

Regeneracja serca

Katarzyna Kozar-Kamińska

Klinika Niewydolności Serca i Transplantologii, Instytut Kardiologii, Warszawa, Polska

Postępowanie Kardiologiczne 2012; 8, 4 (30): 308–314

DOI: 10.5114/pwki.2012.31911

Streszczenie

Niewydolność serca jest główną przyczyną zgonów na świecie i najczęstszym powodem hospitalizacji pacjentów po 65. roku życia. Współczesna terapia niewydolności serca opóźnia postęp choroby, ale nie zmniejsza całkowitej śmiertelności, która wynosi nawet 20% rocznie. Bez względu na etiologię niewydolności serca: ostry zawał serca, przewlekły stres związany z chorobą czy starzenie, u podłoża problemu leży postępująca utrata kardiomiocytów i zmniejszony rzut serca. Od ponad 10 lat podejmowane są próby regeneracji uszkodzonego mięśnia serca za pomocą terapii komórkowej. W doświadczeniach laboratoryjnych na zwierzętach oraz badaniach klinicznych I generacji wykorzystano w tym celu wiele różnych typów komórek, m.in.: mioblasty szkieletowe, komórki jednojądrzaste szpiku kostnego i krwi obwodowej, progenitory endotelialne, kardiomiocyty płodowe, komórki mezenchymalne, zarodkowe komórki macierzyste, indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste oraz komórki macierzyste serca. Wyniki obserwacji wskazują, że zastosowanie komórek macierzystych w leczeniu schyłkowych postaci niewydolności serca może poprawić mechaniczną funkcję serca. Ostatnio wykazano, że serce nie jest narządem ostatecznie zróżnicowanym, a obecne w tkance komórki macierzyste mogą być wykorzystane w celu regeneracji kardiomiocytów, komórek mięśni gładkich i komórek śródbłonna naczyniowego. W niniejszym artykule podsumowano pokrótce wyniki badań klinicznych I generacji oraz omówiono perspektywy rozwoju terapii regeneracyjnej w najbliższej przyszłości, ze szczególnym uwzględnieniem nowych populacji komórek macierzystych.

Słowa kluczowe: regeneracja serca, komórki macierzyste, komórki pluripotencjalne

Wprowadzenie

Przewlekła niewydolność serca jest najczęściej wynikiem utraty kardiomiocytów i w konsekwencji niekorzystnego remodelingu mięśnia serca. Pomimo znacznego postępu w terapii, niewydolność serca jest główną przyczyną hospitalizacji wśród pacjentów po 65. roku życia. Zastosowanie leków o udowodnionym efekcie terapeutycznym, takich jak β -adrenolityki, inhibitory konwertyazy angiotensyny oraz leki moczopędne z grupy antagonistów aldosteronu znacznie wydłużyło przeżycie pacjentów z niewydolnością serca. Jednak nawet idealnie dobrana farmakoterapia nie zapobiega śmiertelności z powodu choroby serca, która wynosi do 20% na rok [1]. Zaawansowane techniki leczenia niewydolności serca, takie jak ortotopowy przeszczep serca, mechaniczne urządzenia wspomagające pracę lewej komory czy sztuczne serce, nie są powszechnie dostępne, a ich użycie jest ograniczone do nielicznej grupy chorych.

Duży nacisk kładzie się w związku z tym na poszukiwanie nowych, doskonalszych metod leczenia pozwalających na poprawę bądź nawet przywrócenie mechanicz-

nej funkcji serca, szczególnie u pacjentów w zaawansowanych stadiach choroby, niekwalifikowanych do leczenia zabiegowego. W ostatniej dekadzie zainteresowanie naukowców i lekarzy wzbudziła koncepcja zdolności kardiomiocytów do odnowy z populacji komórek macierzystych. Warto podkreślić, że obecnie w żadnej innej dziedzinie medycyny terapia regeneracyjna nie rozwija się tak prężnie jak w kardiologii.

W doświadczeniach eksperymentalnych na zwierzętach oraz próbach klinicznych I generacji wykorzystano dotychczas wiele różnych typów komórek. Należą do nich: zarodkowe komórki macierzyste (*embryonic stem cells* – ESC) [2], indukowane pluripotencjalne komórki macierzyste (*induced pluripotent stem cells* – iPSC) [3], kardiomiocyty płodowe [4], mioblasty (*skeletal myoblasts* – SKM) [5], komórki jednojądrzaste szpiku kostnego i krwi obwodowej (*bone marrow mononuclear cells* – BMMNC, *peripheral blood mononuclear cells* – PBMNC) [6], komórki mezenchymalne (*mesenchymal stem cells* – MSC), progenitory endotelialne (*endothelial progenitor cells* – EPC) [7] oraz komórki macierzyste serca (*cardiac stem cells* – CSC) [8].

Adres do korespondencji:

dr n. med. Katarzyna Kozar-Kamińska, Klinika Niewydolności Serca i Transplantologii, Instytut Kardiologii, ul. Alpejska 42, 04-628 Warszawa, Polska, tel.: +48 22 343 44 84, e-mail: kkozar@ikard.pl

Praca wpłynęła: 2.11.2012, przyjęta do druku: 5.11.2012.

Poszukiwania idealnego leku dla chorych z ostrą i przewlekłą niewydolnością serca ciągle trwają, a w kontekście terapii komórkowej ich celem jest zdefiniowanie populacji, która:

- 1) jest bezpieczna dla pacjenta, tzn. nie stanowi ryzyka powstania nowotworu ani nie zwiększa częstości występowania arytmii,
- 2) jest skuteczna, tzn. poprawia mechaniczną pracę serca poprzez wytworzenie nowego, zdrowego mięśnia serca i naczyń krwionośnych, które funkcjonalnie integrują się z tkankami pacjenta,
- 3) jest dostępna jako wystandaryzowany produkt i stosunkowo niedroga,
- 4) może być stosowana w klinice przy użyciu metod małoinwazyjnych,
- 5) jest tolerowana przez układ immunologiczny pacjenta,
- 6) nie rodzi wątpliwości natury prawno-etycznej.

W artykule zostaną pokrótce podsumowane wyniki badań klinicznych I generacji oraz omówione perspektywy rozwoju terapii regeneracyjnej w najbliższej przyszłości.

Endogenne mechanizmy regeneracji w sercu

Od dawna wiadomo, że serce człowieka ma niewielki potencjał odtwórczy w porównaniu z innymi tkankami i narządami, takimi jak: wątroba, mięsień szkieletowy, jelito, kość czy skóra. Oszacowano, że lewa komora serca zbudowana jest z około 2–4 bilionów kardiomiocytów [9]. Fizjologiczne starzenie się organizmu wiąże się z naturalnym obumieraniem komórek mięśnia serca. W zdrowym narządzie zakłada się utratę około 1 g miokardium (tj. około 20 milionów kardiomiocytów) w ciągu roku [10]. Zawał serca w kilka godzin może zniszczyć nawet 25% mięśnia. Choroby przewlekłe układu krążenia, w tym nadciśnienie tętnicze oraz wady zastawkowe serca, powodują stopniową, lecz systematyczną utratę kardiomiocytów [11]. Większość komórek mięśnia sercowego dorosłego człowieka jest jednojądrzasta i poliploidalna [12]. Wydaje się, że zachowują one zdolność do proliferacji przez kilka pierwszych miesięcy życia. Ostatnie cykle syntezy DNA przebiegają zazwyczaj bez podziału jądra komórkowego oraz cytoplazmy. Powstają wówczas komórki jednojądrzaste, o zwielokrotnionej zawartości DNA ($4n$ i więcej) [13]. Po okresie proliferacji kardiomiocyty wchodzi w fazę fizjologicznego wzrostu i zwiększają swoją objętość nawet 30–40-krotnie. W odpowiedzi na patologiczne obciążenie, np. w nadciśnieniu tętniczym, wadach zastawkowych serca czy po zawale serca, kardiomiocyty ponownie inicjują syntezę DNA, ale ostatecznie nie dochodzi do podziału jądra komórkowego i cytokinezy [14]. To dodatkowo zwiększa ploidię komórek serca, nawet do $64n$. Zjawisko to znacząco utrudnia interpretację badań, które zmierzają do oszacowania zdolności proliferacyjnych miokardium u człowieka. Wyniki takich obliczeń zostały opublikowane w 2009 roku w prestiżowym czasopiśmie *Lancet* [15].

Bergmann i wsp. wykorzystali w eksperymencie fakt uwolnienia do atmosfery radioaktywnego węgla (^{14}C)

w okresie zimnej wojny, a następnie gwałtowne zmniejszenie jego zawartości po wejściu w życie Traktatu o Zakazie Prób Broni Nuklearnej w 1963 roku. ^{14}C został włączony do łańcucha pokarmowego, a poprzez korelowanie jego stężenia w powietrzu i ilości wbudowanej do DNA komórek oszacowano wiek kardiomiocytów. Wykazano, że zdolności regeneracyjne tych komórek zależą od wieku osobniczego. Około 1% nowych kardiomiocytów powstaje rokrocznie u człowieka w wieku 20 lat, ten odsetek zmniejsza się natomiast do 0,4% w wieku 75 lat. Znaczy to, że około 45% komórek mięśnia serca odnawia się w ciągu życia człowieka. Choć ten endogeny mechanizm regeneracji kardiomiocytów kompensuje na bieżąco fizjologiczną utratę komórek, to jest niewątpliwie mało wydajny i niewystarczający, żeby uzupełnić straty powstałe w przebiegu np. zawału serca.

Mioblasty szkieletowe

Już od ponad 10 lat podejmowane są próby wzmocnienia potencjału regeneracyjnego serca. Działania naprawcze koncentrują się z jednej strony na aktywacji mechanizmów endogennych, poprzez dostarczanie w okolice miejsca uszkodzenia sygnałów sprzyjających proliferacji i neoangiogenezie, działających antyapoptotycznie i przeciwoksydacyjnie, z drugiej natomiast – na zwiększeniu bezwzględnej liczby komórek prekursorowych kardiomiocytów w strefie zagrożenia.

Pierwsze w terapii regeneracyjnej serca użyte zostały mioblasty szkieletowe ze względu na ich właściwości kurczliwe, możliwość pobrania do zabiegów autologicznych i znaczną odporność na niedokrwienie. W 2000 roku Menasche zastosował mioblasty szkieletowe u pacjentów z chorobą niedokrwinną serca poddawanych rewaskularyzacji chirurgicznej [16]. W kilkumiesięcznej obserwacji udało się wykazać poprawę żywotności i kurczliwości w obrębie przeszczepionej tkanki, ocenianą za pomocą badania echokardiograficznego i pozytonowej tomografii emisyjnej. Jednocześnie w tym i kolejnych badaniach obserwowano zwiększenie częstości występowania utrwalonych arytmii komorowych, zwłaszcza we wczesnym okresie pooperacyjnym [17]. Wiadomo już, że mioblasty nie integrują się elektrycznie z otaczającymi tkankami, w ich błonie komórkowej brak jest bowiem białka, koneksyny 43, która stanowi strukturalną część połączeń międzykomórkowych o typie *gap junction*. W związku z tym przeszczepione mioblasty stanowią przeszkodę dla rozprzestrzeniania się potencjału aktywacyjnego w mięśniu i sprzyjają powstawaniu arytmii w mechanizmie fali nawrotnej [18]. Po transplantacji do tkanki serca mioblasty szkieletowe przekształcają się w wielojądrzaste miotuby, a nie kardiomiocyty.

Prowadzone są obecnie badania przedkliniczne z wykorzystaniem populacji komórek macierzystych izolowanych ze ściany naczyń krwionośnych mięśni szkieletowych, tzw. komórek mioendotelialnych, o proponowanym potencjalnie do różnicowania się w kierunku kardiomiocytów

i komórek śródbłonka. One jednak również nie wykazują ekspresji koneksyny 43, należy więc oczekiwać powikłań w postaci zaburzeń rytmu serca [18].

Komórki macierzyste szpiku kostnego

Mniej więcej równoległe z pracą Menasche ukazało się pierwsze doniesienie o zastosowaniu komórek macierzystych szpiku kostnego w terapii regeneracyjnej serca [19]. Koncepcja wykorzystania szpiku kostnego wyływała z wieloletniego doświadczenia klinicznego z zabiegami transplantacji oraz stosunkowo łatwego dostępu do dużej ilości komórek autologicznych. Szpik kostny zawiera co najmniej kilka populacji komórek macierzystych, a wśród nich właściwe komórki krwiotwórcze (*hematopoietic stem cells* – HSC) [20], MSC [21] i prekursorzy śródbłonka (EPC) [22]. Do użytku klinicznego najczęściej stosuje się frakcję tzw. komórek jednojądrzastych szpiku kostnego (BMMNC). Jest to populacja bardzo heterogenna, której większość stanowią komórki wszystkich linii układu krwiotwórczego na różnych etapach dojrzewania. Właściwych komórek macierzystych jest wśród nich stosunkowo niewiele, ich ilość szacuje się na około 2–4% HSC/EPC oraz około 0,01% MSC [23]. W terapii wykorzystuje się zarówno nieselekcjonowaną populację BMMNC, jak i komórki wzbogacone we frakcje progenitorowe. Dotąd znalazły zastosowanie przede wszystkim u pacjentów w ostrym zawałe serca, w mniejszym stopniu również w leczeniu odpornej dławicy piersiowej oraz przewlekłej niewydolności serca [24–26]. Nie udało się niestety bezspornie wykazać, że w warunkach *in vivo* komórki krwiotwórcze mają zdolność do przekształcania się w kardiomiocyty [26]. Efekt ich działania przypisuje się raczej mechanizmom parakrynnym (poprzez wydzielane cytokiny i czynniki wzrostu) oraz bezpośredniej cytoprotekcji (poprzez oddziaływania międzykomórkowe i cząsteczki adhezyjne) [9]. Analiza zgromadzonych wyników pozwala na wyciągnięcie kilku wniosków:

1. Dowieńcowe podanie komórek szpiku kostnego jest bezpieczne i stosunkowo proste do wykonania.
2. Odnotowuje się umiarkowaną poprawę kliniczną w związku z zastosowaną terapią, chociaż nie zawsze osiągnięte są punkty końcowe badania; wątpliwości budzi też trwałość efektu takiego leczenia.
3. Dotychczas terapią objęci byli przede wszystkim chorzy przyjmowani do szpitala z powodu pierwszego w życiu zawału serca, poddawani zabiegowi pierwotnej angioplastyki, z niewielkim deficytem kurczliwości mięśnia lewej komory (EF około 50%), u których trudno wykazać istotną poprawę po leczeniu.

Interesującą populacją wśród BMMNC są komórki mezenchymalne (komórki zrębowe szpiku) [28]. Nie wykazują one bowiem ekspresji cząsteczek głównego układu zgodności tkankowej typu II (HLA DR, DQ, DP) oraz cząsteczek adhezyjnych, są więc niskoimmunogenne. Potencjalnie mogą być źródłem do wykorzystania w terapii allogenicznej. Ma to znaczenie, tym bardziej że wraz ze

starzeniem się organizmu oraz w przebiegu zaawansowanej niewydolności krążenia znacząco obniża się jakość i potencjał regeneracyjny komórek krwiotwórczych. Zastosowanie wobec tego wystandaryzowanych, allogenicznych komórek mezenchymalnych może pomóc w ujednoczeniu efektów terapii. Komórki mezenchymalne stosunkowo łatwo mogą być namnażane w warunkach *in vitro*, są odporne na działanie czynników uszkadzających DNA i zachowują integralność materiału genetycznego nawet przez kilka miesięcy hodowli. Warto wspomnieć, że najbardziej spektakularny opisany dotąd efekt terapii regeneracyjnej dotyczył właśnie pacjentów z ostrym zawałem serca, którzy w trakcie angioplastyki otrzymali komórki mezenchymalne. U tych chorych zaobserwowano poprawę frakcji wyrzutowej lewej komory serca o 14% [29]. Komórki mezenchymalne ze względu na właściwości wydają się atrakcyjnym przedmiotem badań również z punktu widzenia przemysłu farmaceutycznego.

Komórki macierzyste serca

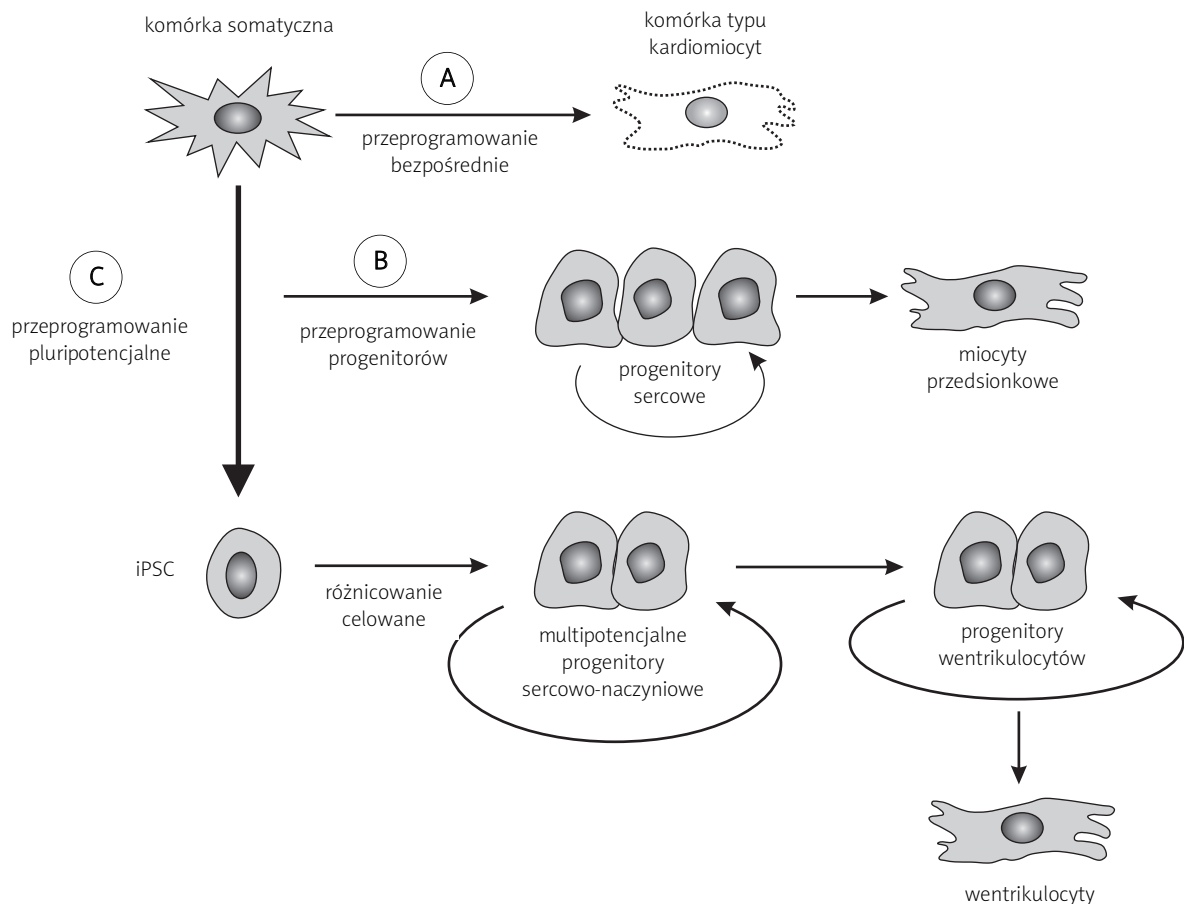
Poszukiwania naturalnych prekursorów dla kardiomiocytów doprowadziły na początku tego wieku do odkrycia i zdefiniowania endogennych CSC [30]. Wiadomo, że komórki te mają zdolność do samoodnowy, proliferacji klonalnej oraz różnicowania w kierunku komórek mięśnia serca, mięśni gładkich i śródbłonka. Komórki macierzyste serca zlokalizowane są w sercu w obrębie tzw. niszy, czyli skupisk komórek macierzystych i zrębowych, co umożliwiałoby wzajemne interakcje i oddziaływanie ze strukturami macierzy zewnątrzkomórkowej. W 2004 roku Messina pierwszy wyizolował CSC z fragmentów miokardium pobieranych od chorych w trakcie zabiegów kardiokirurgicznych [31]. Komórki te utrzymywano w hodowli w warunkach *in vitro* w postaci sferycznych konglomeratów komórkowych, zwanych kardiosferami (*cardiospheres* – CSp). Mimo zachęcających wyników uzyskanych w doświadczeniach na zwierzętach, kardiosfery nie znalazły zastosowania w badaniach klinicznych ze względu na znaczne rozmiary ich cząsteczek (50–200 μm). Rutynowe podawanie cząsteczek tej wielkości poprzez naczynia wieńcowe mogło się okazać mało bezpieczne. W związku z tym 3 lata później grupa Marbana zmodyfikowała protokół izolacji i opracowała metodę pozyskiwania zawiesiny pojedynczych komórek progenitorowych z kardiosfer (*cardiosphere-derived cells* – CDC) [32]. Materiałem wyjściowym do izolacji były biopsje endomiokardialne pobierane od pacjenta drogą przezskórną. Komórki uzyskane w trakcie hodowli *in vitro* można namnażać w celu przygotowania odpowiedniej ich ilości (dziesiątki milionów) do zastosowania w praktyce klinicznej. Cała procedura zajmuje około 4–6 tygodni, pomimo niewielkiej wyjściowej ilości materiału. Komórki CDC to morfologicznie heterogenna populacja, bogata zarówno w komórki macierzyste, jak i zrębowe serca. W ponad 1000 eksperymentach wykonanych dotąd na zwierzętach nie obserwowano działania proarytmicznego ani nowotworów

w związku z podaniem CDC. Rozpoczęła się faza I/II badań klinicznych pod nazwą CADUCEUS (*Cardiosphere-Derived autologous stem Cells to reverse ventricular dysfunction*) [33]. Do badania włączono pacjentów po przebytych zawałach serca, z uszkodzoną kurczliwością lewej komory i EF około 25–45%. Chorzy otrzymali autologiczne komórki 2–3 miesiące po epizodzie niedokrwienia. W rocznej obserwacji odnotowano zmniejszenie obszaru blizny pozawałowej oraz poprawę kurczliwości i wzrost masy żywego mięśnia w porównaniu z grupą kontrolną leczoną w tradycyjny sposób. Kolejne badanie I fazy w trakcie realizacji (*SCIPPIO trial – Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic cardiomyopathy*) potwierdziło bezpieczeństwo dowieńcowego podawania komórek macierzystych izolowanych z serca [34].

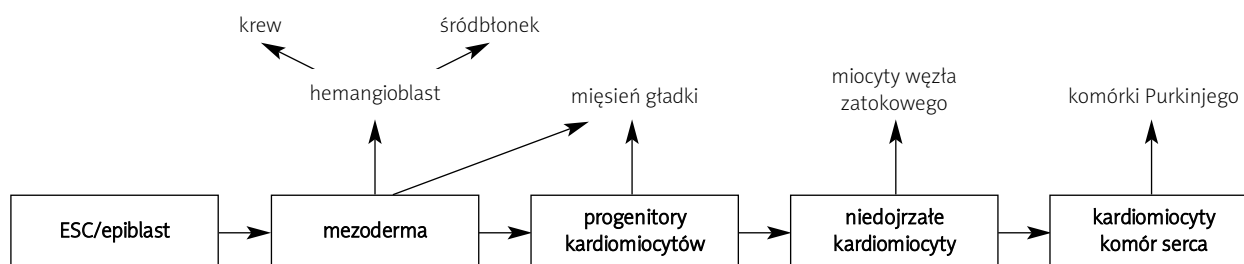
Pluripotencjalne komórki macierzyste

Komórki macierzyste można ogólnie scharakteryzować i podzielić na podstawie ich potencjału do odnowy. Chociaż populacja CDC, podobnie jak HSC, należy do multipotencjalnych komórek macierzystych (tzn. wykazuje zdolność do różnicowania tylko w określonym kierunku, np. kardiomiocytów i komórek śródbłonna czy komórek krwio-

twórczych), to bezspornie największe możliwości regeneracyjne mają pluripotencjalne komórki macierzyste. Należą do nich ESC i iPSC. Źródłem tych ostatnich są komórki somatyczne (np. fibroblasty, limfocyty), które w wyniku manipulacji molekularnych nabywają morfologicznych i czynnościowych cech komórek macierzystych [35] (ryc. 1). Warto nadmienić, że to odkrycie zostało wyróżnione w 2012 roku Nagrodą Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii dla J. Gurdon i S. Yamanaki. Zarodkowe komórki macierzyste otrzymuje się natomiast z wężła zarodkowego pobieranego na etapie blastocysty [36]. Pluripotencjalne komórki macierzyste wykazują zdolność do nieograniczonej proliferacji i samoodnowy, mogą różnicować się we wszystkie tkanki pochodzące z trzech listków zarodkowych: ektodermy, endodermy i mezodermy, w tym w kardiomiocyty [37] (ryc. 2.). Pluripotencjalne komórki macierzyste są stosunkowo łatwe do hodowli w warunkach *in vitro*, sprawnie się dzielą, w związku z czym nietrudno uzyskać odpowiednią ich ilość do zastosowania w terapii. Niestety, z powodu kilku poważnych przeszkód komórki te nie zyskały jeszcze powszechnego uznania w badaniach klinicznych [38]. Po pierwsze, nieograniczona zdolność do podziału w przy-



Ryc. 1 Metody pozyskiwania kardiomiocytów z komórek somatycznych: **A** – przeprogramowanie bezpośrednie do komórek efektorowych, **B** – przeprogramowanie pośrednie do komórek progenitorowych kardiomiocytów, **C** – przeprogramowanie pośrednie do pluripotencjalnych komórek macierzystych



Ryc. 2. Powstawanie linii efektorowych układu sercowo-naczyniowego w trakcie różnicowania zarodkowych komórek macierzystych i rozwoju embrionalnego

padku komórek niezróżnicowanych grozi powstaniem nowotworów. Są to najczęściej guzy o charakterze łagodnym, tzw. potworniaki. Nie można jednak wykluczyć zanieczyszczenia materiału komórkami o potencjale do transformacji złośliwej. Po drugie, podawanie komórek allogenicznym wiąże się z ryzykiem ich odrzucenia przez układ odpornościowy gospodarza. Stąd zapewnienie trwałego efektu terapii będzie wymagać zastosowania jakiejś formy leczenia immunosupresyjnego. Dodatkowo sposób pozyskiwania zarodkowych komórek macierzystych budzi kontrowersje natury prawno-etycznej [39]. Próba obejścia tego problemu było właśnie stworzenie indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych. Obecnie wydajność procesu przeprogramowania komórek somatycznych jest jednak bardzo niska i mieści się w zakresie od 0,001% do 0,1%, w zależności od typu komórek i ich wyjściowej ilości [40]. Wątpliwości budzi również metodyka ich przygotowywania. Najczęściej w celu dokonania modyfikacji genetycznej stosuje się wektory wirusowe, których

integracja w obręb materiału genetycznego może spowodować transformację onkogeną komórek. Ten aspekt wymaga więc dopracowania, toczą się obecnie prace nad zastosowaniem nośników episomalnych, cząsteczek białka i krótkoniciowego RNA [41]. Czas potrzebny na przeprogramowanie komórek somatycznych wynosi około 4 miesięcy. Przy całościowej ocenie metody nie można również pominąć wysokich kosztów terapii przygotowywanej każdorazowo dla konkretnego pacjenta [42].

Mimo wszystkich ograniczeń, potencjał regeneracyjny komórek pluripotencjalnych stanowi o nieustającym zaangażowaniu środowiska naukowego w badania nad wykorzystaniem ich możliwości terapeutycznych w praktyce klinicznej. Nie jest to jednak kwestia do rozstrzygnięcia w ciągu najbliższych kilku lat.

Zadania na przyszłość

Badania kliniczne I generacji nie przyniosły jednoznacznych rezultatów. Wykazały niewątpliwie, że terapia

Tabela 1. Charakterystyka różnych populacji komórek macierzystych dostępnych w terapii regeneracyjnej serca

Typ komórek	Zalety	Wady	Zastosowanie w próbach klinicznych
ESC	<ul style="list-style-type: none"> • pluripotencjalne • nielimitowany potencjał do proliferacji i różnicowania 	<ul style="list-style-type: none"> • allogeniczne • niekontrolowany potencjał do proliferacji i różnicowania • wątpliwości natury prawno-etycznej 	pierwsze próby kliniczne (neurologia, okulistyka)
iPSC	<ul style="list-style-type: none"> • autologiczne • pluripotencjalne • nielimitowany potencjał do proliferacji i różnicowania • łatwe do pozyskania 	<ul style="list-style-type: none"> • koszt terapii • niejednorodna populacja • niekontrolowany potencjał do proliferacji i różnicowania • modyfikowany materiał genetyczny • potencjalnie immunogenne 	nie
BMMNC/MSC	<ul style="list-style-type: none"> • autologiczne • możliwość użycia komórek alogenicznych niskoimmunogennych • łatwe do pozyskania • duże doświadczenie kliniczne 	<ul style="list-style-type: none"> • limitowany potencjał do proliferacji • ograniczona skuteczność • niska przeżywalność komórek • wątpliwy potencjał kardiogeny 	tak
CSC	<ul style="list-style-type: none"> • autologiczne • udowodniony potencjał kardiogeny • mieszana populacja progenitorów • szybka ekspansja w hodowli <i>in vitro</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • słaba znajomość biologii komórek • niewystandaryzowana technika hodowli <i>in vitro</i> • inwazyjne metody pozyskiwania • zmienność osobnicza • umiarkowana efektywność 	pierwsze próby kliniczne

komórkowa jest możliwa i stosunkowo bezpieczna u pacjentów z zaawansowaną chorobą serca, przy użyciu inwazyjnych metod leczenia. Jednocześnie mamy świadomość słabych punktów dotychczasowych badań. Należą do nich:

- 1) brak ujednoczonych i wystandaryzowanych procedur dotyczących przygotowania komórek (populacja nieselekcyjowana vs komórki wzbogacane we frakcje progenitorowe, hodowla w warunkach *in vitro*), dawki terapii (ograniczona dostępność komórek i ich potencjał proliferacyjny), drogi podania (bezpośrednie – dożylna, dowieńcowa, iniekcje epi- i endokardialne, oraz pośrednie – mobilizacja komórek macierzystych za pomocą czynników wzrostu) oraz okna terapeutycznego (podanie w momencie incydentu wieńcowego vs w okresie odległym) [43];
- 2) utrata komórek od momentu ich pobrania do zagnieżdżenia w tkance docelowej; szacuje się, że po upływie doby w sercu pozostaje mniej niż 10% komórek, niezależnie od drogi podania ani rodzaju stosowanych komórek; z tego po tygodniu ginie kolejnych 90%; jest to wynikiem wymywania komórek drogą naczyń żylnych, mechanicznego wyrzucania z miejsca wstrzyknięcia oraz apoptozy związanej z niedokrwieniem, brakiem kontaktu z elementami macierzy pozakomórkowej i stanem zapalnym [44];
- 3) wątpliwy potencjał kardiogeny komórek macierzystych szpiku kostnego; tworzenie nowych naczyń krwionośnych i mięśnia sercowego zachodzi w tej sytuacji wyjątkowo rzadko, jeśli w ogóle jest możliwe; nie przekreśla to jednak miejsca tych populacji w terapii regeneracyjnej np. u pacjentów w wieku podeszłym, kiedy celem nadrzędnym może być nie tyle odtworzenie utraconego mięśnia sercowego, ile poprawa jakości życia; rozważany mechanizm działania: poprzez wydzielane cytokiny i czynniki wzrostu – kardioprotekcja, angiogeneza, modulacja zapalenia, poprawa metabolizmu tkankowego; możliwa jest również fuzja komórek dawcy i biorcy [45].

Niebagatelną sprawą jest również kwestia badań przedklinicznych, których wyniki nie przetożyły się na powodzenie terapii regeneracyjnej u ludzi. Na podstawie dotychczasowych doświadczeń trudno powiedzieć, jaki model zwierzęcy byłby idealny do wykorzystania. Zwyczajowo zwierzęta używane do eksperymentów są jednakowe pod względem genetycznym, młode, zdrowe, niepoddawane farmakoterapii z powodu chorób dodatkowych i utrzymywane w ściśle zdefiniowanych warunkach środowiska. Nie jest również znany naturalny zwierzęcy model choroby niedokrwiennej serca. Najczęściej korzysta się z mechanicznego zamknięcia tętnicy wieńcowej, co nie zawsze oddaje istotę problemu klinicznego [43].

Mając świadomość wielu niedoskonałości metody, nie można zapominać, że komórki macierzyste to potężne narzędzie, które optymalnie zastosowane może okazać się krokiem milowym w leczeniu niektórych chorób przewle-

łych. Odkrycie CSC i prace nad wdrożeniem pluripotencjalnych komórek macierzystych do praktyki klinicznej otwierają nowy rozdział w terapii regeneracyjnej serca (tab. 1.). Konieczne są jednak dalsze badania, przede wszystkim duże próby kliniczne z randomizacją, aby rozstrzygnąć wątpliwości i zapewnić tej formie leczenia stałe miejsce w terapii.

Piśmiennictwo

1. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM i wsp. Heart disease and stroke statistics-2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2011; 123: e18-e209.
2. Caspi O, Huber I, Kehat I i wsp. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1884-1893.
3. Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Yamada S i wsp. Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 2009; 120: 408-416.
4. Muller-Ehmsen J, Peterson KL, Kedes L i wsp. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation* 2002; 105: 1720-1726.
5. Menasche P, Alfieri O, Janssens S i wsp. The Myoblast Autologous grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008; 117: 1189-1200.
6. Lunde K, Solheim S, Aakhus S i wsp. Intracoronary injection of mononuclear bone-marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1199-1209.
7. Katritsis DG, Sotiropoulou PA, Karvouni E i wsp. Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheter Cardiovasc Interv* 2005; 65: 321-329.
8. Smith RR, Barile L, Cho HC i wsp. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007; 115: 896-908.
9. Murry CE, Reinecke H, Pabon LM. Regeneration gaps: observations on stem cells and cardiac repair. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47: 1777-1785.
10. Olivetti G, Melissari M, Capasso JM i wsp. Cardiomyopathy of the aging human heart. *Circ Res* 1991; 68: 1560-1568.
11. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol* 2010; 72: 19-44.
12. Olivetti G, Cigola E, Maestri R i wsp. Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28: 1463-1477.
13. Adler CP, Costabel U. Cell number in human heart atrophy, hypertrophy and under the influence of cytostatics. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1975; 6: 343-355.
14. Adler CP. Relationship between deoxyribonucleic acid content and nucleoli in human heart muscle cells and estimation of cell number during cardiac growth and hyperfunction. *Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab* 1975; 8: 373-386.
15. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S i wsp. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* 2009; 324: 98-102.

16. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M i wsp. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-280.
17. Menasche P, Alfieri O, Janssens S i wsp. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 2008; 117: 1189-1200.
18. Menasche P. Skeletal myoblasts for cardiac repair: act II? *J Am Coll Cardiol* 2008; 52: 1881-1883.
19. Strauer BE, Brehm M, Zeus T i wsp. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: 932-938.
20. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 1993; 2: 137-144.
21. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I i wsp. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.
22. Crosby JR, Kaminski WE, Schattman G i wsp. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 2000; 87: 728-730.
23. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology* 2009; 113: 155-160.
24. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ i wsp. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008; 29: 1807-1818.
25. Losardo DW, Schatz RA, White CJ i wsp. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007; 115: 3165-3172.
26. van Ramshorst J, Bax JJ, Jeroen J i wsp. Intramyocardial bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: a randomized controlled trial. *JAMA* 2009; 301: 1997-2004.
27. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H i wsp. Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668.
28. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: Biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res* 2011; 109: 923-940.
29. Chen SL, Fang WW, Ye F i wsp. 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.
30. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D i wsp. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.
31. Messina E, De Angelis L, Frati G i wsp. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004; 95: 911-921.
32. Smith RR, Barile I, Cho HC i wsp. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007; 115: 896-908.
33. CADUCEUS. Cardiosphere-Derived autologous stem Cells to reverse ventricular dysfunction (NCT00893360) www.clinicaltrials.gov
34. SCPIO. Stem Cell Infusion in Patients with Ischemic cardiomyopathy (NCT00474461) www.clinicaltrials.gov
35. Park IH, Zhao R, West JA i wsp. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451: 141-146.
36. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS i wsp. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
37. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008; 132: 660-680.
38. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA i wsp. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *Faseb J* 2007; 21: 1345-1357.
39. Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature* 2008; 453: 322-329.
40. Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: a source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50: 327-332.
41. Shi Y, Do JT, Despons C i wsp. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 525-528.
42. Freund C, Mummery CL. Prospects for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in cardiac cell therapy and as disease models. *J Cell Biochem* 2009; 107: 592-599.
43. Lovell MJ, Mathur A. Cardiac stem cell therapy: progress from bench to bedside. *Heart* 2010; 96: 1531-1537.
44. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A i wsp. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans: histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 879-888.
45. Gnechchi M, Zhang Z, Ni A i wsp. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res* 2008; 103: 1204-1219.