

# Využití autologních kmenových buněk kostní dřeně v léčbě srdečního selhání

Leoš Pleva<sup>1</sup>, Pavel Kukla<sup>1</sup>, Kateřina Vítková<sup>2</sup>, Václav Procházka<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kardiovaskulární oddělení, Fakultní nemocnice Ostrava

<sup>2</sup>Oddělení pro vědu a výzkum, Fakultní nemocnice Ostrava

<sup>3</sup>Radiodiagnostický ústav, Fakultní nemocnice Ostrava

Srdeční selhání představuje jedno z hlavních chronických onemocnění s vysokou morbiditou a mortalitou. Nejčastější příčinu rozvoje srdečního selhání se sníženou systolickou funkcí představuje ischemická choroba srdeční. Ačkoliv revaskularizace ischemického myokardu vede ke zlepšení kontraktility viabilního myokardu a systolické funkce, žádná z těchto metod nemůže obnovit viabilitu již nekrotické tkáně. V našem přehledu se zabýváme možností využití autologních kmenových buněk kostní dřeně v léčbě pacientů se srdečním selháním na podkladě ischemického poškození myokardu.

**Klíčová slova:** autologní kmenové buňky kostní dřeně, srdeční selhání, myokardiální regenerace.

## The use of autologous bone marrow stem cells in the treatment of heart failure

Heart failure is a major chronic illness, resulting in high morbidity and mortality. The most frequent cause of heart failure with reduced ejection fraction is coronary artery disease. Although revascularisation of ischaemic myocardium leads to improvements in contractility of viable myocardium and systolic function, it can not restore the viability of an already necrotic tissue. In our review, we focus on the use of autologous bone marrow stem cells in the treatment of patients with heart failure due to ischaemic myocardial injury.

**Key words:** autologous bone marrow cells, heart failure, myocardial regeneration.

## Úvod

Srdeční selhání představuje v současné době jedno z hlavních chronických onemocnění s vysokou morbiditou a mortalitou. Průměrná mortalita těžkého srdečního selhání ve třídě NYHA IV dosahuje ročně 40–50 % (1). Nejčastější příčinu poklesu systolické funkce levé komory a rozvoje srdečního selhání se sníženou systolickou funkcí (HFREF) představuje ve vyspělých zemích ischemická choroba srdeční (1). Ačkoliv katetrizační a chirurgická revaskularizace ischemického myokardu vede ke zlepšení anginózních obtíží, kontraktility viabilního myokardu a systolické funkce, žádná z těchto metod nemůže obnovit viabilitu již nekrotické tkáně.

Hlavním procesem, který by mohl zabránit remodelaci levé komory, by mohla být stimulace regenerace kardiálních myocytů, jako i podpora neovaskularizace v postižených oblastech myokardu. Primitivní pluripotentní progenitorové buňky kostní dřeně se mohou diferencovat ve funkční tkáň, což vedlo k velkému zájmu o jejich využití v terapii akutního infarktu myokardu, systolické dysfunkce levé komory a chronického srdečního selhání (2).

## Mechanismus účinku

V rámci preklinického výzkumu bylo na zvířecích modelech k regeneraci myokardiálního poškození používáno několik typů buněk, včetně: embryonálních kmenových buněk (ESC),

indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSC), novorozeneckých kardiomyocytů, skeletálních myoblastů (SKM), endoteliálních progenitorových buněk (EPC), mononukleárních buněk kostní dřeně (BMMNC), mezenchymálních kmenových buněk (MSC) a nejnověji srdečních kmenových buněk (CSC) (2, 3).

Myokardiální regenerace byla z počátku brána jako důsledek přímé diferenciace transplantovaných autologních buněk kostní dřeně (BMC) v nové kardiomyocyty. Avšak počet přeživších kmenových buněk, jakož i počet nově vzniklých kardiomyocytů či vaskulárních buněk (EPC či hladkých svalových buněk cévní stěny [VSMC]) se jeví natolik malý, že nemůže sám o sobě vysvětlit signifikantní zlepšení srdeční funkce. Nyní

KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA:

MUDr. Leoš Pleva, Ph.D., leos.pleva@volny.cz

Kardiovaskulární oddělení, Fakultní nemocnice Ostrava, tř. 17. listopadu 1 790, 708 52 Ostrava

Cit. zkr: Interv Akut Kardiol 2018; 17(3): 148–151

Článek přijat redakcí: 20. 3. 2018

Článek přijat k publikaci: 25. 6. 2018

se domníváme, že intramyokardiálně aplikované kmenové buňky uvolňují množství solubilních faktorů, které jsou na podkladě parakrinního mechanismu účinku zodpovědné za regeneraci myokardu.

Mezi dva hlavní zdroje náhradních buněk patří BMC a SKM. Implantace SKM však byla spojena s rozvojem maligních arytmií, neboť implantované buňky nejsou schopny vytvořit funkční elektrické spoje s okolní zdravou tkání. Naproti tomu BMC se jeví jako praktická a bezpečná alternativa, neboť jak dokazují preklinická data, tyto buňky jsou schopny se diferencovat v cévní struktury a dále mohou fungovat působením parakrinních mechanismů, uvolňují faktory vedoucí ke zlepšení funkce existujících kardiomyocytů či angiogenezi (2, 3, 4). Bylo prokázáno, že infuze BMC vede ke zlepšení perfuze myokardu a funkce levé komory s minimem nežádoucích účinků a je tedy bezpečná s potenciálním klinickým přínosem; současně nebylo neprokázáno zvýšení výskytu maligních arytmií (2, 3, 4).

V současnosti jsou za tři hlavní mechanismy účinku BMC považovány: kardiomyogeneze, vaskulogeneze a parakrinní působení, které představuje klíčový faktor v procesu myokardiální regenerace. Parakrinní efekt BMC se může projevovat myokardiální protekcí, neovaskularizací, ovlivněním zánětlivých a fibrotických procesů, myokardiální kontraktility a metabolismu a stimulací endogenní regenerace reziduálních kardiomyocytů. Bezprostředí cytoprotektivní efekt BMC spočívá v uvolnění cytoprotektivních molekul, jako jsou vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) a insulin-like growth factor (IGF-1) vedoucí in vivo k inhibici apoptózy a redukcii velikosti infarktového ložiska (2, 3, 4). Další mechanismus účinku BMC se projevuje potenciací neovaskulogenezi. BMC produkují řadu proangiogenních faktorů, jako jsou VEGF, basic fibroblast growth factor (bFGF), hepatocyte growth factor (HGF), angiopoietin, IL-1 $\beta$  a tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), jejichž efekt se projevuje zvýšením mikrovaskulární denzity v ischemické tkáni. BMC taktéž uvolňují řadu faktorů s parakrinním antifibrotickým efektem ovlivňujícím myokardiální fibrózu a remodelaci. Dochází ke snížení proliferace fibroblastů, snížení syntézy kolagenu I a III, zvýšení exprese tkáňového inhibitoru metaloproteináz (TIMP-1) a transforming

growth factoru (TGF), které příznivě ovlivňuje extracelulární matrix. Zábřana negativní remodelace myokardu následně způsobuje snížení end-diastolického tlaku levé komory a zvýšení dP/dt. Parakrinní efekt BMC vede prostřednictvím snížení downregulace  $\beta$ -receptorů v selhávajícím myokardu ke zlepšení kontraktility reziduálních kardiomyocytů a ke zlepšení metabolismu ischemizovaných kardiomyocytů. BMC mohou ovlivnit regeneraci kardiomyocytů jednak přímo, transdiferenciací nebo fúzí s nativními kardiomyocyty, avšak převážně díky parakrinnímu působení (HGF, IGF-1) vedoucímu k mobilizaci, proliferaci a diferenciaci reziduálních endogenních myokardiálních progenitorových buněk (2, 3, 4). Implantované BMC jsou senzitivní vůči svému okolí, u pacientů s akutním infarktem myokardu (AIM) hraje roli načasování aplikace. Časná implantace v akutní fázi IM v důsledku akutní zánětlivé reakce nebývá úspěšná, v preklinických studiích většina takto implantovaných buněk nepřežila několik prvních dní. Naproti tomu pozdní implantace do již vytvořené jizvy může být spojena s diferenciací implantovaných buněk ve fibroblasty. Jako optimální načasování se jeví aplikace mezi 4. a 14. dnem po AIM (3, 4).

Na procesu neoangiogenezi se intenzivně podílí i krevní destičky a to nejen v rámci hemostázy, ale rovněž prostřednictvím intenzivního kontaktu s endoteliálními buňkami. Krevní destičky mohou ovlivnit novotvorbu cév prostřednictvím uvolňování velkého množství růstových faktorů (VEGF, bFGF, epidermal growth factor [EGF], PDGF) a matrix metaloproteináz (MMP), ale obsahují rovněž velké množství inhibitorů (endostatin, destičkový faktor-4 [PF4], trombospondin-L, 2-makroglobulin, PAI-1 inhibitor a angiostatin) (5).

## Získávání a způsoby aplikace BMC

BMC jsou získávány ve spolupráci s hematologi standardní aspirací kostní dřeně prováděné v analgosedaci nejčastěji z lopat kyčelních kostí. Aspirát (cca 240 ml) je následně laboratorně zpracován a jsou separovány požadované BMC (např. progenitorové buňky CD133+ imunomagnetickou separací *CliniMACS Prodigy*, koncentrát aspirátu buněk kostní dřeně [BMAC] metodou *Ficoll* nebo *SmartPreP2* obsahující i trombocyty, etc). Aspirace kostní dřeně je spojena s minimálními riziky, nejčastěji hematomy lokálně, vzácně infekcí či snížením hematopoézy.

Hlavní možné metody aplikace kmenových buněk do ischemického myokardu jsou: intrakoronární infuze, přímá intramyokardiální injekce nebo retrogradní aplikace cestou koronárního sinu (6).

**Intrakoronární infuze** je nejčastějším způsobem aplikace u pacientů s AIM. Hlavní výhodou tohoto přístupu je bezpečnost a jednoduše podání kmenových buněk selektivně do infarktové tepny zásobující ischemizovaný myokard. Avšak intrakoronární aplikace vede k zachycení pouze 1–3% buněk v myokardu, většina buněk je vyplavena a zachycena v plicích a játrech. Dále infuze těchto poměrně velkých buněk může vést k obstrukci koronární mikrocirkulace a mikroinfarktům (7). Gyöngyösi et al. prokázal, že absolutní myokardiální průtok po intrakoronární injekci kmenových buněk se okamžitě snižuje o -30% a toto snížení přetrvává 24 hodin (8).

**Přímá intramyokardiální aplikace** kmenových buněk vede k jejich vysokému zachytu v myokardu bez ovlivnění koronárního průtoku. **Perkutánní endoventrikulární intramyokardiální aplikace** s použitím dedikovaných katétrů je relativně bezpečná, i když může být spojena s rizikem perforace a tamponády nebo s indukci komorových arytmií v prvních dvou týdnech po AIM. Intramyokardiální retence buněk může dosahovat až 20–30%, zbývající buňky jsou opět zachyceny v plicní cirkulaci a játrech. Další výhodou endoventrikulární aplikace je posouzení myokardiální viability a kontraktility v reálném čase pomocí elektromechanického mapování (např. NOGA system) a možnost cílené aplikace kmenových buněk do oblastí hibernovaného myokardu. **Perioperační epimyokardiální injekce** kmenových buněk v průběhu CABG umožňuje cílenou aplikaci pod kontrolou zrakem, nevýhodou je nutnost perioperačního přístupu. Jako alternativa jsou vyvíjeny endoskopické procedury umožňující transepikardiální aplikaci bez nutnosti otevření hrudníku (7).

**Retrogradní infuze cestou koronárního sinu** po předchozí obturaci balonkovým katétrem představuje možnou alternativu k antegradní intrakoronární aplikaci. Retrogradní kanylace koronárního žilního systému se jeví bezpečná a je běžně využívána arytmiologi např. k implantaci levokomorové elektrody u resynchronizační terapie (9). Suzuki et al. ve své dřívější práci na myším modelu prokázali, že retrogradní infuze

cestou koronárního sinu umožňuje proniknutí buněk do jednotlivých vrstev myokardu s minimálním rizikem poškození (10).

Zhou et al. ve své práci na prasečím modelu studovali tkáňovou distribuci radioaktivně značených BMC při různých způsobech aplikace – přímým intramyokardiálním, intrakoronárním a retrográdním transvenózním, cestou koronárního sinu. Každá metoda aplikace byla spojena s významným zachycením aplikovaných buněk extramyokardiálně v plicní cirkulaci (26 +/-3 % vs. 47 +/-1 % a 43 +/-3 %). Signifikantně nejvíce buněk bylo v myokardu zachyceno při přímé intramyokardiální aplikaci (11 +/-3 %) ve srovnání s intrakoronárním (2,6 +/-0,3 %;  $p < 0,05$ ) a retrográdním transvenózním podáním (3,2 +/-1 %), tento rozdíl však již nedosahoval statistické významnosti (11).

## Preklinické studie

Vzhledem k malé velikosti souborů v jednotlivých studiích se preklinické i klinické výsledky většinou opírají o metaanalýzy.

Van der Spoel et al. se ve své metaanalýze preklinických studií zabývali terapií ischemické kardiomyopatie u zvířecích modelů (52 studií s celkem 888 zvířaty). Tato metaanalýza prokázala, že transplantace BMC vedla k signifikantnímu zlepšení ejekční frakce levé komory (EF LK) o 7,5 % (95 % CI: 6,2–8,9 %;  $p < 0,001$ ) ve srovnání s kontrolní skupinou a nebyla spojena se zvýšením celkové mortality (9,5 % vs. 8,4 %; OR 1,13 [0,63–2,02];  $p = 0,68$ ). Dle multivariační regresní analýzy mezi hlavními prediktory zlepšení EF LK byly: použitý typ buněk (MSC vs. neselektované BMC;  $p = 0,04$ ) a lokalizace infarktu myokardu (uzávěr povodí RIA + 8 % zlepšení EF LK vs. uzavěr povodí RCX +5,8 %;  $p = 0,045$ ). Byl prokázán trend výraznějšího zlepšení EF LK při použití většího počtu buněk ( $\geq 10^7$ ), u pozdější aplikace ( $> 1$  týden po AIM) a u modelů s chronickou okluzí koronární tepny (12).

## Klinické studie

Jeevanantham et al. provedli metaanalýzu 50 klinických studií (zahrujících přes 2 600 pacientů) zabývajících se využitím BMC v terapii kardiovaskulárních onemocnění. Průměrný počet pacientů v jednotlivých studiích byl 39 (10–390 pacientů) a průměrná doba sledování byla šest měsíců (3–60 měsíců). Průměrná doba implantace BMC u pacientů s AIM byla 6,7 dní po infarktu; průměrný počet aplikovaných BMC byl  $100 \times 10^6$  a průměrná EF LK studované populace byla 43 %. Ve srov-

nání se standardní terapií vedla transplantace BMC ke zlepšení EF LK o 3,96 % (95 % CI: 2,90–5,02;  $p < 0,00001$ ), snížení end-systolického objemu levé komory (LVESV) o 8,9 ml (95 % CI: –11,57 to –6,25;  $p < 0,00001$ ) a snížení end-diastolického objemu levé komory (LVEDV) o 5,23 ml (95 % CI: –7,6 to –2,86;  $p < 0,00001$ ). Přičemž zmenšení rozsahu infarktového ložiska a snížení LVESV a LVEDV přetrvávalo minimálně 12 měsíců a zlepšení EF LK minimálně 24 měsíců po implantaci.

Analýza jednotlivých podskupin prokázala, že zlepšení funkce levé komory, rozsahu jizvy a objemu levé komory je obdobné u pacientů s akutním infarktem myokardu i chronickým srdečním selháním (s výjimkou většího snížení LVESV u chronických pacientů).

U pacientů s anteriorním infarktem myokardu bylo dosaženo většího snížení LVEDV ve srovnání s IM v ostatních lokalizacích, v dalších parametrech se tyto skupiny nelišily.

U pacientů s EF LK  $< 43$  % vedla BMC terapie k signifikantnímu snížení LVESV i LVEDV ve srovnání s pacienty s EF  $\geq 43$  %, kde signifikantní zlepšení LVEDV nebylo pozorováno.

Zatímco zlepšení EF LK a pokles LVESV u pacientů s AIM bylo dosaženo jak při časné aplikaci BMC (do 7. dne od AIM), tak i při pozdějším podání (7.–30. den), pokles LVEDV byl prokázán jen u časné implantace do 7. dne. Analýzy prokázaly, že implantace  $> 40 \times 10^6$  buněk vede k signifikantnímu zlepšení EF LK, snížení rozsahu jizvy a poklesu LVEDV, naproti tomu podání  $< 40 \times 10^6$  buněk ke zlepšení v žádném sledovaném parametru nevedlo. Zdá se tedy, že počet  $40 \times 10^6$  buněk představuje limitní hranici, pod kterou implantace BMC již nepřináší klinický benefit. Třicet šest studií používalo BMNC, pět studií neselektované BMC, šest studií separované CD 133+ /nebo CD34+ a tři studie MSC nebo EPC buňky. Implantace BMMNC vedla ke zlepšení EF LK, rozsahu jizvy a poklesu objemu levé komory, při použití CD 133+ /CD 34+ buněk signifikantní rozdíly oproti kontrolní skupině prokázány nebyly. Avšak vzhledem k malému počtu studií a s malými soubory pacientů posouzení přínosu implantací jednotlivých typů BMC bude vyžadovat další studie. Ve srovnání se standardní terapií vedlo podání BMC k signifikantnímu snížení celkové mortality (OR 0,39; 95 % CI: 0,27–0,55;  $p < 0,00001$ ), kardiovaskulární mortality (OR 0,41; 95 % CI: 0,22–0,79;  $p = 0,005$ ), recidivy IM (OR 0,25; 95 % CI: 0,11–0,57,  $P = 0,001$ ) a trombózy ve stentu (OR 0,34; 95 % CI: 0,12–0,94;  $p = 0,04$ ). Byl pozorován

trend ke snížení progresu srdečního selhávání (OR 0,52; 95 % CI: 0,27–1,00;  $p = 0,05$ ) a výkytu cerebrovaskulárních příhod (OR 0,28; 95 % CI: 0,08–1,07;  $p = 0,06$ ). Nutnost opakované revaskularizace cílové tepny (TVR; OR 0,83; 95 % CI: 0,55 – 1,23;  $p = 0,35$ ) a výskyt komorových arytmií (OR 1,14; 95 % CI: 0,52–2,53;  $p = 0,74$ ) byly srovnatelné (13).

Delewi et al. provedli metaanalýzu 16 studií s intrakoronární aplikací BMC u pacientů po STEMI (celkem 1 640 pacientů: 980 léčených a 660 kontrol). Aplikace BMC vedla k signifikantnímu zlepšení EF LK (+2,55 %; 95 % CI: 1,83–3,26;  $p < 0,001$ ), snížení indexu LVEDV (-3,17 ml/m<sup>2</sup>; 95 % CI: -4,86 až -1,47;  $p < 0,001$ ) a indexu LVESV (-2,6 ml/m<sup>2</sup>; 95 % CI -3,84 až -1,35;  $p < 0,001$ ). Větší zvýšení EF LK bylo prokázáno u pacientů mladších 55 let (3,38 %; 95 % CI: 2,36–4,39) ve srovnání se staršími (1,77 %; 95 % CI: 0,80–2,74;  $p = 0,03$ ). Taktéž pacienti s EF LK  $< 40$  % vykazovali větší přínos z BMC terapie. Zlepšení EF LK v této skupině bylo signifikantně vyšší (5,3 %; 95 % CI: 4,27–6,33) oproti pacientům s EF LK  $\geq 40$  % (1,45 %; 95 % CI: 0,60–2,31;  $p < 0,001$ ) (14). Proarytmogenní či proonkogenní riziko aplikace BMC v těchto metaanalýzách nebylo prokázáno (13, 14).

Intrakoronární aplikací BMC se zabývalo i několik českých pracovišť. Pudil et al. prokázali u šesti pacientů po intrakoronární aplikaci BMC pět dní po AIM zlepšení EF LK z 31,6 +/- 4,9 % na 36,6 % po 24 měsících, bez průvodních závažných komplikací (15, 16).

Pěnička et al. neprokázali u pacientů s anteriorním AIM (uzávěr RIA) a s EF LK  $< 50$  % při časném (4–11 dní) intrakoronárním podání BMMNC signifikantní zlepšení EF LK (45 +/- 9 % vs. 47 +/- 7 %;  $p = NS$ ), změny objemu LK (LVEDV: 172 +/- 34 ml vs. 174 +/- 29 ml;  $p = NS$  a LVESV: 95 +/- 28 ml vs. 96 +/- 28 ml;  $p = NS$ ) či regresí rozsahu infarktového ložiska (30,5 +/- 16,1 % vs. 35,3 +/- 17,2 %;  $p = NS$ ) po čtyřech měsících oproti kontrolní, standardně léčené skupině. Rozdíl v EF LK mezi skupinami nebyl signifikantní ani po 12 měsících. Studie byla předčasně ukončena po randomizaci 27 pacientů pro výskyt významných nežádoucích účinků v léčené skupině; i když pravděpodobně nesouvisejících s vlastní aplikací BMNC (17, 18).

Meluzín et al. randomizovali 60 pacientů s AIM k časné (3–8 dní) intrakoronární aplikaci vysoké ( $10^8$ ), nízké ( $10^7$ ) dávky BMC nebo ke standardní léčbě. Ve skupině pacientů s vysokou dávkou BMC bylo prokázáno přechodné zlepšení regionální kinetiky infarktové stěny (Sinfarct:

$\Delta+0,7 \pm 0,2$  cm/s vs.  $0 \pm 0,2$  cm/s;  $p=0,024$ ) po 3 měsících oproti kontrolní skupině, které však ve 12. měsíci již nepřetrvávalo. Oproti tomu zlepšení EF LK bylo v této skupině prokázáno jak po třech ( $\Delta+6 \pm 2\%$  vs.  $+3 \pm 2\%$ ;  $p=0,044$ ), tak po 12 měsících ( $\Delta+7 \pm 2\%$  vs.  $0 \pm 2\%$ ;  $p=0,027$ ) (19, 20). U části pacientů, kteří prokazovali funkční zlepšení po třech měsících, byla opakovaně apli-

kována vysoká dávka BMC, nicméně toto opakované podání u pacientů s chronickým IM bylo spojeno se zvýšeným výskytem intrakoronárních komplikací a bylo předčasně ukončeno (21).

## Závěr

Aplikace autologních kmenových buněk kostní dřeně do oblasti postiženého myokardu

se zdá být slibnou léčebnou metodou u pacientů se srdečním selháním ischemické etiologie. Bude však potřeba ještě dlouhá řada klinických studií, než tato metoda bude přijata do běžné klinické praxe.

*Práce byla podpořena Ministerstvem zdravotnictví České republiky z projektu Institucionální podpory – RVO-FNOs/2014.*

## LITERATURA

1. Ponikowski P, Voors AA, Anker SD, et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC). Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal* 2016; 37(27): 2129–2200.
2. Lerman DA, Alotti N, Ume KL, Péault B. Cardiac repair and regeneration: the value of cell therapies. *European Cardiology Review* 2016; 11(1): 43–48.
3. Katarzyna R. Adult stem cell therapy for cardiac repair in patients after acute myocardial infarction leading to ischemic heart failure: an overview of evidence from the recent clinical trials. *Curr Cardiol Rev* 2017; 13(3): 223–231.
4. Takashima S, Tempel D, Duckers HJ. Current outlook of cardiac stem cell therapy towards a clinical application. *Heart* 2013; 0: 1–13.
5. Sheng CC, Zhou L, Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *BioMed Research International*. 2013; Article ID 547902: 1–15. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/547902>
6. Wu KH, Hanb ZC, Moa XM, et al. Cell delivery in cardiac regenerative therapy. *Ageing Research Reviews* 2012; 11: 32–40.
7. Strauer BE, Steinhoff G. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart from the methodological origin to clinical practice. *JACC* 2011; 58(11): 1095–104.
8. Gyöngyösi M, Giurgea GA, Syeda B, et al. Long-Term Outcome of combined (percutaneous intramyocardial and intracoronary) application of autologous bone marrow mononuclear cells post myocardial infarction: The 5-Year MYSTAR Study. *PLoS One*. 2016; 11(10): e0164908.
9. Wu K, Mo X, Lu S, Han Z. Retrograde delivery of stem cells: promising delivery strategy for myocardial regenerative therapy. *Clin Transplant* 2011; 25: 830–833.
10. Suzuki K, Murtuza B, Fukushima S, et al. Targeted cell delivery into infarcted rat hearts by retrograde intracoronary infusion: distribution, dynamics, and influence on cardiac function. *Circulation* 2004; 110(11): 11225–230.
11. Zhou R, Acton PD, Victor A, Ferrari VA. Imaging stem cells implanted in infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 2094–2106.
12. van der Spoel TIG, Lorkeers SJ, Agostoni P, et al. Human relevance of pre-clinical studies in stem cell therapy: systematic review and meta-analysis of large animal models of ischaemic heart disease. *Cardiovascular Research*. 2011; 91: 649–658.
13. Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zubair-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2012; 126: 551–568.
14. Delewi R, Andriessen A, Tijssen JGP, et al. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomised controlled clinical trials. *Heart* 2013; 99: 225–232.
15. Pudil R, Vojáček J, Filip S, et al. Transplantation of bone marrow derived progenitor cells in acute myocardial infarction. The first results. *Acta Medica (Hradec Králové)* 2005; 48(3–4): 153–155.
16. Pudil R, Vojáček J, Filip S, et al. Transplantation of bone marrow derived progenitors in acute myocardial infarction. Two-year follow-up. [abstract] *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2007; 42: S88–S101.
17. Pěnička M, Widimský P, Kobyłka P, et al. Transplantation autologních kmenových buněk kostní dřeně po akutním infarktu myokardu, způsobeném uzávěrem kmene levé věnčité tepny. *Cor Vasa* 2003; 45(9): 465–468.
18. Penicka M, Horak J, Kobyłka P, et al. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction a prematurely terminated randomized study. *JACC* 2007; 49(24).
19. Meluzín J, Mayer J, Groch L, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006; 152: 975.e9–975.e15.
20. Meluzín J, Janoušek S, Mayer J, et al. Three-, six-, and 12-month results of autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* 2008; 128: 185–192.
21. Meluzín J, Janoušek S, Mayer J, et al. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with chronic myocardial infarction. *Cor Vasa* 2007; 49: 46–54.