

PRÓBY PRZEDKLINICZNE I KLINICZNE ZASTOSOWANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH DO REGENERACJI MIĘŚNIA SERCOWEGO*

STEM CELLS FOR HEART REGENERATION –
PRECLINICAL AND CLINICAL TRIALS

Maciej KURPISZ

Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

Streszczenie: W pracy poglądowej przedstawiono obecną klasyfikację i hierarchię komórek macierzystych, wskazano na źródła komórek macierzystych oraz ich poszczególne podtypy, które wykorzystywane są w próbach klinicznych, jak i przedklinicznych dla regeneracji mięśnia sercowego. Dokonano szczegółowej analizy sposobu podawania komórek do mięśnia sercowego, tj. a) intramiokardialnie, b) przezskórną, c) systemowo oraz wpływu drogi podania komórek na stopień zasiedlenia w miokardium. Przy pomocy publikowanych meta-analiz dokonano syntezy poszczególnych prób w zakresie naprawy: a) pozawałowego mięśnia sercowego, b) serca w stanie przewlekłego niedotlenienia, c) mięśnia sercowego w stanie zastoinowej niewydolności. Wskazano też na nowe podejścia naukowo-badawcze dążące do optymalizacji protokołów klinicznych zmierzających do regeneracji miokardium.

Słowa kluczowe: regeneracja mięśnia sercowego, komórki macierzyste, próby kliniczne.

Summary: In this review it has been presented current classification of stem cells indicating novel sources (tissues) of stem cells subtypes that can be used in clinical and pre-clinical attempts of heart regeneration. In the article an analysis of delivery of stem cells to myocardium has been provided dividing stem cells administration into: a) intramyocardial, b) percutaneous, c) systemic ones and its influence on stem cell homing. Quoting the so far published meta-analysis it was outlined the updated view for therapy of particular heart disease by using cell engineering that is for: a) post-infarction heart, b) chronic ischaemia, c) congestive heart failure. Novel approaches were indicated that may optimize clinical protocols of stem cell application for heart regeneration.

Key words: heart regeneration, stem cells, clinical trials.

*Praca dofinansowana z projektów Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego: nr N 403 065 31/3011 oraz projektu rozwojowego nr N R13 0065 06.

1. WSTĘP

Badania przedkliniczne powzięte na przełomie wieków przyniosły niezwykłą obietnicę wykorzystania komórek macierzystych o wszechstronnym potencjale różnicowania i zastępowania wszystkich typów komórek w dotkniętych procesem patologicznym narządach. Stąd odkrycie totipotencjalnej komórki macierzystej o wielofunkcjonalnych możliwościach przyrównano do identyfikacji DNA w zeszłym stuleciu, z podobnymi wszechstronnymi implikacjami dla współczesnej medycyny. Zanim uświadomiono sobie, że komórki macierzyste stanowią nieodzowny element prawie każdej tkanki/narządu, na początku stulecia zdecydowano się na ich aplikację (próby kliniczne), szczególnie w stosunku do narządów o małym zasobie odnawialnych komórek, co występuje w przypadku mięśnia sercowego, ośrodkowego układu nerwowego czy wysepek trzustki. W ten sposób ukuto pojęcie medycyny regeneracyjnej.

2. ŹRÓDŁA KOMÓREK MACIERZYSTYCH I ICH DEFINICJE

Od pierwszych nieśmiałych prób klinicznych z początku obecnego stulecia z użyciem tylko 2 lub 3 typów komórek macierzystych organizmu dorosłego – ASC (ang. *Adult Stem Cells*), obecnie próbuje się śmieiej wykorzystywać coraz to nowsze populacje komórek macierzystych, poznając lepiej ich hierarchię, plastyczność czy skutki uboczne ich stosowania. Stosunkowo największym „szacunkiem” wśród badaczy cieszą się komórki określane jako:

– totipotencjalne, to jest dające początek wszystkim bez wyjątku komórkom organizmu dorosłego, trzem jego podstawowym listkom zarodkowym, tj. ekto-, endo- i mezodermie, a także tkankom pozazarodkowym. Inne, dotąd zidentyfikowane linie komórek macierzystych, musiały być uzyskiwane z zarodków na wczesnych etapach rozwoju, aby zachować swoją totipotencjalność. Obecnie rozróżnia się następujące populacje komórek macierzystych:

– komórki iPS (indukowane komórki pluripotencjalne) naśladujące komórki o możliwości różnicowania w kierunku wszystkich narządów i tkanek organizmu dorosłego (ale nie pozazarodkowych), poprzez genetyczne przeprogramowanie komórek somatycznych powodujące nadekspresję kluczowych dla zarodkowych komórek macierzystych genów kodujących czynniki transkrypcyjne: Oct3/4, Sox 2, Klf4 i c-Myc.

– komórki pluripotencjalne, następne w hierarchii plastyczności komórki macierzyste mogą się kierunkować w tkanki wszystkich trzech listków zarodkowych, jednak bez możliwości zróżnicowania się w tkanki pozazarodkowe i jednocześnie mogą nie wykazywać pochodzenia zarodkowego, ale przynależać do puli komórek ASC. Te ostatnie zaś obejmują swoim synonimicznym określeniem zarówno pulę komórek pluripotencjalnych, jak i multipotencjalnych.

– MASC (ang. *Multipotential Adult Stem Cells*), komórki te ze swojej definicji winny mieć ograniczoną (w stosunku do pluripotencjalnych) plastyczność, wyrażającą się możliwością do różnicowania w typy komórek przynależne jedynie do danego listka zarodkowego. Stąd też najbardziej rozpoznawalne w terapii mięśnia sercowego komórki szpiku kostnego – BMSC (ang. *Bone Marrow Stem Cells*) należą do tej grupy. Komórki uprzednio opisane, nie stały się jak dotąd kandydatami prób klinicznych, a jedynie badań przedklinicznych i/lub w modelu *in vitro*.

– BMSC nie są grupą jednorodną i w pewnym sensie należy uznać je za mieszaninę komórek progenitorowych w stosunku do innych typów komórkowych, jak np. HSC (ang. *Hematopoietic Stem Cells*) lub EPC (ang. *Endothelial Progenitor Cells*) lub BMSSC (ang. *Bone Marrow Stromal Stem Cells*), będących synonimem dla MSC (ang. *Mesenchymal Stem Cells*), które mogą różnicować się w osteoblasty, adipocyty czy też komórki zrębu/fibroblasty. Adipocyty mogą wywodzić się właśnie z takiej trójprogenitorowej puli komórek macierzystych.

Progenitorowe komórki macierzyste – PCS (ang. *Progenitor Stem Cells*) należą zwykle do rezerwy tkankowej i mogą stanowić początek dla trzech różnych typów komórek (jak opisano powyżej), dwóch typów lub być unipotencjalne (np. mioblasty jako prekursorowe komórki w stosunku do mięśniowych), jakkolwiek mają one swoją pulę samoodnawialną.

Komórki progenitorowe o różnych fenotypach stały się prawdziwymi bohaterami prób klinicznych w regeneracji mięśnia sercowego.

3. KOMÓRKI MACIERZyste STOSOWANE W REGENERACJI MIĘŚNIA SERCOWEGO

3.1. Komórki iPS

Komórki te, przeprogramowane genetycznie (transfekcja genów *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *cMyc*), uzyskane zostały ze zwykłej komórki somatycznej. Jednocześnie przypominają one pluripotencjalne zarodkowe komórki macierzyste – ESC (ang. *Embryonal Stem Cells*) swoją morfologią, markerami powierzchniowymi, profilem ekspresji genów i aktywnością telomerazy. Mają także podobną plastyczność i zdolność do samoodnawiania. iPS mogą różnicować się w dojrzałe kardiomiocyty zachowując podobną charakterystykę jak kardiomiocyt pozyskany z pluripotencjalnych ESC [13]. Ponieważ są przeprogramowanymi komórkami somatycznymi, iPS mogą być generowane z autologicznych somatycznych komórek dorosłego gospodarza, będącego docelowo biorcą, tak więc autoimplantacja zabezpiecza je przed atakiem ze strony układu odpornościowego. Jest to ich istotnie różna cecha w porównaniu z ESC, które w normalnych warunkach są komórkami allogenicznymi (o ile oczywiście nie są pozyskane z własnego zarodka, np. uzyskanego drogą klonowania przez transfer diploidalnego jądra komórkowego). Jak dotąd iPS, podobnie do ESC, kwalifikowane są do badań przedklinicznych w modelach zwierzęcych, ponieważ

różnicowane *in vitro* kardiomiocyty powstają w małych ilościach, mają także często heterogeny fenotyp, przez co stanowią niejednorodną mieszaninę komórkową. Ponadto iPS, ze względu na użycie wirusowych wektorów (dla nadekspresji wybranych genów), mogą ulegać niekontrolowanej proliferacji, a nawet onkogenezie czy anomaliom rozwojowym [18].

3.2. Pluripotencjalne komórki ESC

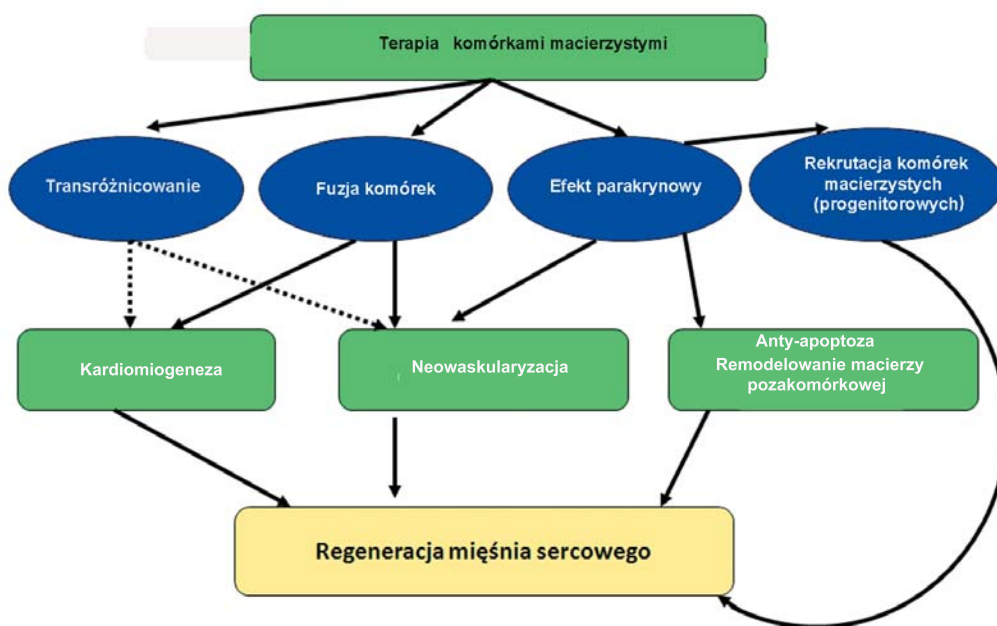
W porównaniu do pluripotentnych komórek dorosłych organizmów (ASC lub MASC), ESC (ang. *Embryonal Stem Cells*) mają lepszy potencjał proliferacyjny (praktycznie nieograniczona samoodnowa) bez zmian w kariotypie i przy zachowaniu niezachwianej pluripotencji. Zasadniczo z komórek ESC uzyskuje się kardiomiocyty zarówno z zachowaną charakterystyką strukturalną, jak i funkcją [9]. Tak więc uzyskuje się różne podtypy kardiomiocytów, tj. uczestniczące w układzie bódźcowo-przewodzącym serca, a także zróżnicowane na przedsionkowe i komorowe [7]. Zatem ESC mogą być postrzegane jako potencjalnie nieograniczone źródło kardiomiocytów dla terapii komórkowych. Opisano liczne próby przedkliniczne z użyciem komórek ESC, jak i zróżnicowanych z nich kardiomiocytów, które podawano do pozawałowego miokardium. Transplantacje zarówno ESC, jak i zróżnicowanych z nich kardiomiocytów, polepszały funkcję lewej komory (po wcześniej zaindukowanym zawale) [6]. Pomimo to istnieją poważne przyczyny zniechęcające do klinicznych aplikacji ESC (i ich pochodnych). Po pierwsze, wydajność różnicowania kardiomiocytów *in vitro* nie przekracza 1%, co istotnie ogranicza uzyskanie adekwatnych dla implantacji liczebności. Po drugie, uzyskanie zróżnicowanych kardiomiocytów z ESC objawia się powstaniem heterogennej populacji składającej się z komórek bódźcowo-przewodzących, przedsionkowych czy komorowych, co powoduje potencjalne niebezpieczeństwo arytmii, jeśli komórki te w losowy sposób będą układały się wobec kardiomiocytów narządu biorczego. Po trzecie, kardiomiocyty uzyskiwane z ESC są zarówno strukturalnie, jak i funkcjonalnie niedojrzałe wobec swoich dorosłych odpowiedników, a zatem taka niedojrzałość, np. w aspekcie przekazywania bodźców elektrofizjologicznych, może również oddziaływać pro-arytmicznie [35]. Wreszcie ESC, ze względu na swoją (nadmierną) plastyczność, mogą dać początek potworniakom, względnie mogą spowodować swoją immunogennością (allogeniczność) zaindukowanie odpowiedzi immunologicznej u biorcy.

3.3. Komórki macierzyste szpiku kostnego – BMDC

Jak wspomniano powyżej, komórki macierzyste szpiku kostnego – BMDC (ang. *Bone Marrow-Derived Cells*) są mieszaniną (ok. 2%) macierzystych komórek multipotencjalnych (MASC) i progenitorowych (ok. 98%) o różnym zakresie plastyczności oraz (jeśli w ogóle) w olbrzymiej mniejszości komórek pluripotencjalnych. Spośród mieszaniny komórek progenitorowych, szczególne powodzenie w terapii ostrego zawału zdobyły komórki hematopoetyczne (HSC), śródłonkowe (EPC), a ostatnio komórki mezenchymalne (MSC). W fazie początkowej prób

klinicznych nie rozróżniano dobrze poszczególnych fenotypów tych komórek, tak więc bardzo często używano mieszanin tych populacji, przez co uzyskane wyniki należy traktować z dużą ostrożnością. Do dzisiaj jednak istnieją grupy badawczo-kliniczne preferujące np. przetaczanie całkowitej mieszaniny komórek szpikowych bez ich frakcjonowania. Olbrzymią zaletą komórek macierzystych/progenitorowych pochodzenia szpikowego jest ich dostępność i łatwość ewentualnej propagacji *in vitro*, ponadto pochodzą one i wracają do tego samego osobnika, przez co unika się uaktywnienia odpowiedzi immunologicznej. Początkowo sądzono (a wynikało to z badań przedklinicznych), że komórki pochodzenia szpikowego transplątowane do obszaru graniczącego z zawałem, transróżnicują się na zasadzie zainicjowania miogenezy *in vivo* czy też neoangiogenezy [19], jednak później stwierdzono, że fenomen transróżnicowania komórek szpikowych (jeśli w ogóle przebiega u ludzi), jest nader rzadkim zjawiskiem [17]. Obecnie przyjmuje się, że za poprawę parametrów funkcjonalnych (hemodynamicznych) serca w wyniku implantacji BMSC odpowiedzialne są raczej inicjowane przez nie mechanizmy parakrynowe (ryc. 1).

Ogólnie rzecz ujmując obecność antygenu powierzchniowego CD34⁺ stała się wyróżnikiem dla podziału na dwie podstawowe subpopulacje komórek. Komórki mające ten marker należą do grupy hematopoetycznych i endotelialnych, dodatkowo marker CD 133 identyfikuje progenitorowe komórki endotelialne [31], zaś nieobec-



RYCINA 1. Mechanizmy terapii komórkami macierzystymi
FIGURE 1. Therapeutic mechanism with stem cells

ność antygeny CD 34 definiuje komórki MSC oraz multipotencjalne (MASC) [22]. Dodatkowo, pozyskane dane wskazują, że progenitorowe komórki śródbłonkowe (jak i HSC) mogą być dodatkowo mobilizowane (ze szpiku) do krążenia (a stąd do miokardium) i w ten sposób brać udział w neowaskularyzacji pozawałowego miokardium [3, 27], czy regeneracji śródbłonka [32].

Komórki mezenchymalne (negatywne w stosunku do antygeny CD 34), jakkolwiek zdolne do różnicowania w kardiomiocyty, są nadal trudne do zdefiniowania genotypowego. Mają one cały panel określających ich markerów, takich jak: CD 29, CD 90, CD 44 czy CD 73, ale nie mają jednego selektywnego markera dla ich selekcji. Próby przedkliniczne, jak i całkiem niedawno przedsięwzięte próby kliniczne z implantowanymi MSC, wskazują na zwiększoną perfuzję miokardium, redukcję apoptozy (kardiomiocytów po zawale), jak i pomniejszenie pola zawału [2]. Pomimo że MSC mają pewien potencjał do transróżnicowania (w kardiomiocyt), funkcjonalne kardiomiocyty w miejscu implantacji po świeżym zawale, obserwowane są raczej rzadko. Dyskutując ich pewną przewagę nad BMSC, należy zwłaszcza podnieść możliwość ich allogenicznego zastosowania, ze względu na ich uprzywilejowanie immunologiczne (brak indukcji odpowiedzi immunologicznej), ze względu na nietypową ekspresję antygenów zgodności tkankowej i możliwość wydzielania immunosupresyjnych cytokin [23]. Oczywiście, komórki multipotencjalne szpiku (MASC) mając zdolność do wielokierunkowego różnicowania, również mogą przekształcać się w kardiomiocyty i być aplikowane w sercu, te sytuacje utrudnia fakt braku swoistych markerów dla ich jednoznacznej identyfikacji [44].

Zachęcające wyniki badań przedklinicznych przy użyciu różnych podtypów uzyskiwanych komórek szpikowych wywołały serię prób klinicznych (co najmniej kilkadziesiąt), zwłaszcza w zawałach świeżych i zwłaszcza u pacjentów ze schorzeniami naczyń wieńcowych, a dotychczas uzyskane wyniki zostaną poddane interpretacji w podrozdziale poświęconym badaniom klinicznym [1, 12].

3.4. Komórki macierzyste krwi pępowinowej oraz łożyska

Osobną kategorią komórek to komórki macierzyste z tzw. narządów przejściowych. Łożysko i/lub naczynia pępowinowe są obfitym źródłem komórek macierzystych, jednak w obu przypadkach, co najwyżej stanowią nie do końca zidentyfikowaną ich mieszaninę. Na przykład krew pępowinowa jest w zasadzie mieszaniną podobną do tej w przypadku opisywanych komórek szpikowych, w której znajdują się komórki o potencjale hematopoetycznym, mezenchymalnym, a także multipotencjalnym oraz (nie do końca udowodnionej) puli komórek pluripotencjalnych. W przypadku komórek macierzystych pochodzących z łożyska, sprawę komplikuje fakt wieku (ciążowego) łożyska oraz dualizm ich pochodzenia, tj. macicznego i płodowego. Próby z użyciem tych komórek do regeneracji mięśnia sercowego są do tej pory nieliczne i limitowane z podanych względów.

3.5. Progenitorowe komórki macierzyste tkanki tłuszczowej

Tkanka tłuszczowa jest obfitym i łatwo dostępnym źródłem komórek macierzystych organizmu dorosłego (ASC), które mogą zostać wykorzystane do regeneracji

mięśnia sercowego. Oprócz komórek linii adipocyttopochodnej, tkanka tłuszczowa zawiera komórki o charakterystyce mezenchymalnej (MSC) oraz progenitorowej endotelialnej (EPC). Podobnie jak w przypadku komórek pochodzenia szpikowego, komórki mezenchymalne tkanki tłuszczowej mogą różnicować się w kardiomiocyty i komórki śródbłonna [24, 25]. Dane eksperymentalne sugerują, że uzyskane z tkanki tłuszczowej MSC mogą implantować do miokardium, nabywać fenotyp mięśnia sercowego w tkance pozawałowej i polepszać funkcję mięśnia sercowego [15], jednak ich potencjał terapeutyczny w porównaniu z komórkami MSC z innych źródeł pozostaje nie do końca określony.

3.6. Progenitorowe komórki mięśnia sercowego – CSC

W mięśniu sercowym dorosłego organizmu ludzkiego (a także i innych ssaków) wyodrębniono pulę komórek macierzystych [5], których pochodzenie nie do końca jednak pozostaje wyjaśnione (rezerwa tkankowa?, krążące komórki szpikowe?, pozostałość po okresie rozwojowym?). Szereg autorów wykazuje obecność CSC (ang. *Cardiac Stem Cells*) lub CPC (ang. *Cardiac Progenitor Cells*), które mają zdolność do samoodnowy, dają się klonować oraz różnicować w różne podtypy kardiomiocyta, mięśni gładkich czy komórek śródbłonna [4]. Komórki te identyfikuje się markerami c-kit (u ssaków) oraz sca-1 (u myszy) i podlegają one propagacji oraz różnicowaniu w hodowli *in vitro*. Progenitorowe komórki serca izoluje się zwykle po interwencji chirurgicznej lub też z biopsji endomiokardialnej, a następnie dokonuje się ich ekspansji *ex vivo*. W modelach eksperymentalnych (przedklinicznych) z zaindukowanym zawałem, mobilizuje się i implantuje CPC, które następnie nabywają fenotyp dojrzałego mięśnia sercowego lub też naczyniowy (śródbłonkowy) w pozawałowym miokardium, polepszając jego funkcję [8].

3.7. Mioblasty szkieletowe lub komórki macierzyste pochodzenia miogenne – MDSC

Nazwa mioblasty szkieletowe jest obecnie sformułowaniem mylącym, ponieważ są to właściwie komórki satelitowe leżące pomiędzy blaszką podstawową a sarkolemą mięśnia szkieletowego, są więc faktyczną rezerwą tkankową, natomiast komórki MDSC (ang. *Muscle-Derived Stem Cells*) lub mioblasty (aktywowane) stanowią poszczególne stadia różnicowania komórek satelitowych. Zwykle pozyskuje się je drogą biopsji mięśniowej, a następnie izoluje i poddaje propagacji *ex vivo* dla uzyskania wystarczających liczebności komórek, adekwatnych do celów implantacji [20], najczęściej autologicznych. Mioblasty szkieletowe stały się zwłaszcza atrakcyjnym modelem przeszczepowym dla regeneracji pozawałowego miokardium, ponieważ modele przedkliniczne wskazywały, że transplantowane komórki tworzą skuteczny przeszczep w mięśniu sercowym, różnicują się (*in situ*) w kierunku miotubul oraz poprawiają funkcję (hemodynamikę) pozawałowego mięśnia sercowego, dostarczając elementu kurczliwego w obszarze blizny pozawałowej [16, 39]. Te początkowe, zachęcające dane wytyczyły drogę dla pierwszych prób klinicznych, zainicjowanych na początku stulecia w formule I fazy badań klinicznych [14], które zostały podjęte

także przez zespoły badawczo-kliniczne w naszym kraju [33, 34]. Początkowo mioblastom, stosowanym w próbach klinicznych towarzyszyły zabiegi pomostowania aortalno-wieńcowego, przez co wpływ samego mioblasta na regenerację miokardium był niejasny. Do tej pory wykonano ponad 25 różnych prób klinicznych [30], a początkowy entuzjazm, jaki wzbudzało stosowanie autologicznych mioblastów, został wytłumiony skutkami ubocznymi w postaci pojawiania się uporczywych arytmii, w wyniku obniżenia ekspresji genów, decydujących o połączeniach szczelinowych (koneksyna 43) pomiędzy kardiomiocytami narządu biorczego a przesiedlonymi autologicznymi mioblastami. Obecnie, próby modyfikacji genetycznej mioblastów przez nadekspresję genu koneksyny 43 wykazały w sytuacjach modelowych (przedklinicznych), prawidłowość tego toru myślenia [28] i wydaje się, że mioblasty po pewnych modyfikacjach staną się na powrót atrakcyjnymi kandydatami, które bez transróżnicowania dostarczają naturalnych elementów kurczliwych w uległej atrofii tkance pozawałowego miokardium.

4. SPOSÓB PODAWANIA KOMÓREK MACIERZYSTYCH DO MIEJSCA DOCELOWEGO

Sukces terapii komórkowej zależy od wytworzenia przeszczepu w miejscu ściśle określonym i newralgicznym dla regeneracji danego narządu oraz od przeżycia jak największej liczby zaimplantowanych komórek. Ponadto brak znajomości fizjologii komórek, skorelowany z nietrafionym sposobem podania, może wywołać lub spotęgować niekorzystne skutki uboczne (zarówno lokalne, jak i systemowe). Zatem, sposób podania zależy od charakterystyki wybranej populacji komórek macierzystych i środowiska danego narządu podlegającego naprawie.

W pierwszej serii badań przedklinicznych (ostry zawał serca) wydawało się, że podwyższone sygnały 'zasiedlania' komórek macierzystych wypływają z uszkodzonego narządu przez czynnik 'kotwiczący' komórki, tj. SDF-1 (ang. *Stromal Derived Factor*), rozpoznający chemoatrakcyjne struktury receptorowe. Z kolei naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) umożliwia przenikanie komórek przez ścianę naczyniową, ich migrację oraz retencję w pozawałowym miokardium [36]. Stąd początkowo preferowano drogę dożylną podawania tych komórek. Wkrótce jednak okazało się, że gradienty wytwarzane przez ligand SDF-1 oraz receptory dla chemokin, nie są u człowieka wystarczająco aktywne, aby wychwytywać w uszkodzonym narządzie np. komórki ze szpiku, podane w odległym punkcie organizmu drogą naczyniową. Stosując system cewników, używany pierwotnie dla celów koronarografii, zdecydowano się na podawanie komórek drogą naczyń wieńcowych, najchętniej tych, które zaopatrują miejsce pozawałowe, przez co dla komórek mogących przenikać naczynia (np. pochodzenia szpikowego BMSC lub MSC), sposób ten stał się obowiązujący.

Nadal otwartą sprawą pozostaje optymalizacja sposobu podawania komórek, które nie mają zdolności przenikania przez naczynia (np. mioblast). W tym przypadku

komórki można podawać intramiokardialnie, albo posługując się systemem nawigacji NOGA, względnie przy okazji pomostowania aortalno-wieńcowego (wstrzyknięcie bezpośrednie) lub drogą minitorakotomii itp.

Dla pacjentów z przewlekłymi stanami niedokrwienia, sygnały do zasiedlania mogą okazać się zbyt słabe, tak więc drogi systemowego podania dożylnego lub dowieńcowego zaopatrzą miokardium w komórki macierzyste, w nader ograniczonym zakresie (zaledwie do kilku procent z populacji wyjściowej). W tym przypadku drogi bezpośredniego podania intramiokardialnego, przy okazji interwencji chirurgicznej (pomostowanie), czy też endokardialne przy pomocy cewników, pozostają metodami z wyboru. Zwłaszcza system NOGA, z trójwymiarowym elektromechanicznym układem mapującym, gwarantuje dotarcie cewnika wraz z komórkami do precyzyjnie wyznaczonego miejsca docelowego i każdym typem komórki.

Bezpośrednie podawanie komórek w sąsiedztwo blizny pozawałowej staje się kwestionowaną procedurą. Komórki nie mają tu warunków dla różnicowania (poprzez brak sąsiedztwa z kardiomiocytami), nieadekwatne jest zaopatrzenie naczyń, jak również brakuje komórek docelowych dla czynników parakrynowych (kardiomiocyty czy też rezydujące CPC). Także implantując komórki w bliskości blizny, prowokujemy ryzyko arytmii [11]. Rozważa się przeto użycie podejść bioinżynieryjnych, takich jak stosowanie łąk, wkładek biologicznych czy też macierzy pozakomórkowych, by polepszyć przeżywalność, zasiedlenie i różnicowanie [38], jednak brakuje prób klinicznych potwierdzających słuszność takiego podejścia badawczego.

5. PRÓBY KLINICZNE

Od początku wieku przeprowadzono stosunkowo dużą liczbę prób klinicznych (faza I/II), często randomizowanych, jednak na stosunkowo małą skalę (liczebnie) w zawałach świeżych i odległych. W przypadku wykorzystania komórek pochodzenia szpikowego, zarejestrowano ponad 75 opublikowanych prób z tego zakresu, a z użyciem mioblastów o ok. połowę mniej. Przyjrzyjmy się opracowaniom zbiorczym podsumowującym dotychczas wykonane próby kliniczne [1, 12, 30].

5.1. Próby kliniczne w zawałach ostrych

U takich pacjentów zwykle wykonuje się randomizowane próby kliniczne z podaniem dowieńcowym autologicznych komórek szpikowych. Najczęściej pacjenci ci przechodzą tzw. koronaroplastykę naczynia zaopatrującego miejsce zawału z wszczepieniem stentu. Dotychczas wykonane próby (komórki szpikowe) dostarczają kontrowersyjnych danych posługując się małymi populacjami pacjentów (zwykle poniżej 200) i różnią się dawką i preparatyką podawanych komórek, czasem implantacji (od dokonanego zawału) i oceną funkcji mięśnia sercowego. Co najważniejsze, jak dotąd przy podawaniu komórek pochodzenia szpikowego, nie wykryto poważniejszych skutków ubocznych.

W wyniku przeprowadzonych meta-analiz (z grupą randomizowanych pacjentów) stwierdzono potencjalne korzyści dowieńcowego podawania komórek szpikowych (BMSC), poprawiających w zawale ostrym frakcję wyrzutową lewej komory o ok. 3–4% (poprawa umiarkowana, ale statystycznie znamienne) oraz niewielkie pomniejszenie wielkości blizny pozawałowej i wymiarów lewej komory (zmniejszenie remodelingu lewej komory) [1]. Poprawa ta jest porównywalna z polepszeniem frakcji wyrzutowej – EF (ang. *Ejection Fraction*) stwierdzanym w badaniu REPAIR-AMI (*Remodeling in Acute Myocardial Infarction*) [29]. Korzyści terapii z użyciem komórek macierzystych są większe w przypadkach poważniejszej dysfunkcji lewej komory, aczkolwiek podsumowując uzyskane wyniki, można pokusić się o wniosek, że poprawa hemodynamiki serca w wyniku terapii za pomocą komórek macierzystych jest ogólnie porównywalna z wynikami uzyskiwanymi przy użyciu innych procedur, jak np. reperfuzja, stosowanie inhibitorów enzymatycznych konwertujących angiotensynę, blokujących receptory angiotensynowe i inne [26]. Obecnie kontynuowane są próby kliniczne (SWISS-AMI, BOOST-2) na większą skalę, które z pewnością zweryfikują dotychczasowe meta-analizy i być może dostarczą nowych danych na temat optymalnego czasu i dawki podawanych komórek.

5.2. Próby kliniczne w przewlekłym niedokrwieniu miokardium

Jak dotąd, tylko kilka małych, randomizowanych, kontrolowanych prób klinicznych, zarejestrowano z użyciem komórek macierzystych przy leczeniu dusznicy opornej na leczenie (w wyniku przewlekłego niedotlenienia miokardium). W próbach tych wykorzystywano komórki szpikowe wprowadzając je bezpośrednio do miokardium za pomocą trójwymiarowego mapowania elektromechanicznego (NOGA), prowadzącego kateter [21, 41]. Losordo i wsp. testowali trzy dawki preparatu G-CSF mobilizującego ze szpiku komórki o fenotypie CD34⁺. Demonstrowali oni trend obniżający częstość ataków duszności oraz zwiększonej zdolności do ćwiczeń, jakkolwiek bez żadnych zmian w perfuzji badanej przy użyciu SPECT [10]. Inne dwie próby kliniczne z wykorzystaniem jednojądrzastych komórek szpikowych wykazały znamienne, ale umiarkowane polepszenie zdolności do wysiłku fizycznego, jak również podwyższenie frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF) [42,43]. Także znamienne polepszenie wyników w perfuzji ocenianej metodą SPECT zaobserwowano w badaniach Ramshorsta i wsp. [43]. Przyczyny kontrowersji nie zostały wyjaśnione, być może związane jest to z heterogennością badanych grup, dawką użytych komórek czy różnicą w podejściu metodologicznym do wyników uzyskanych z badania SPECT. Najważniejsze, że w tych próbach klinicznych nie wykazano skutków ubocznych, w tym arytmii, wykonując bezpośrednie intramiokardialne podania komórek. W ostatnich dwóch badaniach z użyciem oceny mięśnia sercowego za pomocą rezonansu magnetycznego wskazano na podobny wzrost frakcji wyrzutowej (3–5%) z zastosowaniem dwóch różnych prób implantacji komórek pochodzenia szpikowego [42, 43].

5.3. Próby kliniczne w kardiomiopatii niedokrwiennej – podsumowanie

Ukazujące się ostatnio meta-analizy dotyczące zastosowania komórek macierzystych w regeneracji mięśnia sercowego na tle choroby niedokrwiennej (zawał ostry lub odległy) wskazują na kilka interesujących faktów dotyczących obserwacji frakcji wyrzutowej serca (EF), pomniejszenia pola zawału oraz zahamowania deformacji mięśnia sercowego. W istocie donoszą one o podobnych parametrach poprawy ($>3\%$ wzrasta frakcja wyrzutowa lewej komory i o ponad 3% zmniejsza się obszar pozawałowy) niezależnie od zastosowanych komórek szpikowych [1, 12]. Potwierdzają to także wyniki polskich autorów przedstawione w badaniach REGENT [40], którzy selekcjonowali macierzyste komórki szpikowe stosując marker $CD34^+$ bądź też całą populację komórek jednojądrzastych szpiku, nie wykazali pomiędzy ich działaniem żadnych różnic.

W meta-analizie przedstawionej przez Abel-Latif i wsp. [1] stosowano komórki szpikowe zarówno obejmujące jednojądrzaste komórki szpiku, jak i komórki mezenchymalne (także występujące razem w mieszaninie) oraz pulę macierzystych komórek szpikowych pozyskanych z krwi obwodowej. W pracy tej dokonywano podania komórek szpikowych od 1 doby po zawałe aż do 80 miesięcy po zawałe. Wykazano pozytywny wpływ implantowanych komórek szpikowych powyżej 5 dni od wystąpienia zawału, przy czym liczba komórek nie wpływała na polepszenie się parametrów hemodynamicznych, podobnie jak droga podawania tych komórek. W zasadzie jednak w ponad 90% komórki szpikowe podaje się do tętnicy wieńcowej, przez co analiza różnic z podanymi intramiokardialnie komórkami szpikowymi nie może być właściwie dokonana. Pozytywny efekt podawania macierzystych komórek szpikowych nie jest obserwowany natychmiast, ale narasta w 3–6 miesięcy po podaniu, utrzymując się zwykle przez 1 rok i zanikając po około 18 miesiącach (ocena EF). Podawanie komórek szpikowych o charakterystyce $CD133^+$ (hematopoetycznych szpiku) czy też tzw. mezenchymalnych komórek szpikowych, ze względu na ograniczoną liczbę prób klinicznych nie może stanowić jeszcze podstawy do wykonywania meta-analiz.

W innej analizie statystycznej oceniano podawanie jednojądrzastych macierzystych komórek szpikowych (BMSC) [12]. Zwraca uwagę pozytywny efekt implantacji komórek (zawał świeży) co najmniej po 7 dniach od dokonanego zawału. Poprawa parametrów hemodynamicznych serca w tej analizie wykazała zależność od zastosowanej liczby komórek ($>100 \times 10^6$ /podanie). Mierzona EF wzrastała w przedziale od 3–6 miesięcy od podania, jakkolwiek punkt końcowy poprawy nie został jeszcze wyznaczony w omawianych próbach.

Przeprowadzone obie meta-analizy utrudnia fakt, że frakcja wyrzutowa (główny oceniany parametr hemodynamiczny serca) była ustalana na podstawie badania echokardiograficznego, jak i rezonansu magnetycznego, jakkolwiek wiadomo, że badania te nie można uważać za równie precyzyjne i sobie równoważne.

5.4. Próby kliniczne w zastoinowej niewydolności serca

Do tej pory dwa randomizowane badania kliniczne wykonano w tej jednostce chorobowej (używając autologicznych komórek pochodzenia szpikowego lub mioblastów). W próbie klinicznej TOPCARE-CHD, pacjenci z zawałem odległym

(ponad 3 miesiące) otrzymywali dowieńcowo komórki szpikowe lub krążące (we krwi) macierzyste komórki progenitorowe. U pacjentów po implantacji komórek szpikowych (ale nie krążących progenitorowych), wykazano umiarkowane aczkolwiek statystycznie znamienne podwyższenie (2,9%) frakcji EF [21], w 3 miesiące po podaniu komórek i nie zaobserwowano istotnych zmian w rozmiarach lewej komory.

U pacjentów z zastoinową niewydolnością serca, w wyniku ubytku kardiomiocytów po przeżytym zawale, można oczekiwać, że implantacja komórek z zachowanymi właściwościami kurczliwymi może doprowadzić do repopulacji akinetycznego, uległego atrofii miokardium, przywracając funkcję mechaniczną w tym regionie. Próby klinicznej z użyciem mioblastów szkieletowych dokonano na pacjentach z kardiomiopatią niedokrwienną przy okazji zabiegu pomostowania aortalno-wieńcowego (bezpośrednie wstrzykiwanie mioblastów na otwartym sercu). W tej próbie pod nazwą MAGIC (ang. *Myoblast Autologous Grafting in Ischaemic Cardiomyopathy*) dokonano oceny bezpieczeństwa i efektywności procedury podając 4×10^8 oraz 8×10^8 komórek *versus placebo* [37]. Z powodu niebezpieczeństwa arytmogennego, u wszystkich pacjentów implantowano defibrylator-kardiowerter przed zabiegiem. Po 6 miesiącach nie wykryto jednak znamiennych różnic w regionalnej bądź globalnej funkcji lewej komory, posługując się metodą echokardio-graficzną, nie wykryto też znaczących różnic w indukowaniu arytmii w badanych 3 podgrupach. Jednakże u pacjentów otrzymujących wyższą dawkę komórek macierzystych wykryto znaczący (znamienny) spadek końcowo-diastolicznej oraz końcowo-systolicznej objętości serca, co sugeruje odwrócenie trendu niekorzystnego remodelingu mięśnia sercowego.

6. PODSUMOWANIE

Stosowanie komórek macierzystych nadal uważane jest za atrakcyjną metodę w medycynie regeneracyjnej. Obecne trudności spowodowane są brakiem możliwości precyzyjnego ich fenotypowania, przez co duża liczba wykonywanych prób klinicznych staje się nieporównywalna z prowadzonymi meta-analizami. Z drugiej strony trwają prace nad dramatyczną poprawą odsetka osiedlania tych komórek w miejscu docelowym, obecnie niewielkie ich odsetki, które 'kotwiczone' są w narządach, co najwyżej 'skazane są' na czynność parakrynową, a nie zastępują wobec zużytych komórek czy patologicznych struktur. Modyfikacje genetyczne komórek macierzystych stają się następną modną dziedziną w dążeniu do poprawienia efektywności komórek macierzystych, jak i próbą wykorzystania ich tropizmu w transportowaniu innych substancji. Liczba możliwych wariantów implantacji komórek macierzystych zwiększa się wraz z następnymi odkryciami i być może, tak jak w przypadku ustalenia optymalnego składu dla leków chemioterapeutycznych w ubiegłym stuleciu, muszą minąć dwie/trzy dekady upartych badań w celu optymalizacji schematów leczniczych, wynikających z prowadzonych terapii komórkowych u człowieka.

LITERATURA

- [1] ABDEL-LATIF A, BOLLI R, TLEYJEH IM, MONTORI VM, PERIN EC, HORNUNG CA, ZUBA-SURMAEK, AL-MALLAH M, DAWN B. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007; **167**: 989–997.
- [2] AMADO LC, SALIARIS AP, SCHULERI KH, ST JOHN M, XIE JS, CATTANEO S, DURAND DJ, FITTON T, KUANG JQ, STEWART G, LEHRKE S, BAUMGARTNER WW, MARTIN BJ, HELDMAN AW, HARE JM. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11474–11479.
- [3] ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T, WITZENBICHLER B, SCHATTEMAN G, ISNER JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**: 964–967.
- [4] BELTRAMI AP, BARLUCCHI L, TORELLAD, BAKER M, LIMANA F, CHIMENTI S, KASAHARA H, ROTA M, MUSSO E, URBANEK K, LERIA, KAJSTURA J, NADAL-GINARD B, ANVERSA P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; **114**: 763–776.
- [5] BERGMANN O, BHARDWAJ RD, BERNARD S, ZDUNEK S, BARNABÉ-HEIDER F, WALSH S, ZUPICICH J, ALKASS K, BUCHHOLZ BA, DRUID H, JOVINGE S, FRISÉN J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; **324**: 98–102.
- [6] HABIB M, CASPI O, GEPSTEIN L. Human embryonic stem cells for cardiomyogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**: 462–474.
- [7] HE JQ, MA Y, LEE Y, THOMSON JA, KAMP TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 2003; **93**: 32–39.
- [8] KAJSTURA J, URBANEK K, ROTA M, BEARZI C, HOSODA T, BOLLI R, ANVERSA P, LERIA. Cardiac stem cells and myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **45**: 505–513.
- [9] KEHAT I, KENYAGIN-KARSENTI D, SNIR M, SEGEV H, AMIT M, GEPSTEIN A, LIVNE E, BINAH O, ITS KOVITZ-ELDOR J, GEPSTEIN L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; **108**: 407–414.
- [10] LOSORDO DW, SCHATZ RA, WHITE CJ, UDELSON JE, VEERESHWARAYYA V, DURGIN M, POH KK, WEINSTEIN R, KEARNEY M, CHAUDHRY M, BURG A, EATON L, HEYD L, THORNE T, SHTURMAN L, HOFFMEISTER P, STORY K, ZAK V, DOWLING D, TRAVERSE JH, OLSON RE, FLANAGAN J, SODANO D, MURAYAMA T, KAWAMOTO A, KUSANO KF, WOLLINS J, WELT F, SHAH P, SOUKAS P, ASAHARA T, HENRY TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34⁺ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; **115**: 3165–3172.
- [11] MACIA E, BOYDEN PA. Stem cell therapy is proarrhythmic. *Circulation* 2009; **119**: 1814–1823.
- [12] 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**: 1807–1818.
- [13] MAURITZ C, SCHWANKE K, REPEL M, NEEF S, KATSIRNTAKI K, MAIER LS, NGUEMO F, MENKE S, HAUSTEIN M, HESCHELER J, HASENFUSS G, MARTIN U. Generation of functional murine cardiac myocytes from induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2008; **118**: 507–517.
- [14] MENASCHÉ P, HAGÉGE AA, SCORSIN M, POUZET B, DESNOS M, DUBOC D, SCHWARTZ K, VILQUIN JT, MAROLLEAU JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; **357**: 279–280.
- [15] MIYAHARA Y, NAGAYA N, KATAOKA M, YANAGAWA B, TANAKA K, HAO H, ISHINO K, ISHIDA H, SHIMIZU T, KANGAWA K, SANO S, OKANO T, KITAMURA S, MORI H. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006; **12**: 459–465.
- [16] MURRY CE, WISEMAN RW, SCHWARTZ SM, HAUSCHKA SD. Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *J Clin Invest* 1996; **98**: 2512–2523.
- [17] NYGREN JM, JOVINGE S, BREITBACH M, SÄWÉN P, RÖLL W, HESCHELER J, TANEERA J, FLEISCHMANN BK, JACOBSEN SE. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; **10**: 494–501.
- [18] OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; **448**: 313–317.

- [19] ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, BODINE DM, LERI A, ANVERSA P. Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; **410**: 701–705.
- [20] PAGANI FD, DERSIMONIAN H, ZAWADZKAA, WETZEL K, EDGE AS, JACOBY DB, DINSMORE JH, WRIGHT S, ARETZ TH, EISEN HJ, AARONSON KD. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *Am Coll Cardiol* 2003; **41**: 879–888.
- [21] PERIN EC, DOHMANN HF, BOROJEVIC R, SILVA SA, SOUSA AL, MESQUITA CT, ROSSI MI, CARVALHO AC, DUTRA HS, DOHMANN HJ, SILVA GV, BELÉM L, VIVACQUA R, RANGEL FO, ESPORCATTE R, GENG YJ, VAUGHN WK, ASSAD JA, MESQUITA ET, WILLERSON JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; **107**: 2294–2302.
- [22] PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD, MOORMAN MA, SIMONETTI DW, CRAIG S, MARSHAK DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143–147.
- [23] PITTENGER MF, MARTIN BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res* 2004; **95**: 9–20.
- [24] PLANAT-BÉNARD V, MENARD C, ANDRÉ M, PUCEAT M, PEREZ A, GARCIA-VERDUGO JM, PÉNICAUD L, CASTEILLA L. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res* 2004; **94**: 223–229.
- [25] PLANAT-BENARD V, SILVESTRE JS, COUSIN B, ANDRÉ M, NIBBELINK M, TAMARAT R, CLERGUE M, MANNEVILLE C, SAILLAN-BARREAU C, DURIEZ M, TEDGUIA, LEVY B, PÉNICAUD L, CASTEILLA L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 2004; **109**: 656–663.
- [26] REFFELMANN T, KÖNEMANN S, KLONER RA. Promise of blood- and bone marrow-derived stem cell transplantation for functional cardiac repair: putting it in perspective with existing therapy. *J Am Coll Cardiol* 2009; **53**: 305–308.
- [27] REYES M, DUDEK A, JAHAGIRDAR B, KOODIE L, MARKER PH, VERFAILLIE CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; **109**: 337–346.
- [28] ROELL W, LEWALTER T, SASSE P, TALLINI YN, CHOI BR, BREITBACH M, DORAN R, BECHER UM, HWANG SM, BOSTANI T, VON MALTZAHN J, HOFMANN A, REINING S, EIBERGER B, GABRIS B, PFEIFER A, WELZ A, WILLECKE K, SALAMA G, SCHRICKEL JW, KOTLIKOFF MI, FLEISCHMANN BK. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature* 2007; **450**: 819–824.
- [29] SCHÄCHINGER V, ERBS S, ELSÄSSERA, HABERBOSCH W, HAMBRECHT R, HÖLSCHERMANN H, YU J, CORTI R, MATHEY DG, HAMM CW, SÜSELBECK T, ASSMUS B, TONN T, DIMMELER S, ZEIHERRAM; REPAIR-AMI INVESTIGATORS. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1210–1221.
- [30] SEIDEL M, BORCZYŃSKAA, ROZWADOWSKAN, KURPISZ M. Cell-based therapy for heart failure: skeletal myoblasts. *Cell Transplant* 2009; Apr 6. pii: CT-1928. [Epub ahead of print]
- [31] SHANTSILA E, WATSON T, TSE HF, LIP GY. New insights on endothelial progenitor cell subpopulations and their angiogenic properties. *J Am Coll Cardiol* 2008; **51**: 669–671.
- [32] SHI Q, RAFII S, WU MH, WIJELATH ES, YU C, ISHIDA A, FUJITA Y, KOTHARI S, MOHLE R, SAUVAGE LR, MOORE MA, STORB RE, HAMMOND WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; **92**: 362–367.
- [33] SIMINIAK T, FISZER D, JERZYKOWSKA O, GRYGIELSKA B, ROZWADOWSKAN, KAŁMUCKI P, KURPISZ M. Percutaneous trans-coronary-venous transplantation of autologous skeletal myoblasts in the treatment of post-infarction myocardial contractility impairment: the POZNAN trial. *Eur Heart J* 2005; **26**: 1188–1195.
- [34] SIMINIAK T, KALAWSKI R, FISZER D, JERZYKOWSKA O, RZEZNICZAK J, ROZWADOWSKAN, KURPISZ M. 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.
- [35] SIU CW, MOORE JC, LI RA. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for heart therapies. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007; **7**: 145–152.
- [36] SMART N, RILEY PR. The stem cell movement. *Circ Res* 2008; **102**: 1155–1168.

- [37] SORRENTINO SA, BAHLMANN FH, BESLER C, MÜLLER M, SCHULZ S, KIRCHHOFF N, DOERRIES C, HORVÁTH T, LIMBOURGA, LIMBOURG F, FLISER D, HALLER H, DREXLER H, LANDMESSER U. Oxidant stress impairs in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells from patients with type 2 diabetes mellitus: restoration by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *Circulation* 2007; **116**: 163–173.
- [38] SUURONEN EJ, KURAITIS D, RUEL M. Improving cell engraftment with tissue engineering. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2008; **20**: 110–114.
- [39] TAYLOR DA, ATKINS BZ, HUNGSPREUGS P, JONES TR, REEDY MC, HUTCHESON KA, GLOWER DD, KRAUS WE. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; **4**: 929–933.
- [40] TENDERA M, WOJAKOWSKI W, RUZYŁŁO W, CHOJNOWSKA L, KEPKA C, TRACZ W, MUSIAŁEK P, PIWOWARSKA W, NESSLER J, BUSZMAN P, GRAJEK S, BREBOROWICZ P, MAJKA M, RATAJCZAK MZ; REGENT INVESTIGATORS. *Eur Heart J* 2009; **30**: 1313–1321.
- [41] 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**: 47–49.
- [42] TSE HF, THAMBAR S, KWONG YL, ROWLINGS P, BELLAMY G, MCCROHON J, THOMAS P, BASTIAN B, CHAN JK, LO G, HO CL, CHAN WS, KWONG RY, PARKER A, HAUSER TH, CHAN J, FONG DY, LAU CP. 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.
- [43] VAN RAMSHORST J, BAX JJ, BEERES SL, DIBBETS-SCHNEIDER P, ROES SD, STOKKEL MP, DE ROOS A, FIBBE WE, ZWAGINGA JJ, BOERSMA E, SCHALIJ MJ, ATSMAN DE. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA* 2009; **301**: 1997–2004.
- [44] YOON YS, WECKER A, HEYD L, PARK JS, TKEBUCHAVA T, KUSANO K, HANLEY A, SCADOVA H, QIN G, CHA DH, JOHNSON KL, AIKAWA R, ASAHARA T, LOSORDO DW. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* 2005; **115**: 326–338.

Prof. dr hab. Maciej Kurpisz
Instytut Genetyki Człowieka PAN
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań
e-mail: kurpimac@man.poznan.pl