

Studi osservazionali Mobilizzazione di cellule staminali dopo bypass aortocoronarico

Achille Gaspardone, Paolo De Fabritiis*, Raffaele Scaffa**, Paolo Nardi**,
Francesca Palombi***, Francesco Versaci**, Luigi Chiariello**

U.O.C. di Cardiologia, Ospedale S. Eugenio, Azienda USL Rm "C", *Cattedra di Ematologia, **Cattedra di Cardiocirurgia, Università degli Studi "Tor Vergata", ***U.O.C. di Ematologia, Ospedale S. Eugenio, Azienda USL Rm "C", Roma

Key words:
Coronary artery
bypass graft;
Ischemic heart disease.

Background. Recently, the role of stem cells as a potential therapeutic tool for ischemic heart disease has been evaluated by a number of experimental and clinical studies. Although preliminary clinical data appear to be promising, the precise pathophysiological role of stem cell mobilization during acute myocardial ischemia remains uncertain. The present study was aimed at assessing factors affecting stem cell mobilization after coronary artery bypass grafting used as a clinical model of controlled myocardial ischemia.

Methods. Eighteen patients (16 men, 2 women, mean age 66 ± 8 years) with three-vessel coronary artery disease undergoing coronary artery bypass grafting were included in the study; 24 age- and sex-matched healthy subjects served as controls. On admission, 10 patients had stable angina and 8 had unstable angina. Clinical history and instrumental evidence of previous myocardial infarction were present in 11 patients. Venous peripheral blood was sampled at baseline and 6, 24, 48 and 72 hours after coronary surgery. Duration of cardiac arrest and extracorporeal circulation were recorded as well as the release of total creatine kinase (CK), CK-MB, troponin I and C-reactive protein. CD34⁺ stem cells were analyzed by flow cytometry according to published methods.

Results. In patients with ischemic heart disease the peripheral concentration of CD34⁺ cells was higher than that of control subjects (0.202 ± 0.30 vs $0.068 \pm 0.059\%$, $p = 0.03$). However, patients with stable and unstable angina had similar concentration of CD34⁺ cells (0.171 ± 0.33 vs $0.241 \pm 0.275\%$, $p = 0.63$) as well as patients with and without previous myocardial infarction (0.134 ± 0.19 vs $0.245 \pm 0.352\%$, $p = 0.4$). Coronary artery bypass grafting caused a non-significant increase in concentration of CD34⁺ cells at 24 hours which was similar in patients with stable and unstable angina. Finally, no significant correlation was found between peripheral concentration of CD34⁺ cells and aortic clamping and extracorporeal circulation duration, peak release of total CK, CK-MB, troponin I and C-reactive protein.

Conclusions. Peripheral concentration of CD34⁺ stem cells is higher in patients with ischemic heart disease than in healthy controls but it is similar in patients with stable and unstable coronary syndromes. Peripheral mobilization of CD34⁺ cells is not correlated with the duration and severity of ischemic insult induced by surgical cardiac arrest. These preliminary findings suggest that CD34⁺ cell mobilization may be modulated more by tonically active than phasic factors.

(Ital Heart J Suppl 2004; 5 (1): 23-28)

© 2004 CEPI Srl

Ricevuto il 2 settembre 2003; nuova stesura il 19 novembre 2003; accettato il 20 novembre 2003.

Per la corrispondenza:

Dr. Achille Gaspardone

U.O.C. di Cardiologia
Ospedale S. Eugenio
Azienda USL Rm "C"
Piazzale dell'Umanesimo, 10
00144 Roma
E-mail: a_gaspardone@
yahoo.com

Il ruolo delle cellule staminali nel trattamento della disfunzione ventricolare sinistra postischemica è stato recentemente oggetto di numerosi studi sperimentali e clinici¹⁻¹⁴. In ambito clinico, studi preliminari, condotti in pazienti con ischemia miocardica acuta, hanno suggerito che l'infusione intracoronarica di cellule staminali ematopoietiche derivate dal midollo osseo e dal sangue periferico è in grado di produrre un miglioramento quantificabile della funzione ventricolare sinistra a breve e medio termine^{11,12}. Tuttavia, malgrado i risultati promettenti di questi studi iniziali, permangono ancora numerose incertezze sul significato fisiopatologico e sulla cinetica interindividuale della mobilizzazione delle cellule

staminali nel corso di ischemia miocardica acuta; inoltre, poco è noto relativamente ai fattori genetici e/o ambientali in grado di modulare la mobilizzazione delle cellule staminali ematopoietiche in condizioni patologiche¹⁵⁻¹⁹.

Si ritiene che l'ischemia miocardica costituisca un fattore in grado di promuovere la mobilizzazione di cellule staminali attraverso la liberazione di mediatori bioumorali²⁰. L'arresto cardiaco durante interventi di chirurgia coronarica rappresenta un modello clinico di ischemia miocardica *controllata* i cui parametri temporali possono essere facilmente misurabili. In questo studio abbiamo utilizzato questo modello clinico di ischemia miocardica per valutare la mo-

bilizzazione periferica di cellule staminali ematopoietiche in un gruppo di pazienti sottoposti consecutivamente a rivascolarizzazione miocardica mediante bypass aortocoronarico.

Materiali e metodi

Pazienti. Sono stati studiati 18 pazienti (16 uomini, 2 donne, età media 66 ± 8 anni) con cardiopatia ischemica, evidenza strumentale di ischemia miocardica e coronaropatia aterosclerotica trivasale sottoposti consecutivamente a bypass aortocoronarico nel periodo luglio-ottobre 2002 presso la Cattedra di Cardiocirurgia dell'Università degli Studi "Tor Vergata" di Roma. Al ricovero, 10 pazienti presentavano un quadro clinico stabilizzato di cardiopatia ischemica (classe CCS II-III) con inizio dei sintomi databile a più di 6 mesi dal momento del ricovero; i rimanenti 8 pazienti presentavano un quadro clinico e strumentale di angina instabile (classe di Braunwald IIB e IIIB) senza elevazione dei marker di danno miocardico. La terapia in atto al momento del ricovero consisteva in: aspirina (94%), betabloccanti (83%), nitrati (83%), calcioantagonisti non diidropiridinici (28%) e statine (22%). Tre pazienti con angina instabile erano in terapia con nitrati ed eparina per via endovenosa. Storia clinica ed evidenza strumentale di pregresso infarto miocardico (databile a più di 6 mesi dal momento del ricovero) era presente in 11 pazienti, 7 con angina stabile e 4 con angina instabile. Nessun paziente presentava un quadro clinico di disfunzione ventricolare sinistra: la frazione di eiezione angiografica media era di $51 \pm 8\%$. Tutti i pazienti sono stati sottoposti consecutivamente ad intervento elettivo di bypass aortocoronarico in circolazione extracorporea. Il decorso postoperatorio è stato regolare in tutti i pazienti. Il gruppo di controllo, sovrapponibile per età e sesso, era costituito da 24 soggetti in apparenti buone condizioni di salute reclutati presso la Cattedra di Ematologia dell'Università degli Studi "Tor Vergata"-Ospedale S. Eugenio di Roma.

Disegno dello studio e analisi ematochimica. Per l'analisi ematochimica è stato eseguito un prelievo di sangue intero basalmente (al momento del ricovero) e 6, 24, 48 e 72 ore dopo l'arrivo del paziente in terapia intensiva postoperatoria. Il gruppo di controllo è stato sottoposto solamente al prelievo basale. Sono stati valutati i seguenti parametri ematochimici: numero totale di globuli bianchi ($/\text{mm}^3$), numero assoluto di cellule CD34+ ($/\text{mm}^3$), percentuale di cellule CD34+, proteina C reattiva (Roche Unimate 3 CRP, Milano, Italia)²¹, creatininasasi (CK) totale, CK-MB e troponina I (utilizzando sistemi di dosaggio commerciali). La conta delle cellule CD34+ è stata effettuata su sangue venoso periferico non separato mediante doppia marcatura con anticorpi monoclonali anti-CD34-PE e anti-CD 45-FITC (Becton Dickinson, Boston, MA, USA)²². Le cellule CD34+ sono state enumerate sulla popolazione di

cellule CD45+. Sono state incubate 3×10^5 - 5×10^5 cellule per 30 min a 4°C con gli anticorpi monoclonali o con anticorpi di controllo. È stato quindi effettuato un doppio lavaggio con soluzione isotonica a base di PBS-NaN₃ e la lisi dei globuli rossi residui con NH₄Cl per 10 min a 4°C. L'analisi citofluorimetrica è stata eseguita mediante FACScalibur (Becton Dickinson, Boston, MA, USA) equipaggiato con laser a 488 nm. Per l'analisi a due colori, un minimo di 100 000 cellule sono state acquisite per ogni misurazione. Le cellule CD34+ sono state acquisite in base alle loro caratteristiche scattografiche e all'intensità di fluorescenza ed analizzate utilizzando i software di analisi Cell Quest e Paint-a-gate (Becton Dickinson, Boston, MA, USA) come descritto in precedenza²².

Analisi statistica. L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma StatView SAS 1998 (Becton Dickinson, Boston, MA, USA). Le variabili continue distribuite normalmente sono state espresse come media \pm 1 DS se non altrimenti specificato e sono state confrontate mediante test t di Student per dati non appaiati. L'analisi della varianza per misure ripetute è stata effettuata per valutare le differenze nel tempo dei parametri ematochimici considerati; per livelli di $p < 0.05$, i confronti delle coppie sono stati effettuati mediante il test *post-hoc* di Bonferroni-Dunn. La correlazione tra la mobilitazione di cellule staminali ed i parametri di danno miocardico è stata effettuata mediante la regressione semplice. Le differenze tra i gruppi sono state considerate statisticamente significative per livelli di $p < 0.05$. Sono stati effettuati sempre test statistici a due code.

Risultati

Nei pazienti con cardiopatia ischemica i valori di globuli bianchi, cellule CD34+ e percentuale di cellule CD34+ sono risultati significativamente superiori a quelli riscontrati nei controlli (7781 ± 2416 vs $5987 \pm 1016/\text{mm}^3$, $p = 0.0022$; 18.8 ± 33 vs $2.3 \pm 1.9/\text{mm}^3$, $p = 0.0187$; e 0.202 ± 0.30 vs $0.068 \pm 0.059\%$, $p = 0.0373$) (Fig. 1). Mediamente la concentrazione di cellule CD34+ nel sangue periferico è stata di circa 3 volte maggiore nei pazienti con cardiopatia ischemica rispetto ai controlli. Nell'ambito dei pazienti con cardiopatia ischemica, non sono state osservate differenze significative tra pazienti con angina stabile o instabile né tra i pazienti senza o con pregresso infarto relativamente al valore di globuli bianchi, cellule CD34+ e percentuale di cellule CD34+ (8226 ± 2950 vs $7225 \pm 1532/\text{mm}^3$, $p = 0.39$; 17.8 ± 40.2 vs $20.1 \pm 23.8/\text{mm}^3$, $p = 0.88$; 0.171 ± 0.33 vs $0.241 \pm 0.275\%$, $p = 0.63$; e 6498 ± 1096 vs $8597 \pm 2705/\text{mm}^3$, $p = 0.07$; 9.6 ± 13.2 vs $24.6 \pm 40.7/\text{mm}^3$, $p = 0.36$; 0.134 ± 0.19 vs $0.245 \pm 0.352\%$, $p = 0.4$).

Il numero degli innesti/paziente è stato di 3.4 ± 0.7 e in tutti i casi è stata utilizzata l'arteria mammaria in-

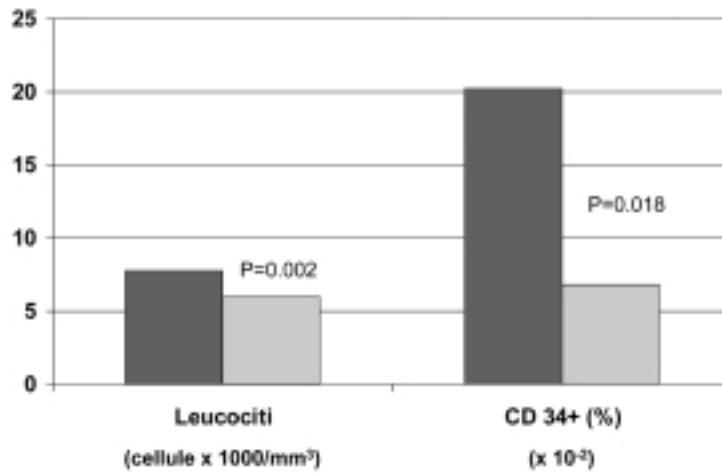


Figura 1. Valori medi del numero di globuli bianchi e numero assoluto di cellule staminali CD34⁺ nei pazienti con cardiopatia ischemica sintomatica (barre scure) e nei soggetti di controllo (barre chiare).

terna sinistra. Il numero di innesti nei pazienti con angina stabile ed instabile è stato simile (3.40 ± 0.7 vs 3.37 ± 0.7 , $p = 0.94$). La durata media di clampaggio aortico e circolazione extracorporea è stata rispettivamente di 53 ± 15 e 94 ± 33 min; non sono state osservate differenze significative di durata di questi due parametri in relazione al quadro clinico presentato dai pazienti (angina stabile o instabile). La quantità media di soluzione cardioplegica cristalloide è stata di 968 ± 296 ml con simile utilizzo tra pazienti con angina stabile ed instabile (1040 ± 206 vs 877 ± 375 ml, $p = 0.25$). La mobilizzazione di cellule CD34⁺, espressa in termini di percentuale di cellule CD34⁺, indotta dall'intervento di bypass aortocoronarico è riportata nella figura 2. A distanza di 24 ore dall'intervento si è registrata la massima mobilizzazione di cellule CD34⁺ che tuttavia, in termini quantitativi, non è risultata significativamente differente rispetto alla concentrazione di cellule CD34⁺ osservate nei vari tempi di analisi. Inoltre la mobilizzazione delle cellule CD34⁺ non è risultata influenzata dallo stato clinico preoperatorio (Fig. 3).

Non è stata osservata alcuna correlazione significativa tra mobilizzazione di cellule staminali a 24 ore, in termini di percentuale di cellule CD34⁺, e la durata di clampaggio aortico e della circolazione extracorporea né con gli indici di danno miocardico (liberazione massima e/o totale di CK totale, CK-MB e troponina I) ed infiammatori (proteina C reattiva) in nessuno dei tempi postoperatori (Fig. 4).

Discussione

Recentemente il ruolo delle cellule staminali post-natali come potenziale strumento terapeutico per il trattamento della disfunzione ventricolare sinistra post-ischemica è stato oggetto di numerosi studi sperimentali e clinici¹⁻¹⁴. Recenti osservazioni preliminari in pazienti con ischemia miocardica acuta hanno confermato l'applicabilità clinica delle cellule staminali in termini terapeutici. Tuttavia, malgrado questi promettenti risultati iniziali, non è ancora del tutto chiaro il signifi-

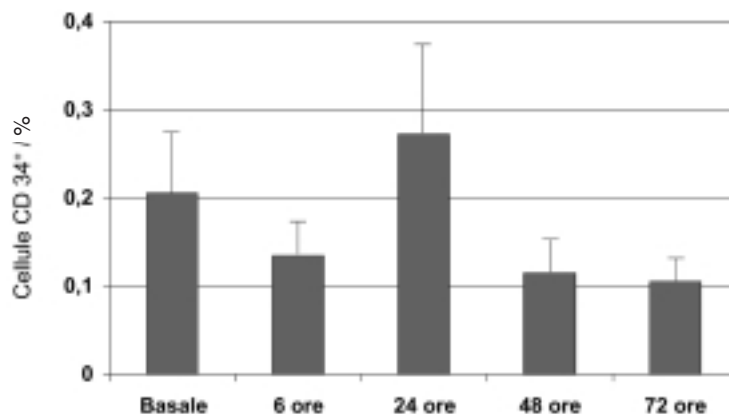


Figura 2. Mobilizzazione delle cellule CD34⁺ nei vari tempi di analisi nei pazienti sottoposti a rivascularizzazione miocardica. Le linee verticali rappresentano l'errore standard. Le variazioni nei vari tempi di analisi non sono significative.

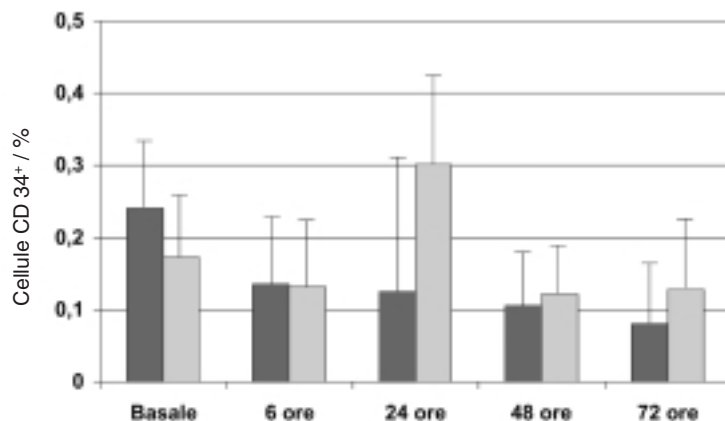


Figura 3. Mobilizzazione delle cellule CD34⁺ in relazione alla presentazione clinica dei pazienti. Pazienti con angina instabile (barre scure); pazienti con angina stabile (barre chiare). Le linee verticali rappresentano l'errore standard. Le differenze non sono significative in nessun tempo di analisi.

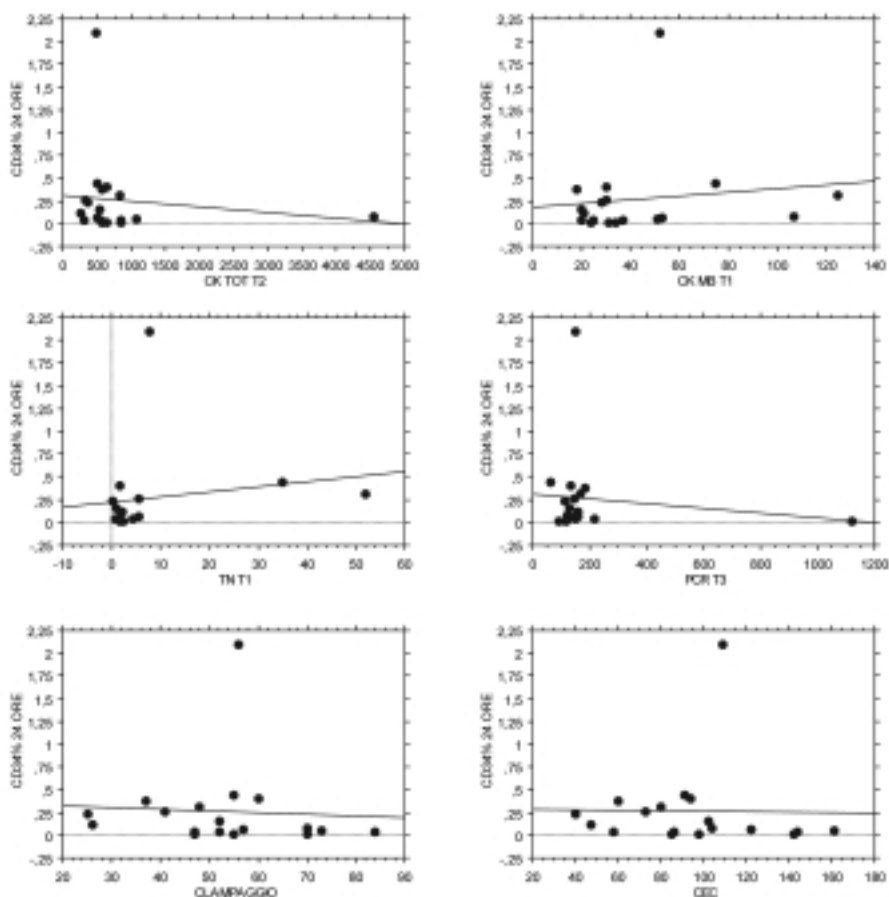


Figura 4. Mobilizzazione delle cellule CD34⁺ in rapporto a variabili intra e postoperatorie. Per le analisi specifiche delle variabili ematochimiche sono stati utilizzati i tempi nei quali è stata osservata la massima dismissione periferica. CEC = durata della circolazione extracorporea; CK-MB T1 = concentrazione di creatinichinasi-MB a 6 ore dall'intervento; CK TOT T2 = concentrazione di creatinichinasi totale a 24 ore dall'intervento; Clampaggio = durata del clampaggio aortico; PCR T3 = concentrazione di proteina C reattiva a 48 ore dall'intervento; TN T1 = concentrazione di troponina I a 6 ore dall'intervento.

cato biologico e fisiopatologico delle cellule staminali nell'ambito della patologia cardiovascolare. Numerose incertezze permangono sui potenziali fattori individuali (*genetici*) ed ambientali in grado di modulare la mobilizzazione di cellule staminali nel corso di patologie cardiovascolari e del tutto oscuro è il significato pro-

gnostico della mobilizzazione di cellule staminali durante ischemia miocardica acuta.

In questo studio, abbiamo valutato la mobilizzazione di cellule CD34⁺, una classe di cellule staminali ematopoietiche, durante bypass aortocoronarico effettuato mediante l'impiego della circolazione extracor-

porea. Quest'ultima è stata utilizzata come modello clinico *controllato* di ischemia miocardica transitoria.

Un primo dato di interesse è l'osservazione che la concentrazione ematica di cellule CD34⁺ in pazienti con cardiopatia ischemica è significativamente maggiore (mediamente di 3 volte) rispetto ai controlli apparentemente sani. Questo dato, in termini finalistici, potrebbe indicare un tentativo biologico di compensare gli effetti dell'insulto ischemico a livello cardiaco. Diversamente da quanto osservato nel nostro studio, Hill et al.²³ hanno riportato una relazione inversa tra la concentrazione di cellule progenitrici endoteliali e il numero di fattori di rischio cardiovascolare suggerendo che la presenza di questi ultimi potesse essere causa di una deplezione delle cellule endoteliali progenitrici circolanti per loro eccessivo utilizzo. Da notare, tuttavia, che nello studio di Hill et al. sono state valutate solo le unità cellulari in grado di formare colonie (*colony-forming units*) e quindi un parametro sostanzialmente funzionale e non il numero assoluto di cellule progenitrici circolanti come è stato fatto nel nostro studio. In quest'ultimo non abbiamo osservato alcuna differenza nella concentrazione ematica di cellule CD34⁺ tra pazienti con quadri stabilizzati di cardiopatia ischemica e quelli con ischemia miocardica acuta; inoltre, nessuna differenza è stata osservata tra pazienti con e senza pregressa necrosi miocardica. Queste osservazioni sembrano suggerire che fattori biumorali indotti dall'ischemia miocardica transitoria o legati a pregressi eventi acuti esitanti in necrosi miocardica non abbiano un ruolo determinante nel modulare la mobilizzazione transitoria di cellule CD34⁺ nei pazienti con cardiopatia ischemica. Alternativamente, è possibile che la mobilizzazione delle cellule CD34⁺ sia di natura tonica cioè legata più al *burden* aterosclerotico aspecifico che alla momentanea (fasica) evenienza di ischemia miocardica e che la risposta acuta sia legata alla reattività individuale.

A supporto di questa ipotesi è l'evidenza che la mobilizzazione di cellule CD34⁺ non è affatto influenzata dalla durata dell'ischemia miocardica indotta dall'arresto cardiaco né dall'intensità dell'insulto ischemico espressa come liberazione di marker di danno miocardico (CK e troponina). Anche fattori di natura infiammatoria come la proteina C reattiva non appaiono correlati con l'entità della mobilizzazione di cellule staminali ematopoietiche.

Queste osservazioni nel loro complesso sembrano indicare che fattori a carattere tonico possano giocare un ruolo di maggior rilievo rispetto a fattori ambientali fasici nel promuovere la mobilizzazione periferica di cellule staminali. Nel contempo, fattori individuali, di probabile natura genetica, potrebbero avere un ruolo nella modulazione della risposta fasica a stimoli transitori come l'ischemia miocardica acuta.

Limiti dello studio. L'ischemia indotta dal clampaggio aortico/circolazione extracorporea è estremamente lie-

ve e transitoria e potrebbe quindi essere non sufficientemente intensa da promuovere una significativa mobilizzazione di cellule staminali ematopoietiche. Tuttavia, nel periodo postoperatorio, è stata comunque osservata una liberazione di marker umorali di danno miocardico a dimostrazione che un insulto ischemico, di fatto, è stato prodotto. Inoltre, circa la metà dei pazienti presentavano preoperatoriamente quadri di angina instabile con evidenza clinica e strumentale di ischemia miocardica in atto. Un altro potenziale limite è che la nostra analisi è stata condotta fino a 72 ore dall'intervento e quindi non sufficientemente prolungata per identificare un'eventuale mobilizzazione tardiva di cellule staminali. In realtà, in questo studio, il picco di mobilizzazione è stato osservato a 24 ore dall'intervento quindi ben prima dell'ultimo tempo di studio; pertanto è estremamente improbabile la possibilità di una mobilizzazione tardiva.

In conclusione, i dati di questo studio indicano che i pazienti con cardiopatia ischemica presentano livelli significativamente maggiori di cellule staminali circolanti CD34⁺ rispetto ai controlli sani. La concentrazione periferica di cellule staminali non sembra essere influenzata dalla presentazione clinica della malattia e la mobilizzazione di cellule staminali ematopoietiche non è correlata né alla durata né all'intensità dell'ischemia miocardica. È probabile che stimoli tonici legati a processi degenerativo-infiammatori cronici (*burden* aterosclerotico) svolgano il ruolo maggiore nel modulare la mobilizzazione periferica cronica di cellule staminali, mentre la risposta a stimoli fasici come l'ischemia miocardica acuta essendo altamente variabile nei singoli pazienti potrebbe essere legata a fattori individuali di verosimile natura genetica.

Riassunto

Razionale. Recentemente, il ruolo delle cellule staminali come potenziale mezzo terapeutico per il trattamento della cardiopatia ischemica è stato valutato in diversi studi sperimentali e clinici. Sebbene i dati clinici preliminari appaiano promettenti, il preciso ruolo fisiopatologico della mobilizzazione della cellula staminale durante ischemia miocardica acuta rimane da chiarire. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare i fattori correlati alla mobilizzazione di cellule staminali dopo bypass coronarico impiegato come modello clinico di ischemia miocardica controllata.

Materiali e metodi. Sono stati valutati in questo studio 18 pazienti (16 uomini, 2 donne, età media 66 ± 8 anni) affetti da malattia coronarica ostruttiva trivasale e sottoposti a bypass aortocoronarico; il gruppo di controllo, sovrapponibile per età e sesso, era costituito da 24 soggetti in buone condizioni di salute. Al ricovero, 10 pazienti presentavano angina stabile, 8 angina instabile. Storia clinica ed evidenza strumentale di pregres-

so infarto miocardico erano presenti in 11 pazienti. Il prelievo di sangue intero veniva effettuato in tutti i pazienti al momento del ricovero e a 6, 24, 48 e 72 ore dopo bypass aortocoronarico. Sono stati misurati la durata della circolazione extracorporea e del clampaggio aortico, come anche i valori di rilascio enzimatico di creatinichinasi (CK) totale, CK-MB, troponina I e della proteina C reattiva. La conta delle cellule staminali CD34⁺ è stata effettuata mediante citofluorimetria a flusso.

Risultati. Nei pazienti affetti da cardiopatia ischemica la concentrazione delle cellule CD34⁺ era maggiore rispetto al controllo (0.202 ± 0.30 vs $0.068 \pm 0.059\%$, $p = 0.03$). Tuttavia, nei pazienti con angina stabile ed instabile i valori di concentrazione di cellule CD34⁺ erano simili (0.171 ± 0.33 vs $0.241 \pm 0.275\%$, $p = 0.63$), come pure in quelli senza o con pregresso infarto miocardico (0.134 ± 0.19 vs $0.245 \pm 0.352\%$, $p = 0.4$). L'intervento di bypass aortocoronarico non era correlato ad un aumento di concentrazione di CD34⁺ peraltro simile nei pazienti con angina stabile ed instabile. Infine, non vi era correlazione significativa tra concentrazione nel sangue periferico di CD34⁺ e durata di circolazione extracorporea e clampaggio aortico, picco di rilascio di CK totale, CK-MB, troponina I e proteina C reattiva.

Conclusioni. La concentrazione periferica di cellule staminali CD34⁺ è più elevata nei pazienti con cardiopatia ischemica rispetto ai controlli, mentre è simile nei pazienti che presentano angina stabile ed instabile. La mobilizzazione periferica di cellule CD34⁺ non è correlata con durata e gravità dell'insulto ischemico indotto dall'arresto cardiaco durante chirurgia coronarica. Questi dati preliminari suggeriscono che la mobilizzazione delle cellule CD34⁺ potrebbe essere modulata più da fattori di natura tonica (*burden* aterosclerotico) che fasica (ischemia miocardica acuta).

Parole chiave: Bypass aortocoronarico; Cardiopatia ischemica.

Bibliografia

1. 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: 1034-9.
2. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-5.
3. 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.
4. Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929-33.
5. Frishman WH, Anversa P. Stem cell therapy for myocardial regeneration: the future is now. *Heart Dis* 2002; 4: 205-7.
6. Semsarian C. Stem cells in cardiovascular disease: from cell biology to clinical therapy. *Intern Med J* 2002; 32: 259-65.
7. Schwartz Y, Kornowski R. Progenitor and embryonic stem cell transplantation for myocardial angiogenesis and functional restoration. *Eur Heart J* 2003; 24: 404-11.
8. Penn MS, Francis GS, Ellis SG, Young JB, McCarthy PM, Topol EJ. Autologous cell transplantation for the treatment of damaged myocardium. *Prog Cardiovasc Dis* 2002; 45: 21-32.
9. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-6.
10. 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.
11. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction. *Dtsch Med Wochenschr* 2001; 126: 932-8.
12. 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.
13. 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.
14. Yau TM, Tomita S, Weisel RD, et al. Beneficial effect of autologous cell transplantation on infarcted heart function: comparison between bone marrow stromal cells and heart cells. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: 169-76.
15. Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107: 461-8.
16. Brehm M, Zeus T, Strauer BE. Stem cells: clinical application and perspectives. *Herz* 2002; 27: 611-20.
17. Stanworth SJ, Newland AC. Stem cells: progress in research and edging towards the clinical setting. *Clin Med* 2001; 1: 378-82.
18. Rosenthal N. High hopes for the heart. *N Engl J Med* 2001; 344: 1785-7.
19. Reinlib L, Field L. Cell transplantation as future therapy for cardiovascular disease? A workshop of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 2000; 101: 182-7.
20. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103: 2776-9.
21. Hyafner G, Endler T, Oppitz M. Effects of standardization with the new international reference preparation for proteins in human serum on method comparability and reference values. *Clin Lab* 1995; 41: 743-8.
22. De Fabritiis P, Gonzales M, Meloni G, et al. Monitoring of CD34⁺ cells during leukapheresis allows single successful collection of hemopoietic progenitors in patients with low numbers of circulating stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1999; 23: 1229-36.
23. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600.