

Terapia cellulare cardiaca: un *puzzle* in attesa di composizione

Marco Canepa¹, Domenico Coviello², Francesco Chiarella¹

¹U.O. di Cardiologia, A.O. Ospedale Santa Corona - DEA II Livello, Pietra Ligure (SV), ²Laboratorio di Genetica Medica, Fondazione IRCCS, Ospedale Maggiore Policlinico Mangiagalli e Regina Elena, Milano

Key words:
Cell therapy;
Heart failure;
Myocardial infarction;
Stem cells.

Cell therapy has been proposed as an innovative hypothesis to treat acute myocardial infarction and heart failure. However, the mechanism by which stem cells could improve cardiac function remains unclear and many controversies have been arisen in interpretation of experimental and clinical data. Answering the five “WH questions” we discuss the process that has led to consider cell therapy as a new treatment option for myocardial tissue regeneration after ischemic damage. 1) Why should we use stem cells? The rationale derives from the disclosure that apoptosis and regeneration occur at the myocardial level and stem cells migrate from bone marrow to repopulate the damaged cardiac tissue. 2) Which are the most appropriate cells, delivery methods and therapeutic purposes? Adult stem cells can be mobilized or directly transplanted in human hearts to accomplish myocardiogenesis, neoangiogenesis and/or paracrine effects. 3) Where should we transplant these cells? The infarct border zone seems to be the best place to home and differentiate transplanted cells hampering post-ischemic cardiac remodeling. 4) When should we perform cell therapy? Cell therapy should be performed during or after an acute myocardial infarction: best setting and timing still need to be precisely addressed. 5) Who might be the suitable patient? Further multicenter randomized trials with adequate patient selection are needed to answer this crucial question.

(G Ital Cardiol 2006; 7 (4): 252-265)

© 2006 CEPI Srl

Ricevuto il 4 ottobre 2005; nuova stesura il 15 novembre 2005; accettato il 23 novembre 2005.

Per la corrispondenza:

Dr. Marco Canepa

U.O. di Cardiologia
A.O. Ospedale Santa Corona
DEA II Livello
Via XXV Aprile, 128
17027 Pietra Ligure (SV)
E-mail:
canepamarco@email.it

Introduzione

Nel corso di questi anni la terapia cellulare cardiaca ha mosso l'interesse di molti centri d'avanguardia che hanno effettuato le prime sperimentazioni nell'animale e nell'uomo, suscitando talvolta attese fuori misura. Sulla base di queste esperienze si è arrivata a proporre la terapia cellulare come innovativa ipotesi di trattamento per i pazienti con infarto miocardico acuto (IMA) e con scompenso cardiaco postinfartuale (Tabella 1)¹. Il trattamento dell'insufficienza ventricolare sinistra postinfartuale, secondaria ad alterazioni segmentarie interessanti le zone necrotiche e perinecrotiche dell'infarto, appare di grande difficoltà. Le terapie convenzionali non portano, infatti, ad una rigenerazione del miocardio perduto; la presenza di estese aree cicatriziali condiziona sfavorevolmente il rimodellamento e l'evoluzione dilatativa conduce verso l'insufficienza ventricolare cronica, che rappresenta una delle più importanti sfide delle prossime decadi dal punto di vista terapeutico, gestionale ed economico²⁻⁴. Nel presente lavoro prendiamo in considerazione cinque punti (le “WH questions” anglosassoni) che ci possono aiutare ad inquadrare l'argomento: perché usare le cellule staminali (*Why stem cells*); quali sono le cellule migliori, quali i metodi per utilizzarle, quali gli obiettivi

(*Which cells, methods and targets*); dove e quando utilizzarle (trattamento precoce o ritardato) (*Where and When use them [early or delayed]*); ed infine chi potrebbe beneficiare maggiormente del trattamento sperimentale in oggetto (*Who*).

Why - Perché usare le cellule staminali: premesse fisiopatologiche

L'impiego della terapia cellulare cardiaca trae le sue ragioni dallo sviluppo delle conoscenze sulla fisiopatologia del danno cardiaco, in particolare sull'apoptosi e sulla mitosi dei cardiomiociti, sulla migrazione spontanea e sulla mobilitazione con citochine di cellule staminali provenienti dal midollo osseo. L'insieme di tali evidenze scientifiche ha aperto un nuovo orizzonte concettuale per i cardiologi, impensabile solo pochi anni fa: la possibilità teorica di interagire e potenziare processi riparativi intrinseci del miocardio, evidentemente insufficienti in condizioni fisiologiche, al fine di ottenere terapie mirate alla parziale o totale rigenerazione del muscolo cardiaco danneggiato o sofferente.

Apoptosi

Per apoptosi si intende la morte cellulare programmata e geneticamente controllata^{5,6}.

Tabella 1. Le quattro possibilità di trattamento dello scompenso cardiaco postinfartuale secondo von Harsdorf et al.¹

<i>Dinosaur approach</i>	Terapie farmacologiche convenzionali
<i>Newt approach</i>	Possibilità di indurre la replicazione di cardiomiociti endogeni, come avviene per alcuni anfibi in grado di rigenerare parte del loro cuore
<i>Dolly approach</i>	Possibilità di clonare un nuovo cuore
<i>Flatworm approach</i>	Possibilità di far ricrescere i propri organi, come accade in questo elminto

A differenza della necrosi, l'apoptosi è attivata da diverse molecole regolatrici e dall'esposizione a stimoli nocivi⁷, molti dei quali sicuramente presenti nel microambiente del miocardio infartuato.

Evidenze sperimentali suggeriscono che i cardiomiociti possono andare in apoptosi se sottoposti ad ipossia⁵, ad infarto miocardico⁷, a scompenso cardiaco⁸, a riperfusione dopo ischemia⁹. Durante una sindrome coronarica acuta la percentuale delle cellule apoptotiche è inoltre significativamente più alta nelle zone a margine dell'area infartuata (*border zones*) rispetto a quella riscontrata nelle aree centrali dell'infarto e nelle aree non interessate dall'infarto¹⁰.

In campo neurologico sono in corso studi clinici che utilizzano farmaci inibenti l'apoptosi nelle patologie degenerative del sistema nervoso centrale¹¹. Lo studio del fenomeno apoptotico nel cuore ha suggerito la possibilità di intervenire sui fenomeni cellulari che determinano l'apoptosi, con il tentativo di controllarli o prevenirli utilizzando farmaci capaci di interferire con questo processo di morte cellulare programmata.

Rigenerazione dei cardiomiociti

Alcuni anni fa si riteneva che il numero di cardiomiociti presenti alla nascita andasse diminuendo con il passare degli anni, senza fenomeni di rigenerazione¹²⁻¹⁴. Recentemente è stata evidenziata per la prima volta nell'uomo la presenza di una sottopopolazione di miociti in grado di replicarsi dopo IMA¹⁵ e scompenso cardiaco congestizio¹⁶. Il numero di miociti in replicazione, dimostrato dalla presenza dell'antigene di replicazione cellulare Ki-67, è significativamente più elevato nelle *border zones*¹⁵.

Alla luce di tali evidenze è apparso chiaro che il cuore adulto non è un organo postmitotico e si è delineata l'ipotesi che la rigenerazione di miociti possa comportare un incremento della massa muscolare del miocardio, soprattutto dopo l'insulto ischemico⁵.

Migrazione spontanea di cellule staminali midollari nel cuore

In soggetti adulti, cellule staminali extracardiache sono capaci di migrare e ripopolare il miocardio. Questo è stato dimostrato attraverso due indagini che hanno utilizzato come marker dell'origine midollare delle cellule la presenza di nuclei contenenti il cromosoma Y. La

prima ha individuato cardiomiociti cromosoma Y-positivi nel cuore di pazienti deceduti di sesso maschile trapiantati con cuore di soggetti di sesso femminile^{17,18}; la seconda cardiomiociti cromosoma Y-positivi in cuori autoptici di donne che erano state sottoposte a trapianto di midollo osseo da donatori maschili¹⁹.

Questi studi hanno fornito le premesse scientifiche necessarie per i futuri tentativi di capire ed incrementare la naturale mobilitazione, l'insediamento nel miocardio e la differenziazione delle cellule provenienti dal midollo osseo.

Mobilizzazione sotto stimolo di cellule staminali midollari

Studi sperimentali sull'animale hanno dimostrato l'effetto rigenerativo in zone infartuate da parte di cellule staminali midollari mobilitate attraverso stimoli citochinici. La più importante esperienza è quella riportata da Orlic et al.²⁰, che hanno utilizzato il fattore per le cellule staminali (SCF) e il fattore stimolante le colonie di granulociti (G-CSF) in presenza di un IMA sperimentalmente indotto dalla legatura di una coronaria, riportando un significativo grado di rigenerazione tissutale dopo appena 27 giorni.

L'immagine che mostra la sezione istologica trasversale del cuore di topo trattato con citochine (Figura 1)²⁰ ha generato stupore; si è aperta così una strada di indagine per lo studio di nuove strategie terapeutiche non invasive per la rigenerazione del tessuto miocardico perduto in seguito ad infarto.

Which - Quali metodi, quali cellule, quali obiettivi

Quali metodi

La terapia cellulare nel tessuto miocardico può essere effettuata con due diversi procedimenti: il trapianto e la

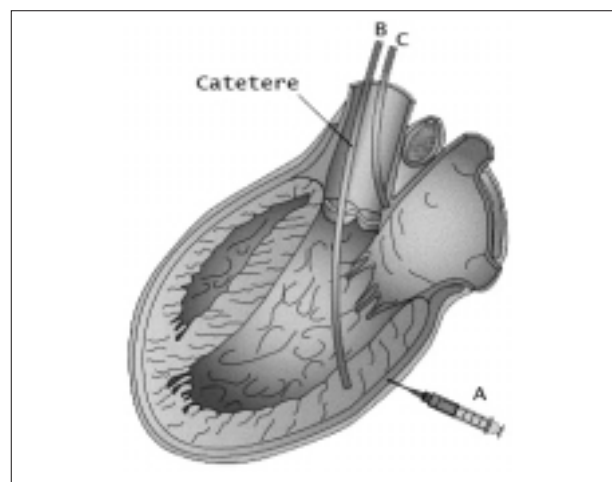


Figura 1. Potenziali metodiche di trapianto delle cellule. A: iniezione intramiocardica diretta attraverso l'epicardio; B: iniezione intramiocardica diretta attraverso l'endocardio; C: iniezione intracoronarica.

mobilizzazione di cellule. Entrambi i metodi sono studiati per valutarne le possibili applicazioni sulla cardiopatia ischemica e sullo scompenso cardiaco.

Il trapianto cellulare nell'uomo utilizza principalmente due tipi di cellule: i mioblasti scheletrici e le cellule staminali pluripotenti di midollo osseo di adulto (Tabelle 2-4)²¹⁻³⁷.

Le potenzialità dell'utilizzo di mioblasti scheletrici prelevati tramite biopsia da tessuto muscolare autologo vennero inizialmente studiate su modelli animali³⁸⁻⁴¹; su tali basi sperimentali Menasche et al.⁴² hanno realizzato il primo trapianto di mioblasti scheletrici nell'uomo e hanno successivamente presentato più ampie casistiche³³.

La replicazione e la differenziazione in cardiomiociti e cellule endoteliali sono state inizialmente ottenute iniettando cellule staminali ematopoietiche (prelevate dal midollo osseo) in un modello di infarto sperimentale⁴³. Altre evidenze da modelli animali hanno confermato che cellule pluripotenti del midollo osseo aumentano la funzione e la perfusione miocardica in una situazione sperimentale di cardiopatia ischemica^{44,45}.

La mobilizzazione cellulare è parte integrante della risposta flogistica che segue un danno miocardico acuto⁴⁶. Shintani et al.⁴⁷ hanno dimostrato per la prima volta sull'uomo la mobilizzazione di progenitori delle cellule endoteliali (EPC) e di cellule mononucleari CD34⁺ durante un evento di ischemia miocardica acuta, correlandola con il significativo aumento dei livelli plasmatici di fattore di crescita vascolare endoteliale. Alla luce di questo lavoro, la ricerca si è mossa nel tentativo di incrementare gli stimoli citochinici con lo scopo di aumentare la mobilizzazione cellulare.

Riassumendo, dei due procedimenti, il trapianto si configura come un processo *ex-novo* che non ha un corrispettivo fisiologico, mentre la mobilizzazione rappresenta il potenziamento di un fenomeno fisiologico comunque presente.

Trapianto: quali vie di somministrazione

Le principali tecniche sperimentate nel cuore umano per il trapianto di cellule (staminali adulte o mioblasti scheletrici) sono le seguenti (Figura 1):

- l'iniezione intracoronarica di cellule staminali in corso di procedure di rivascularizzazione percutanea. Gli studi che utilizzano questa tecnica sono tra i più numerosi (Tabella 2)²¹⁻²⁷, poiché risulta tecnicamente semplice associare alla procedura di angioplastica coronarica l'iniezione di cellule. Il catetere con palloncino viene introdotto nell'arteria coronaria responsabile dell'infarto e posizionato a livello della *border zone*, viene ripetutamente gonfiato per alcuni secondi e, in condizioni di assenza di flusso, vengono infuse ad alta pressione le cellule in sospensione. In questo modo, le cellule raggiungono la zona infartuata e quella circostante²¹;
- l'iniezione intramiocardica diretta attraverso l'epicardio ad opera del cardiocirurgo durante l'intervento di

bypass aortocoronarico. Vengono iniettate in regione sottoepicardica piccole quantità di cellule in sospensione (staminali o mioblasti), utilizzando un ago ipodermico, lungo la circonferenza dell'area infartuata³⁶ o all'interno dell'area infartuata stessa³³;

- l'iniezione intramiocardica diretta attraverso l'endocardio raggiunto con procedura percutanea attraverso speciale catetere (NOGA). In tale procedura, detta trans-endocardica, la punta del catetere aderisce alla superficie dell'endocardio nelle aree di interesse (miocardio cicatriziale o ibernato) individuato con tomografia computerizzata ad emissione di fotone singolo (SPECT) o con mappaggio elettromeccanico²⁹⁻³².

Mobilizzazione e differenziazione: quali stimoli

ANIMALE. Nell'animale sono stati effettuati studi utilizzando le citochine G-CSF, SCF e GM-CSF (fattore stimolante le colonie di granulociti e macrofagi). L'intera letteratura fa riferimento all'esperienza di Orlic et al.²⁰; essi hanno utilizzato SCF e G-CSF, già dimostratisi avere un effetto sinergico⁴⁸, nei 27 giorni successivi all'IMA indotto nel topo dalla legatura di un'arteria coronaria, ottenendo la crescita e differenziazione di tutte le popolazioni cellulari presenti nel miocardio e di conseguenza il riparo del danno cardiaco e il miglioramento della funzionalità. I risultati di questo studio sono stati contestati dalle successive esperienze di Murry et al.⁴⁹ e Balsam et al.⁵⁰. Utilizzando, infatti, marker genetici (rispettivamente LacZ e GFP) invece che proteine citoplasmatiche, questi autori hanno evidenziato che la quota di cellule staminali che vanno incontro a differenziazione in cellule cardiache, una volta trapiantate nel cuore di topo, è inferiore al 2%⁵¹.

L'utilizzo di queste citochine provoca la mobilizzazione dal midollo osseo sia di cellule staminali adulte⁵²⁻⁵⁷ che di cellule infiammatorie^{58,59}; permangono i dubbi se le cellule staminali adulte, come accade per altri organi^{60,61}, siano in grado di raggiungere e colonizzare il tessuto miocardico (*homing*), di proliferare e differenziarsi in miociti e strutture vascolari.

La risposta infiammatoria e il rilascio di citochine che seguono l'IMA sono diversi nell'animale e nell'uomo, in quanto specie-specifici⁶²; è importante perciò considerare sempre queste differenze, quando si effettua la mobilizzazione cellulare attraverso citochine nell'uomo.

UOMO. Nell'uomo la mobilizzazione di cellule staminali è ottenuta attraverso l'utilizzo di citochine e, più recentemente, di statine.

- Citochine. La sicurezza nell'impiego del G-CSF evidenziata in pazienti sani^{63,64} ed in soggetti affetti da malattie ematologiche⁵⁶ non è ancora confermata in soggetti con malattie cardiovascolari. Il MAGIC trial (Myoblast Autologous Grafting in Ischemia Cardiomyopathy)⁶⁵ ha infatti dimostrato i possibili effetti avversi della somministrazione sottocutanea di G-CSF

Tabella 2. Trial in pazienti con infarto miocardico acuto (IMA).

Studio	N. pazienti	Cellule	Dose	Via di inoculo	Tempo dopo IMA (giorni)	Risultati	
						Miglioramenti	No cambiamenti
Strauer et al. ²¹	10 trattati 10 controlli*	MNC	2.8 ± 2.2 × 10 ⁷	IC	5-9	Cinetica regionale [§] , dimensione infarto ↓, perfusione [§]	FEVS globale, VTDVS [§]
TOPCARE-AMI ^{22,23}	29 MNC 30 CPC 11 controlli*	MNC CPC	2.1 ± 0.8 × 10 ⁸ 1.6 ± 1.2 × 10 ⁷	IC	5 ± 2	Cinetica regionale [§] , FEVS globale [§] , dimensione infarto ↓ [§] , flusso coronarico [§]	VTDVS [§]
Fernandez-Aviles et al. ²⁴	20 trattati 13 controlli*	MNC	7.8 ± 4.1 × 10 ⁷	IC	14 ± 6	Cinetica regionale [§] , FEVS globale [§]	VTDVS [§]
BOOST ²⁵	30 trattati 30 controlli	NC	2.5 ± 0.9 × 10 ⁹	IC	6 ± 1	Cinetica regionale, FEVS globale	VTDVS, dimensione infarto
Chen et al. ²⁶	34 trattati 35 controlli	MSC	4.8 ± 6.0 × 10 ¹⁰	IC	18	Cinetica regionale, FEVS globale, dimensione infarto ↓, VTDVS ↓	
Vanderheyden et al. ²⁷	12 trattati 10 controlli*	CD133 ⁺	6.6 ± 1.4 × 10 ⁶	IC	14 ± 6	Cinetica regionale [§] , FEVS globale [§] , perfusione [§]	

CD133⁺ = cellule CD133⁺ midollari; CPC = cellule progenitrici circolanti derivate dal sangue; FEVS = frazione di eiezione del ventricolo sinistro; IC = intracoronarica; MNC = cellule mononucleari midollari; MSC = cellule staminali mesenchimali midollari; NC = cellule nucleate midollari; VTDVS = volume telediastolico del ventricolo sinistro. * gruppi di controllo non randomizzati; § effetti riportati solo nei gruppi trattati. Da Wollert e Drexler²⁸, modificata.

Tabella 3. Trial in pazienti con ischemia miocardica e senza possibilità di rivascularizzazione.

Studio	N. pazienti	FEVS (%)	Cellule	Dose	Via di inoculo	Risultati	
						Soggettivi	Oggettivi
Tse et al. ²⁹	8 trattati	58 ± 11	MNC	40 ml BM	Transendocardica (guidata da EMM)	Angina ↓ [§]	Perfusione ↑ [§] , cinetica regionale ↑ [§]
Fuchs et al. ³⁰	10 trattati	47 ± 10	NC	7.8 ± 6.6 × 10 ⁷	Transendocardica (guidata da EMM)	Angina ↓ [§]	Perfusione ↑ [§]
Perin et al. ^{31,32}	14 trattati 7 controlli*	30 ± 6	MNC	3.0 ± 0.4 × 10 ⁷	Transendocardica (guidata da EMM)	Angina ↓, classe NYHA ↓	Perfusione ↑ [§] , cinetica regionale ↑ [§] , FEVS globale ↑

BM = midollo osseo; EMM = mappaggio elettromeccanico; FEVS = frazione di eiezione del ventricolo sinistro; MNC = cellule mononucleari midollari; NC = cellule nucleate midollari; NYHA = New York Heart Association. * gruppi di controllo non randomizzati; § effetti riportati solo nei gruppi trattati. Da Wollert e Drexler²⁸, modificata.

Tabella 4. Trial in pazienti con cardiomiopatia ischemica e scompenso cardiaco.

Studio	N. pazienti	FEVS (%)	Cellule	Dose	Tempo dopo IMA	Via di inoculo	Risultati
Menasche et al. ³³	10 trattati	24 ± 4	Mioblasti	8.7 ± 1.9 × 10 ⁸	3-228 mesi	Transepicardica (durante CABG)*	Cinetica regionale ↑, FEVS globale ↑
Siminiak et al. ³⁴	10 trattati	25-40	Mioblasti	0.04-5.0 × 10 ⁷	4-108 mesi	Transepicardica (durante CABG) [§]	Cinetica regionale ↑, FEVS globale ↑
Chachques et al. ³⁵	20 trattati	28 ± 3	Mioblasti	3.0 ± 0.2 × 10 ⁸	NR	Transepicardica (durante CABG)*	Cinetica regionale ↑, FEVS globale ↑, vitalità nell'area infartuata ↑
Stamm et al. ³⁶	12 trattati	36 ± 11	CD133 ⁺	1.0-2.8 × 10 ⁶	3-12 settimane	Transepicardica (durante CABG)*	FEVS globale ↑, VTDVS ↑, perfusione ↑
Assmus et al. ³⁷	51 MNC 35 CPC 16 controlli	40 ± 11	MNC CPC	1.7 ± 0.8 × 10 ⁸ 2.3 ± 1.2 × 10 ⁷	3-144 mesi	IC	FEVS globale ↑ (solo nel gruppo MNC)

CABG = bypass aortocoronario; CD133⁺ = cellule CD133⁺ midollari; CPC = cellule progenitrici circolanti derivate dal sangue; FEVS = frazione di eiezione del ventricolo sinistro; IC = intra-coronaria; IMA = infarto miocardico acuto; MNC = cellule mononucleari midollari; NR = non riportato; VTDVS = volume telediastolico del ventricolo sinistro. * CABG solo in zone non iniettate; § CABG in zone iniettate e non. Da Wollert e Drexler²⁸, modificata.

in pazienti entro le 48 h dallo sviluppo di sintomi di IMA. In particolare sono stati registrati un aumentato spessore della tonaca intima nella zona dello stent ed un alto numero di fenomeni di restenosi che hanno causato l'interruzione della sperimentazione. In questo studio la somministrazione di citochine precedeva l'intervento di angioplastica, che veniva quindi effettuato in una condizione di importante flogosi sistemica. Lavori più recenti utilizzano il G-CSF nei giorni successivi la procedura di rivascularizzazione⁶⁶⁻⁶⁹, non registrando incrementi del numero di restenosi⁷⁰; risulta ancora difficile però valutare la sicurezza e l'efficacia di questo approccio.

Le cellule infiammatorie, mobilitate insieme alle cellule staminali con l'utilizzo di G-CSF, potrebbero in parte incrementare l'infiammazione delle placche aterosclerotiche (fattore predisponente la loro crescita e destabilizzazione⁷¹) ed i fenomeni di restenosi⁷². Non è noto quale numero di cellule infiammatorie circolanti può essere raggiunto senza causare eventi avversi, per esempio, in un paziente affetto da coronaropatia multi-vasale stabile o rivascularizzato con angioplastica – con o senza l'impianto di stent – o comunque cardiopatico. Questo costringe ad utilizzare piccole dosi di citochine nell'uomo, che potrebbero non essere sufficienti per ottenere un'adeguata mobilitazione di cellule staminali.

L'utilizzo di citochine nell'uomo si può oggi paragonare a quello di immunosoppressori in pazienti reumatologici; sembra incidere positivamente sul miglioramento della funzionalità d'organo ma, per l'azione sistemica, complica la malattia coronarica già presente.

- **Statine:** mobilitazione e differenziazione. Rappresenta un nuovo punto di interesse la capacità delle statine di mobilitare le EPC dal midollo osseo, documentata sia in animali^{73,74} che nell'uomo⁷⁵. Da tempo l'impiego degli inibitori dell'enzima 3-idrossi-3-metilglutaril-coenzima A riduttasi costituisce il principale approccio terapeutico per la riduzione dei livelli di colesterolo nell'uomo⁷⁶. Inoltre le statine possiedono effetti positivi indipendenti dalla riduzione del colesterolo^{77,78}; in particolare diminuiscono la proliferazione delle cellule muscolari lisce *in vitro* e l'infiammazione neointimale *in vivo* in modelli animali^{79,80} riducendo gli eventi di restenosi dopo l'impianto coronarico di stent⁸¹.

L'effetto mobilizzante delle statine è stato dimostrato per la prima volta nell'uomo trattando 15 pazienti con sindrome coronarica stabile con 40 mg/die di atorvastatina⁷⁵. Si è osservato un progressivo aumento delle EPC circolanti già a partire dalla settimana seguente l'inizio della terapia (aumento di 1.5 volte dopo 1 settimana, di 3 volte dopo 4 settimane)⁷⁵. Nell'animale è stato dimostrato che queste cellule, una volta mobilitate, si concentrano nella *border zone* dell'infarto⁸² e che sono in grado di aumentare la neovascolarizzazione di tessuti ischemici⁸³.

L'effetto pro-differenziativo delle statine è stato rilevato nei confronti delle EPC. Le EPC, prelevate da

sangue umano, se coltivate con cardiomiociti di topo, sono in grado di transdifferenziarsi in cardiomiociti⁸⁴. La terapia con statine *in vivo* incrementerebbe questa naturale capacità differenziativa delle EPC (da $3.56 \pm 0.72\%$ senza statine a $6.36 \pm 0.69\%$ con le statine, $p = 0.01$)⁸⁵.

Concludendo, le statine sono in grado di mobilitare le EPC dal midollo osseo (cellule che per loro natura causerebbero neoangiogenesi nel cuore ischemico) e di favorire la differenziazione in cardiomiociti delle EPC da loro mobilitate. I due effetti potrebbero anche essere contemporanei, causando quindi sia neovascolarizzazione che aumento della massa cardiaca nel cuore danneggiato. Il contributo *in vivo* di questi fenomeni non è ancora stato dimostrato e si attendono i risultati di diversi studi clinici in corso.

Quali cellule

Oggi l'interesse è focalizzato su alcuni tipi cellulari, ed in particolare su cellule staminali/progenitrici adulte, mioblasti scheletrici e cellule staminali cardiache residenti. Un'ulteriore opportunità è rappresentata dall'utilizzo delle cellule staminali embrionali.

Le cellule staminali/progenitrici adulte possono essere selezionate a diversi livelli di maturazione, valutando l'espressione di particolari antigeni di superficie, tra cui CD34 e CD133. La cellula staminale adulta è potenzialmente in grado di differenziarsi in un'altra identica cellula staminale o in una cellula progenitrice; la cellula progenitrice è destinata a dare origine unicamente a cellule differenziate (Figura 2A).

La maggior parte degli studi (Tabelle 2-4)²¹⁻³⁷ è stata effettuata utilizzando cellule non selezionate del midollo osseo, tra le quali sono presenti, oltre alle EPC, anche le cellule staminali ematopoietiche e le cellule staminali mesenchimali. I motivi che ne hanno determinato l'utilizzo sono: 1) la possibilità di sfruttare al meglio la potenzialità differenziativa multilineare propria delle cellule midollari; 2) la facilità di esecuzione del prelievo e la "manipolazione minima" *in vitro*; 3) la necessità di un sistema veloce di isolamento e trapianto cellulare per poter procedere negli immediati giorni successivi all'infarto (da 5 a 20 giorni dopo).

I mioblasti scheletrici, ottenuti biopsiando il tessuto muscolare, vengono coltivati *ex-vivo*, trapiantati in aree cicatriziali miocardiche con iniezione intramiocardica diretta di cellule attraverso l'epicardio³³.

La recente scoperta di cellule staminali cardiache residenti, capaci di differenziarsi in cardiomiociti e strutture vascolari, suggerisce la loro possibile applicazione per il riparo del tessuto cardiaco⁸⁶⁻⁹⁰. Le cellule staminali cardiache residenti ottenute da una biopsia miocardica possono essere espanse e quindi trapiantate; la loro efficacia è già stata riscontrata su topi⁹⁰, ma non esistono ancora studi clinici al riguardo. È ipotizzabile, ma ancora da dimostrare, che le cellule del midollo osseo contengano una popolazione di cellule staminali con simili caratteristiche⁹¹.

Le cellule staminali embrionali costituiscono una fonte cellulare alternativa. I recenti studi di xenotrapianto condotti su modello animale dimostrano le capacità differenziative di queste cellule in senso cardiomiocitario^{92,93}. Tuttavia il trapianto allogenico (che necessita di una terapia immunosoppressiva per evitare la reazione di rigetto⁹⁴), la tumorigenicità ed il dibattito etico vincolano attualmente l'utilizzo di queste cellule alla ricerca di base.

Quali obiettivi

I dati disponibili in letteratura orientano ad utilizzare la terapia cellulare per ottenere: 1) un aumento del tessuto muscolare con conseguente incremento della massa cardiaca e della contrattilità miocardica; 2) la formazione di nuovi vasi che vadano ad irrorare la zona ischemica; 3) la stimolazione del tessuto cardiaco per effetto paracrino⁷¹.

I primi due obiettivi, che potremmo definire cardiomiogenesi e angiogenesi, presuppongono l'esistenza di fenomeni di differenziazione delle cellule trapiantate in strutture muscolari e/o vascolari. Non sono ancora del tutto chiari i meccanismi che governano la capacità differenziativa (plasticità) delle cellule progenitrici/staminali; alcuni autori sostengono l'esistenza di processi di differenziazione/transdifferenziazione dovuti al semplice contatto delle cellule trapiantate con il tessuto ospite⁴³ (Figura 2B), altri parlano di fusione piuttosto che di differenziazione^{95,96}, suggerendo quindi la possibilità che lo scambio di materiale genetico tra cellule progenitrici/staminali impiantate e cardiomiociti residenti sia alla base della trasformazione cellulare^{97,98} (Figura 2C); altri ancora non individuano alcun fenomeno di differenziazione cellulare^{49,50}. Alcune sessioni del recente congresso della Società Europea di Cardiologia a Stoccolma sono state dedicate a questo tema; i dati discordanti ricavati da studi sperimentali sull'animale non permettono ancora oggi di avere evidenze scientifiche condivise⁹⁹⁻¹⁰¹. L'associazione di terapie geniche *in vitro* sulle cellule staminali prima del loro trapianto viene già proposta ed indagata nell'animale come possibile via attraverso cui ottenere il rilascio di segnali intra- ed extracellulari favorevoli l'attecchimen-

to e la differenziazione delle cellule staminali/progenitrici ed effetti paracrini sul miocardio^{102,103}.

Allo stato attuale non è nota *in vivo* la dinamica biologica di queste cellule trapiantate nel tessuto cardiaco e neppure come si comportino, se aumentando lo spessore della parete muscolare o promuovendo fenomeni di angiogenesi od entrambi. Perciò, occorre procedere con studi sperimentali *in vitro* ed *in vivo* su animali prima di proporre l'impiego di questo tipo di terapia nell'uomo⁵¹.

I primi risultati ottenuti con la terapia cellulare sembrerebbero dimostrare un costante aumento della contrattilità cardiaca e della perfusione miocardica. Non sappiamo però, come scrivono alcuni autori, quale sia la popolazione di cellule staminali provenienti dal midollo osseo che contribuisce maggiormente a questi miglioramenti ed in che modo agisca sul miocardio²².

Where - Dove trapiantare le cellule

Possiamo immaginare di dividere la superficie miocardica interessata dall'infarto in tre differenti zone: quella centrale primariamente colpita; quella marginale o *border zone*, che separa la parte danneggiata da quella sana; quella remota, non interessata dall'ischemia. Sia nel modello animale che nell'uomo la maggior parte degli studi hanno individuato la *border zone* quale bersaglio dove trapiantare le cellule. Immediatamente dopo l'infarto, l'estensione di questa porzione di miocardio è limitata e la sua funzione è solo in parte alterata¹⁰⁴. La situazione tende poi a peggiorare con il passare del tempo.

La *border zone* riveste particolare importanza perché in essa si concentrano fenomeni apoptotici contemporaneamente e successivamente alla necrosi della fase acuta dell'infarto¹⁰, perché in essa si registra la massima rigenerazione di cardiomiociti¹⁵ e perché ha un ruolo fondamentale nell'influenzare il rimodellamento del ventricolo postinfartuato¹⁰⁵. Inoltre, come è stato dimostrato nell'animale, è in tale zona che si riscontra l'aumento più significativo di spessore della parete ventricolare e della vascolarizzazione dopo il trapianto di cellule staminali midollari¹⁰⁶.

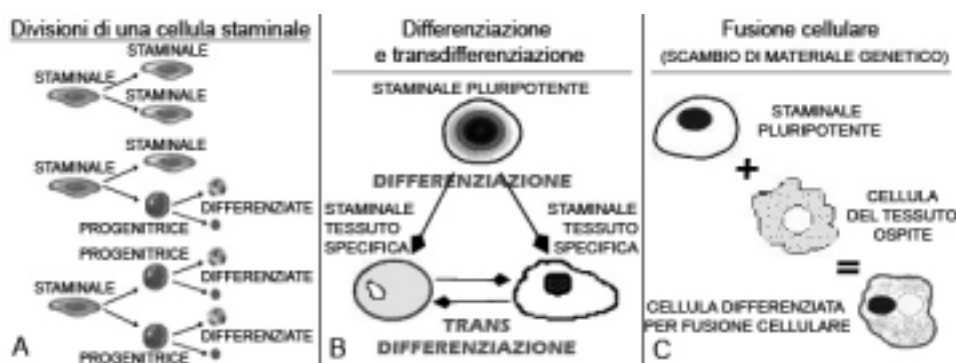


Figura 2. Possibili spiegazioni della plasticità delle cellule staminali.

Strauer et al.²¹ sono stati i primi ad iniettare le cellule all'interno della coronaria in corrispondenza della *border zone*²¹; i successivi studi BOOST e TOPCARE-AMI (Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction) hanno seguito la stessa procedura e avrebbero dimostrato in tale zona un importante miglioramento della cinetica regionale rilevabile a 4, 6 e 12 mesi^{22,23,25} e il maggior *homing* delle cellule staminali trapiantate¹⁰⁷.

Stamm et al.³⁶ sono stati i primi ad iniettare le cellule per via epicardica nella *border zone*.

Gli studi effettuati con iniezione transendocardica hanno identificato aree con diminuita perfusione e attività meccanica attraverso l'uso di SPECT e mappaggio elettromeccanico e hanno scelto quelle come punti privilegiati dove effettuare le iniezioni^{28,30,31}; non sappiamo se queste corrispondano alle *border zones* dell'infarto.

La *border zone* sembra quindi essere la zona più adatta a favorire l'attecchimento e la differenziazione cellulare, per il suo particolare microambiente. In essa inoltre si svilupperebbe, nel modo più efficace, l'attività contrattile, vascolare o paracrina delle cellule trapiantate, attraverso la soppressione dell'apoptosi e del rimodellamento cardiaco e il miglioramento della cinetica globale del ventricolo.

When - Quando eseguire il trapianto: terapia cellulare precoce o ritardata

Terapia cellulare precoce

Tra le applicazioni della terapia cellulare quelle "in acuto" (Figura 3) sono tra le più numerose ed ormai diffuse in tutto il mondo, soprattutto in Germania (Tabelle 1 a 2)²¹⁻²⁷.

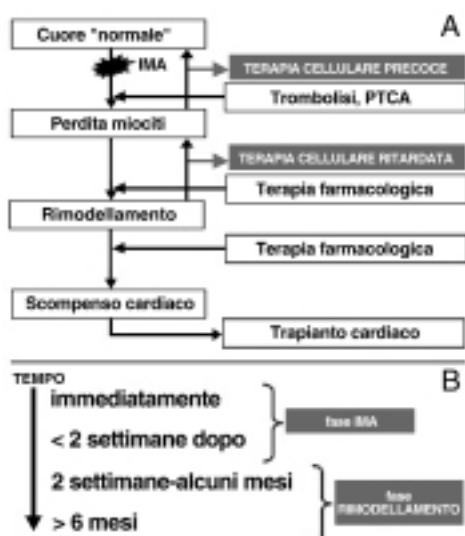


Figura 3. A: possibili momenti in cui utilizzare la terapia cellulare. B: le fasi dell'infarto miocardico acuto (IMA) e loro durata. PTCA = angioplastica coronarica.

A favore dell'utilizzo della terapia cellulare immediatamente dopo IMA sono l'incremento della cinetica regionale di parete e della frazione di eiezione globale del ventricolo sinistro riscontrati in generale negli studi fino ad oggi eseguiti e la presenza degli stimoli necessari alla corretta differenziazione delle cellule staminali/progenitrici trapiantate.

Per contro non vengono segnalate modificazioni del volume telediastolico, implicato nel determinare l'ipertrofia ventricolare eccentrica che precede la dilatazione della camera cardiaca e la successiva insufficienza cardiaca. La terapia cellulare "acuta" non sembra quindi in grado di intervenire sul rimodellamento patologico del ventricolo e di confermare a lungo termine i buoni risultati ottenuti in acuto.

Inoltre, studi sull'animale dimostrerebbero che durante IMA meno del 2% delle cellule trapiantate o iniettate diventano *in vivo* cellule cardiache^{88,95} ed alcuni autori non avrebbero ritrovato nel cuore nessuna delle cellule CD133⁺ trapiantate⁴¹; quindi gli intensi fenomeni infiammatori ed apoptotici presenti nella fase acuta (3-4 giorni dopo l'infarto)²¹, ritenuti importanti – se non essenziali – nel determinare la corretta differenziazione cellulare, potrebbero indirizzare le cellule trapiantate ad incrementare la risposta infiammatoria piuttosto che la neoformazione di tessuto cardiaco. D'altra parte, recenti esperienze nell'uomo (BOOST trial)²⁵ hanno ottenuto evidenze di *homing* cellulare intramiocardico di cellule CD34⁺ dopo iniezione intracoronarica¹⁰⁷. È quindi necessario capire quale sia il miglior *timing* per l'utilizzo della terapia cellulare in acuto.

Terapia cellulare ritardata

La terapia cellulare ritardata (Figura 3) è di grande interesse per i pazienti che abbiano avuto un infarto miocardico ad evoluzione dilatativa e che presentino insufficienza cardiaca (Tabelle 3 e 4)²⁹⁻³⁷ ad eziologia ischemica; si consideri infatti che, per il loro costante aumento, lo scompenso cardiocircolatorio rappresenta la principale causa di morte nel mondo industrializzato¹⁰⁸. A svantaggio della terapia cellulare ritardata sarebbe l'assenza nel cuore delle condizioni necessarie per l'*homing* delle cellule staminali/progenitrici e la loro differenziazione. Iniettando direttamente *in loco* (per via transendocardica)^{31,32} o attraverso particolari *scaffolds* le cellule staminali/progenitrici ed utilizzando cellule autologhe parzialmente/totalmente differenziate *in vitro* o cellule capaci di generare, per naturale inclinazione anche sotto debole stimolazione, tessuto muscolare (per esempio le cellule staminali mesenchimali midollari) o vascolare (per esempio le EPC) si potrebbe tentare di risolvere questi due problemi.

I mioblasti scheletrici vengono utilizzati unicamente come terapia cellulare ritardata, con un trapianto diretto a cuore aperto nella zona cicatriziale. Essendo cellule terminalmente differenziate, non sono in grado di trasformarsi in cardiomiociti o cellule endoteliali (anche se in studio c'è la possibilità di modificare *in vitro*, prima

del trapianto, le loro capacità differenziative rendendoli idonei alla trasformazione in muscolo cardiaco). Alcune criticità riguardano la loro capacità di integrazione nel sistema elettrico cardiaco, la loro efficacia nel migliorare la funzione di pompa, e, soprattutto, la potenziale aritmogenicità. Dopo i primi studi sull'animale³⁸⁻⁴¹ e sull'uomo^{33,42}, sono attesi i risultati sul beneficio meccanico che consegue il trapianto di mioblasti scheletrici dello studio MAGIC di fase II, che prevede la protezione antiaritmica con impianto di defibrillatore automatico. Sono attesi risultati sul beneficio meccanico che consegue il trapianto di mioblasti scheletrici.

Who - Quale paziente

Il crescente bisogno di nuove strategie terapeutiche in grado di modificare la storia naturale della patologia ischemica cardiaca ha fatto porre molta attenzione sulle possibilità offerte dall'utilizzo delle cellule staminali/progenitrici e dei mioblasti scheletrici. Nonostante le numerose sperimentazioni sia sull'animale che nell'uomo, non sono disponibili ad oggi evidenze sufficienti per proporre l'impiego clinico di routine.

Le attuali ricerche cliniche utilizzano la terapia cellulare nell'IMA (Tabella 2)²¹⁻²⁷, nell'ischemia miocardica senza possibilità di rivascolarizzazione (Tabella 3)²⁹⁻³² e nello scompenso cardiaco cronico (Tabella 4)³³⁻³⁷. Dimostrata la sicurezza e l'effettiva efficacia di tali applicazioni, i candidati preferenziali potrebbero essere pazienti che con le attuali terapie non sono trattati in modo soddisfacente. Alcuni esempi sono il paziente con scompenso cardiaco cronico, nel quale la terapia farmacologica non permette di ottenere un adeguato compenso emodinamico, il paziente con grave scompenso cardiaco postischemico e senza altre opzioni terapeutiche di rivascolarizzazione meccanica ed infine il paziente con coronaropatia multivasale diffusa non trattabile con tecniche convenzionali.

Discussione

Dopo aver delineato il possibile campo d'azione della terapia con cellule staminali adulte e alla luce dei dati di letteratura, emergono alcune criticità che devono essere tenute presenti.

Indagine statistica

Gli studi clinici di terapia cellulare cardiaca eseguiti fino ad ora comprendono piccole popolazioni di pazienti. I criteri di inclusione ed esclusione sono differenti nelle varie casistiche; anche la raccolta dei dati nei follow-up non è omogenea. Tutto ciò non permette di aggregare i dati disponibili in metanalisi. Risulta quindi necessario pianificare studi multicentrici con una numerosità adeguata, per ricavare dati significativi sulla sicurezza, efficacia e fattibilità della tecnica.

Analisi istologica

A differenza delle rilevazioni fatte su sezione istologica negli animali da esperimento, nell'uomo non sono state indagate tramite biopsia cardiaca l'attecchimento e la differenziazione delle cellule trapiantate. È stata proposta la valutazione *post-mortem* in pazienti deceduti dopo essere stati sottoposti al trapianto cellulare³¹, ma non esiste quasi casistica al riguardo.

Trapianto e procedura primaria

Negli studi compiuti fino ad ora nell'uomo, la terapia cellulare è stata somministrata a completamento di una procedura di rivascolarizzazione percutanea o chirurgica (Tabelle 2-4)²¹⁻³⁷; risulta pertanto di estrema difficoltà distinguere il beneficio sicuro della rivascolarizzazione dal beneficio possibile della terapia cellulare, come segnalato sia da studi associati ad angioplastica²¹ che da studi associati a bypass aortocoronarico^{33,36}.

Si potranno ricondurre alla terapia cellulare i miglioramenti che si dimostreranno indipendenti dalla procedura di rivascolarizzazione e risulteranno stabili o progressivi nel tempo.

Le stesse procedure di iniezione intramiocardica e di occlusione coronarica temporanea ed intermittente connesse al trapianto potrebbero influenzare i risultati ottenuti^{22,31,36}.

Frazione di eiezione e volumi ventricolari

I parametri che più spesso vengono utilizzati dagli autori per documentare l'efficacia della terapia cellulare sono la frazione di eiezione globale, i volumi ventricolari (telesistolico e telediastolico) e la contrattilità regionale. Tuttavia la rilevazione di questi parametri è effettuata tramite metodiche di imaging che hanno notevoli limiti sia nella fase di acquisizione che in quella di analisi dei dati, dipendenti dall'apparecchiatura impiegata ma soprattutto dall'esperienza dell'operatore. Per valutare gli effetti della terapia cellulare sui parametri morfologici e funzionali inerenti alla funzione ventricolare sinistra è necessario conoscere per ciascun parametro quale sia la variabilità inter- ed intraosservatore ed effettuare valutazioni in cieco.

La maggior parte dei lavori non rilevano significative diminuzioni del volume telediastolico^{21-24,31,33} ma unicamente del volume telesistolico^{22,23,25}. Dati più recenti dello studio BOOST evidenziano che la terapia cellulare intracoronarica è in grado di attenuare la progressione della disfunzione diastolica in pazienti post-infartuali¹⁰⁹.

L'aumento della frazione di eiezione sembra essere un evento relativamente "acuto", che riguarda il periodo post-trapianto; lo studio TOPCARE-AMI evidenzia, dopo un picco di circa +8% a 4 mesi nei pazienti trattati, una variazione percentuale della frazione di eiezione (da 6 a 12 mesi) dello 0.8%^{22,23}; Chen et al.²⁶ non riscontrano cambiamenti della frazione di eiezione da 3 mesi in poi. Resta da dimostrare il permanere di tale miglioramento a distanza di tempo.

Neoangiogenesi

Non c'è finora nell'uomo alcuna dimostrazione della presenza di fenomeni di neoangiogenesi conseguenti al trapianto di cellule.

Molti studi su animale hanno dimostrato che l'integrazione tra cellule trapiantate e cellule presenti nel tessuto ospite provoca la formazione di nuove strutture vascolari^{45,82,106,110-115}. Qualora questo fenomeno si verificasse anche nell'uomo, la sua dimostrazione si potrebbe avere in maniera indiretta con metodiche di imaging quali SPECT e tomografia ad emissione di positroni impiegando traccianti metabolici quali l'¹⁸F-fluorodesossiglucosio.

Anche in questo caso si è cercato di distinguere i benefici dovuti alle procedure di rivascolarizzazione da quelli legati al trapianto cellulare^{21-23,26}. Per scindere i risultati cellule CD133⁺, selezionate per la loro spiccata capacità di differenziazione angiogenetica¹¹⁶, sono state iniettate in un'altra area rispetto a quella dove era effettuato il bypass; la successiva analisi con SPECT ha evidenziato un importante incremento della perfusione miocardica³⁶.

Sono questi gli unici elementi attualmente disponibili che, per quanto indiretti, orienterebbero all'esistenza di fenomeni di neoangiogenesi nel cuore umano adulto.

Effetto paracrino

Recenti lavori sia nell'animale che nell'uomo hanno sottolineato la potenziale azione paracrina di cellule staminali midollari iniettate in tessuti ischemici¹¹⁷⁻¹²¹; queste cellule sarebbero in grado di promuovere nel cuore la formazione di nuove strutture vascolari non tanto attraverso il loro attecchimento e differenziazione ma per il rilascio di fattori angiogenici (come il fattore di crescita vascolare endoteliale e il fattore di crescita dei fibroblasti) e citochine (come l'interleuchina-1 β e il fattore di necrosi tumorale- α) e il conseguente stimolo su cellule residenti nel miocardio¹²².

Effetti collaterali

Per quanto riguarda le complicanze, tutti i pazienti hanno tollerato bene l'ischemia transitoria provocata dalla procedura di angioplastica coronarica o l'iniezione intramiocardica con catetere; le modificazioni degli enzimi cardiaci e dei marker infiammatori sono risultate nella norma. Negli studi di iniezione cellulare intracoronarica, non sono stati riportati eventi di restenosi^{21,26} o questi non sono risultati superiori^{22,24,25} a quelli che in media si verificano in soggetti con IMA sottoposti ad angioplastica con stent¹²³. La registrazione elettrocardiografica secondo Holter non ha segnalato importanti alterazioni di tipo ipo/ipercinetico nei pazienti trattati con cellule staminali/progenitrici; in 4 di 10 pazienti trattati con mioblasti scheletrici sono stati invece registrati episodi di tachicardia ventricolare sostenuta che hanno costretto all'impianto di defibrillatore automatico³³. I tassi di riospedalizzazione dello studio TOPCARE-

AMI (0 pazienti su 59 in 1 anno di follow-up)^{22,23} sembrerebbero inoltre dimostrare una riduzione significativa degli episodi di scompenso cardiaco acuto.

Conclusioni

Nell'ultimo decennio la terapia cellulare ha mosso l'interesse di molti laboratori d'eccellenza che hanno realizzato diversi modelli sperimentali nell'animale e hanno affrontato le prime applicazioni cliniche nell'uomo, suscitando talvolta attese fuori misura. Numerosi sono i lavori comparsi in letteratura ed i tentativi di sintesi sull'argomento^{28,71}. In molte situazioni gli incoraggianti risultati ottenuti nel modello animale non hanno trovato conferme nell'esperienza sull'uomo; in pochi studi condotti sull'uomo, seppur con casistiche limitate, sembrano delinearsi risultati interessanti^{22,23,25,37}. Tuttavia sono molte le problematiche aperte e limitate le nostre conoscenze. La ricerca di base su preparati *in vitro* e su modelli animali rimane un elemento indispensabile per evidenziare i meccanismi coinvolti nel delicato equilibrio della differenziazione cellulare che segue il trapianto di cellule staminali adulte.

Ad oggi, si dispone di esperienze su popolazioni differenziate e su casistiche estremamente limitate. Considerata anche l'incertezza dei risultati, è importante che vengano coordinati ampi studi multicentrici randomizzati con un'adeguata selezione dei pazienti. Per far questo è necessario che le società scientifiche e gli esperti qualificati riuniti in *consensus conferences*, nazionali o internazionali, a) individuino i parametri per definire i pazienti cardiopatici nei quali sperimentare la terapia cellulare, b) coordinino trial multicentrici con significativi numeri di pazienti arruolati, c) forniscano dati in grado di dare informazioni chiare sull'efficacia o meno della terapia cellulare cardiaca.

Riassunto

La terapia cellulare è stata proposta come innovativa ipotesi di trattamento per i pazienti con infarto miocardico acuto e con scompenso cardiaco postinfartuale. Il meccanismo attraverso cui le cellule staminali possono intervenire nel migliorare la funzione cardiaca è dibattuto e l'interpretazione dei dati sperimentali e clinici suscita più domande che risposte. Rispondendo alle cinque "WH questions" anglosassoni vengono discusse le fasi che hanno portato a considerare la terapia cellulare come un nuovo tipo di trattamento in grado di ottenere la rigenerazione miocardica. 1) *Why* - perché usare le cellule staminali? Il razionale deriva dalla scoperta che apoptosi e rigenerazione avvengono a livello miocardico e che le cellule staminali migrano dal midollo osseo ripopolando il tessuto cardiaco danneggiato. 2) *Which* - quali sono le cellule più adatte, i metodi di rilascio e gli obiettivi terapeutici? Le cellule staminali adulte possono essere mobilitate o direttamente trapiantate nel cuore umano per ottenere miocardioneogenesi, neoangiogenesi e/o effetti paracrini sul tessuto cardiaco. 3) *Where* - dove trapiantare le cellule? La *border zone* dell'infarto sembra essere il posto migliore per l'*homings* e la differenziazione delle cellule trapiantate e per controllare il ri-

modellamento cardiaco postischemico. 4) *When* - quando utilizzare la terapia cellulare? La terapia cellulare dovrebbe essere utilizzata durante o dopo un infarto miocardico acuto: l'ambito e la tempistica migliori devono ancora essere definite. 5) *Who* - quale paziente trattare? Sono necessari ulteriori studi multicentrici randomizzati con un'adeguata selezione dei pazienti per rispondere a questa domanda cruciale.

Parole chiave: Cellule staminali; Infarto miocardico; Scompenso cardiaco; Terapia cellulare.

Bibliografia

1. von Harsdorf R, Poole-Wilson PA, Dietz R. Regenerative capacity of the myocardium: implications for treatment of heart failure. *Lancet* 2004; 363: 1306-13.
2. Berry C, Murdoch DR, McMurray JJ. Economics of chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2001; 3: 283-91.
3. O'Connell JB, Bristow MR. Economic impact of heart failure in the United States: time for a different approach. *J Heart Lung Transplant* 1994; 13: S107-S112.
4. American Heart Association. 2000 Heart and Stroke Statistical Update. Dallas, TX: American Heart Association, 2001.
5. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
6. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
7. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74: 86-107.
8. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 1996; 148: 141-9.
9. Gottlieb RA, Bureson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1621-8.
10. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997; 95: 320-3.
11. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407: 802-9.
12. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ Res* 1998; 83: 15-26.
13. MacLellan WR, Schneider MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol* 2000; 62: 289-319.
14. Chien KR, Olson EN. Converging pathways and principles in heart development and disease: CV@CSH. *Cell* 2002; 110: 153-62.
15. Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2001; 344: 1750-7.
16. Kajstura J, Leri A, Finato N, Di Loreto C, Beltrami CA, Anversa P. Myocyte proliferation in end-stage cardiac failure in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8801-5.
17. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002; 346: 5-15.
18. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* 2002; 90: 634-40.
19. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: a study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation* 2003; 107: 1247-9.
20. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344-9.
21. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8.
22. Schachinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-9.
23. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17.
24. Fernandez-Aviles F, San Roman JA, Garcia-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95: 742-8.
25. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-8.
26. Chen SL, Fang WW, Ye F, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 2004; 94: 92-5.
27. Vanderheyden M, Mansour S, Vandekerckhove B, et al. Selected intracoronary CD133⁺ bone marrow cells promote cardiac regeneration after acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110 (Suppl III): 324-5.
28. Wollert KC, Drexler H. Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005; 96: 151-63.
29. Tse HF, Kwong YL, Chan JK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
30. Fuchs S, Satler LF, Kornowski R, et al. Catheter-based autologous bone marrow myocardial injection in no-option patients with advanced coronary artery disease: a feasibility study. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1721-4.
31. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-302.
32. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, et al. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004; 110 (Suppl 1): II213-II218.
33. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-83.
34. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004; 148: 531-7.
35. Chachques JC, Herreros J, Trainini J, et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol* 2004; 95 (Suppl 1): S29-S33.
36. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-

- marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-6.
37. Assmus B, Honold J, Lehmann R, et al. Transcoronary transplantation of progenitor cells and recovery of left ventricular function in patients with chronic ischemic heart disease: results of a randomized, controlled trial. (abstr) *Circulation* 2004; 110 (Suppl III): 238.
38. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929-33.
39. Jain M, DerSimonian H, Brenner DA, et al. Cell therapy attenuates deleterious ventricular remodeling and improves cardiac performance after myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 1920-7.
40. Pouzet B, Vilquin JT, Hagege AA, et al. Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation. *Ann Thorac Surg* 2001; 71: 844-51.
41. Agbulut O, Vandervelde S, Al Attar N, et al. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133⁺ progenitors for the repair of infarcted myocardium. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 458-63.
42. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-80.
43. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
44. Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-7.
45. Fuchs S, Baffour R, Zhou YF, 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: 1726-32.
46. Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. The inflammatory response in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 31-47.
47. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-9.
48. Andrews RG, Briddell RA, Knitter GH, et al. In vivo synergy between recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in baboons enhanced circulation of progenitor cells. *Blood* 1994; 84: 800-10.
49. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-8.
50. 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: 668-73.
51. Chien KR. Stem cells: lost in translation. *Nature* 2004; 428: 607-8.
52. Bodine DM, Seidel NE, Zsebo KM, Orlic D. In vivo administration of stem cell factor to mice increases the absolute number of pluripotent hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 82: 445-55.
53. Bodine DM, Seidel NE, Gale MS, Nienhuis AW, Orlic D. Efficient retrovirus transduction of mouse pluripotent hematopoietic stem cells mobilized into the peripheral blood by treatment with granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor. *Blood* 1994; 84: 1482-91.
54. Molineux G, Pojda Z, Hampson IN, Lord BI, Dexter TM. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 1990; 76: 2153-8.
55. Vora AJ, Toh CH, Peel J, Greaves M. Use of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) for mobilizing peripheral blood stem cells: risk of mobilizing clonal myeloma cells in patients with bone marrow infiltration. *Br J Haematol* 1994; 86: 180-2.
56. Bensinger W, Singer J, Appelbaum F, et al. Autologous transplantation with peripheral blood mononuclear cells collected after administration of recombinant granulocyte stimulating factor. *Blood* 1993; 81: 3158-63.
57. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 1993; 81: 2031-5.
58. Gazitt Y. Immunologic profiles of effector cells and peripheral blood stem cells mobilized with different hematopoietic growth factors. *Stem Cells* 2000; 18: 390-8.
59. Gazitt Y. Comparison between granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the mobilization of peripheral blood stem cells. *Curr Opin Hematol* 2002; 9: 190-8.
60. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-34.
61. Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000; 290: 1775-9.
62. Dewald O, Ren G, Duerr GD, et al. Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004; 164: 665-77.
63. Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, Korbling M. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood* 1996; 88: 2819-25.
64. Cavallaro AM, Lilleby K, Majolino I, et al. Three to six year follow-up of normal donors who received recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25: 85-9.
65. Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-6.
66. Wang Y, Tagil K, Ripa RS, et al. Effect of mobilization of bone marrow stem cells by granulocyte colony stimulating factor on clinical symptoms, left ventricular perfusion and function in patients with severe chronic ischemic heart disease. *Int J Cardiol* 2005; 100: 477-83.
67. Valgimigli M, Rigolin GM, Cittanti C, et al. Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J* 2005; 26: 1838-45.
68. Hill J, Syed M, Arai A, et al. Outcomes of granulocyte colony-stimulating factor administration to patients with severe coronary artery disease. (abstr) *Circulation* 2004; 110 (Suppl III): 352.
69. Ince H, Petzsch M, Kleine H, et al. Prevention of LV remodeling with G-CSF in acute myocardial infarction: insights from FIRSTLINE-AMI (Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor). (abstr) *Circulation* 2004; 110 (Suppl III): 352.
70. Petzsch M, Ince H, Kleine H, et al. No restenosis after G-CSF in acute myocardial infarction: insights from FIRSTLINE-AMI (Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor). (abstr) *Circulation* 2004; 110 (Suppl III): 238.
71. Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart:

- the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 2005; 115: 572-83.
72. Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 224-30.
73. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, et al. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001; 108: 399-405.
74. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108: 391-7.
75. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, et al. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103: 2885-90.
76. Grundy SM. Statin trials and goals of cholesterol-lowering therapy. *Circulation* 1998; 97: 1436-9.
77. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; 101: 207-13.
78. Mundy G, Garrett R, Harris S, et al. Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* 1999; 286: 1946-9.
79. Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, et al. Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo after vascular injury. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 214-21.
80. Bustos C, Hernandez-Presa MA, Ortego M, et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 2057-64.
81. Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Mach S, Auch-Schwelk W, Zeiher AM. Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am J Cardiol* 2000; 85: 962-8.
82. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 385: 221-8.
83. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-8.
84. Badorff C, Brandes RP, Popp R, et al. Transdifferentiation of blood-derived human adult endothelial progenitor cells into functionally active cardiomyocytes. *Circulation* 2003; 107: 1024-32.
85. Rupp S, Badorff C, Koyanagi M, et al. Statin therapy in patients with coronary artery disease improves the impaired endothelial progenitor cell differentiation into cardiomyogenic cells. *Basic Res Cardiol* 2004; 99: 61-8.
86. Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, Rudnicki MA, Megeney LA. The post-natal heart contains a myocardial stem cell population. *FEBS Lett* 2002; 530: 239-43.
87. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-76.
88. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12313-8.
89. Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, et al. Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, Abcg2, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart. *Dev Biol* 2004; 265: 262-75.
90. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004; 95: 911-21.
91. Beltrami A, Cesselli D, Damiani D, et al. In the adult human heart resides a population of non-blood-borne multipotent cardiac progenitor cells. (abstr) *Circulation* 2004; 110 (Suppl III): 239.
92. Menard C, Hagege AA, Agbulut O, et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 2005; 366: 1005-12.
93. Laflamme MA, Gold J, Xu C, et al. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 2005; 167: 663-71.
94. Swijnenburg RJ, Tanaka M, Vogel H, et al. Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 2005; 112 (Suppl): I166-I172.
95. Alvarez-Dolado M, Pardo R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425: 968-73.
96. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med* 2004; 10: 494-501.
97. Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-5.
98. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416: 545-8.
99. Mueller-Ehmsen J, Baisch L, Tossios P, et al. Assessment of cardiac function and cell tracking after bone marrow cell transplantation in pigs with myocardial infarction. (abstr) *Eur Heart J* 2005; 26 (Suppl 1): 219.
100. Angelini A, Castellani C, Della Barbera M, et al. Absence of cell fusion of stem cells with cardiac myocytes in mismatched heart transplantation. (abstr) *Eur Heart J* 2005; 26 (Suppl 1): 320.
101. Ye L, Haider KH, Jiang S, Law P, Sim E. Fusion between myoblasts and pig cardiomyocytes is the mechanism of survival of XENP transplanted human skeletal myoblasts in pig heart. (abstr) *Eur Heart J* 2005; 26 (Suppl 1): 320.
102. Ahn Y, Lim S, Jeong M, et al. Effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt on porcine myocardial infarction. (abstr) *Eur Heart J* 2005; 26 (Suppl 1): 219.
103. Angoulvant D, Fazel S, Fedak PW, et al. Enhanced ventricular remodelling after a myocardial infarction by augmented cell transplantation: bone marrow stromal cells overexpressing tissue inhibitors of metalloproteinase-3. *Eur Heart J* 2005; 26 (Suppl 1): 220.
104. Jackson BM, Gorman JH, Moainie SL, et al. Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1160-71.
105. Miki T, Miura T, Nishino Y, et al. Granulocyte colony stimulating factor/macrophage colony stimulating factor improves postinfarct ventricular function by suppression of border zone remodelling in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 873-82.
106. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, et al. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell implantation. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1210-5.
107. Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al. Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium. *Circulation* 2005; 111: 2198-202.
108. Braunwald E. Clinical manifestations of heart failure. In: Braunwald E, ed. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 3rd edition. Philadelphia, PA: WB Saunders, 1988: 471-84.

109. Meyer GP, Schaefer A, Fuchs M, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer prevents the progression of diastolic dysfunction in patients after acute myocardial infarction. (abstr) *Eur Heart J* 2005; 26 (Suppl 1): 318.
110. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, 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: 430-6.
111. Tomita S, Li RK, Weisel RD, et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100 (Suppl): II247-II256.
112. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1804-10.
113. Kobayashi T, Hamano K, Li TS, et al. Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model. *J Surg Res* 2000; 89: 189-95.
114. Nishida M, Li TS, Hirata K, Yano M, Matsuzaki M, Hamano K. Improvement of cardiac function by bone marrow cell implantation in a rat hypoperfusion heart model. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 768-74.
115. Norol F, Merlet P, Isnard R, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood* 2003; 102: 4361-8.
116. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109: 337-46.
117. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046-52.
118. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-35.
119. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res* 2004; 94: 230-8.
120. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res* 2004; 94: 678-85.
121. Heil M, Ziegelhoeffer T, Mees B, Schaper W. A different outlook on the role of bone marrow stem cells in vascular growth: bone marrow delivers software not hardware. *Circ Res* 2004; 94: 573-4.
122. Galli D, Innocenzi A, Staszewsky L, et al. Mesoangioblasts, vessel-associated multipotent stem cells, repair the infarcted heart by multiple cellular mechanisms: a comparison with bone marrow progenitors, fibroblasts, and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25: 692-7.
123. Neumann FJ, Kastrati A, Schmitt C, et al. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with abciximab on clinical and angiographic restenosis rate after the placement of coronary stents following acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 915-21.