí levé komory (LVEF). Srovnáváme-li úspěšnost podobně designovaných studií, upozorníme na následující:

- TOP-CARE AMI versus BOOST: obohaceno medium o lidský VEGF a atorvastarin.
- REPAIR-AMI versus ASTAMI: 3x větší statistický soubor, 3,5x více hematopoetických buněk v podávané nefrakcionované dávce BMC.
- Chen (2004) versus Katritsis (2005): vyšší počet buněk, mimoto Katritsis má značně

Tabulka 2. Studie s použitím PBSC a buňkami stimulovanými pomocí G-CSF

Název studie	Nemoc / prodleva do aplikace buněk	Počty pacientů v jednotlivých ramenech	Doba sledování / změna LVEF (v %) / signifikance
MAGIC Cell-1	AMI 4 dny	C 10 G-CSF10 PBSC 10	6 měsíců +10% (NS)
FIRSTLINE –AMI	AMI 6 dní	C 25 G-CSF 37	+6% (P < 0,001)
STEMMI	AMI 6 dní	C 25 G-CSF 37	+8,5% (NS)
G-CSF STEMI	AMI 5 dní	C 58 G-CSF 19	+6,2% (NS)
MAGIC Cell-3 DES	AMI do 14 dní	C 29 PBSC 27	+5,1% (P < 0,05)
	AMI nad 14 dní	C 20 PBSC 20	+1,97% (P < 0,01)

Struktura tabulky je obdobná jako u tabulky 1. Tamtéž viz vysvětlení údajů a zkratk. Zkratky: C – kontrolní skupina, PBSC – skupina s aplikací PBSC buněk získaných sběrem z periferní krve, G-CSF – skupina se stimulací pomocí G-CSF bez aplikace buněk.

Tabulka 3. Studie se skeletálními myoblasty

Název studie	Nemoc / prodleva do aplikace buněk	Průměrné množství buněk	Počty pacientů v jednotlivých ramenech	Změna LVEF (v %)
POZNAN	CIHD 3 měsíce a více	10 x 10 ⁷	SkM 10	+3% až 8%
MAGIC trial (Menasché 2008)	CIHD nejméně 4 týdny	40 x 10 ⁷ 80 x 10 ⁷	C 30 SkM 33 SkM 34	+3,4% +5,2%

Struktura tabulky je obdobná jako u tabulky 1. Tamtéž viz vysvětlení údajů a zkratk. Zkratky: C – kontrolní skupina, SkM – skupina s aplikací skeletálních myoblastů.

nehomogenní skupinu vstupních pacientů (čas od MI). Katritsis uvádí, že akinetické segmenty tkáně se podařilo regenerovat jen u pacientů s infarktem ne starším než jeden měsíc.

- Meluzín a kol. (2006): srovnává efekt dvou dávek BM MNC oproti kontrolní skupině.

Některé další práce bohužel nerozlišují mezi EPC a PBSC buňkami uvolněnými pomocí G-CSF. PBSC mohou být buď pouze uvolněné pomocí G-CSF do periferní cirkulace, nebo sbírané pomocí separátoru krvinek a podané zpět pacientovi. Jejich přehled uvádí tabulka 2.

V posledních letech byla provedena řada malých studií s povzbudivými výsledky s aplikací non-stem cells. První randomizovaná studie se skeletálními myoblasty byla publikována v minulém roce (20). Přehled těchto studií podává tabulka 3.

Nežádoucí efekty terapie

Nežádoucí účinky léčby pomocí celulární terapie byly v klinických studiích pozorovány výjimečně. Vyplývá to z faktu, že v klinických studiích se jednalo vždy o podání autologních buněk, které jsou pro pacienta fyziologické. Mezi nežádoucí účinky patří zejména arytmie,

koronární obstrukce, restenóza koronární tepny, infekce a abnormální celulární diferenciaci.

V minulosti byla zaznamenána arytmie po podání CD133+ buněk. O arytmií při počátečních studiích u skeletálních myoblastů jsme se již zmínili. V klinických studiích nebyla dosud pozorována abnormální celulární diferenciaci, na modelech však ano, což ale souvisí s použitými technikami kultivace a manipulace s buňkami *in vitro*. Nutno konstatovat, že ve většině klinických studií byl na sledování nežádoucích účinků kladen mimořádný důraz a že podání autologních buněčných preparátů, a to i přímo do koronárních cév, je velmi bezpečnou procedurou.

Diskuze

Přesný mechanismus účinku kmenových buněk sice stále není znám, víme ale, že buňky kostní dřeně by pravděpodobně mohly disponovat vlastnostmi, které lze rozdělit jako:

- „pomocné“, tj. parakrinní uvolňování růstových faktorů a cytokinů, což by mělo redukovat apoptózu přeživších kardiomyocytů, indukovat angiogenezu, což může být doplněno i vznikem mechanické vazby implantovaných buněk se zbytky původní tkáně.
- „částečně kompenzující kardiomyocyty“, tj. vznik gap junctions (9) a následný podíl bu-

něk na obnovení iontové konduktivity mezi kardiomyocyty (15).

- „ideálně kompenzující kardiomyocyty“, tj. vznik typických kardiomyocytárních kontraktálních struktur (aktin a myosin uspořádaný do myofibril) v buňkách, při vhodných podmínkách nastartování kontraktálních pohybů (8), což je základem tzv. transdiferenční teorie.

Ještě nedávno bylo frekventovanou frází v odborných diskuzích, že způsob aplikace, načasování a optimální množství buněk je nedořešenou otázkou, v současných publikacích se ale objevují již konkrétní odpovědi. Bez spolehlivé odpovědi sice nadále zůstává, jaký je správný typ buněk či jaká by měla být jejich cílená preinkubace a kultivace, indicií však nadějně přibývá. Z přehledu významných klinických studií vyplývá, že nejlepších výsledků regenerace AMI bylo dosaženo s použitím MSC, existují i výjimečně efektivní výsledky u studií na PBSC. MSC buňky jsou obsaženy ve frakci BM MNC, což vysvětluje úspěch studií s těmito buňkami. Větší úspěšná studie pro skeletální myoblast zatím neexistuje. Obecně sledujeme, že množství buněk má vliv na efektivitu terapie. Ve většině velkých klinických studií byl prokázán efekt neoangiogeneze a neovaskulogeneze, naproti tomu myogeneze nebyla jednoznačně prokázána vůbec. Tato fakta podporují uplatnění minimálně prvního mechanismu parakrinní produkce faktorů, které pak angiogenezu v myokardu indukují.

Závěr

I když bezpečnost metod celulární terapie využívaných v klinických studiích lze považovat

za vysokou, jejich účinnost v regeneraci funkce myokardu byla relativně nízká. Metody implantace kmenových buněk do myokardu se tedy pravděpodobně nestanou v dohledné době rutinní klinickou léčebnou metodou u nemocných s akutním infarktem myokardu a srdečním selháním. Nicméně nové experimentální postupy *in vitro* i na zvířecích modelech přináší velmi slibné výsledky do budoucna.

Literatura

1. Thompson JA, Itszkovicz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocytes. *Science* 1998; 282: 1145–1147.
2. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964–967.
3. Vulliamt PR, Greeley M, Halloran SM, et al. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet* 2004; 363 (9411): 783–784.
4. Siminiak T, Fizser D, Jerzowska, et al. Percutaneous transcoronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005; 26: 1118–1195.
5. Ott HC, Matthies TS, Goh SK, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med*. 2008; 14 (2): 213–221.
6. Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif*. 2008; 41 (Suppl 1): 51–56.
7. Yuehua J, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2003; 418: 41–49.
8. Xyamadani M, Tang L, Zagreda L, et al. Platelet-derived growth factor-AB promotes the generation of adult marrow-derived cardiac myocytes. *Circ. Res* 2004; 94: e39–e45.
9. Plotnikov EY, Khryapenkova TG, Vasileva AK, et al. Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med*. 2008; 12 (5A): 1622–1631.
10. Freyman T, Polin G, Osman H, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006; 27: 1114–1122.
11. 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 (9 suppl): 1150–1156.
12. Psaltis PJ, Zanneitino A, Worthley SG, et al. Mesenchymal stromal cell – Potential for cardiovascular repair. *Stem Cells* 2007; 26: 2201–2210.
13. 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 (9): 1651–1658.
14. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, et al. Recent advances into the understanding of mesenchymal cell trafficking. *Br J Haematol* 2007; 137: 491–502.
15. Beeres SLM, Atsma DE, van der Laarse A, et al. Human Adult Bone marrow mesenchymal stem cells repair experimental conduction block in rat cardiomyocyte cultures. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1943–1952.
16. Gallo MP, Ramella R, Alloati, Penna C, et al. Limited plasticity of mesenchymal stem cell cocultured with adult cardiomyocytes. *J Cell Biochem* 2007; 100: 86–99.
17. Badorff C, Brandes RP, Popp R. Transdifferentiation of blood – derived human adult endothelial progenitor cells into functional active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107: 1024–1032.
18. Abraham MR, Henrikson CA, Tung L. Antiarrhythmic engineering of skeletal myoblast for cardiac transplantation. *Circ Res* 2005; 97: 159–167.
19. 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 (5): 975.e9–15.
20. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial: First Randomized Placebo-Controlled Study of Myoblast Transplantation. *Circulation* 2008; 117 (9): 1189–1200.

doc. MUDr. Martin Klabusay, Ph.D.

Interní hematologická klinika,
LF MU a FN
Jihlavská 20, 625 00 Brno
mklabus@fnbrno.cz

