

# Komórki macierzyste w klinicznych badaniach kardiologicznych

Stem cells in cardiological clinical trials

Krzysztof Przybycień<sup>1</sup>, Zdzisława Kornacewicz-Jach<sup>1</sup>, Bogusław Machaliński<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Klinika Kardiologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

<sup>2</sup>Zakład Patologii Ogólnej, Pomorski Uniwersytet Medyczny, Szczecin

## Abstract

Stem cell-based therapy is a novel therapeutic strategy introduced into cardiology, although there are not any established standards within the stem/progenitor cell type employed, their preparation, route of administration as well as methods controlling the pathophysiological and clinical parameters after the cell application. The aim of the present work was a complex metaanalysis of the clinical trials carried out in this field. Over 1000 patients with myocardial infarction as well as circulatory failure have been treated with stem cell-based therapy so far, but the obtained results are not concordant. Progress within cell biology and biotechnology give hopes for development of more effective therapeutic approaches. Identification and isolation of cardiac-specific stem/progenitor cells may deliver new perspectives for such therapy in the nearest future.

**Key words:** stem/progenitor cells, myocardial infarction, clinical trials, stem cell-based therapy

Kardiol Pol 2011; 69, 6: 601–609

## WSTĘP

Historia komórek macierzystych (*stem cells*) ma już ponad 100 lat. Pod koniec XIX wieku termin *stem cells* pojawił się w kontekście dwóch zagadnień. Theodor Boveri i Valentin Häcker użyli tej nazwy w celu określenia komórek zaangażowanych w produkcję komórek płciowych. Natomiast w 1896 r. Artur Pappenheim użył terminu *stem cell* do opisu komórki prekursorowej hematopoezy, zdolnej do różnicowania się w kierunku erytrocytów i leukocytów. W podobnym rozumieniu nazwy tej użył Alexander Maximow na Kongresie Towarzystwa Hematologicznego w Berlinie w 1908 r. [1].

Od tego czasu pojęcie „komórka macierzysta” uległo pewnym zmianom. Obecnie pod pojęciem komórki macierzystej, czyli tzw. komórki pnia (*stem cells*) rozumie się komórki, które charakteryzują się jednocześnie zdolnością do samoodnowy i możliwością różnicowania się do różnych typów komórek dojrzałych [2].

Ze względu na zdolność do różnicowania komórki macierzyste dzieli się na:

- totipotentne — takie, które mogą ulec zróżnicowaniu do każdego typu komórek, w tym komórek tworzących tkanki tzw. płodu (łożysko, sznur pępowinowy, błony płodowe);
- pluripotentne — takie, które mogą dać początek każdemu typowi komórek dorosłego organizmu z wyjątkiem komórek płodu;
- multipotentne — takie, które mogą dać początek kilku różnym typom komórek, z reguły o podobnych właściwościach i pochodzeniu embrionalnym z tego samego listka zarodkowego;
- unipotentne — inaczej komórki, które mogą różnicować tylko do jednego typu komórek dojrzałych.  
Ze względu na pochodzenie komórki macierzyste dzieli się na:
  - embrionalne komórki macierzyste (ESC, *embryonic stem cells*) — wyprowadzone z komórek embrionalnych; mogą być totipotentne (pochodzą z kilkokomórkowego embrionu) lub pluripotentne (pochodzą z węzła zarodkowego blastocysty);

## Adres do korespondencji:

dr n. med. Krzysztof Przybycień, Klinika Kardiologii, Pomorski Uniwersytet Medyczny, ul. Powstańców Wlkp. 72, 70–111 Szczecin, e-mail: kppam@wp.pl

**Praca wpłynęła:** 16.11.2010 r. **Zaakceptowana do druku:** 17.11.2010 r.

Copyright © Polskie Towarzystwo Kardiologiczne

— somatyczne (dorosłe) komórki macierzyste (ASC, *adult stem cells*) — znajdujące w tkankach dorosłych organizmów; komórki te mogą być pluripotenne, np. bardzo małe, podobne do embrionalnych (VSEL), multipotentne (jak np. komórki hematopoetyczne — HSC czy mezenchymalne — MSC) lub unipotentne (np. komórki owalne wątroby, satelitowe mięśni szkieletowych).

**Embrionalne komórki macierzyste** są to komórki, które mogą dać początek wszystkim tkankom organizmu. Komórki macierzyste 1–5-dniowego zarodka (embrionu) mogą rozwinąć się w dowolny typ komórek i teoretycznie zastąpić uszkodzone komórki. U ssaków embrionalne komórki macierzyste są wyprowadzane z komórek węzła zarodkowego blastocysty lub z wyhodowanych zarodków zwierząt lub ludzi. Jednak wykorzystywanie komórek embrionalnych związane najczęściej ze zniszczeniem zarodka jest bardzo kontrowersyjne pod względem etycznym [3].

W 2006 r. Klimanskaya i wsp. [4] donieśli o wyhodowaniu 2 linii komórek macierzystych z embrionu, bez jego zniszczenia. Technika ta polega na pobraniu 1 komórki na bardzo wczesnym etapie rozwoju embrionu, a następnie jej namnożeniu poza organizmem. Procedura ta przypomina techniki wykorzystywane w trakcie zapłodnienia *in vitro*, kiedy również pobiera się pojedyncze komórki do badań genetycznych wykonywanych przed implantacją zarodka.

**Dorosłe (somatyczne) komórki macierzyste** znajdują się we względnie niewielkich ilościach w szpiku kostnym, trzustce, wątrobie, naskórku, rogówce i siatkówce oka oraz innych tkankach i narządach, gdzie są odpowiedzialne za ich regenerację. Multi- lub unipotentne mogą się przekształcać w komórki określonych szeregów komórkowych, zazwyczaj w obrębie tkanki, z której pochodzą. Chociaż posiadają ograniczoną zdolność różnicowania w różne narządy/tkanki, wykazują cechy dające im istotną przewagę nad komórkami embrionalnymi w zastosowaniu terapeutycznym. Przede wszystkim nie tworzą potworników ani innych nowotworów, zwłaszcza niezróżnicowanych pochodzenia zarodkowego, względnie często spotykanych po aplikacji komórek embrionalnych. Mogą być ponadto pobrane z własnego organizmu pacjenta, dzięki czemu nie istnieje ryzyko ich odrzucenia. Dodatkowo pozyskanie dorosłych komórek macierzystych nie wiąże się ze zniszczeniem embrionu, więc nie wywołuje kontrowersji etycznych. Komórki macierzyste somatyczne zastępują wyspecjalizowane, dojrzałe komórki, które obumierają w sposób naturalny. Niestety, w warunkach naturalnych komórki macierzyste somatyczne w większości narządów nie są w stanie efektywnie zregenerować rozległych uszkodzeń powstałych w wyniku chorób [2].

Innym źródłem pozyskania pluripotennych komórek macierzystych jest krew pępowinowa, która stanowi jedyne źródło komórek macierzystych niewymagające używania metod inwazyjnych u dawcy. Do niedawna łożysko i pępowina, a wraz z nimi komórki macierzyste mogły być wyko-

rzystywane jedynie tuż po porodzie. Obecnie krew pępowinowa może być przechowywana przez kilkadziesiąt lat i dostępna, gdy zajdzie potrzeba leczenia. Metoda ta nie budzi kontrowersji natury etycznej. Ponadto przy zastosowaniu komórek z krwi pępowinowej nie ma ryzyka, że zostaną zniszczone przez układ odpornościowy gospodarza, od którego pochodzą, a ryzyko przekształcenia się ich w nowotwór jest zdecydowanie mniejsze lub nawet wykluczone. Aktualnie nie ma jednak badań klinicznych z ich wykorzystaniem w kardiologii [5].

W 2006 r. grupa uczonych pod kierunkiem Takahashiego i Yamanaki zidentyfikowała (w doświadczeniach na myszach) grupę genów, które są włączone w komórkach macierzystych zarodkowych, a wyłączone w komórkach dojrzałych [6]. W dalszych badaniach wykazano, że włączenie 4 genów w komórce ludzkiej skóry powoduje, że „cofa się w rozwoju” i zyskuje własności komórek embrionalnych. Komórki te nazwano indukowanymi pluripotennymi komórkami macierzystymi (iPS, *induced pluripotent stem cells*). Komórki iPS, podobnie jak komórki zarodkowe, mogą się przekształcić w dowolny typ dojrzałej komórki i proliferować w sposób nieograniczony. Słabą stroną komórek iPS jest to, że 2 z 4 genów wykorzystywanych do tworzenia komórek iPS to tzw. onkogeny, co oznacza, że istnieje duże ryzyko, że komórki iPS ulegną nowotworzeniu. Co więcej, do przeniesienia tych 4 genów do komórki dojrzałej wykorzystywano cząsteczki retrowirusa, co również wiąże się z ryzykiem nowotworzenia powstałych komórek iPS. W 2008 r. naukowcy donieśli jednak, że udało się stworzyć komórki iPS bez udziału onkogenów i retrowirusa [7].

Obecnie bardzo duże nadzieje wiąże się z odkrytymi w szpiku dorosłych myszy tzw. bardzo małymi komórkami szpikowymi o cechach komórek embrionalnych (VSEL, *very small embryonic-like stem cells*) [8]. Są to stosunkowo nieliczne, bardzo małe komórki o średnicy 3–5  $\mu\text{m}$  wykazujące cechy morfologiczne typowe dla komórek embrionalnych. Dalsze badania wykazały, że podobne komórki występują również w ludzkiej krwi pępowinowej i innych tkankach u człowieka (szpik kostny, serce, trzustka itp.). Takie nie-dojrzałe komórki cechuje szerokie spektrum różnicowania (w kierunku komórek/tkanek należących do 3 listków zarodkowych) oraz obecność antygenów powierzchniowych typowych dla komórek ESC.

Poza wykorzystaniem komórek macierzystych pozyskiwanych ze szpiku kostnego lub mięśni szkieletowych w regeneracji mięśnia sercowego w niektórych badaniach korzysta się także z puli komórek krążących we krwi obwodowej po dodatkowej stymulacji w celu ich mobilizacji. Używa się do tego najczęściej czynnika wzrostu granulocytów [9].

**Komórki progenitorowe** są kolejnym typem komórek wykorzystywanych w badaniach klinicznych. Należą do nich np. mioblasty szkieletowe stosowane u pacjentów z pogorszeniem funkcji serca. Podobnie jak w przypadku komórek

szpikowych ich dość powszechne zastosowanie w badaniach klinicznych jest spowodowane względnie dobrze znanymi i prostymi technikami izolacji i hodowli. Niestety, komórki te nie integrują się w pełni elektrycznie z mięśniem sercowym z powodu braku ekspresji koneksyny 43 na powstałych włóknach mięśniowych i są potencjalnie arytmogenne [2, 10].

O przydatności komórek macierzystych w terapii komórkowej decydują m.in. ich zdolności do proliferacji i różnicowania. Utrzymanie przez komórki macierzyste zdolności do samoodnawiania wymaga zaangażowania wielu szlaków sygnalizacyjnych i czynników transkrypcyjnych. Do najlepiej poznanych należą szlaki Notch, Wnt i Shh [5, 11].

Szlak sygnalizacyjny Notch stanowi ewolucyjnie konserwatywny, a więc uniwersalny mechanizm regulacji aktywności genów, pozwalający na kontrolowanie proliferacji i różnicowania komórek. Białka Notch tworzą rodzinę receptorów błonowych. Aktywacja szlaku Notch jest konieczna do utrzymania zdolności komórek macierzystych do samoodnawiania przez zahamowanie procesów różnicowania [12]. W kontroli różnicowania komórek macierzystych, oprócz szlaku Notch, ważną rolę odgrywają także szlaki sygnalizacyjne Wnt i Shh. Szlak sygnalizacyjny Wnt funkcjonuje w komórkach macierzystych różnych tkanek, zapewniając im zdolność do samoodnawiania i ochronę przed różnicowaniem. Szlak sygnalizacyjny aktywowany przez białko Shh stanowi mechanizm zaliczany do podstawowych elementów regulacji rozwoju embrionalnego ssaków. Szlak ten jest zaangażowany także w kontrolę proliferacji i determinację różnicowania komórek macierzystych, zwłaszcza mezenchymalnych i neuronalnych.

Kontrolę proliferacji i różnicowania komórek macierzystych niezwiązaną z aktywacją receptorów zapewniają obecne w komórce czynniki transkrypcyjne, m.in. Octamer 4 (Oct-4) i Nanog. Czynniki Oct-4 aktywuje proliferację i utrzymuje komórki w stanie niezróżnicowanym. *In vivo* ulega ekspresji jedynie w komórkach węzła zarodkowego blastocysty i jest niezbędny do zapewnienia komórkom pluripotencji. W hodowlach *in vitro* obecność czynnika transkrypcyjnego Oct-4 stwierdza się wyłącznie w komórkach macierzystych o charakterze pluripotentnym, natomiast nie występuje on w dojrzałych, wyspecjalizowanych komórkach. Czynniki Oct-4 jest uniwersalnym wewnątrzkomórkowym znacznikiem pluripotentnych komórek macierzystych [13, 14]. Białko Nanog ulega ekspresji w embrionalnych komórkach macierzystych i jest uznawane za główny czynnik samoodnawiania tych komórek, utrzymujący je w stanie pluripotencji. Prawidłowe funkcjonowanie białka Nanog wymaga często obecności dodatkowych czynników transkrypcyjnych. W hodowlach komórkowych Oct-4 wraz z białkiem Nanog są wystarczające do utrzymania embrionalnych komórek macierzystych w stanie niezróżnicowanym [15].

## KOMÓRKI MACIERZYTE W KARDIOLOGII

W terapii komórkowej z wykorzystaniem komórek macierzystych w dziedzinie kardiologii największe doświadczenie istnieje w badaniach z wykorzystaniem komórek progenitorowych mięśni szkieletowych oraz komórek macierzystych szpiku kostnego (zarówno linii hematopoetycznej, jak i mezenchymalnej).

Swoiste białka powierzchniowe i wewnątrzkomórkowe pozwalają odróżnić fenotyp HSC lub MSC od dojrzałych, zróżnicowanych komórek obecnych we krwi. Większość markerów stanowią białka transbłonowe, których domeny zewnętrzne są eksponowane na powierzchni komórek, stanowiąc swoiste antygeny. Białko CD34 jest uniwersalnym markerem ludzkich hematopoetycznych komórek macierzystych i progenitorowych i występuje na niedojrzałych komórkach krwiotwórczych. W miarę ich różnicowania ekspresja białka CD34 stopniowo się zmniejsza i dojrzałe komórki (np. limfocyty, monocyty czy granulocyty) nie wykazują już tego antygeny na swej powierzchni. Innym markerem wczesnych komórek hematopoetycznych jest białko CD133. Należy jednak uwzględnić fakt, że ekspresję wymienionych antygenów opisano także na powierzchni innych typów komórek macierzystych i progenitorowych, np. VSEL czy progenitorów endotelialnych (EPC). Niewątpliwie charakterystycznym antygenem dla szeregu hematopoetycznego jest białko CD45, obecne jednak nie tylko na komórkach macierzystych i progenitorowych, lecz również na dojrzałych elementach morfotycznych krwi. W odróżnieniu od HSC mezenchymalne komórki macierzyste nie prezentują jednego, swoistego białka markerowego. Profile ekspresji MSC wskazują na obecność jednego lub kilku z takich białek, jak: CD44, CD73, CD90, CD105 oraz brak ekspresji białka CD34 [2].

### Drogi podania

Obecnie istnieje możliwość aplikacji komórek macierzystych/progenitorowych do serca kilkoma drogami [16–19]:

- podanie dożylnie — ze względu na małą efektywność nie jest wykorzystywane, chociaż teoretycznie możliwe;
- podanie dowieńcowe — jest najprostszą i najmniej obciążającą metodą podania zawiesiny komórek macierzystych. Zawiesinę podaje się przez cewnik bezpośrednio do tętnicy dożawałowej. Problemem w tej metodzie jest zatrzymanie komórek macierzystych w strefie zawałowej, a nawet w samym mięśniu sercowym. Aby zwolnić przepływ krwi i dłużej utrzymać zawiesinę komórek macierzystych w tętnicy zawałowej, światło naczynia zamyka się na kilka minut przez napełnienie balonu do 2–4 atmosfer. Część badaczy w celu uzyskania tego samego efektu w podobny sposób zamyka światło zatoki wieńcowej. Wiadomo, że w chwili uszkodzenia tkanki zaczynają produkować czynniki chemotaktyczne dla komór-

rek macierzystych, ale ich wydzielanie z czasem maleje. Hofmann et al. [20], badając redystrybucję komórek szpiku po podaniu dowieńcowym między 5. a 10. dniem zawału, stwierdził, że tylko około 1,3–2,6% podanych komórek pozostaje w mięśniu sercowym, a reszta zasiedla wątrobę i śledzionę. Dlatego też metoda ta jest wykorzystywana głównie u pacjentów z ostrym zawałem serca i nie jest zalecana w terapii pacjentów z przebytym zawałem serca;

- podanie przez bezpośrednie nastrzyknięcie epicardium (podczas operacji lub pod kontrolą torakotomu). Droga ta jest wykorzystywana głównie podczas operacji kardiologicznych, np. podczas implantacji pomostów aortalno-wieńcowych. Komórki macierzyste są dostarczane bezpośrednio do mięśnia sercowego w obszar blizny lub na jego obrzeża. Teoretyczną przewagą takiej metody jest zmniejszenie udziału mechanizmów chemotaktycznych przy odnalezieniu przez komórki macierzyste miejsca docelowego;
- podanie przez bezpośrednie nastrzyknięcie endocardium — także polega na bezpośrednim dostarczeniu komórek do mięśnia sercowego, ale do strony wewnętrznej lewej komory. O ile podanie od strony epicardium podczas operacji jest stosunkowo proste, o tyle wykonanie nastrzyknięcia od strony endocardium wymaga specjalistycznego oprzyrządowania. Do tego celu służy cewnik do iniekcji transendokardialnych MYOSTAR. Jest to specjalny cewnik zaopatrzony w igłę, który wprowadza się do lewej komory drogą wsteczną przez aortę i zastawkę aortalną. Ponadto metoda ta wymaga użycia systemu mapowania endokawitarnego w celu znalezienia strefy martwicy i strefy okołozawałowej. Do tego celu wykorzystuje się system NOGA, który umożliwia tworzenie map elektromechanicznych lewej komory;
- droga podania od strony zatoki wieńcowej, czyli poprzez żyły wieńcowe — także pozwala na podanie zawiesiny komórek bezpośrednio do mięśnia sercowego, ale również wymaga odpowiedniego oprzyrządowania, czyli cewnika zaopatrzonego w igłę, i dużego doświadczenia w precyzyjnej manipulacji cewnikiem.

Wykonywano także próby podania komórek macierzystych do roztworu kardiopleginy podczas operacji kardiologicznych.

Aktualnie żadna z powyższych metod nie uzyskała jednoznacznej opinii jako metoda preferencyjna.

### KOMÓRKI MACIERZYTE W KARDIOLOGICZNYCH BADANIACH KLINICZNYCH

U człowieka rozróżniono ok. 260 typów komórek. Wśród nich aktualnie rozróżnia się (m.in. na podstawie ich cech fenotypowych) ok. 30 różnych subpopulacji komórek macierzystych. Do najważniejszych z punktu widzenia terapii komórkowej należą komórki hematopoetyczne z powierzchow-

nyimi antygenami: CD34, CD133, CD45, CD117, komórki mezenchymalne z białkami: CD44, CD73, CD90, CD105 oraz brakiem ekspresji białka CD34 (odpowiadają za regenerację kości, więzadeł, mięśni, ścięgien, tkanki łącznej i tłuszczowej) oraz komórki endotelialne z powierzchniowymi markerami: CD133 i CD34 (odpowiadają za regenerację endotelium) [2].

Zainteresowanie komórkami macierzystymi wśród kardiologów wzrosło, kiedy stwierdzono obecność chromosomów Y w mięśniu sercowym u mężczyzn, którym przeszczepiono serce od żeńskich dawców [21]. Zaobserwowano także, że komórki mięśnia sercowego wykazują mitotyczną aktywność po zawale serca. Rozpoczęły się badania nad regeneracją uszkodzonego przez zawał serca z wykorzystaniem komórek macierzystych/progenitorowych szpiku, komórek progenitorowych mięśni szkieletowych, a także embrionalnych komórek macierzystych.

Początkowo komórkami używanymi do regeneracji mięśnia sercowego po zawale były mioblasty mięśni szkieletowych. Pierwsze doniesienia o praktycznym ich zastosowaniu u człowieka pochodzą z 2003 r., a w Polsce w 2004 r. jako pierwsi komórki tych użyli Siminiak i wsp. z Poznania [22]. W większości przeprowadzonych na tym modelu badań stwierdzono istotny wzrost kurczliwości lewej komory, jednak użycie tych komórek powodowało powstanie trwałych arytmii komorowych w ok. 40% przypadków. Pacjenci ci musieli dodatkowo przyjmować leki antyarytmiczne (najczęściej amiodaron) lub mieć implantowany kardiowerter-defibrylator (ICD). Nie jest znany dokładny mechanizm tego zjawiska, ale przypuszcza się, że u jego podłoża leży brak integracji elektrycznej wszczepionych komórek z komórkami mięśnia sercowego z powodu braku ekspresji koneksyny 43 [16]. Implantowane mioblasty hamują rozchodzenie pobudzenia i zwalniają przewodzenie, które leży u podstaw zjawiska reentry i komorowych zaburzeń rytmu. Ponadto ostatnie doniesienia z 2008 i 2009 r. z 2 randomizowanych prób nie wykazały istotnej poprawy funkcji skurczowej lewej komory (tab. 1).

Komórki embrionalne, w zależności od stadium rozwoju człowieka, mogą wykazywać cechy totipotenne lub pluripotenne i te właściwości powodują, że mogłyby być one szczególnie atrakcyjne dla badań nad regeneracją mięśnia sercowego. Dotychczas opublikowano kilka badań doświadczalnych przeprowadzonych na zwierzętach dotyczących regeneracji miokardium przy użyciu komórek embrionalnych. Charakteryzują się one jednak stosunkowo niskim tempem różnicowania do dojrzałych, funkcjonalnych komórek mięśnia sercowego, a także stwarzają możliwość nowotworzenia [28]. Dlatego też większość badań klinicznych opiera się na użyciu zawiesiny komórek macierzystych szpiku kostnego lub endotelialnych komórek macierzystych.

Do dziś liczba badań klinicznych z wykorzystaniem komórek macierzystych w terapii kardiologicznej przekroczyła 40. Wśród nich są także badania z polskich ośrodków, jak np. randomizowane badanie pod kierownictwem prof. Graj-

**Tabela 1.** Kliniczne badania z implantacją mioblastów szkieletowych do uszkodzonego mięśnia sercowego

Autor badania	Rok	Liczba pacjentów	Droga podania	Badana zmienna	P
Menasché i wsp. [23]	2003	10	t.c.	LVEF	0,02
Pagani i wsp. [24]	2003	5	e.c.	Przeżywalność komórek	–
Smits i wsp. [25]	2003	5	e.c.	LVEF	0,009
Siminiak i wsp. [22]	2004	10	t.c.	LVEF	< 0,05
Menasché i wsp. (MAGIC) [26]	2008	63 (34)	t.c.	LVEF	0,25
Dib i wsp. (CAuSMIC) [27]	2009	12 (11)	t.c.	LVEF NYHA	0,07 0,004

t.c. — transepikardialnie; e.c. — endokardialnie; LVEF — frakcja wyrzutowa lewej komory; NYHA — *New York Heart Association*

**Tabela 2.** Kliniczne badania nierandomizowane z zastosowaniem komórek macierzystych w regeneracji uszkodzonego zawałem mięśnia sercowego

Badania nierandomizowane	Rok	Typ komórek	Grupa badana (kontrolna)	Droga podania
Hamano [31]	2001	BMC	5	t.c. (CABG)
Fuchs [32]	2003	BMC	10	e.c. (NOGA)
Li [33]	2003	BMC	8	t.c. (CABG)
Tse [34]	2003	BMC	8	e.c. (NOGA)
Perin [35]	2004	BMC	14 (9)	e.c. (NOGA)
Fernández-Avilés [36]	2004	BMC	20 (13)	i.c.
Galinanes [37]	2004	BMC	14	t.c. (CABG)
Ozbaran [38]	2004	CPC (G-CSF)	6	t.c. (CABG)
Pompilio [39]	2004	G-CSF (CD133+)	4	t.c. (CABG)
Stamm [40]	2004	BMC	12	t.c. (CABG)
TOPCARE-AMI [41]	2004	BMC/CPC	30/29	i.c.
Kuethe [42]	2004	BMC	5	i.c.
Bartunek [43]	2005	EPC (CD133+)	19 (16)	i.c.
Boyle [44]	2005	G-CSF (CD34+)	5	i.c.
IACT study [45]	2005	BMC	18 (18)	i.c.
Katritsis [46]	2005	MSC+EPC	11 (11)	i.c.
Suárez de Lezo [47]	2005	CD34+ G-CSF	13	s.c.
TOPCARE-CHD [48]	2006	BMC/CPC	35/33 (23)	i.c.
ABCD [49]	2006	BMC	24 (20)	i.c.
Manginas [50]	2007	EPC (CD133+, 133–, 34+)	12 (12)	i.c.
TABMMI [51]	2007	BMC	10	e.c.
BALANCE [52]	2009	BMC	62 (62)	i.c.
TOPCARE-DCM [53]	2009	BMC	33	i.c.
Srimahachota [54]	2009	BMC	5	i.c.

BMC — komórki szpiku kostnego; CPC — krążące komórki progenitorowe; EPC — endotelialne komórki progenitorowe; G-CSF — czynnik wzrostu granulocytów; MSC — mezenchymalne komórki macierzyste; t.c. — transepikardialnie; e.c. — endokardialnie; i.c. — dowieńcowo; s.c. — podskórnie; CABG — pomostowanie aortalno-wieńcowe; NOGA — system umożliwiający tworzenie map elektromechanicznych lewej komory

ka z Poznania [29] czy wielośrodkowe randomizowane badanie REGENT pod kierownictwem prof. Tendery z Katowic [30]. W badaniach nad wykorzystaniem komórek macierzystych w kardiologii wzięło już udział ponad 1000 pacjentów z ostrym i przebyłym zawałem serca oraz niewydolnością

serca. Najbardziej popularną metodą podania jest podanie dowieńcowe, najczęściej połączone z czasową inflacją balonu w świetle naczynia, która ma zapobiec zbyt szybkiemu wypłukaniu podanych komórek. Dotychczasowe nierandomizowane badania przedstawiono w tabeli 2.

**Tabela 3.** Randomizowane badania z komórkami macierzystymi nad regeneracją mięśnia sercowego

Badania randomizowane	Rok	Typ komórek	Grupa badana (kontrolna)	Droga podania	Badana zmienna	P
BOOST [55]	2004	BMC	30 (30)	<i>i.c.</i>	LVEF	NS
Chen [56]	2004	BMC	34 (35)	<i>i.c.</i>	LVEF	0,01
MAGIC cell [57]	2004	BMC/CPC G-CSF	10/10 (8)	<i>i.c./s.c.</i>	LVEF	< 0,005
Erbs [58]	2005	CPC (G-CSF)	13 (13)	<i>i.c.</i>	Wielkość zawału	< 0,05
FIRSTLINE-AMI [59]	2005	G-CSF	25 (25)	<i>s.c.</i>	LVEF	< 0,003
Hambrecht [60]	2005	CPCs	13 (12)	<i>i.c.</i>	LVEF	< 0,05
ASTAMI [61]	2006	BMC	47 (50)	<i>i.c.</i>	Wielkość zawału	NS
Janssens [62]	2006	BMC	33 (34)	<i>i.c.</i>	LVEF	NS
MAGIC Cell-3-DES [63]	2006	BMC/G-CSF	27/20 (29/20)	<i>i.c.</i>	LVEF	< 0,05
REPAIR-AMI [64]	2006	BMC	101 (103)	<i>i.c.</i>	Zdarzenia kliniczne	0,006
REVIVAL-2 [65]	2006	G-CSF	56 (58)	<i>s.c.</i>	Wielkość zawału	NS
STEMMI [66]	2006	G-CSF	39 (39)	<i>s.c.</i>	LVEF	NS
TCT-STAMI [67]	2006	BMC	10 (10)	<i>i.c.</i>	LVEF	< 0,05
G-CSF-STEMI [68]	2006	G-CSF	23 (21)	<i>s.c.</i>	LVEF	NS
Penicka [69]	2007	BMC	17 (10)	<i>i.c.</i>	LVEF	NS
PROTECT-CAD [70]	2007	BMC	10/10 (9)	<i>e.c.</i>	LVEF	0,044
FINCELL [71]	2008	BMC	40 (40)	<i>i.c.</i>	LVEF	0,03
Meluzin [72]	2008	BMC	22/22 (22)	<i>i.c.</i>	LVEF	0,027
Cao [73]	2009	BMC	41 (45)	<i>i.c.</i>	LVEF	0,001
van Ramshorst [74]	2009	BMC	25 (25)	<i>e.c.</i>	LVEF	0,03
Lai [75]	2009	BMC	22 (22)	<i>i.k.</i>	CI	NS
REGENT [30]	2009	CD34iCXCR4/BMC	80/80 (40)	<i>i.c.</i>	LVEF	NS
Traverse [76]	2010	BMC	30 (10)	<i>i.c.</i>	LVEF	0,001
Grajek [29]	2010	BMC	31 (14)	<i>i.c.</i>	LVEF	NS

BMC — komórki szpiku kostnego; CPC — krążące komórki progenitorowe; EPC — endotelialne komórki progenitorowe; G-CSF — czynnik wzrostu granulocytów; *e.c.* — endokardialnie; *i.c.* — dowieńcowo; *i.k.* — do kardiopleginy; *s.c.* — podskórnie; LVEF — frakcja wyrzutowa lewej komory; CI — wskaźnik sercowy

Mała liczebność i brak grup kontrolnych w części badań nierandomizowanych z komórkami macierzystymi nie pozwalały na wnioskowanie, czy ten rodzaj terapii daje istotne korzyści pacjentom. Badania te pokazały natomiast, że tego typu terapia jest technicznie możliwa i stosunkowo bezpieczna. W części z nich uzyskano zachęcające wyniki (poprawa wydolności, zmniejszenie dolegliwości wieńcowych) czy rezultaty sugerujące poprawę kurczliwości, co dało podstawy do przeprowadzenia dalszych badań.

W tabeli 3 zestawiono randomizowane badania kliniczne z użyciem komórek macierzystych do regeneracji mięśnia sercowego. W 10 z nich nie wykazano istotnej różnicy badanego parametru (najczęściej LVEF) między pacjentami poddanymi terapii komórkowej w porównaniu z osobami, które nie otrzymały komórek macierzystych. Stanowi to prawie 50% pacjentów rekrutowanych do tych badań.

Jak widać z powyższych zestawień, wyniki dotychczasowych badań nie są jednoznaczne. Jedną z przyczyn trudności w interpretacji otrzymanych rezultatów może stanowić

fakt, że pacjenci prawie nigdy nie są poddawani tylko i wyłącznie terapii komórkowej. Zazwyczaj łączy się ją z procedurami kardiologicznymi, takimi jak rewaskularyzacja przezskórna czy kardiochirurgicznymi, np. pomostowaniem aortalno-wieńcowym. Ponadto mimo że większość badań dotyczy pacjentów z ostrym niedokrwieniem (zawał lub niestabilność wieńcowa), to część z nich wykonano u osób z przewlekłym niedokrwieniem serca [68, 70], po przebytych zawałach [48, 58] lub z niewydolnością serca na innym podłożu niż niedokrwienie, np. z kardiomiopatią rozstrzeniową [49, 53]. Badania różnią się także czasem aplikacji terapii komórkowej po zawale serca (od kilku dni do kilku lat). Zwraca też uwagę znaczna różnica wiekowa pacjentów poddawanych terapii komórkami macierzystymi. W różnych badaniach wiek pacjentów wynosił 18–80 lat [59, 65, 76]. Wprawdzie komórki macierzyste mają zdolności samoodnowy, ale ich liczba z wiekiem spada. Ponadto zmniejszają się różne czynniki ochronne zapewniające tym komórkom zdolności do rozmnażania się i odnowy.

Kolejną różnicą jest liczba podawanych komórek macierzystych. Zdrowe serce dorosłego człowieka waży ok. 250–350 g [77]. Blisko 80% tej masy stanowią komórki mięśniowe, których liczba wynosi ok.  $10 \times 10^9$ . Jeśli przyjąć, że w zawałe ginie ok. 20% kardiomiocytów, to do uzupełnienia ubytku potrzeba jest ok.  $2 \times 10^9$  nowych komórek ważących ok. 50 g. W przeprowadzonych badaniach liczba podawanych komórek wahała się od  $2,5 \times 10^6$  do  $17,8 \times 10^7$  [45, 76]. Niezależnie od rodzaju i liczby zastosowanych komórek macierzystych oraz sposobu i drogi ich podania wyniki tych badań przemawiających za istotną poprawą funkcji serca i niewykazujących takiej poprawy nie różnią się istotnie.

Ponadto w różnych badaniach zwracano uwagę na różnorodne zmienne. W większości z nich za poprawę uznawano istotny przyrost frakcji wyrzutowej lewej komory. W części badań dodatkowo wykonywano stress echo z dobutaminą [50, 57, 59], mierząc przyrost grubości ściany i liczby segmentów, których kurczliwość uległa poprawie. Część badań opierała się na kontroli parametrów serca w rezonansie magnetycznym, scyntygrafii [38, 61, 70, 78] i/lub żywotności w pozytonowej emisyjnej tomografii komputerowej [38, 59, 62]. W części badań porównanie tych wszystkich parametrów także dawało niejednoznaczne wyniki (np. wykazano brak istotnej różnicy kurczliwości lewej komory, ale uzyskano istotną różnicę grubości jej ściany).

Można natomiast stwierdzić, że dotychczas zaproponowane metody terapii komórkowej w kardiologii z wykorzystaniem komórek szpiku są stosunkowo bezpieczne. W przypadku użycia komórek progenitorowych z mięśni szkieletowych należy się jednak liczyć z możliwością wystąpienia zaburzeń rytmu wymagających niekiedy implantacji ICD.

Terapia komórkami macierzystymi w kardiologii jest nadal dyscypliną stosunkowo młodą i brak w niej standardów dotyczących wyboru rodzaju komórek macierzystych, sposobu ich przygotowania i podania, a także nie ma jednoznacznej metody i rodzaju kontrolowanych parametrów.

Niezależnie od tego, ciągły postęp w dziedzinie biologii komórki i technologii hodowli tkankowych pozwala na umiarkowany optymizm, jeśli chodzi o zastosowanie w przyszłości terapii komórkowej w leczeniu chorób serca. Nadzieję dają poszukiwania najbardziej optymalnej puli komórek macierzystych mających zdolności do różnicowania się w kierunku kardiomiocytów. Możliwe, że badania z iPS lub VSEL przyniosą nowe dane na temat terapii komórkowej w kardiologii. Nadzieję na postęp w tej dziedzinie stanowi także odkrycie tzw. rezydentnych komórek macierzystych serca [78].

Wydaje się, że głównym problemem w dalszym postępie badań nad terapią komórkową zawału serca jest kontrola różnicowania różnych subpopulacji komórek macierzystych w ludzkie kardiomiocyty w warunkach *in vivo*. Poznanie wszystkich czynników zawiadujących tym procesem, dokładne określenie mechanizmów komórkowych i molekularnych może leżeć u podstaw dalszego rozwoju tego rodzaju terapii.

Kolejną ważną kwestią jest pełne bezpieczeństwo związane z zabiegiem podawania komórek w postępowaniu terapeutycznym. Preferowane powinny być zatem procedury względnie mało inwazyjne, takie jak podanie dotętnicze, gdyż umożliwiają one zminimalizowanie ryzyka dalszego uszkodzenia tkanki mięśnia sercowego czy indukcji procesu zapalnego w miejscu podania komórek. Mimo postępu w badaniach nad terapią komórkową w schorzeniach kardiologicznych dotychczasowe efekty kliniczne wydają się nie do końca satysfakcjonujące, zwłaszcza uwzględniając sukcesy osiągane w pracach na modelach zwierzęcych. Jak wskazują liczne przykłady, prosta transformacja zwierzęcych protokołów terapeutycznych na model kliniczny nie wystarcza, dlatego niezwykle ważne jest podejmowanie dalszych prób klinicznych z wykorzystaniem lepiej zdefiniowanych populacji komórkowych oraz ich ewentualnej wcześniejszej ekspansji w warunkach *ex vivo*. Ważnym obszarem dalszych badań będzie niewątpliwie identyfikacja optymalnej subpopulacji komórkowej odpowiedzialnej za regenerację tkanki mięśnia sercowego. Dokładne zdefiniowanie kontroli różnicowania komórek, ustalenie konfiguracji czynników humoralnych wspomagających ten proces w połączeniu z rozwojem metod umożliwiających obserwację komórek *in vivo* mogą się przyczynić do powszechniejszego wprowadzenia terapii komórkowej i jej standaryzacji w warunkach klinicznych.

**Konflikt interesów:** nie zgłoszono

### Piśmiennictwo

1. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term „stem cell”. *Cell Stem Cell*, 2007; 1: 35–38.
2. Dib N, Taylor DA, Diethrich EB. Stem cell therapy and tissue engineering for cardiovascular repair from basic research to clinical applications. Springer Science, Business Media, Inc. Singapore 2006.
3. Hotta Y. Ethical issues of the research on human embryonic stem cells. *J Int Bioethique*, 2008; 19: 77–85.
4. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature*, 2006; 444: 481–485.
5. Roszek K, Komoszyński M. Kontrola i kierunki różnicowania komórek macierzystych krwi pępowinowej oraz ich zastosowanie terapeutyczne. *Post Hig Med Dośw*, 2008; 62: 660–667.
6. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006; 126: 663–676.
7. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008; 7: 949–953.
8. Kucia M, Reza R, Campbell FR et al. A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia*, 2006; 20: 857–869.
9. Kastrup J, Ripa RS, Wang Y. Myocardial regeneration induced by granulocyte-colony-stimulating factor mobilization of stem cells in patients with acute or chronic ischaemic heart disease: a non-invasive alternative for clinical stem cell therapy? *Eur Heart J*, 2006; 27: 2748–2754.
10. Trzosek E, Krzemińska-Pakuła M, Rechciński T et al. The influence of intracoronary autologous mononuclear bone marrow cell transplantation on heart rate variability. *Kardiologia Polska*, 2009; 67: 713–721.

11. Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*, 2004; 16: 700–707.
12. Sitnik K, Cichy J. Udział techniki warunkowej inaktywacji genów opartej na systemie Cre-loxP w postępie wiedzy na temat roli receptorów Notch. *Post Bioch*, 2006; 52: 49–55.
13. Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol*, 2004; 16: 700–707.
14. Kucia M, Halasa M, Wysoczyński M et al. Morphological and molecular characterization of novel population of CXCR4+ SSEA-4+ Oct-4+ very small embryonic-like cells purified from human cord blood. *Leukemia*, 2007; 21: 297–303.
15. Pan G, Thomson JA. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res*, 2007; 17: 42–49.
16. Sokal A. Komórki macierzyste: nadzieja czy mit? *Kardiologia Pol*, 2006; 64: 656–660.
17. Balsam LB, Robbins RC. Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart. *Clin Sci*, 2005; 109, 6: 483–492.
18. Vento A, Hämmäinen P, Pätälä T et al. Somatic stem cell transplantation for the failing heart. *Scand J Surg*, 2007; 96, 2: 131–139.
19. Lai VK, Ang KL, Rathbone W et al. Randomized controlled trial on the cardioprotective effect of bone marrow cells in patients undergoing coronary bypass graft surgery. *Eur Heart J*, 2009; 30: 2354–2359.
20. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation*, 2005; 111: 2198–2202.
21. Quaini F, Urbanek K, Beltrami A et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*, 2002; 346: 5–15.
22. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J*, 2004; 148: 531–537.
23. Menasché P, Hagege A. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 41: 1078–1083.
24. Pagani FD, DerSimonian H. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 42: 589.
25. Smits PC, van Geuns RJ. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 42: 2063–2069.
26. 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: 1189–1200.
27. Dib N, Dinsmore J, Lababidi Z et al. One-year follow-up of feasibility and safety of the first u.s., randomized, controlled study using 3-dimensional guided catheter-based delivery of autologous skeletal myoblasts for ischemic cardiomyopathy (causmic study). *J Am Coll Cardiol Interv*, 2009; 2: 9–16.
28. van Laake LW, Hassink R, Doevendans PA et al. Heart repair and stem cells. *J Physiol*, 2006; 577: 467–478.
29. Grajek S, Popiel M, Gil L et al. Influence of bone marrow stem cells on left ventricle perfusion and ejection fraction in patients with acute myocardial infarction of anterior wall: randomized clinical trial: Impact of bone marrow stem cell intracoronary infusion on improvement of microcirculation. *Eur Heart J*, 2010; 31: 691–702.
30. Tendra M, Wojakowski W, Rużyłło W et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre myocardial regeneration by intracoronary infusion of selected population of stem cells in acute myocardial infarction (REGENT) trial. *Eur Heart J*, 2009; 30: 1313–1321.
31. 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 J*, 2001; 65: 845–848.
32. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol*, 2003; 41: 1721–1724.
33. Li TS, Hamano K, Hirata K et al. The safety and feasibility of the local implantation of autologous bone marrow cells for ischemic heart disease. *J Card Surg*, 2003; 18 (suppl. 2): S69–S75.
34. Tse HF, Kwong YL, Chan JK et al. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet*, 2003; 361: 47–49.
35. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation*, 2004; 110: II213–II218.
36. Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res*, 2004; 95: 742–748.
37. Galinanes M, Loubani M, Davies J et al. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant*, 2004; 13: 7–13.
38. Ozbaran M, Omay SB, Nalbantgil S et al. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004; 25: 342–350.
39. Pompilio G, Cannata A, Peccatori F et al. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg*, 2004; 78: 1808–1812.
40. Stamm C, Kleine HD, Westphal B et al. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2004; 52: 1528.
41. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI: mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging). *Circulation*, 2003; 108: 2212–2218.
42. Kuethe F, Richartz BM, Sayer HG et al. Lack of regeneration of myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans with large anterior myocardial infarctions. *Int J Cardiol*, 2004; 97: 123–127.
43. 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 (suppl. 9): I178–I183.
44. Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S. Intra-coronary high-dose CD34 stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: A 12-month follow-up. *Int J Cardiol*, 2006; 109: 21–27.
45. 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: 1651–1658.
46. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E et al. Transcatheter transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005; 65: 321–329.
47. de Lezo JS, Torres A, Herrera I et al. Effects of stem-cell mobilization with recombinant human granulocyte colony stimulating factor in patients with percutaneously revascularized acute anterior myocardial infarction. *Rev Esp Cardiol*, 2005; 58: 253–261.
48. Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH et al. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone mar-



- row-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*, 2009; 2: 417–423.
49. Seth S, Narang R, Bhargava B et al. Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results: the first-in-man ABCD (Autologous Bone Marrow Cells in Dilated Cardiomyopathy) trial. *J Am Coll Cardiol*, 2006; 48: 2350–2351.
  50. Manginas A, Goussetis E, Koutelou M et al. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2007; 69: 773–781.
  51. Fuente L, Stertz SH, Argentieri J et al. Transendocardial autologous bone marrow in chronic myocardial infarction using a helical needle catheter: 1-year follow-up in an open-label, nonrandomized, single-center pilot study (the TABMMI study). *Am Heart J*, 2007; 154: 79.e1–79.e7
  52. Yousef M, Schannwell CM, Köstering M et al. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2009; 53: 2262–2269.
  53. Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH et al. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*, 2009; 2: 417–423.
  54. Srimahachota S, Boonyaratavej S, Rerkpattanapipat P et al. Feasibility and safety of intra-coronary bone marrow mononuclear cell transplantation in ST-elevation myocardial infarction patients. *J Med Assoc Thai*, 2009; 92: 1591–1596.
  55. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*, 2004; 364: 141–148.
  56. Chen S-l, Fang WW, Ye F et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 2004; 94: 92–95.
  57. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet*, 2004; 363: 751–756.
  58. Erbs S, Linke A, Adams V et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res*, 2005; 97: 756–762.
  59. Ince H, Petzsch M, Kleine HD et al. Front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by granulocyte colony-stimulating factor (FIRST-LINE-AMI) trial. *Circulation*, 2005; 112 (suppl. I): I73–I80.
  60. Hambrecht R, Erbs S, Thiele H et al. Intracoronary transplantation of circulating progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusions: long term effects on left ventricular function. *Circulation*, 2005; 112 (suppl. II): 581.
  61. Lunde K, Solheim S, Aakhus S et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006; 355: 1199–1209.
  62. Janssens S, Dubois C, Bogaert J et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomized controlled trial. *Lancet*, 2006; 367: 113–121.
  63. Kang HJ, Lee HY, Na SH et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation*, 2006; 114 (suppl. 1): I145–I151.
  64. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A et al. REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*, 2006; 355: 1210–1221.
  65. Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2006; 295: 1003–1010.
  66. Ripa RS, Jorgensen E, Wang Y et al. Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial. *Circulation*, 2006; 113: 1983–1992.
  67. Ge J, Li Y, Qian J et al. Efficacy of emergent transcatheter transplantation of stem cells for treatment of acute myocardial infarction (TCT-STAMI). *Heart*, 2006; 92: 1764–1767.
  68. Engelmann MG, Theiss HD, Hennig-Theiss C et al. Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol*, 2006; 48: 1712–1721.
  69. Penicka M, Horak J, Kobylka P et al. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. *J Am Coll Cardiol*, 2007; 49: 2373–2374.
  70. Tse HF, Thambar S, Kwong YL et al. Prospective randomized trial of direct endomyocardial implantation of bone marrow cells for treatment of severe coronary artery diseases (PROTECT-CAD trial). *Eur Heart J*, 2007; 28: 2998–3005.
  71. Huikuri HV, Kervinen K, Niemelä M et al. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 2008; 29: 2723–2732.
  72. Meluzin J, Mayer J, Groch L et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J*, 2006; 152: 975.e9–e15.
  73. Cao F, Sun D, Li C et al. Long-term myocardial functional improvement after autologous bone marrow mononuclear cells transplantation in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: 4 years follow-up. *Eur Heart J*, 2009; 30: 1986–1994.
  74. van Ramshorst J, Bax JJ. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia. *JAMA*, 2009; 301: 1997–2004.
  75. Lai VK, Ang KL, Rathbone W et al. Randomized controlled trial on the cardioprotective effect of bone marrow cells in patients undergoing coronary bypass graft surgery. *Eur Heart J*, 2009; 30: 2354–2359.
  76. Traverse JH, McKenna DH, Harvey K et al. Results of a phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bone marrow mononuclear stem cell administration in patients following ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J*, 2010; 160: 428–434.
  77. Mayhew TM, Pharaoh A, Austin A et al. Stereological estimates of nuclear number in human ventricular cardiomyocytes before and after birth obtained using physical dissectors. *J Anat*, 1997; 191: 107–115.
  78. Jadczyk T, Wojakowski W. Komórki macierzyste serca. *Kardiologia Pol*, 2010; 68: 1163–1167.