

La terapia cellulare dell'infarto miocardico acuto con cellule staminali osteomidollari: dati acquisiti e problematiche aperte

Bone marrow stem cells therapy for acute myocardial infarction: acquired data and opened issues

P. Scacciatella, S. Marra

*S.C. Cardiologia Ospedaliera,
Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista – Molinette, Torino*

Abstract

La recente scoperta della possibile rigenerazione o riparazione miocardica dopo infarto miocardico acuto mediante cellule staminali osteomidollari autologhe e l'identificazione di cellule staminali cardiache residenti hanno aperto la porta a un nuovo promettente campo terapeutico: la terapia cellulare delle malattie cardiovascolari. Gli studi preclinici e i primi trial clinici hanno suscitato grandi attese, che però vanno confermate da studi clinici più ampi, multicentrici, randomizzati e controllati, che possono rispondere alle domande ancora aperte in tema di terapia cellulare: quali pazienti con infarto miocardico acuto possono realmente beneficiare di tale terapia, qual è la tempistica migliore dall'evento acuto per la somministrazione dei preparati cellulari, quali sono le cellule più adatte, qual è la miglior via di somministrazione. Solo la stretta collaborazione tra ricerca di base e ricerca clinica potrà dare risultati apprezzabili e dirimere la reale utilità di tale promettente nuovo approccio terapeutico. È in tale contesto che il nostro Centro si sta muovendo in questo periodo storico nel campo della ricerca clinica.

Parole chiave: Cellule staminali, Infarto miocardico acuto, Terapia cellulare

The possibility of regenerating or repairing the injured myocardium after acute myocardial infarction through autologous bone marrow stem cells administration and the recent identification of stem cells within the adult heart have opened the door to the "cell therapy for cardiac disease". However, the great expectation generated from the results of the preclinical studies and the early phase clinical trials must be confirmed by randomised, controlled clinical trial, that could answer the opened question related to such a therapy: who (patients), when (timing), what (type of cells), way (way of administration). Along with basic studies designed to show the mechanisms of action of cell therapy, parallel intermediate sized, randomised, placebo-controlled clinical trials are needed to confirm basic findings or redirect basic research according to their results. Our Center is moving in this historical phase of the cell therapy clinical research.

Key words: Acute myocardial infarction, Cells therapy, Stem cells

PREMESSE FISIOPATOLOGICHE

L'assunto secondo cui il cuore sia un organo costituito da miociti differenziati e incapace di una rigenerazione cellulare negli ultimi anni è stato messo in discussione: pare sempre più evidente che una limi-

tata rigenerazione possa occorrere in particolari situazioni fisiopatologiche mediante il reclutamento di cellule staminali residenti e circolanti.¹⁻² La descrizione di meccanismi di riparazione endogena in pazienti con infarto miocardico, malattia coronarica avanzata o scompenso cardiaco suggerisce che la rigenerazione

cardiaca possa essere un obiettivo terapeutico in tali contesti patologici.

Il presupposto fisiopatologico della terapia cellulare è rappresentato dalla plasticità delle cellule staminali adulte.³ Le cellule staminali sono in grado di auto-rinnovarsi, trasformarsi in progenitori cellulari specifici e differenziarsi in linee cellulari specializzate. La plasticità delle cellule staminali implica che precursori cellulari determinati possano transdifferenziarsi in tipologie cellulari diverse dalla loro linea in risposta a stimoli microambientali diversi. Nel caso specifico del cuore, cellule staminali ematopoietiche qualora trapiantate nel miocardio, in modelli sperimentali murini di ischemia miocardica acuta, possono transdifferenziare in cardiomiociti e strutture vascolari con conseguente miglioramento della funzione cardiaca e della sopravvivenza.⁴ In alternativa alla transdifferenziazione delle cellule staminali è stato proposto come meccanismo per spiegare gli effetti dell'impianto di cellule staminali nel miocardio patologico quello della fusione cellulare.⁵⁻⁶ In realtà, i meccanismi fin alla base degli effetti funzionali del trapianto cellulare possono essere ben più complessi e articolati di quelli sopra esposti: le cellule staminali possono rilasciare ligandi angiogenetici, esercitare effetto protettivo antiapoptotico nei confronti dei cardiomiociti, indurre la proliferazione di cardiomiociti endogeni mediante reclutamento di cellule staminali cardiache residenti.⁷⁻¹¹

Indipendentemente dal meccanismo fisiopatologico e biocellulare, vi è comunque consenso scientifico che la terapia cellulare abbia il potenziale di migliorare la perfusione e la funzione contrattile del miocardio patologico.

DATI ACQUISITI: GLI STUDI CLINICI

In ambito clinico alcuni studi di fase 1 e fase 2 hanno dimostrato la fattibilità e i potenziali benefici clinici della terapia cellulare nelle sindromi coronariche acute e croniche.¹ I risultati ottenuti nell'uomo suggeriscono che una rigenerazione miocardica e una neoangioge-

nesi possano conseguire quale effetto diretto o indiretto dell'iniezione intracoronarica o intramiocardica (epicardica o endocardica) di cellule staminali derivate dal midollo osseo¹.

Tali studi nascono sulla scorta dei dati incoraggianti della ricerca di base e sono stati dapprima mirati a verificare fattibilità e sicurezza della terapia cellulare nell'infarto miocardico acuto (fase 1), quindi a valutarne l'efficacia con un gruppo di controllo (fase 2). Tutti gli studi clinici hanno incluso pazienti con infarto miocardico acuto trattati con angioplastica primaria con impianto di stent, le cellule staminali sono state infuse per via intracoronarica usando cateteri a palloncino con interruzioni temporanee di flusso. In tali studi sono state utilizzate sia cellule staminali osteomidollari non selezionate (cellule mononucleari, MNC) sia popolazioni cellulari selezionate. I dati di rilievo di tali studi clinici sono riportati nella Tabella 1.

Studi clinici condotti con cellule osteomidollari non selezionate

Relativamente agli studi clinici condotti con cellule osteomidollari non selezionate comprendenti le frazioni staminali (tutte le cellule nucleate o solo la frazione cellulare mononucleata),¹²⁻¹⁷ l'esperienza combinata di più di 100 pazienti trattati consente di affermare che l'inoculazione intracoronarica di tali cellule è sicura sia nel breve sia nel medio termine. Non sono state riferite complicanze emorragiche durante o dopo la raccolta del midollo osseo. L'infusione intracoronarica di cellule mononucleari osteomidollari non ha comportato alterazioni ischemiche miocardiche peri- o postprocedurali, né reazioni infiammatorie sistemiche (non sono stati osservati ulteriori e significativi rialzi enzimatici e della proteina C reattiva), né sono stati evidenziati aumentati tassi di ristenoosi postangioplastica o di aritmie ventricolari. Non sono state evidenziate calcificazioni intramiocardiche o sviluppo di neoplasie. Tutti gli studi¹²⁻¹⁶ hanno dimostrato un miglioramento della cinesisi regionale, nei tre studi con casistica più ampia¹³⁻¹⁶ è stato descritto un aumento della frazione di eiezione anche se solo uno di questi prevedeva un gruppo di

Tabella I. Studi clinici pubblicati, parte I

Autore	Istituto	Pz	Controllo	Purificazione cellulare	Tipo di cellule	Dose totale	Dose CD34 o CD133	Tempo di infusione	Follow-up
Strauer et al. ¹²	Düsseldorf Germania	10	10 caso-controllo non random	No	MNC	$2,8 \pm 2,2 \times 10^7$	$2,1 \pm 0,28\%$ CD34 $0,65 \pm 0,4\%$ CD133	5-9 ^a giornata	3 mesi
Assmus et al. ¹³⁻¹⁴ TOPCARE-AMI trial	Frankfurt Germania	29 MNC 30 CPC	11 caso-controllo non random	No	MNC CPC	$2,1 \pm 0,8 \times 10^8$ $1,6 \pm 1,2 \times 10^7$	$5,5 \pm 3,9 \times 10^6$ CD34/CD45	5 $\pm$ 2 giorni	12 mesi
Wollert et al. ¹⁵ BOOST trial	Hanover e Mannheim Germania	30	30 random	No	NC	$2,5 \pm 0,9 \times 10^9$	$9,5 \pm 6,3 \times 10^6$	6 $\pm$ 1 giorni	6 mesi
Fernandez-Aviles et al. ¹⁶	Valladolid Spagna	20	13 caso-controllo non random	No	MNC	$7,8 \pm 4,1 \times 10^7$	1% CD34 0,6% CD133	13,5 $\pm$ 5,5 giorni	6 mesi
Chen et al. ¹⁷	Nanjing Cina	34	35 random	Si	MSC	$4,8-6 \times 10^{10}$	-	18 giorni	6 mesi
Bartunek et al. ¹⁸	Aalst e Gent Belgio	19	16 random	Si	CD133	$12,6 \pm 2,2 \times 10^6$	Vedi a lato	11,6 $\pm$ 1,4 giorni	4 mesi

CPC, progenitori cellulari circolanti (*circulating blood-derived progenitor cells*); MNC, cellule mononucleari osteomidollari (*mononuclear cells*); MSC, cellule staminali mesenchimali (*mesenchymal stem cells*); NC, cellule nucleate osteomidollari (*bone marrow-derived nucleated cells*); Pz, pazienti trattati.

Tabella I. Studi clinici pubblicati, parte II

Autore	Risultati: miglioramento	Risultati: non variazioni	Δ frazione di eiezione	Eventi avversi significativi
Strauer et al. ¹²	Cinesi regionale, dimensioni infarto, perfusione miocardica	Frazione di eiezione, volumi ventricolari	+5% pre-post +2% caso-controllo	Nessuno
Assmus et al. ¹³⁻¹⁴ TOPCARE-AMI	Cinesi regionale, dimensioni infarto, frazione di eiezione globale, flusso coronarico	Volumi ventricolari	9,3 $\pm$ 8% caso-controllo	Nessuno
Wollert KC et al. ¹⁵ BOOST	Cinesi regionale, frazione di eiezione globale	Volumi ventricolari, dimensioni infarto	+6,7% pre-post +6% caso-controllo	Nessuno
Fernandez-Aviles et al. ¹⁶	Cinesi regionale, frazione di eiezione globale, volumi ventricolari sistolici, spessori parietali	Volumi ventricolari diastolici, perfusione miocardica (FFR, CFR)	+5,8% pre-post	Nessuno
Chen et al. ¹⁷	Cinesi regionale, frazione di eiezione globale, dimensioni infarto, volumi ventricolari	-	+13% caso-controllo	Nessuno
Bartunek et al. ¹⁸	Frazione di eiezione, cinesi regionale, perfusione miocardica	-	+7% pre-post	Aumentata incidenza eventi coronarici (ristenosi, progressione, occlusione)

controllo randomizzato,¹⁵ i miglioramenti della frazione di eiezione in tale studio erano dovuti essenzialmente a un miglioramento della cinesi regionale a livello della cosiddetta "border zone".

Molto recentemente sono stati pubblicati sul *New England Journal of Medicine* 2 studi clinici randomizzati sull'utilizzo di cellule staminali mononucleate nei pazienti con infarto miocardico acuto dopo angioplastica primaria.¹⁹⁻²⁰ Lo studio ASTAMI,¹⁹ condotto in Scandinavia, non ha evidenziato benefici statisticamente significativi dal trattamento con cellule staminali osteomidollari mononucleate, infuse per via intracoronarica dopo infarto miocardico acuto trattato con angioplastica primaria. Va sottolineato però che la scelta del *timing* del trattamento (prime 24 ore) e dei pazienti inclusi (pazienti con frazione di eiezione media postinfartuale nei limiti di norma) può aver condizionato negativamente l'esito della terapia sperimentale. L'altro recente studio randomizzato relativamente ampio è lo studio REPAIR-AMI.²⁰ Tale trial ha visto l'arruolamento di 204 pazienti con infarto miocardico acuto e angioplastica primaria, trattati in maniera randomizzata con inoculazione di cellule mononucleari osteomidollari (in media $2,4 \times 10^6$), per via intracoronarica, in media a 4 giorni dall'evento acuto. È stato descritto un miglioramento significativo della frazione di eiezione globale del ventricolo sinistro dell'ordine del 5% in assenza di eventi avversi maggiori. Il beneficio era tanto più evidente nei pazienti con frazione di eiezione depressa (<50%) e nei casi in cui l'inoculazione intracoronarica avveniva dopo la 5ª giornata dall'evento acuto.²⁰

Studi clinici condotti con cellule osteomidollari selezionate, purificate e arricchite

Solo due studi clinici randomizzati sono stati condotti con linee cellulari selezionate (cellule staminali mesenchimali osteomidollari¹⁷ o precursori endoteliali CD133 osteomidollari¹⁸) con risultati contrastanti e non definitivi. La scarsa numerosità della popolazione trattata, pertanto, non consente di trarre indicazioni definitive.

PROBLEMATICHE APERTE

La terapia cellulare, quindi, viene vista con sempre maggior interesse nel contesto della terapia della cardiopatia ischemica in generale, e dell'infarto miocardico acuto in particolare, soprattutto nei casi in cui anche la miglior terapia meccanica e farmacologica non possa consentire il recupero funzionale del miocardio compromesso.

Allo stato attuale però è ancora da chiarire:

- *Quali siano i pazienti che maggiormente possono beneficiare di tale trattamento.* È possibile che ne possano beneficiare diverse tipologie di pazienti con cardiopatia acuta e cronica. I dati clinici più rilevanti sono stati sviluppati in pazienti con infarto miocardico acuto mediante studi di fase 1 e 2 prevalentemente mirati a valutazioni di fattibilità e sicurezza.¹ In tale contesto clinico, appare intuitivo che possano beneficiare maggiormente di tale approccio terapeutico i pazienti con grave compromissione della funzione miocardica, nonostante l'applicazione della miglior terapia medica e interventistica disponibile, ma le evidenze sperimentali cliniche a tale riguardo sono del tutto iniziali. Esistono attualmente solo pochi studi clinici già condotti in pazienti con cardiopatia ischemica cronica e con scompenso cardiaco cronico con risultati incoraggianti ma talora contrastanti.¹
- *Quali siano le migliori modalità di trapianto cellulare.* Le vie possibili sono la intracoronarica, l'intramiocardica epi- o endocardica, l'endovenosa sistemica e la transvenosa coronarica. Finora la tecnica di prelievo e trapianto cellulare più diffusa, che pare risultare il miglior compromesso tra efficacia e complessità di esecuzione e che ha dimostrato i risultati più incoraggianti nei pazienti affetti da infarto miocardico acuto, è stata quella dell'aspirazione in anestesia locale o generale dalla cresta iliaca di cellule midollari autologhe, l'isolamento e la purificazione delle cellule mononucleari ex vivo e la reinoculazione delle stesse per via intracoronarica.¹ Una tecnica alternativa, ma con risultati più controversi, è rappresentata dalla mobilitazione di cellule staminali osteomidollari con citochine, in par-

ticolare G-CSF o GM-CSF¹. È possibile inoltre che la strategia migliore non sia l'utilizzo di una modalità univoca in tutti i contesti clinici: è verosimile che la via intracoronarica sia la migliore nel contesto dell'infarto miocardico acuto, mentre le altre metodiche di inoculazione intracardiaca, endocardica transcatetere o epicardica per via chirurgica a cielo aperto, o di mobilizzazione con citochine (G-CSF e/o GM-CSF) possano avere un ruolo nei pazienti con cardiopatia ischemica o scompenso cardiaco cronico.

- *Quali siano le migliori linee cellulari da utilizzare a scopo terapeutico.* Un approccio pragmatico ha visto l'utilizzo, nella maggior parte degli studi clinici finora condotti, di cellule di derivazione midollare mononucleate non frazionate che contengono basse percentuali di diverse popolazioni di precursori cellulari: cellule staminali ematopoietiche, precursori endoteliali, cellule mesenchimali. La semplicità del prelievo e della manipolazione ex vivo, che non richiedono strumentazioni e procedure di laboratorio complesse, è stata considerata il possibile vantaggio dell'utilizzo di cellule midollari non frazionate. Pochissimi studi hanno visto l'impiego di popolazioni cellulari purificate, né vi sono ancora studi di confronto delle diverse capacità rigenerative di varie popolazioni cellulari purificate. Sono diverse le popolazioni di precursori cellulari utilizzabili a scopo terapeutico. Le *cellule CD34* sono identificate dall'espressione sulla membrana plasmatica di tale marcatore che individua una popolazione di precursori cellulari ematopoietici teoricamente in grado di transdifferenziare in miociti o cellule vascolari o di stimolare per effetto paracrino mio- e angiogenesi. Una piccola percentuale di cellule CD34 risulta positiva anche per il marcatore di membrana CD133. I *progenitori cellulari endoteliali* sono stati originariamente descritti dall'espressione sulla membrana plasmatica dei marcatori ematopoietici CD133 e CD34 e dal marcatore endoteliale VEGFR-2 (*vascular endothelial growth factor receptor-2* o KDR), nonché dalla loro capacità di essere incorporati in siti di neovascolarizzazione e di differenziarsi in cellule endoteliali in situ.²¹ È stata descritta anche

un'ulteriore e differente linea di precursori endoteliali. Alcuni studi di espansione cellulare in vitro e anche uno studio svolto presso il nostro Centro su campioni ematologici di pazienti con infarto miocardico acuto trattati in modo convenzionale o sottoposti a mobilizzazione terapeutica con citochine²²⁻²³ hanno dimostrato l'esistenza di una popolazione di precursori cellulari mononucleari CD14 positivi, CD 34 negativi, KDR positivi, con capacità precursore endoteliale-simile e in grado di mediare la loro capacità angiogenetica mediante il rilascio di fattori paracrini.²⁴⁻²⁵ Le *cellule CD133* sono caratterizzate dall'espressione sulla membrana plasmatica di tale marcatore. Questo marcatore è espresso sia sulle cellule staminali ematopoietiche sia sui precursori cellulari endoteliali, entrambi in grado di promuovere la vascolarizzazione dei tessuti ischemici.²⁶ Le cellule CD133 sono in grado di integrarsi in siti di neovascolarizzazione e di differenziarsi in cellule endoteliali mature. Dal momento che l'espressione del CD133 viene persa nelle cellule di linea mielomonocitica, questo marcatore fornisce un metodo efficace per distinguere i vari precursori endoteliali CD133 dai precursori endoteliali di derivazione monocitaria CD14/KDR. Poiché le cellule CD133 rappresentano meno dell'1% delle cellule midollari mononucleate solo un numero limitato di tali cellule può essere ottenuto per essere utilizzato a scopo terapeutico. Le *cellule mesenchimali* rappresentano una rara popolazione di cellule CD34 e CD133 negative presenti nello stroma del midollo osseo (e negli altri tessuti mesenchimali), e sono 10 volte meno numerose delle cellule staminali osteomidollari. Le cellule mesenchimali sono in grado di differenziare in osteociti, condrociti e adipociti. La differenziazione di cellule mesenchimali in cardiomiociti è stata osservata in specifiche condizioni culturali e dopo iniezione nel miocardio di modelli animali sani e infartuati.²⁷⁻²⁹ Qualora iniettate nel tessuto miocardico infartuato, in condizioni sperimentali le staminali mesenchimali sono in grado di migliorare la cinetica parietale regionale e di prevenire il rimodellamento del tessuto non infartuato.²⁹⁻³⁰ Al contrario, non sono noti gli eventuali

effetti di tali cellule sulla perfusione miocardica. I *mioblasti scheletrici* o *cellule satelliti* sono precursori cellulari normalmente quiescenti a livello delle fibre muscolari adulte. I mioblasti possono essere isolati dalle biopsie muscolari scheletriche ed espansi in vitro; essi sono in grado di sviluppare le proprietà delle cellule muscolari striate qualora trapiantati a livello di cicatrici infartuate e di migliorare la performance miocardica pur non sviluppando proprietà di eccitazione-conduzione.¹ Le *cellule staminali cardiache residenti* possono essere espanse in vitro da biopsie miocardiche umane e qualora iniettate in modelli sperimentali di infarto nell'animale paiono essere in grado di promuovere la formazione di cardiomiociti e cellule vascolari con conseguente miglioramento della funzione sistolica globale.³¹ Le ricerche con l'utilizzo di tali cellule sono in fase del tutto iniziale e qualora i risultati suddetti siano riproducibili le cellule staminali cardiache parrebbero essere una grande promessa per la terapia cellulare del cuore.

- *Quale sia il momento migliore per l'inoculazione dall'evento acuto.* Il substrato miocardico e l'andamento della riparazione tissutale e del rimodellamento miocardico dopo infarto determinano il momento ottimale per l'applicazione cellulare. In seguito a una massiva mionecrosi ed emorragia il miocardio ripperfuso è rapidamente invaso da leucociti e mastociti, con generazione di matrice contenente fibrina con un picco tra 24 e 72 ore. Dopo 7-10 giorni dall'infarto miocardico la rimozione dei miociti necrotici avviene in parallelo a una riduzione dei neutrofili e dei monociti, con inizio della granulazione dopo 3 settimane e la completa formazione della cicatrice dopo 6 settimane. Il numero di cellule staminali circolanti mostra un picco e progressivamente decresce tra 7 e 14 giorni dopo l'infarto.³²⁻³³ Tale picco coincide con l'espressione di fattori che modulano la chemiotassi e l'adesione cellulare. Il precoce aumento nel tessuto infartuato di radicali liberi dell'ossigeno può condizionare la sopravvivenza cellulare, mentre le citochine infiammatorie (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10) con il loro effetto pleiotropico possono contribuire alla sopravvivenza o alla distru-

zione dei miociti: indipendentemente dalle proprietà di ciascuna citochina, spesso contrastanti, è il bilanciamento degli effetti infiammatori e antinfiammatori che regola in modo fine il rimodellamento della matrice cellulare, la crescita vascolare e gli eventi critici per la sopravvivenza e la funzione di eventuali cellule staminali impiantate. In conclusione, il momento ottimale per il trapianto cellulare è probabilmente definito dall'equilibrio tra citochine facilitanti e citochine proinfiammatorie potenzialmente dannose con l'*homing* e la sopravvivenza cellulare. Considerato l'andamento dei processi riparativi dopo infarto miocardico e l'espressione di multipli fattori, la probabilità più alta di un ottimale attecchimento e sopravvivenza di eventuali cellule staminali trapiantate appare tra il 3° e il 10° giorno dall'infarto miocardico.³⁴

CONCLUSIONI

La terapia cellulare dell'infarto miocardico acuto è un campo di ricerca clinica e di base in attivo fermento. Molti sono i punti ancora da chiarire prima di definire meccanismi d'azione, tipologie di trattamento e categorie di pazienti che possano beneficiarne. Il nostro Centro è attivamente impegnato proprio in tale settore di ricerca clinica, mediante collaborazione con Centri per la ricerca di base, la promozione di protocolli clinici randomizzati e multicentrici, e l'attiva partecipazione nel Gruppo di Studio per la terapia cellulare della Federazione Italiana di Cardiologia.

Bibliografia

1. Wollert KC, Drexler H. Clinical application of stem cells for the heart. *Circ Res* 2005;96:151-163
2. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003;92:139-150
3. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell* 2004;116:639-648
4. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;401:701-705
5. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003;425:968-973

6. 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
7. 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;7:430-436
8. 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;104:1046-1052
9. Ficht 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;37:1726-1732
10. 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;94:678-685
11. Schuster MD, Kocher AA, Seki T, et al. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H525-H532
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;106:1913-1918
13. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;106:3009-3017
14. 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;44:1690-1699
15. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomized, controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-148
16. 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;95:742-748
17. Chen S, Fang W, 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;94:92-95
18. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, et al. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction. *Circulation* 2005;112:1178-1183
19. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1199-1209
20. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210-1221
21. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;287:C572-C579
22. Marra S, Scacciatella P, Usmani T, et al. Concurrent G-CSF and GM-CSF administration for the induction of bone marrow-derived cell mobilization in patients with acute myocardial infarction: a pilot study evaluating feasibility, safety and efficacy. *Eurointerv* 2006;1:425-431
23. Bruno S, Bussolati B, Scacciatella P, et al. Combined administration of G-CSF and GM-CSF stimulates monocyte derived pro-angiogenic cells in patients with acute myocardial infarction. *Cytokine* 2006;34:56-65
24. Rehman J, Li J, Orschell CM, March KL. Peripheral blood endothelial progenitor cells are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164-1169
25. Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004;95:343-353
26. Rafii S, Lyden D. Therapeutic stem and progenitor cells transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nat Med* 2003;9:702-712
27. Makino S, Fukada K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705
28. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells can differentiate to cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-98
29. Mangi AA, Noiseux N, Kong D, et al. Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003;9:1195-1201
30. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, et al. Mesenchymal stem cells implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002;73:1919-1925
31. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-776
32. Wojakowski W. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, cmet+ stem cells and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;110:3213-3220
33. Massa M. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005;105:199-206
34. Bartunek J. Timing of intracoronary bone-marrow-derived stem cells transplantation after ST-elevation myocardial infarction. *Nature* 2006;355:556