

**Univerzita Karlova v Praze**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



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

MUDr. Skalická Hana

Praha 2010



**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

**Obor:** Fyziologie a patofyziologie člověka

**Předseda oborové rady:** Prof. MUDr. Jaroslav Pokorný, DrSc.

**Školící pracoviště:** II. interní klinika kardiologie a angiologie Všeobecné fakultní nemocnice  
a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze

**Autor:** MUDr. Skalická Hana

**Školitel:** As. MUDr. Horák Jan, CSc.

*This project on behalf of the IGA MZ grant no.NR/8225-3 and Charles University Prague Research Project  
MSM 0021620817.*

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

1	Regenerace myokardu po intrakoronární aplikaci mononukleárních buněk kostní dřeně u pacientů s akutním infarktem s opožděnou reperfuzí a dysfunkcí levé komory .....	4
2	Myocardial regeneration after intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction and late reperfusion.....	5
3	Úvod.....	6
4	Cíle a hypotéza práce.....	7
5	Metodika .....	8
5.1	Design studie .....	9
5.2	Odběr, zpracování kmenových buněk, intrakoronární aplikace .....	9
5.3	Echokardiografické vyšetření .....	10
5.4	Dobutaminová echokardiografie .....	11
5.5	Vyšetření myokardiální viability pomocí SPECTu .....	12
5.6	Kvalita života .....	12
5.7	Statistická analýza .....	12
6	Výsledky .....	13
6.1	Bezpečnost implantace BMNCs.....	15
6.1.1	Krátkodobé sledování (4 měsíce).....	15
6.1.2	Dlouhodobé sledování (24 měsíců).....	15
6.2	Efektivita buněčné terapie .....	16
7	Diskuze .....	21
8	Závěr .....	24
9	Literatura.....	25
10	Seznam publikací autora .....	32
10.1	Publikace s IF in extenso, které jsou ve vztahu k tématu dizertační práce .....	32
10.2	Publikace bez IF in extenso, které jsou ve vztahu k tématu dizertační práce .....	32
10.3	Publikace s IF in extenso, bez vztahu k tématu dizertační práce .....	32
10.4	Publikace bez IF in extenso, bez vztahu k tématu dizertační práce.....	33
10.5	Abstrakta.....	33

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

**Úvod a cíl:** Navzdory pokrokům v rozvoji reperfuzní terapie, pacienti s akutním infarktem myokardu s ST elevacemi (STEMI) s pozdní reperfuzí a dysfunkcí levé komory (LK), mají špatnou prognózu. Snažili jsme se zaměřit na hodnocení bezpečnosti a efektivity intrakoronární aplikace mononukleárních buněk kostní dřeně (BMNCs) na zlepšení jejich prognózy díky ovlivnění progresu poinfarktové remodelace LK v rámci dlouhodobého sledování.

**Metodika:** 27 pacientů se STEMI, průměrný věk  $59 \pm 12$  (81% muži), průměrná vstupní ejekční frakce levé komory (LVEF)  $39 \pm 5\%$ , léčených primární koronární angioplastikou (PCI) 4-24 hodin od začátku obtíží, byli randomizováni buď k intrakoronární aplikaci BMNCs 4 až 11 dní po PCI (n=17, BMNCs skupina, z toho 14 podstoupilo 2 leté sledování) či standardní terapii (n=10, kontrolní skupina). Hodnocení LK bylo provedeno echokardiograficky se zaměřením na LVEF, enddiastolický a endsystolický objem (LVEDV, LVESV), diastolickou funkci a myokardiální perfuzi hodnocenou pomocí SPECTu myokardu.

**Výsledky:** V průběhu 24-měsíčního sledování nebyl zjištěn rozdíl mezi oběma skupinami v klinicky závažných událostech (6 pacientů v BMNCs (36%) vs. 5 pacientů (50%) v kontrolní skupině,  $p=0,54$ ). Během 4 měsíční kontroly se LVEF mírně zlepšila v obou skupinách (absolutní změna  $+5,8\%$  vs.  $+7,6\%$ ,  $p=0,75$ ). Stejně tak velikost infarktového ložiska dle SPECTu se zmenšila v obou skupinách srovnatelně ( $-10,9\%$  vs.  $-12,2\%$ ,  $p=0,47$ ). Překvapivě, za 24 měsíců u pacientů s aplikovanými BMNCs došlo k významnému zlepšení LVEF (absolutní změna  $+12\%$  vs.  $+8,5\%$ ,  $p=0,03$ ). Tento efekt vyplývá jak ze zlepšení redukce LVESV v BMNCs skupině ( $-2,6\text{ml}$  vs.  $-1,8\text{ml}$ ,  $p=0,26$ ) tak ze zmenšení progresu LVEDV ( $+16,7\text{ml}$  vs.  $+17,9\text{ml}$ ,  $p=0,27$ ). U nemocných v BMNCs skupině došlo během 2 let ke zlepšení jejich diastolické funkce z převažující změny plnění charakteru pseudonormalizace na lehčí poruchu relaxace oproti kontrolní skupině, u nichž mírně progreduje četnost výskytu středně významné poruchy pseudonormalizace ( $p < 0,001$ ).

**Závěr:** Intrakoronární aplikace BMNCs u nemocných se STEMI s pozdní reperfuzí je bezpečná a je asociovaná se zlepšením ukazatelů funkce a remodelace levé komory v delším časovém horizontu.

**Klíčová slova:** akutní infarkt myokardu s ST elevacemi, mononukleární buňky kostní dřeně, ejekční frakce levé komory, remodelace levé komory.

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

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

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

**Results:** At 24-month, there was no difference in rates of serious clinical events (36% vs. 50%,  $p=0,54$ ). At Month 4 LVEF improved to similar extent in both groups (absolute change  $+5,8\%$  vs.  $+7,6\%$ ,  $p=0,75$ ), with similar infarct size reductions ( $-10,9\%$  vs.  $-12,2\%$ ,  $p=0,47$ ). However, at Month 24, LVEF further improved in BMNCs patients (absolute change  $+12\%$  vs  $+8,5\%$ ,  $p=0,03$ ). This effect resulted from a more pronounced reduction in LVESV ( $-2,6\text{ml}$  vs.  $-1,8\text{ml}$ ,  $p=0,26$ ) and a smaller increase in LVEDV ( $+16,7\text{ml}$  vs.  $+17,9\text{ml}$ ,  $p=0,27$ ). At month 24 we observed improvement in diastolic function in BMNCs patients in contrast to control group ( $p < 0,001$ ). These results suggests beneficial long-term effects of BMNCs therapy on LV remodeling.

**Conclusions:** BMNCs injections in patients with STEMI and LV dysfunction was associated with a significant improvement of global LVEF and diastolic function during longterm follow-up compared to standard therapy. No difference was observed between the groups in adverse clinical events or restenosis.

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

### 3 Úvod

Při akutním infarktu myokardu (AIM) dochází ke vzniku ireverzibilní ischemické nekrózy srdečního svalu, která je provázená ztrátou kontraktilních elementů, kardiomyocytů (CM) <sup>1, 2</sup>. Rozsah postižení je v první řadě závislý na velikosti povodí infarktové tepny, délce trvání ischemie <sup>3</sup> a dále na přítomnosti kolaterální cirkulace, předchozího ischemického zatížení myokardu <sup>4</sup> a v nezanedbatelné míře i na podané léčbě <sup>5</sup>. Bez terapeutického zásahu je u pacientů s AIM udávaná mortalita kolem 30% <sup>6</sup>. Díky rozvoji reperfuze terapie, tj. trombolýzy <sup>7</sup> a perkutánní koronární angioplastiky (PCI) <sup>8, 9</sup>, došlo v posledních 20ti letech k poklesu hospitalizační mortality u AIM na 6-10% <sup>10</sup>. Bohužel, ani rychle navozená rekanalizace infarktové tepny nemusí vždy docílit záchranu myokardu <sup>11</sup>. Efekt je limitovaný možnou přítomností defektu na úrovni mikrocirkulace a časným nebo pozdním ischemicko-reperfučním poškozením <sup>4</sup>. Ztráta většího množství CM <sup>12</sup> má za následek remodelaci levé komory (LK) s postupným poklesem její systolické funkce nad rámec akutního poškození při vlastním infarktu s progresí do chronického srdečního selhání <sup>5, 13-15</sup>. Současná strategie léčby AIM se zaměřuje především na snížení akutní ztráty CM dosažením co nejčasnější reperfúze myokardu <sup>14</sup>. Prozatím žádná konvenční léčba nebo klinicky používaná procedura neumožňuje nahradit již nekrotický myokard nebo zformovanou jizvu funkční kontraktilní tkání. Naději do této sféry vnesly první experimentální práce s kmenovými buňkami <sup>16-18</sup>, jejichž závěry vedly poté k prvním pokusům o klinickou aplikaci. Výsledky těchto pilotních nerandomizovaných prací, publikovaných v době zahájení projektu, byly nadějně <sup>19-22</sup>. U části nemocných došlo ke zlepšení celkové funkce LK, zlepšení parametrů remodelace, viability v infarktovém ložisku a zmenšení perfuzního defektu. Nicméně, tyto studie byly provedeny na pacientech s relativně dobrou celkovou funkcí LK, s různými časovými intervaly reperfúze a jako srovnávací byly použity historické skupiny pacientů. Z těchto poznatků vycházel návrh naší klinické studie, ověřující účinnost a bezpečnost intrakoronárního podání mononukleárních dřevných buněk (BMNCs) v léčbě komorové dysfunkce u pacientů po rozsáhlém AIM přední stěny s pozdní reperfúzí. Jedná se o skupinu nemocných, u níž dochází k významné ztrátě kontraktilních elementů se všemi z toho vyplývajícími důsledky a případný pozitivní efekt buněčné léčby by měl největší význam.

## 4 Cíle a hypotéza práce

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

### 1. Primární cíle:

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

### 2. Sekundární:

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



## Pracovní hypotéza

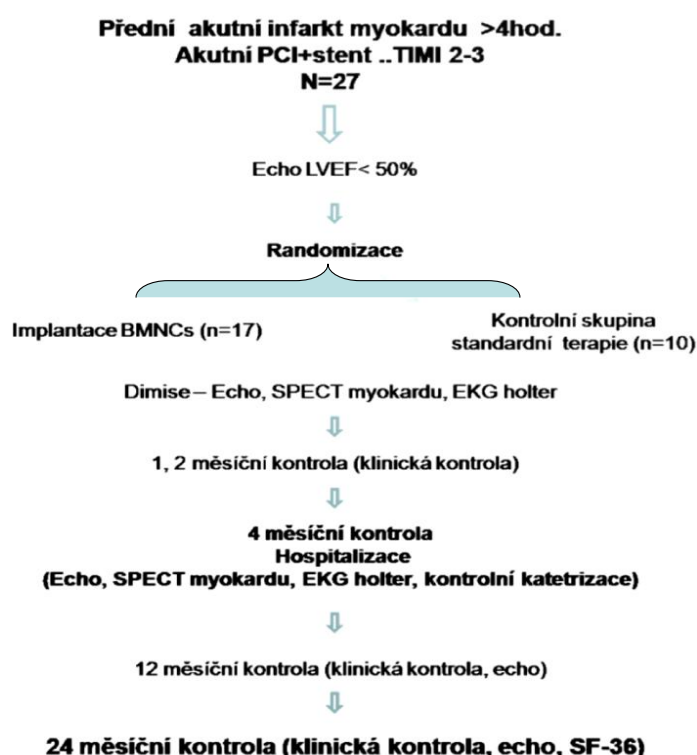
1. Intrakoronární aplikace BMNCs je bezpečná a nepovede ke zvýšení počtu nežádoucích událostí ani ke zvýšení počtu maligních arytmií. Naopak, díky ovlivnění funkce levé komory povede ke snížení počtu rehospitalizací pro srdeční selhání.
2. Intrakoronární aplikace BMNCs časně po akutním infarktu myokardu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

## 5 Metodika

V období od ledna 2004 do května 2006 bylo zařazeno ve dvou centrech (Všeobecná fakultní nemocnice, nemocnice Královské Vinohrady) celkem 27 pacientů s prvním akutním STEMI s pozdní prezentací (nad 4 hodin od počátků symptomů), kteří měli dle vstupní angiografie uzávěr ramus interventricularis anterior ošetřený PCI s implantací stentu a zjištěnou dysfunkcí LK s poruchou kinetiky v povodí infarktové tepny při vstupním echokardiografickém vyšetření (LVEF < 50%, 24-48 hod po primární intervenci). Vyřazovacími kritériemi studie byl věk nad 80 let, difúzní koronární postižení, hemodynamická nestabilita, závažnější komordity a porucha kinetiky LK dle echa v jiném než infarktovém povodí. Pacienti, randomizovaní do studie byli následně rozděleni (obálkovou metodou) v poměru 2:1 do aktivní BMNCs skupiny (časná větve – implantace za 3-5dní od AIM a pozdní za 7-11 dní). Studie byla schválena etickými komisemi zúčastněných pracovišť. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

## 5.1 Design studie (shrnutí viz obr. 1)

Hodnocení systolické funkce LK (dle LVEF), objemy, rozměry LK a diastolické funkce bylo provedeno pomocí echokardiografického vyšetření vstupně, dále při dimisi ze vstupní hospitalizace (referenční nález) a poté za 4, 12 a 24 měsíců. Hodnocení myokardiální perfuze a viability jednotlivých segmentů bylo provedeno dle SPECTu myokardu (při dimisi a za 4 měsíce) pomocí [<sup>99m</sup>Tc]-Tetrofosminu (600 MBq). Kontrolní koronarografie proběhla za 4 měsíce od randomizace. U všech nemocných byly



provedeny seriové laboratorní odběry opakovaně vstupně a při jednotlivých kontrolách (kardiomarkery – troponin I, kreatinkináza, její MB frakce dále CRP, krevní obraz, kompletní biochemický screening). Kontrolní EKG, 24 hodinové holterovská EKG monitorace byla provedena při dimisi ze vstupní hospitalizace, za 2 a 4 měsíce. Při výstupní kontrole (24 měsíců od randomizace) nemocní vyplnili dotazník kvality života (standardizovaný dotazník SF-36).

Obr.1 .: Struktura studie.

## 5.2 Odběr, zpracování kmenových buněk, intrakoronární aplikace

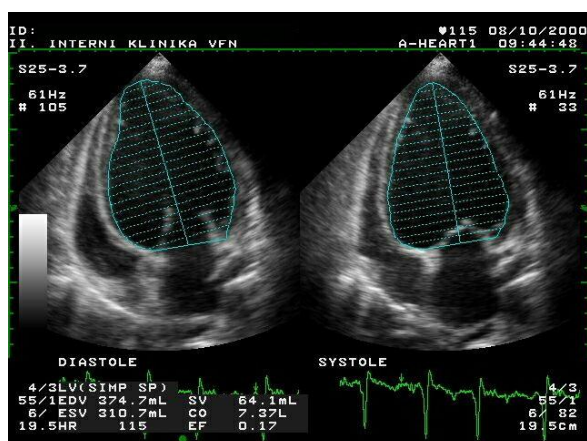
U stabilních pacientů v aktivně léčené skupině byl proveden odběr kostní dřeně zkušeným hematologem za 3-11 dní od PCI (dle randomizace). Kmenové buňky (KB) jim byly odebrány ze zadní horní hrany lopaty kyčelní kosti (spina iliaca posterior superior) v analgosedaci opakovanými aspiracemi (10-15 kostních vpichů ve 4 hloubkových etážích). Vždy se odebralo nejvýše 2 ml dřevové krve do jednorázové injekční stříkačky s 0.1 ml sterilního heparinového roztoku 1:50. Odebrané porce se shromažďovaly v odběrovém setu Bone Marrow Collection Kit with Pre-Filter and Inline Filters (Baxter R4R2107). Erytrocyty byly následně separované pomocí sedimentace s Gelofusinem (B.Braun, Melsungen AG) v laminárním boxu Biohazard. Po izolaci BMNCs se přebývající plasma odebrala a

vytvořil se koncentrát. Přes Sampling site coupler EMC1401 (Baxter) se sterilně odebral vzorek na zjištění počtu jaderných buněk a centrifugací s následnou úpravou objemu pomocí plasmaextraktoru se adjustovala koncentrace jaderných buněk na cílový objem. Finálně zpracované BMNCs byly aplikovány nemocným ještě téhož dne, co byl proveden odběr kostní dřeně intrakoronárně. Aplikace KB byla provedena metodou „over the wire PCI“ popsanou Strauerem a spol.<sup>21</sup>, kdy do infarktové tepny byl zaveden, do místa předchozí intervence krátký angioplastický balónek s centrálním lumenem (Maveric, Boston Scientific). Po nízkotlakém nafouknutí balóneku byla do přechodně obturované tepny během cca 2-3 minut aplikována suspenze připravených dřeňových buněk o objemu 2-5 ml, poté byl balónek vyfouknut a perfuze myokardu znovu obnovena. Celý postup byl opakován v intervalech 3-5 minut 3-5x do aplikace celého množství buněčného koncentrátu. Celková doba ischemie byla 7-18 min.

### 5.3 Echokardiografické vyšetření

Echokardiografické vyšetření bylo provedeno podle standardního vyšetřovacího protokolu na přístroji Vivid 7 (Vingmed-General Electric, Horten, Norway)<sup>23</sup>. Všechny hodnoty byly měřeny nejméně třikrát a průměrovány. Měření byla prováděna ve standardních projekcích (parasternální krátké ose - PSAX, dlouhé ose - PLAX, apikální projekci – 4 dutinové (4AC), 5 dutinové (5AC), 3 a 2 dutinové (3AC a 2AC) sondou MS3 o frekvenci 3,5 MHz<sup>24</sup>. Objemy levé komory (LVEDV, LVESV) a systolická

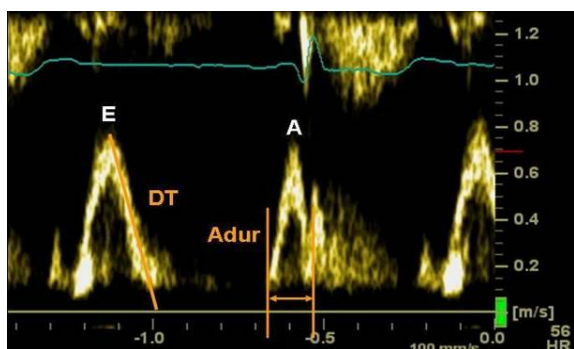
funkce (LVEF) byly měřeny ze 4 AC a 2 AC projekce pomocí Simpsonovy metody (obr. 2).



**Obr.2.:** Echokardiografické hodnocení funkce levé komory dle Simpsonova pravidla (EFLK – ejekční frakce levé komory).

Rozměry LK byly stanovovány z parasternální dlouhé osy ze záznamu M-způsobem, kdy kurzor je vedený kolmo na interventrikulární septum a zadní stěnu LK pod úroveň cípů mitrální chlopně. Měření byla prováděna na konci diastoly určeném kmitem R na současně registrovaném EKG.

Pro hodnocení diastolické funkce jsme použili nejběžnější způsob hodnocení pomocí pulzní dopplerovské echokardiografie, kdy využíváme záznamu toku přes mitrální chlopeň a toku v plicních žilách ze 4AC projekce. Hodnocení rychlosti toku pomocí pulzní dopplerovské echokardiografie transmitrálně: Vrcholová rychlost vlny E je dána velikostí tlakového gradientu mezi síní a komorou na počátku diastoly. Její velikost odráží rychlost relaxace komory, tlak v levé síní (LS) a poddajnost LK. Doba poklesu rychlosti vlny E  $\approx$  decelerační čas (DTe). DTe odráží rychlost vzestupu tlaku v LK v časné diastole. Je závislý na délce trvání relaxace komory a je měřítkem její compliance. Velikost vlny A a její trvání (Adur) závisí na poddajnosti LK, preloadu a na kontraktilitě LS, obr. 3.



**Obr. 3.:** Pulzně dopplerovský záznam transmitrálního průtoku získaný ze 4AC projekce (E – vlna časného transmitrálního průtoku, A – vlna pozdního transmitrálního průtoku, DTe – decelerační čas vlny E, Adur – doba trvání vlny A).

Dále bylo provedení hodnocení v pravé horní plicní žíle: měřena byla velikost vlny S, která je závislá na tlaku v LS a její poddajnosti. Vlna D  $\approx$  vlně E, délka trvání reversní vlny Ar v plicní žíle během síňové systoly (Ardur) a následně spočten rozdíl trvání vln Ar a A (Ardur a Adur).

#### 5.4 Dobutaminová echokardiografie <sup>25</sup>

Tato metoda sloužila k detekci viability hibernovaného myokardu, kdy po aplikaci malých dávek dobutaminu (5, 10 ug/kg/min) bylo zjišťováno zda dochází ke zlepšení funkce LK na základě předpokladu potenciace kontraktility LK (projekcích: PLAX, PSAX, 4AC a 2AC). Měření a porovnávání bylo zaměřeno na regionální kinetiku s analýzou jednotlivých segmentů myokardu v klidu a po zátěži dobutaminem (16ti segmentový model <sup>26</sup>) s otázkou přítomnosti reversibilní ischemie. V případě, že i po maximální aplikaci dobutaminu nedošlo k potenciaci kinetiky byl hodnocen nález jako ireversibilní akineza se zničeným myokardem <sup>27</sup>.

## **5.5 Vyšetření myokardiální viability pomocí SPECTu<sup>28,29</sup>**

Scintigrafická objektivizace distribuce perfuze myokardu LK byla realizována metodou hradlované jednofotonové emisní tomografie (GSPECT) na dvoudetektorové kameře (Infinia Hawkeye GE). Vyšetření probíhalo za klidových podmínek s intravenózním podáním [<sup>99m</sup>Tc]-Tetrofosminu (600 MBq). Distribuce perfuzního indikátoru byla hodnocena z jednotlivých řezů a z polárních map vizuálně a pomocí kvantifikačních programů 4D-MSPECT, který umožňuje korekci na zeslabení a rozptyl metodou low-dose CT. Ke specifikaci viability byl použit 16ti segmentový model<sup>26, 30</sup>. Oblast poškozeného myokardu byla prostřednictvím scintigrafie porovnávána s ostatním zdravým myokardem LK, stanovené hodnoty byly po normalizaci porovnány s implementovanou standardní databází normálních pacientů.

## **5.6 Kvalita života<sup>31-33</sup>**

K hodnocení kvality života (na konci studie) byl použitý standardizovaný dotazník kvality života SF-36. Hodnoceny byly tyto parametry: 1. fyzické funkce (PF), 2. fyzické omezení rolí (RP), 3. tělesná bolest (BP), 4. celkové vnímání vlastního zdraví (GH), 5. vitalita (VT), 6. fyzické nebo emoční omezení sociálních funkcí (SF), 7. emoční omezení rolí (RE), 8. všeobecné duševní zdraví (MH).

## **5.7 Statistická analýza**

Statistické zpracování prezentovaných výsledků bylo provedeno s použitím programu Microsoft Office Excel 2003 (Microsoft corp) a statistického programu JMP 3.2.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Hodnoty byly uváděny jako průměr ± standardní odchylka nebo jako procentuální zastoupení. V souhrnu jsme použili tyto metody: Studentův nepárový t-test u kontinuálních proměnných pro srovnání průměrných hodnot jednotlivých vyšetřovaných spojitých parametrů mezi jednotlivými skupinami, pokud byla distribuce Gaussovského typu. U dichotomických proměnných Analýza rozptylu ANOVA metoda: pro vzájemné srovnání všech souborů, dále pro diskrétní veličiny byl použit chí-kvadrát<sup>2</sup> nebo Fischerovým testem, K posouzení korelací mezi proměnnými bylo používáno lineární regresní analýzy se stanovením Pearsonova korelačního koeficientu. Za statisticky významné byly považovány rozdíly a korelace, kde p bylo menší než 0,05. Všechny použité testy byly dvoustranné.

## 6 Výsledky

Celkový počet zařazených nemocných byl 27 (průměrný věk  $59 \pm 12$  let, 81% tvořili muži se vstupní LVEF  $39 \pm 5\%$  s rozmezím 19 – 45%), přičemž 17 pacientů zařazeno do aktivně léčené skupiny s BMNCs (7 do skupiny časně léčby a 10 do skupiny pozdní léčby) a 10 do kontrolní skupiny. Obě skupiny se významněji nelišily v základních vstupních parametrech včetně systolické funkce (LVEF  $39 \pm 7\%$  vs  $39 \pm 4\%$ ). Pouze nemocní v BMNCs skupině byli nesignifikantně starší a měli naznačenou lehce vyšší prevalenci výskytu postižení více koronárních tepen, podrobnosti viz tabulka 1.

**Tbl. 1.:** Vstupní charakteristika souboru (celkový počet pacientů = 27, kontrolní skupina 10 a BMNCs skupina 17 nemocných).

	BMNCs skupina (n=17)	Kontrolní skupina (n=10)	p hodnota
Věk (roky)	61 ± 14	54 ± 10	0,18
Hypercholesterolémie (%)	5 (30%)	6 (60%)	0,87
Kouření (%)	11 (66)	9 (90%)	0,69
Diabetes mellitus (%)	5 (29)	2 (20)	0,34
Arteriální hypertenze (%)	7 (42%)	6 (60%)	0,79
<b>Vstupní klinické nálezy</b>			
Systolický tlak, vstupní	129±33	142±21	0,21
Diastolický tlak vstupní (mmHg)	77±18	82±21	0,39
Tepová frekvence (počet tepů/min)	83±19	78±10	0,48
<b>Postižení koronárních tepen</b>			
SVD, n (%)	7 (41)	6 (60)	0,87
MVD, n (%)	10 (59)	4 (40)	0,34
Doba od vzniku bolesti do PCI (min)	315 (IQR 300 - 660)	330 (IQR 300 – 630)	0,75
Vstupní kreatinkináza (MB frakce)	6,38±1,9	2,85±2	0,12
<b>Kardioenzymy</b>			
Maximální kreatinkináza (ukat/l)	59,5 ±12	35 ±17	0,32
Maximální troponin (ug/l)	152 ± 22	147 ±20	0,46
<b>Killip klasifikace</b>			
I/II, n (%)	15 (88)	9 (90)	0,46
III/IV, n (%)	2 (12)	1 (10)	0,59
<b>TIMI flow po PCI</b>			
Stupeň 2, n (%)	4 (23)	2 (20)	0,64
Stupeň 3, n (%)	13 (77)	8 (80)	0,68
Katecholaminová podpora, n (%)	2 (12)	1(10)	0,41
Aplikace IIb/IIIa inhibitorů, n (%)	2 (12)	0	0,21
Ejekční frakce levé komory, %	39 ± 7	39 ± 4	0,73
<b>Medikace po PCI, při dimisi</b>			
Aspirin, n (%)	17 (100)	10 (100)	NS
Clopidogrel, n (%)	17 (100)	10 (100)	NS
ACE inhibitory/ AT1 blokátory, n (%)	13 (76)	8 (80)	NS
β-blokátory, n (%)	14 (76)	10 (100)	NS
Statiny, n (%)	15 (88)	10 (100)	NS

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

Celková doba od vzniku bolesti do PCI (do reperfuze) byla u aktivně léčené skupiny 315 min (rozmezí 300-660min) a kontrolní skupiny 330min (rozmezí 300-630min),  $p=0,75$ . Pacientům byly při akutní PCI implantované metalické stenty, kdy průměrný počet stentů byl u aktivně léčených nemocných  $1,3 \pm 0,4$  a kontrolní skupiny  $1,2 \pm 0,7$ ,  $p=0,72$ . U pacientů v obou skupinách bylo vstupní TIMI v infarktové tepně 0 do periferie. Po PCI bylo u aktivně léčených nemocných v 77% TIMI III a v 80% u skupiny kontrolní,  $p=0,68$ . Aplikace IIb/IIIa inhibitorů (® Reo-Pro) byla použita u 2 pacientů zařazených do aktivně léčené skupiny. Tři pacienti byli vstupně v plicním edému (2 z aktivně léčené skupiny a 1 v kontrolní skupině). Celková maximální hodnota vzestupu troponinu byla u aktivně léčené skupiny  $152 \pm 22$  ug/l a kontrolní skupiny  $147 \pm 20$ ug/l,  $p=0,46$ , maximální hodnota kreatinkinázy byla  $59,5 \pm 12$  vs.  $35 \pm 17$  ukat/l,  $p=0,32$ . Po úspěšném katetrizačním výkonu byli všichni pacienti léčeni dle guidelines české a evropské kardiologické společnosti<sup>34</sup> bez statistické významnosti mezi skupinami. Nebyl pozorovaný signifikantní rozdíl ve vstupních základních laboratorních parametrech a markerech zánětu - C reaktivní protein byl vstupně v obou skupinách mírně zvýšen ( $21,5 \pm 42$ mg/l vs.  $12,2 \pm 23$ mg/l,  $p=0,65$ ), stejně tak i byla přítomná mírná leukocytóza ( $13,28 \pm 4$  vs  $9,96 \pm 4$  g/l,  $p=0,49$ ). U tří pacientů z každé skupiny byla verifikovaná vstupně mírná renální insuficience. Nebylo zjištěno pokatetrizačně signifikantní zhoršení renálních parametrů. Změny na EKG odpovídaly v první době změnám při akutním anteroextenzivním STEMI. Vstupně byl nález ST elevací ve svodech I, aVL, V1 - V6. Při akutní PCI po otevření infarktové tepny došlo u 9 pacientů z BMNCs skupiny (64%) vs. 8 pacientů (80%) v kontrolní skupině k okamžité kompletní ST rezoluci. U všech nemocných, vzhledem k pozdní reperfuzi, se nález na EKG vyvinul do obrazu jizvy (Q infarktu). Během 4 měsíčního sledování jsme zaznamenali již jen nespecifické změny na EKG (úsek ST) u 1 pacienta v obou skupinách, a dále během 24 měsíců byl EKG nález prakticky stacionární. Pacientům z aktivně léčené skupiny byl celkový počet podaných KB v průměru  $29 \pm 11 \times 10^8$ , počet CD 34+ buněk  $22,3 \pm 12 \times 10^6$ , poměr CD34+ k celkovému počtu buněk (%)  $1,35 \pm 0,45$ . Nebyla zjištěna pozitivní korelace mezi celkovým množstvím aplikovaných buněk a LVEF během sledování. Výsledná LVEF však slabě korelovala s počtem CD 34+ buněk v aplikovaném koncentrátu.

## **6.1 Bezpečnost implantace BMNCs**

### **6.1.1 Krátkodobé sledování (4 měsíce)**

Ze 17 pacientů zařazených do aktivně léčené skupiny (časná aplikace) došlo u dvou k významným komplikacím po odběru KB ještě před jejich plánovanou implantací (buněčná terapie tedy nebyla aplikována), které vedly nakonec k jejich úmrtí. U jednoho nemocného k subakutní tromboze ve stentu s reinfarktem, která byla řešena komplikovanou angioplastikou a následně urgentním aortokoronárním by-passem, nemocný pak zemřel o 2 týdny později na sepsi a respirační komplikace. U jedné nemocné došlo před plánovanou implantací buněk k ruptuře mezikomorové přepážky, která si vyžádala urgentní chirurgické řešení, nemocná pak zemřela po 3 měsících na srdeční selhání. U jedné nemocné v BMNCs skupině pak byl 6 týdnů po výkonu diagnostikován inoperabilní karcinom žlučových cest (v době infarktu zcela asymptomatický) a nemocná zemřela na toto onemocnění o 2 měsíce později. Celkem tedy dokončilo základní sledovací období 4 měsíců 14 aktivně léčených a 10 pacientů v kontrolní skupině. V každé skupině byla během tohoto intervalu u 1 nemocného nutná re-hospitalizace pro srdeční selhávání, jiné závažné komplikace se nevykly. Výskyt restenózy s následnou angioplastikou při kontrolní angiografii po 4 měsících byl obdobný v obou skupinách (po 2 pacientech), kontrolní angiografii odmítl v každé skupině 1 nemocný. V aktivně léčené skupině nebyl zachycen závažnější běh nesetřvalé komorové tachykardie. Během prvního měsíce byl větší výskyt KES u nemocných v kontrolní skupině (15,2 vs. BMNCs skupina 4,6,  $p=0,004$ ), jejich počet již při následné kontrole za 4 měsíce výrazně klesl a naopak v tomto období ve skupině s implantovanými KB jejich počet byl lehce vyšší ( $3,8 \pm 1,2$  vs.  $1,6 \pm 2,3$  v kontrolní skupině,  $p=0,12$ ) – jednalo se o počet nijak závažný, KES byly převážně monomorfní, izolované. Klinická symptomatologie hodnocená dle NYHA během 4 měsíců nebyla rozdílná mezi skupinami ( $1,7 \pm 0,8$  vs  $1,65 \pm 0,7$ ,  $p=0,55$ ).

### **6.1.2 Dlouhodobé sledování (24 měsíců)**

Během 24 měsíčního sledování nebyl zjištěn statisticky signifikantní rozdíl ve výskytu nežádoucích klinických příhod po aplikaci BMNCs v porovnání s kontrolní skupinou (shrnutí viz tbl. 2). Kompozitní faktor nežádoucích účinků zahrnující úmrtí, re-infarkt myokardu, rehospitalizaci pro srdeční selhání byl prakticky bez rozdílu mezi skupinami (6 pacientů v aktivně léčené skupině (36%) vs. 5



pacientů (50%),  $p=0,54$ ). V každé skupině pak během pozdního sledování prodělali čtyři nemocní revaskularizaci - 2 pomocí aortokoronárního by-passu a 2 pomocí PCI. Během 24 měsíčního intervalu u 4 nemocných z kontrolní skupiny vs. 2 pacientů s BMNCs skupiny byla nutná re-hospitalizace pro srdeční selhávání. Během 24 měsíců nebyla ani v jedné skupině zachycena závažnější komorová tachykardie popř. synkopy.

**Tbl. 2.:** Bezpečnost implantace kmenových buněk při dlouhodobém sledování – 24měsíců (KVO mortalita, rehospitalizace, reintervence, kompozitní faktor).

	BMNCs skupina	Kontrolní skupina	p hodnota
Kardiovaskulární mortalita, n (%)	2 (12)	0	NS
Mortalita - nekardiovaskulární, n (%)	1 (6)	0	NS
Rekurentní infarkt myokardu, n (%)	1 (6)	1 (10)	NS
Hospitalizace pro srdeční selhání, n (%)	2 (12)	4 (40)	NS
Kompozitní faktor - úmrtí, infarkt myokardu a rehospitalizace pro srdeční selhání, n (%)	6 (36)	5 (50)	NS
Restenózy, n (%)	2 (12)	4 (40)	NS
Revaskularizace, n (%)	4 (24)	4 (40)	NS
PCI, n (%)	2 (12)	2 (20)	NS
CABG, n (%)	2 (12)	2 (20)	NS
Dokumentované komorové tachykardie popř. synkopy, n (%)	0	0	NS
NYHA I, II, n (%)	14 (100)	7 (70)	NS
Průměrná NYHA třída	1.2 ± 0.42	1.9 ± 0.83	NS

*CABG = coronary artery bypass graft, LV = levá komor, PCI = percutaneous coronary intervention, NS=nesignifikantní*

Klinická symptomatologie (NYHA klasifikace) byla v obou skupinách v celém sledovaném období srovnatelná ( $1,2 \pm 0,42$  vs  $1,9 \pm 0,83$ ,  $p=0,59$ ). Nebyl, ale zachycen statisticky signifikantní rozdíl mezi skupinami v hodnocení kvality života dle dotazníku SF-36 ve všech domén ( $p=0,25$ ).

## 6.2 Efektivita buněčné terapie

Do našeho souboru byli již primárně zahrnuti nemocní se STEMI s pozdní reperfuzí, tedy pacienti s prakticky plně rozvinutým relativně velkým poškozením myokardu, mírně dilatovanou komorou s LVEDD  $53,5 \pm 6$ mm ( $53,9 \pm 7,2$ mm v BMNCs skupině vs. kontrolní skupina  $53,1 \pm 4,3$ mm,  $p=0,91$ ) a LVESD  $39 \pm 8$ mm ( $40,8 \pm 7,7$ mm vs.  $37,1 \pm 8,7$ mm,  $p=0,21$ ) a alterovanou vstupní systolickou funkcí (LVEF  $39,2 \pm 9,2\%$  vs.  $39,4 \pm 5,6\%$ ,  $p=0,73$ ). Vstupní hodnoty LVEDV a LVESV v obou skupinách

odpovídají vstupním hodnotám LVEDD a LVESD ( $163,3 \pm 10,3\text{ml}$  vs.  $162,3 \pm 39,3\text{ml}$ ,  $p=0,71$  u LVEDV,  $98 \pm 38,1\text{ml}$  vs.  $98 \pm 38,9\text{ml}$ ,  $p=0,79$  u LVESV), shrnutí viz tbl. 4.

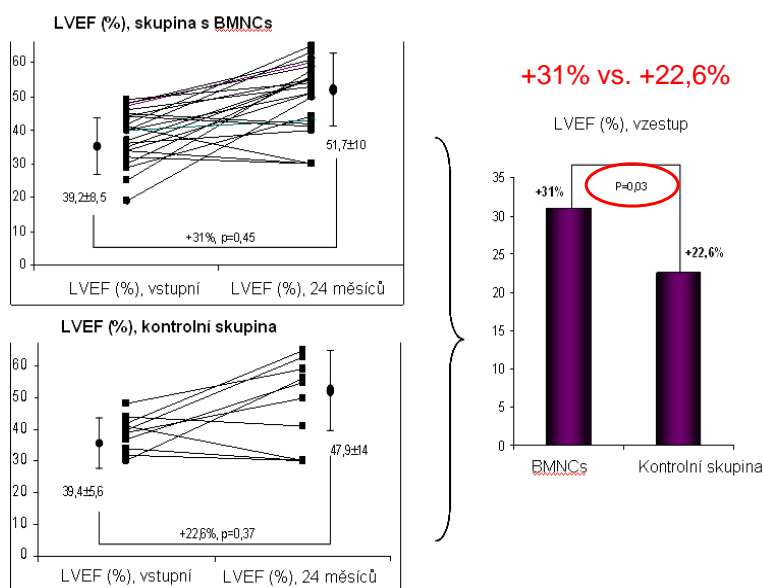
**Tbl. 4.** Souhrn změn během sledování 24 měsíců v systolické funkci levé komory (LVEF), objemech a rozměrech komory.

		BMNCs skupina (n=14)			Kontrolní skupina (n=10)			P hodnota BMNCs vs Kontrolní skupina
		Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs.vstupní hodnota (%)	Průměrná hodnota	Absolutní změna vs. vstupní hodnota	Relativní změna vs.vstupní hodnota (%)	
<b>LVEDD (mm)</b>	<b>Vstupní hodnota</b>	<b>53,9 ± 7,2</b>			<b>53,1 ± 4,3</b>			0,91
	4 měsíce	59,7 ± 6,1	+5,8 mm	+10,70%	56,1 ± 6,1	+3 mm	+5,60%	0,23
	24 měsíců	56,7 ± 5,1	+2,8 mm	5%	55,7 ± 6,6	+2,6 mm	+4,90%	0,27
<b>LVESD (mm)</b>	<b>Vstupní hodnota</b>	<b>40,8 ± 7,7</b>			<b>37,1 ± 8,7</b>			0,21
	4 měsíce	42,4 ± 6,2	+1,6 mm	+3,90%	40,4 ± 5,1	+3,3 mm	+8,90%	0,72
	24 měsíců	41,1 ± 4,7	+0,3 mm	+0,70%	39,9 ± 7,5	+2,8 mm	+7,50%	0,09
<b>LVEDV (ml)</b>	<b>Vstupní hodnota</b>	<b>163,3 ± 10,3</b>			<b>162,3 ± 39,3</b>			0,71
	4 měsíce	172,3 ± 40,5	+9 ml	+5,70%	174,3 ± 59,2	+12 ml	+7,40%	0,33
	24 měsíců	180 ± 50,6	+16,7ml	10%	180,2 ± 35,6	+17,9 ml	10,4%	0,16
<b>LVESV (ml)</b>	<b>Vstupní hodnota</b>	<b>98 ± 38,1</b>			<b>98 ± 38,9</b>			0,79
	4 měsíce	95 ± 28,2	-3 ml	-3,10%	96 ± 41,4	-2 ml	-2%	0,85
	24 měsíců	95,4 ± 39,8	-2,6 ml	-2,65%	96,2 ± 38,5	-1,8 ml	-1,80%	0,26
<b>LVEF (%)</b>	<b>Vstupní hodnota</b>	<b>39,2 ± 9,2</b>			<b>39,4 ± 5,6</b>			0,73
	4 měsíce	45 ± 10,9	+5,8 %	15%	47 ± 9,8	+7,6 %	19%	0,75
	24 měsíců	51,2 ± 6,7	12%	31%	47,9 ± 14	+8,5 %	22,6%	<b>0,03</b>

Při 4 měsíční kontrole byl LVEDD u skupiny s BMNCs  $59,7 \pm 6,1\text{mm}$  vs.  $56,1 \pm 6,1\text{mm}$  u kontrolní skupiny, přičemž relativní změna byla  $+10,7\%$  vs.  $+5,6\%$ ,  $p=0,23$ . Obdobně došlo i k mírnému zvětšení endsystolického diametru za 4 měsíce na hodnoty  $42,4 \pm 6,2\text{mm}$  vs.  $40,4 \pm 5,1\text{mm}$  (relativní změna byla  $+3,9\%$  vs.  $+8,9\%$ ,  $p=0,72$ ). Při kontrolním vyšetření za dva roky od randomizace byly hodnoty LVEDD bez významné změny a statistického rozdílu mezi skupinami v rámci sledovaného období ( $56,7 \pm$

5,1mm vs.  $55,7 \pm 6,6$ mm,  $p=0,27$ ). Absolutní změna představovala hodnotu  $+2,8$ mm vs.  $2,6$ mm a relativní změna  $+5\%$  vs.  $+4,9\%$ . Oproti tomu byl zjištěn pozitivní trend ve velikosti systolického rozměru levé komory ve prospěch aktivně léčené skupiny BMNCs ( $41,1 \pm 4,7$ mm vs.  $39,9 \pm 7,5$ mm) kdy absolutní změna odpovídala hodnotám  $+0,3$ mm vs.  $+2,8$ mm (relativní změna  $+0,7\%$  vs.  $+7,5\%$ ) s hraniční významností ve prospěch pacientů s BMNCs,  $p=0,09$ . Během 2 letého sledování došlo k nárůstu LVEDV na hodnoty  $180 \pm 50,6$ ml ve skupině s implantovanými BMNCs vs.  $180,2 \pm 35,6$ ml u kontrolní skupiny,  $p=0,16$  (nález odpovídá absolutní změně LVEDV  $+16,7$ ml vs.  $+17,9$ ml, relativní změně  $+10\%$  vs.  $+10,4\%$ ). LVESV se lehce zmenšil u obou skupin bez přesvědčivé statistické významnosti, ale s tendencí ve prospěch aktivně léčené skupině ( $95,4 \pm 39,8$ ml vs.  $96,2 \pm 38,5$ ml, absolutní změna za 24 měsíců  $-2,6$ ml vs.  $-1,8$ ml relativní změna  $-2,65\%$  vs.  $-1,8\%$ ,  $p=0,26$ ).

Během 4 měsíční kontroly jsme pozorovali mírné zlepšení LVEF v obou skupinách na hodnoty  $45 \pm 10,9\%$  vs.  $47 \pm 9,8\%$ ,  $p=0,75$  (absolutní změna ve skupině aktivně léčených  $+5,8\%$  vs.  $+7,6\%$  v kontrolní skupině s relativní  $+15\%$  vs.  $+19\%$ ). Velmi pozitivní bylo zjištění statisticky signifikantního vzestupu LVEF během 24 měsíční kontroly u pacientů s BMNCs skupiny na hodnoty  $51,2 \pm 6,7\%$  vs.  $47,9$



$\pm 14\%$  (absolutní změna  $+12\%$  vs.  $8,5\%$ , relativní změna byla  $+31\%$  vs.  $+22,6\%$ ,  $p=0,03$ , graf 1.

**Graf 1:** Hodnocení změny velikosti LVEF (%) u aktivně léčených nemocných s implantovanými kmenovými buňkami a kontrolní skupinou během 24 měsíců sledování.

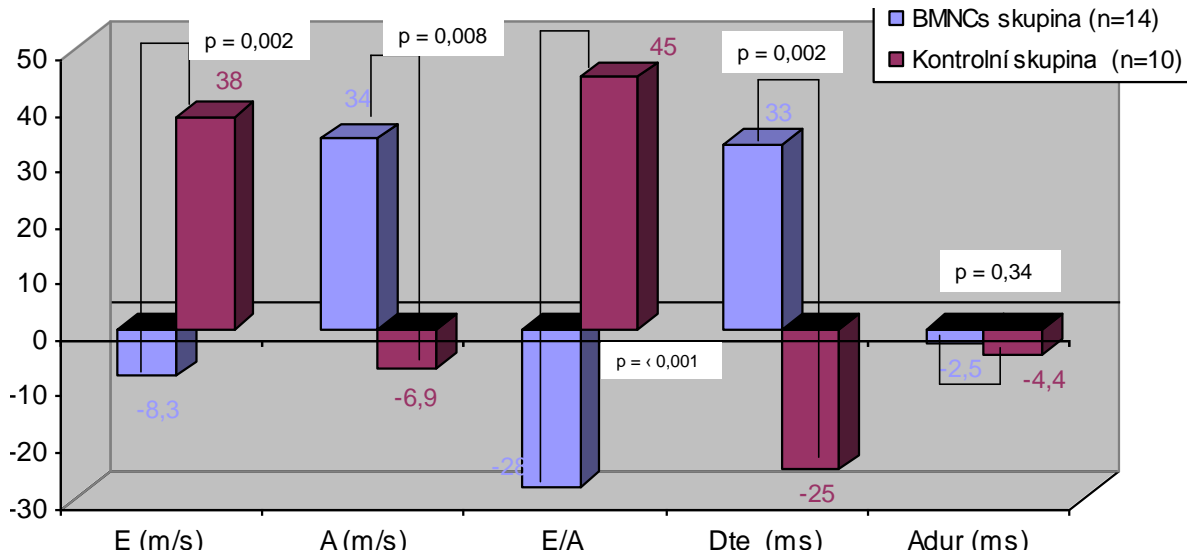
V našem souboru nemocných jsme zjistili vstupně mírnou až středně významnou poruchu diastolické funkce (E  $0,66 \pm 0,19$ m/s, A  $0,56 \pm 0,16$ m/s, E/A  $1,21 \pm 0,37$ , DTe  $162 \pm 23$ ms, Adur-Ardur  $2 \pm 8$ ) vzniklou velmi pravděpodobně na podkladě alterace myokardu při akutním STEMI. Nebyl zachycen statisticky signifikantní rozdíl mezi vstupními hodnotami mezi BMNCs a kontrolní skupinou (BMNCs skupina: E  $0,72 \pm 0,23$ m/s, A  $0,55 \pm 0,16$ m/s, DTe  $143 \pm 21$ ms, Adur  $118 \pm 19$ ms, Ardur  $125 \pm 47$ ms, E/A

1,35 ± 0,45, Adur-Ardur -12ms vs. kontrolní skupina: E 0,6 ± 0,16 m/s, A 0,58 ± 0,17m/s, DTe 182 ± 25ms, Adur 135 ± 6ms, Ardur 119 ± 30ms, E/A 1,07 ± 0,3, Adur-Ardur 16 ± 11ms). Během 24 měsíčního sledování jsme u nemocných s implantovanými BMNCs zjistili zlepšení diastolické funkce z převažující změny plnění charakteru pseudonormalizace na lehčí poruchu relaxace (E 0,66 ± 0,25m/s, A 0,55 ± 0,16 m/s, Dte 190 ± 25ms, Adur115 ± 25ms, Ardur 141 ± 19ms, E/A 0,97 ± 0,45, Adur-Ardur 27 ± 12ms) oproti kontrolní skupině, u nichž mírně progreduje četnost výskytu středně významné poruchy pseudonormalizace (E 0,83 ± 0,11 m/s, A 0,54 ± 0,18 m/s, Dte 136 ± 42ms, Adur 129 ± 21ms, Ardur 138 ± 25ms, E/A 1,56 ± ,3, Adur – Ardur -9), tbl. 5, graf 2.

**Tbl.5.:** Shrnutí parametrů diastolického plnění LK, sledování jednotlivých parametrů a jejich změn, které určují další průběh změny diastolické funkce.

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

**Graf 2 .:** Shrnutí změny diastolické funkce.



Během sledování nebyla zachycena závažnější progresse nárůstu mitrální regurgitace, došlo k mírné dilataci levé síně (z PLAX projekce se u BMNCs skupiny ze vstupní hodnoty  $37 \pm 9\text{mm}$  se zvýšil rozměr na  $43 \pm 10\text{mm}$  a u kontrolní skupiny z  $43 \pm 9\text{mm}$  na  $45 \pm 8\text{mm}$ ), bez statistického rozdílu mezi skupinami. Ze 4AC projekce byla patrná jistá pozitivní změna ve prospěch BMNCs skupiny v podélném rozměru LS, kdy jsme během 24 měsíců pozorovali u aktivně léčených nemocných mírnou regresi velikosti z  $49 \pm 8\text{mm}$  na  $48 \pm 6\text{mm}$  oproti kontrolní skupině, ve které se rozměr zvětšil  $48 \pm 8\text{mm}$  na  $54 \pm 7\text{mm}$ ,  $p = 0,12$ .

Dle scintigrafického vyšetření myokardu došlo během 4 měsíců k redukcí infarktového ložiska v obou skupinách (pokles o 26,3% ve skupině s BMNCs vs. 25,7%), bez statisticky signifikantního rozdílu mezi skupinami. Neprokázali jsme ani v tomto období statisticky signifikantní změnu kinetiky ani významnější potenciace hibernovaného myokardu v jednotlivých definovaných segmentech pomocí dobutaminové echokardiografie. U obou skupin došlo sice k mírnému zlepšení u obou skupin, relativní pokles hodnoty byl u skupiny s implantovanými BMNCs 12,8% vs. 7,4% ve skupině kontrolní,  $p=0,68$  ( $1,7 \pm 0,39$  vs.  $1,76 \pm 0,33$ ).

## 7 Diskuze

Tato randomizovaná studie zkoumala bezpečnost a efektivitu intrakoronární aplikace autologních mononukleárních buněk kostní dřeně u pacientů po velkém AIM s pozdní prezentací, primárně řešeném PCI. Tito nemocní i přes úspěšnou revaskularizaci infarktové tepny jsou vystaveni největšímu riziku negativní poinfarktové remodelace LK s rozvojem srdečního selhání a následné smrti<sup>5, 13-15</sup>. Hlavními klíčovými výsledky naší práce je prokázání bezpečnosti aplikace KB a zjištění, že i když u našich pacientů i.e. podání BMNCs nevedl během 4 měsíců k signifikantnímu vzestupu LVEF či redukcii objemů komory a zmenšení velikosti infarktového ložiska, v dlouhodobém sledování u aktivně léčené skupiny nemocných došlo k poklesu LVESV a stabilizaci LVEDV. To se projevilo, mírným, ale signifikantním zlepšením systolické funkce LK ve srovnání s kontrolní skupinou. Pozitivní byl nálezní příznivého vlivu BMNCs na diastolickou funkci během dvouletého sledování. Tyto výsledky ukazují na možnost ovlivnění především dlouhodobého procesu remodelace buněčnou terapií.

**Bezpečnost intrakoronární aplikace BMNCs:** V naší studii jsme prokázali, že i.e. podané BMNCs u nemocných s AIM nevedou k dlouhodobému vyššímu výskytu nežádoucích událostí (kombinovaný klinický endpoint, počet úmrtí, re-infarktů, re-hospitalizací pro srdeční selhání). Tento závěr je v souladu s většinou dosud publikovaných prací<sup>20, 35-41</sup>. Neprokázali jsme ani vyšší záchyt arytmií, které byly popsány v pilotních studiích<sup>42-44</sup>. Tyto výsledky potvrzují i větší práce<sup>45, 46</sup>. Pravděpodobně zde hraje roli především typ a množství aplikovaných buněk a charakter aplikace. V posledních 10 letech byly také vysloveny obavy z rizika in-stent restenózy a potenciace aterogeneze buněčnou terapií. Tento názor plynul ze závěrů relativně malých studií, u kterých byly KB navíc obohaceny o buňky CD133+ a růstové faktory<sup>47-49</sup>. V naší práci nebyl ve výskytu žádný rozdíl, stejně jak ve větších randomizovaných studiích se toto riziko již později neprokázalo a to včetně pro-aterogenního efektu<sup>38, 41, 50-63</sup>.

**Efektivita buněčné terapie v krátkodobém sledování:** Možnost regenerace myokardu a zlepšení systolické funkce LK po aplikaci BMNCs byla prokázána v řadě experimentálních studií<sup>17, 64-70</sup>. Jistý pozitivní vliv na zlepšení kontraktility LK se potvrdil i v následně presentovaných nerandomizovaných klinických studiích. Nicméně, výsledky později publikovaných randomizovaných prací jsou již rozporuplné. Zatímco některé prokázaly určitý pozitivní vliv na zlepšení systolické funkce LK<sup>22, 47, 51, 58</sup> jiné práce tyto výsledky nepotvrdily<sup>61, 77</sup>. Stejně tak nejsou přesvědčivé důkazy o vlivu na zmenšení

velikosti infarktového ložiska<sup>35, 58, 77, 78</sup>. Výsledky a závěry výše uvedených prací jsou velmi obtížné interpretovat vzhledem k heterogenitě souborů a designům studií. V roce 2008 byla publikovaná metaanalýza Martin-Rendon a spol.<sup>41</sup>, ve které se autoři pokusily o komplexní pohled na i.c. aplikaci BMNCs u pacientů po AMI. Do hodnocení zahrnuli jen větší randomizované práce s podobnou strukturou (13 studií s celkem 811 pacienty). Medián doby sledování čas byl 4 měsíce. Ze závěrů metaanalýzy vyplývá, že i.c. aplikace BMNCs ve statisticky signifikantní míře vede ke zlepšení systolické funkce LK oproti kontrolní skupině se zvýšením LVEF o 2,99% ( $p = 0,0007$ ), poklesem LVESV o 4,74ml ( $p = 0,003$ ) a v malé míře i snížením LVEDV o 2,47ml ( $p = 0,13$ ). Prokázán byl i vliv BMNCs na snížení velikosti infarktového ložiska o 3,51% (dle SPECTu).

**Efektivita při dlouhodobém sledování:** Dosud byly publikované pouze dvě významnější práce sledující dlouhodobější efekt i.c. aplikace BMNCs po STEMI<sup>79, 80</sup>. V první (BALANCE,  $n=62$ ) se po i.c. podání BMNCs během 12 měsíců výrazně zlepšila funkce LK a efekt byl pozorován i po 5ti letech, a navíc ve skupině s KB významně poklesla mortalita. Tato studie poukazuje jako první na možný dlouhodobý pozitivní funkční efekt buněčné léčby. Druhá studie (BOOST 2,  $n=60$ )<sup>52, 81</sup>, již není tak pozitivní. Prakticky zde nebyl pozorovaný aditivní dlouhodobý vliv BMNC na funkci komory při 5ti leté kontrole. Nemáme přesvědčivé vysvětlení pro tuto diskrepanci nálezů. Jednou z možných variant je rozdílné hodnocení, rozdílná vstupní funkce komory a časnost reperfuze a s tím související nižší riziko výraznější progresse remodelace ve studii BOOST.

Naše práce se zaměřovala současně na hodnocení dlouhodobé poinfarktové remodelace LK. Tento děj výrazně přispívá k rozvoji srdečního selhání. Je prokázáno z literatury, že ne u každého nemocného, který prodělá AIM, dochází k rozvoji remodelace, existuje zde značná variabilita<sup>85</sup>. Pravděpodobným hlavním faktorem, který ovlivňuje tento proces je velikost infarktového ložiska. Zdá se, že nejvážněji postižení nemocní, jsou ti, kteří prodělali velký anteroextenzivní STEMI s výraznou vstupní alterací funkce LK. Ti by mohli teoreticky také nejvíce z buněčné terapie profitovat. Tento předpoklad se potvrdil ve velké randomizované studii REPAIR-AMI<sup>36</sup>. Do této práce byli zařazeni pacienti s výrazně sníženou LVEFs tím že došlo k jejímu signifikantnímu zlepšení po i.c. léčbě BMNCs<sup>86</sup>. V představuje rizikový faktor pro rozvoj remodelace LK<sup>89-91</sup>. Experimentální práce na zvířatech poukazují na to, že by mohly mít podané KB jistý vliv na její zlepšení po AIM<sup>16, 92-96</sup>. V naší práci jsme toto zlepšení po i.c. aplikaci BMNCs pozorovali, kdy

v BMNCs skupině jsme zjistili pouze mírnou alteraci diastolické funkce ve smyslu poruchy relaxace oproti kontrolní ve které došlo k progresi do poruchy středně významné (pseudonormalizace). V multivariační analýze jsme vyloučili jiný podíl na změně (skupiny byly prakticky homogenní, nebyl rozdíl v hodnotách arteriálního krevního tlaku, ani ve výskytu diabetu mellitu). Pokud se podíváme do literatury, dosud byla publikovaná prakticky jediná práce zabývající se diastolickou funkcí po AIM s implantovanými KB a to studie BOOST 1 (n=60, sledování 6 a 18 měsíců)<sup>97</sup>. Z výsledků této studie vyplývá také jistý pozitivní nález, kdy u nemocných s aplikovanými BMNCs došlo prakticky k normalizaci diastolické funkce, kdežto u kontrolní byla zjištěna lehká porucha relaxace.

Rozdíly v závěrech popisovaných prací na remodelaci LK mohou být ovlivněny především souborem pacientů a jejich vstupními nálezy, kdy jejich převážná většina zahrnuje do sledování nemocné s relativně málo postiženou LK. V protikladu s tím, jsme sledovali pacienty po prodělaném velkém AIM s pozdní reperfuzí a se signifikantně významně alterovanou funkcí LK a LVEF < 40%. Během 4 měsíců jsme oproti jiným pracem nezaznamenali významnou redukci objemů LK či funkční vliv BMNCs, zatímco v dlouhodobém sledování byl efekt v aktivně léčené skupině patrný. Časné, i když mírné zlepšení funkce LK v obou skupinách může odrážet spontánní proces poinfarktového hojení, který byl popsán u 50% po AIM v tzv. reperfuzní době<sup>98</sup>. Pozdní funkční zlepšení by mohlo odrážet ovlivnění dlouhodobého procesu remodelace BMNCs<sup>99</sup>. Mechanismus, kterým by KB mohly reversní remodelaci ovlivnit je velmi málo znám. Předpokládaný podíl regenerace pomocí transdiferenciace aplikovaných buněk vyházející s experimentu a pilotních projektů je málo pravděpodobný a byl prakticky vyvrácen<sup>100, 101</sup>. Bylo navíc prokázáno, že po podání i.c. BMNCs jich pouze 1-5% přetrvává v myokardu po 24-48 hod<sup>102</sup>. V posledních letech se jeví spíše pravděpodobné ovlivnění pomocí parakrinní stimulace BMNCs<sup>103</sup> s efektem na angiogenezu a tím zlepšení krevního zásobení ischemického ložiska<sup>104</sup> nebo inhibice apoptózy CM v periinfarktové zóně<sup>18</sup>. Naše data naznačují, že účinky implantace BMNCs na remodelaci LK mohou mít vliv na dlouhodobý proces hojení, tvorbu jizvy, jakož i na kontraktlní a cévní struktury.



## 8 Závěr

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

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

## 9 Literatura

1. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina). *Circulation* 2000;102(10):1193-209.
2. Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, Califf RM, Cheitlin MD, Hochman JS, et al. ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2000;36(3):970-1062.
3. Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979;40(6):633-44.
4. Widimsky P. Reperfusion damage or no-reflow damage in primary coronary interventions in acute myocardial infarction? *Eur Heart J* 2002;23(14):1076-8.
5. Wollert KC, Drexler H. Carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) trial: carvedilol as the sun and center of the beta-blocker world? *Circulation* 2002;106(17):2164-6.
6. Schomig A, Ndrepepa G, Mehilli J, Schwaiger M, Schuhlen H, Nekolla S, et al. Therapy-Dependent Influence of Time-to-Treatment Interval on Myocardial Salvage in Patients With Acute Myocardial Infarction Treated With Coronary Artery Stenting or Thrombolysis. *Circulation* 2003;108(9):1084-1088.
7. Aschermann M, Horak J, Reznicek V, Belohlavek J, Aschermann O. [Fibrinolytic therapy in acute myocardial infarct]. *Cas Lek Cesk* 2003;142(10):582-5.
8. Widimsky P, Gregor P, Dvorak J, Sladkova T, Herold M, Jirmar R, et al. [The optimal diagnostic approach in myocardial infarct]. *Vnitr Lek* 1993;39(2):160-5.
9. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet* 2003;361(9351):13-20.
10. Lichtman JH, Spertus JA, Reid KJ, Radford MJ, Rumsfeld JS, Allen NB, et al. Acute Noncardiac Conditions and In-Hospital Mortality in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2007;116(17):1925-1930.
11. Poloczek M, Kala P, Neugebauer P, Brychta T, Bocek O, Jerabek P, et al. [ST-segment resolution as a simple tool for the assessment of successful primary coronary intervention at a microvascular level]. *Vnitr Lek* 2004;50(10):740-5.
12. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979;44(4):503-12.
13. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990;81(4):1161-72.
14. Widimsky P, Zelizko M, Jansky P, Tousek F, Holm F, Aschermann M. The incidence, treatment strategies and outcomes of acute coronary syndromes in the "reperfusion network" of different hospital types in the Czech Republic: results of the Czech evaluation of acute coronary syndromes in hospitalized patients (CZECH) registry. *Int J Cardiol* 2007;119(2):212-9.
15. Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006;367(9507):356-67.

16. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410(6829):701-5.
17. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JI, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001;103(5):634-7.
18. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001;7(4):430-6.
19. Aviles FF, San Roman JA, Garcia Frade J, Valdes M, Sanchez A, de la Fuente L, et al. [Intracoronary stem cell transplantation in acute myocardial infarction]. *Rev Esp Cardiol* 2004;57(3):201-8.
20. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361(9351):45-6.
21. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Dtsch Med Wochenschr* 2001;126(34-35):932-8.
22. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Kostering M, Hernandez A, Sorg RV, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002;106(15):1913-8.
23. Krupicka J, Gregor P, Budesinsky T, Widimsky P, Dvorak J. [Echocardiographic quantification of changes in left ventricular kinetics in patients during hospitalization for a first myocardial infarct and treated with direct angioplasty]. *Vnitr Lek* 2002;48(5):368-72.
24. Cheitlin MD, Armstrong WF, Aurigemma GP, Beller GA, Bierman FZ, Davis JL, et al. ACC/AHA/ASE 2003 guideline update for the clinical application of echocardiography--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASE Committee to Update the 1997 Guidelines for the Clinical Application of Echocardiography). *J Am Coll Cardiol* 2003;42(5):954-70.
25. Widimsky P, Gregor P, Cervenka V, Visek V. [Significance of 2-dimensional and Doppler echocardiography in the diagnosis of complications in myocardial infarct]. *Vnitr Lek* 1984;30(1):1-12.
26. Campos AM, da Cunha AB. Dobutamine stress echocardiography as a predictor of coronary lesion severity on coronary angiography. *Rev Port Cardiol* 2007;26(5):505-18.
27. Wei K. Assessment of myocardial viability using myocardial contrast echocardiography. *Echocardiography* 2005;22(1):85-94.
28. Iskandrian AS, Heo J, Schelbert HR. Myocardial viability: methods of assessment and clinical relevance. *Am Heart J* 1996;132(6):1226-35.
29. Lapeyre AC, 3rd, Klodas E, Rogers PJ, Sinak LJ, Hammell TC, O'Connor MK, et al. Quantitation of regional ejection fractions using gated tomographic imaging with <sup>99m</sup>Tc-sestamibi. *Chest* 2005;127(3):778-86.
30. Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feigenbaum H, et al. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. American Society of Echocardiography Committee on Standards, Subcommittee on Quantitation of Two-Dimensional Echocardiograms. *J Am Soc Echocardiogr* 1989;2(5):358-67.

31. Jenkinson C. Quality of life measurement: does it have a place in routine clinical assessment? *J Psychosom Res* 1994;38(5):377-81.
32. Fitzpatrick R, Jenkinson C, Peto V, Hyman N, Greenhall R. Desirable properties for instruments assessing quality of life: evidence from the PDQ-39. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997;62(1):104.
33. Jenkinson C. Death by questionnaire: quality of life measurement could seriously damage your health. *J Health Serv Res Policy* 1999;4(3):129-30.
34. Van de Werf F, Bax J, Betriu A, Blomstrom-Lundqvist C, Crea F, Falk V, et al. Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: the Task Force on the Management of ST-Segment Elevation Acute Myocardial Infarction of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2008;29(23):2909-45.
35. Janssens S. Stem cell therapy in acute myocardial infarction. *Acta Clin Belg* 2007;62(5):342-7.
36. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355(12):1210-21.
37. Strauer BE, Brehm M, Schannwell CM. The therapeutic potential of stem cells in heart disease. *Cell Prolif* 2008;41 Suppl 1:126-45.
38. Assmus B, Walter DH, Lehmann R, Honold J, Martin H, Dimmeler S, et al. Intracoronary infusion of progenitor cells is not associated with aggravated restenosis development or atherosclerotic disease progression in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27(24):2989-95.
39. Bartunek J, Vanderheyden M, Wijns W, Timmermans F, Vandekerkhove B, Villa A, et al. Bone-marrow-derived cells for cardiac stem cell therapy: safe or still under scrutiny? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4 Suppl 1:S100-5.
40. Brehm M, Strauer BE. Stem cell therapy in postinfarction chronic coronary heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 Suppl 1:S101-4.
41. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ, Stanworth SJ, Mathur A, Watt SM. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008;29(15):1807-18.
42. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106(24):3009-17.
43. Perin EC, Silva GV. Stem cell therapy for cardiac diseases. *Curr Opin Hematol* 2004;11(6):399-403.
44. Hashemi SM, Ghods S, Kolodgie FD, Parcham-Azad K, Keane M, Hamamdizic D, et al. A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29(2):251-9.
45. Mendonca ML, Freitas GR, Silva SA, Manfrim A, Falcao CH, Gonzales C, et al. [Safety of intra-arterial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation for acute ischemic stroke]. *Arq Bras Cardiol* 2006;86(1):52-5.
46. Assmus B, Schachinger V, Zeiher AM. [Regenerative therapy in cardiology: how distant is it from reality?]. *Internist (Berl)* 2006;47(11):1177-82.
47. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004;363(9411):751-6.

48. Mansour S, Vanderheyden M, De Bruyne B, Vandekerckhove B, Delrue L, Van Haute I, et al. Intracoronary delivery of hematopoietic bone marrow stem cells and luminal loss of the infarct-related artery in patients with recent myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(8):1727-30.
49. Bartunek J, Dimmeler S, Drexler H, Fernandez-Aviles F, Galinanes M, Janssens S, et al. The consensus of the task force of the European Society of Cardiology concerning the clinical investigation of the use of autologous adult stem cells for repair of the heart. *Eur Heart J* 2006;27(11):1338-40.
50. Schachinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, et al. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol* 2006;95(1):13-22.
51. Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornacek I, Hlinomaz O, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006;152(5):975 e9-15.
52. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006;113(10):1287-94.
53. Chen S, Liu Z, Tian N, Zhang J, Yei F, Duan B, et al. Intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells for ischemic cardiomyopathy due to isolated chronic occluded left anterior descending artery. *J Invasive Cardiol* 2006;18(11):552-6.
54. Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res* 2005;97(8):756-62.
55. Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. [Stem cells after myocardial infarction]. *Herz* 2006;31(2):127-36; quiz 142-3.
56. Kang HJ, Kim YS, Koo BK, Park KW, Lee HY, Sohn DW, et al. Effects of Stem Cell Therapy with G-CSF on Coronary Artery after Drug-Eluting Stent Implantation in Patients with Acute Myocardial Infarction. *Heart* 2007.
57. Karpov RS, Popov SV, Markov VA, Suslova TE, Ryabov VV, Poponina YS, et al. Autologous mononuclear bone marrow cells during reparative regeneration after acute myocardial infarction. *Bull Exp Biol Med* 2005;140(5):640-3.
58. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006;367(9505):113-21.
59. Ruan W, Pan CZ, Huang GQ, Li YL, Ge JB, Shu XH. Assessment of left ventricular segmental function after autologous bone marrow stem cells transplantation in patients with acute myocardial infarction by tissue tracking and strain imaging. *Chin Med J (Engl)* 2005;118(14):1175-81.
60. Li ZQ, Zhang M, Jin YZ, Zhang WW, Liu Y, Yuan L, et al. [Safety and efficacy of intracoronary transplantation of G-CSF mobilized autologous peripheral blood stem cells in patients with acute myocardial infarction]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi* 2006;34(2):99-102.
61. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Forfang K. Autologous stem cell transplantation in acute myocardial infarction: The ASTAMI randomized

- controlled trial. Intracoronary transplantation of autologous mononuclear bone marrow cells, study design and safety aspects. *Scand Cardiovasc J* 2005;39(3):150-8.
62. Abdel-Latif A, Bolli R, Tleyjeh IM, Montori VM, Perin EC, Hornung CA, et al. Adult bone marrow-derived cells for cardiac repair: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 2007;167(10):989-97.
  63. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2007;50(18):1761-7.
  64. Kawachi Y, Watanabe A, Uchida T, Yoshizawa K, Kurooka N, Setsu K. Acute arterial thrombosis due to platelet aggregation in a patient receiving granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 1996;94(2):413-6.
  65. Kuethe F, Krack A, Fritzenwanger M, Herzau M, Opfermann T, Pachmann K, et al. Treatment with granulocyte-colony stimulating factor in patients with acute myocardial infarction. Evidence for a stimulation of neovascularization and improvement of myocardial perfusion. *Pharmazie* 2006;61(11):957-61.
  66. Kurdi M, Booz GW. G-CSF-based stem cell therapy for the heart-unresolved issues part A: paracrine actions, mobilization, and delivery. *Congest Heart Fail* 2007;13(4):221-7.
  67. Li Y, Fukuda N, Yokoyama S, Kusumi Y, Hagikura K, Kawano T, et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling and arterial hyperplasia in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;549(1-3):98-106.
  68. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells* 2005;23(3):355-64.
  69. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, Shou M, Pierre A, Tio FO, et al. Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2001;37(6):1726-32.
  70. Yin CQ, Chen JL, Wang YF, Cao F, Cheng R, Pei XT. [Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells intracoronary delivery after acute myocardial infarction in miniature pig]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 2005;27(6):696-9.
  71. Badorff C, Brandes RP, Popp R, Rupp S, Urbich C, Aicher A, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003;107(7):1024-32.
  72. Tse HF, Yiu KH, Lau CP. Bone marrow stem cell therapy for myocardial angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 2007;5(2):103-12.
  73. Orlic D. Stem cell repair in ischemic heart disease: an experimental model. *Int J Hematol* 2002;76 Suppl 1:144-5.
  74. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114(6):763-76.
  75. Tomita S, Mickle DA, Weisel RD, Jia ZQ, Tumiaty LC, Allidina Y, et al. Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;123(6):1132-40.
  76. Moelker AD, Baks T, van den Bos EJ, van Geuns RJ, de Feyter PJ, Duncker DJ, et al. Reduction in infarct size, but no functional improvement after bone marrow cell administration in a porcine model of reperfused myocardial infarction. *Eur Heart J* 2006;27(24):3057-64.

77. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tio RA, van der Giessen WJ, Marques KM, et al. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction treated with primary PCI: Pilot study of the multicenter HEBE trial. *Catheter Cardiovasc Interv* 2008;71(3):273-81.
78. Charwat S, Gyongyosi M, Lang I, Graf S, Beran G, Hemetsberger R, et al. Role of adult bone marrow stem cells in the repair of ischemic myocardium: current state of the art. *Exp Hematol* 2008;36(6):672-80.
79. Yousef M, Schannwell CM, Kosterling M, Zeus T, Brehm M, Strauer BE. The BALANCE Study: clinical benefit and long-term outcome after intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;53(24):2262-9.
80. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Pirr J, Rager U, Lippolt P, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 2009;30(24):2978-84.
81. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364(9429):141-8.
82. Sutton MSJ, Pfeffer MA, Moye L, Plappert T, Rouleau JL, Lamas G, et al. Cardiovascular Death and Left Ventricular Remodeling Two Years After Myocardial Infarction : Baseline Predictors and Impact of Long-term Use of Captopril: Information From the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) Trial. *Circulation* 1997;96(10):3294-3299.
83. Sutton MGSJ, Sharpe N. Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction : Pathophysiology and Therapy. *Circulation* 2000;101(25):2981-2988.
84. Sheiban I, Fragasso G, Rosano GM, Dharmadhikari A, Tzifos V, Pagnotta P, et al. Time course and determinants of left ventricular function recovery after primary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2001;38(2):464-71.
85. Giannuzzi P, Temporelli PL, Bosimini E, Gentile F, Lucci D, Maggioni AP, et al. Heterogeneity of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico-3 Echo Substudy. *Am Heart J* 2001;141(1):131-8.
86. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur Heart J* 2006;27(23):2775-83.
87. Kang HJ, Lee HY, Na SH, Chang SA, Park KW, Kim HK, et al. Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial. *Circulation* 2006;114(1 Suppl):I145-51.
88. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74(1):86-107.
89. Killip T, 3rd, Kimball JT. Treatment of myocardial infarction in a coronary care unit. A two year experience with 250 patients. *Am J Cardiol* 1967;20(4):457-64.
90. Pozzoli M, Capomolla S, Sanarico M, Pinna G, Cobelli F, Tavazzi L. Doppler evaluations of left ventricular diastolic filling and pulmonary wedge pressure provide similar prognostic information in patients with systolic dysfunction after myocardial infarction. *Am Heart J* 1995;129(4):716-25.

91. Garcia-Rubira JC, Garcia-Martinez JT, Hidalgo R, Gomez-Barrado JJ, Rodriguez Revuelta M, Rodriguez Banos J, et al. Doppler transmitral flow pattern is an independent prognostic factor in acute myocardial infarction. *Cardiology* 1997;88(2):203-6.
92. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, He H, Rezvani M, Ingwall JS, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9(9):1195-201.
93. Mathur A, Martin JF. Stem cells and repair of the heart. *Lancet* 2004;364(9429):183-92.
94. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005;96(2):151-63.
95. Limbourg FP, Drexler H. Bone marrow stem cells for myocardial infarction: effector or mediator? *Circ Res* 2005;96(1):6-8.
96. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, Sousa AL, Martin BJ, Vela D, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005;111(2):150-6.
97. Schaefer A, Meyer GP, Fuchs M, Klein G, Kaplan M, Wollert KC, et al. Impact of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: results from the BOOST trial. *Eur Heart J* 2006;27(8):929-35.
98. Solomon SD, Glynn RJ, Greaves S, Ajani U, Rouleau JL, Menapace F, et al. Recovery of ventricular function after myocardial infarction in the reperfusion era: the healing and early afterload reducing therapy study. *Ann Intern Med* 2001;134(6):451-8.
99. Hole T, Vegsundvag JA, Morstol TH, Skaerpe T. Early changes in left ventricular volume and function are predictors for long-term remodeling in patients with acute transmural myocardial infarction and preserved systolic function. *J Am Soc Echocardiogr* 2003;16(6):630-7.
100. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428(6983):668-73.
101. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004;428(6983):664-8.
102. Penicka M, Widimsky P, Kobylka P, Kozak T, Lang O. Images in cardiovascular medicine. Early tissue distribution of bone marrow mononuclear cells after transcatheter transplantation in a patient with acute myocardial infarction. *Circulation* 2005;112(4):e63-5.
103. Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T, Brinkmann E, Fischer P, Meyer GP, et al. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J* 2008;29(23):2851-8.
104. Boyle AJ, Whitbourn R, Schlicht S, Krum H, Kocher A, Nandurkar H, et al. Intracoronary high-dose CD34+ stem cells in patients with chronic ischemic heart disease: a 12-month follow-up. *Int J Cardiol* 2006;109(1):21-7.



## 10 Seznam publikací autora

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

- **Hana Skalicka**, MD, Jan Horak, MD, PhD, Petr Kobyłka, MD†, PhD, Tomas Palecek, MD; Ales Linhart, MD, PhD; Michael Aschermann, MD, PhD, Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: A 24-month follow up study, **přijato do BMJ, IF 0,317**

- Penicka M, Horak J, Kobyłka P, Pytlik R, Kozak T, Belohlavek O, Lang O, **Skalicka H**, Simek S, Palecek T, Linhart A, Aschermann M, Widimsky P. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: a prematurely terminated randomized study. J Am Coll Cardiol. 2007 Jun 19; 49(24): 2373-4, **IF 9,2**

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

- **Skalická H Jr**, Horák J, Aschermann M, Linhart A, Palecek T, Kobyłka P. [Myocardial infarction, left ventricle remodeling and cellular therapy]. Vnitr Lek. 2009 Jan; 55(1): 37-44.

- **Skalická H jr.**, Horák J, Aschermann M, Linhart A, Kobyłka P. Intrakoronární aplikace kmenových buněk u nemocných s akutním infarktem myokardu, dosavadní klinické zkušenosti a perspektiva. Cor Vasa 2009; 51(7–8): 513–519.

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

- Hubacek JA, Stanek V, Gebauerová M, Pilipincová A, Dlouhá D, Poledne R, Aschermann M, **Skalická H**, Matousková J, Kruger A, Penicka M, Hrabáková H, Veselka J, Hájek P, Lánská V, Adámková V, Pitha J. A FTO variant and risk of acute coronary syndrome. Clin Chim Acta. 2010 Aug 5; 411(15-16): 1069-72, **IF 2,535**

- Hubáček JA, Poledne R, Pitha J, Aschermann M, **Skalická H**, Stanek V. Apolipoprotein E Arg136 --> Cys in individuals with premature myocardial infarction. Folia Biol (Praha). 2009; 55(3): 116-8, **IF 0,924**

- Kovarnik T, Mintz GS, Karetova D, Horak J, Bultas J, Skulec R, **Skalicka H**, Aschermann M, Elleder M, Linhart A. Intravascular ultrasound assessment of coronary artery involvement in Fabry disease. *J Inherit Metab Dis.* 2008 Dec; 31(6): 753-60, **IF 2,691**

- Widimsky P, Motovská Z, Simek S, Kala P, Pudil R, Holm F, Petr R, Bílková D, **Skalická H**, Kuchynka P, Poloczek M, Miklík R, Maly M, Aschermann M; PRAGUE-8 Trial Investigators. Clopidogrel pre-treatment in stable angina: for all patients > 6 h before elective coronary angiography or only for angiographically selected patients a few minutes before PCI? A randomized multicentre trial PRAGUE-8. *Eur Heart J.* 2008 Jun; 29(12): 1495-503, **IF 7.924**

#### **10.4 Publikace bez IF in extenso, bez vztahu k tématu dizertační práce**

- Skulec R, Cermak O, **Skalicka H**, Kolar J. Variability of aortic blood flow predicts fluid responsiveness in spontaneously breathing healthy volunteers. *Kardiol Pol.* 2009 Mar; 67(3): 265-71.

- **H. Skalická**, P. Jansa, T. Paleček, D. Ambrož, M. Aschermann, A. Linhart, Levostranný pleurální výpotek u nemocného s plicní arteriální hypertenzí – diferenciální diagnostika, *Stud. Pneumol.Phthiseol* 2008; 68: 143-146

- Bani Hani A, **Skalická H**, Karetová D, Šimek S, Havránek Š, Aschermann M, Linhart A Takayasu's arteritis *Cor Vasa* 2008; 50(3): 117-122

#### **10.5 Abstrakta**

- H. Skalicka, J. Horak, M. Aschermann, M. Penicka, J. Kobylka. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction: 24 month follow up. *Euroecho* 2009; 491, 61

- H. Skalicka, J. Horak, M. Penicka, P. Kobylka, R. Pytlik, M. Aschermann, A. Linhart, P. Widimsky. Echocardiography assessments of left ventricular function and remodeling after intracoronary bone marrow mononuclear cell implantation in patients with a large anterior myocardial infarction. *Euroecho* 2009; 480

- H. Skalická, J. Horák, A. Linhart, M. Aschermann, M. Pěnička, P. Kobylka, T. Paleček. Hodnocení efektivity a bezpečnosti intrakoronární aplikace mononukleárních buněk kostní dřeně u pacientů s

anteroextenzivním infarktem myokardu s dysfunkcí levé komory. Výsledky dvouletého sledování, 16. výroční sjezd České kardiologické společnosti, 2008; Brno, 30-31.

- Jan Horák, Martin Pěnička, Michael Aschermann, Aleš Linhart, Hana Skalická, Petr Widimský, Effectivity And Safety Of Intracoronary Autologous Bone Marrow Stem Cell Transplantation In Large Anterior Myocardial Infarction – A Randomized Study, ACC, 2007

- R Skulec, J Belohlavek, A Linhart, O Cermak, T Kovarnik, H Skalicka, J Kolar and M Aschermann. Respiratory variability of aortic blood velocity: predictor of preload responsiveness in healthy spontaneously breathing volunteers, Critical Care 2005; 9 Suppl 1: P54: 10.1186/cc3117

- Kovárník, Tomáš; Horák, Jan; Skalická, Hana; Dostál, Ondřej; Aschermann, Michael; Linhart, Aleš: Studie HEAVEN (Virtual Histology Evaluation of Atherosclerosis Regression During Atorvastatin and Ezetimibe Administration). První výsledky. 16. výroční sjezd České kardiologické společnosti, 2008; Brno, 30-31.

- S. Simek, P. Kuchynka, J. Horak, V. Danzig , V. Mrazek, J. Vojacek, L. Golan, H. Skalicka, A. Linhart. Why do the patients with myocardial infarction due to the left circumflex artery occlusion not receive reperfusion therapy? European Heart Journal 2007; 28: Abstract Supplement, 827

- S. Simek, P. Widimsky, Z. Motovska, P. Kala, R. Pudil , H. Skalicka, P. Kuchynka, R. Petr , F. Holm, M. Aschermann . Women undergoing coronary angiography have increased risk of bleeding compared to men European Heart Journal 2009; 30: Abstract Supplement, 530

