

Nowatorska metoda izolacji endotelialnych komórek progenitorowych w terapii komórkowej

A novel method for isolation of endothelial progenitor cells for cardiac stem cell therapy



Bianka W. Sobolewska¹, Meltem Avci-Adali¹, Bernd Neumann¹, Tim O. Greiner¹, Angelika Stolz², Dorothee Bail¹, Tobias Walker¹, Albertus Scheule¹, Gerhard Ziemer¹, Hans P. Wendel¹

¹Oddział Torakochirurgii, Kardiologii i Chirurgii Naczyniowej, Szpital Uniwersytecki w Tuebingen, Niemcy

²Oddział Chirurgii Ogólnej, Szpital Uniwersytecki w Tuebingen, Niemcy

Kardiologia i Torakochirurgia Polska 2010; 7 (1): 61–65

Streszczenie

Wstęp: Jednym z rodzajów komórek stosowanych w terapii komórkowej są endotelialne komórki progenitorowe (EPCs), które biorą udział w neoangiogenezie oraz regeneracji mięśnia sercowego po zawale serca. W ostatnim naszym badaniu została opracowana szybka i skuteczna metoda izolacji EPCs ze szpiku kostnego.

Cel: Zbadanie wpływu endotelialnych komórek progenitorowych, wyizolowanych przy udziale aptamerów, na unaczynienie i funkcję serca *in vivo*.

Materiał i metody: Bezpośrednio po uzyskaniu szpiku kostnego oraz krwi obwodowej od zdrowych świń, EPCs inkubowano z Dynabeads® i izolowano przy udziale aptamerów albo przeciwciał CD31. Następnie wywołano sztuczny zawał serca i podano EPCs izolowane przy udziale aptamerów albo przeciwciał u grup badawczych. Frakcję wyrzutową lewej komory serca (LVEF) określano przy użyciu echokardiografii. Cztery tygodnie po zawale serca przeprowadzano histologiczną ocenę mięśnia sercowego.

Wyniki: W grupie, która otrzymała dosercowo wyizolowane przy udziale aptamerów EPCs, wykazano istotny wzrost liczby naczyń włosowatych o dużej średnicy światła. Cztery tygodnie po zawale serca nie wykazano istotnej różnicy w pomiarach LVEF wewnątrz grup, jak i pomiędzy grupami.

Wnioski: Endotelialne komórki progenitorowe izolowane przy udziale aptamerów przyczyniły się do poprawy unaczynienia mięśnia sercowego po zawale. Opracowana przez nas nowa metoda terapeutyczna może w przyszłości zwiększyć skuteczność terapii komórkowej u pacjentów z zawałem serca.

Słowa kluczowe: terapia komórkowa, aptamery, niedokrwienie mięśnia sercowego.

Abstract

Background: One of the cell sources valuable for cardiac stem cell therapy is endothelial progenitor cells (EPCs) because of their favourable properties. These cells may contribute to neoangiogenesis and regenerate infarcted myocardium. In the previous study, a rapid and efficient method was established for direct isolation of EPCs from porcine bone marrow.

Aim: To examine the influence of aptamer-isolated EPCs *in vivo* on vascularization and cardiac function.

Material and methods: Immediately after obtaining bone marrow or peripheral blood from healthy pigs endothelial progenitor cells were isolated. The EPCs were incubated with Dynabeads®, which were coated either with aptamer or CD 31 antibodies. Subsequently myocardial ischaemia was induced and then the groups were treated with either aptamer-isolated EPCs or antibody-isolated EPCs. LVEF was quantified by echocardiography. After four weeks, histological examinations were assessed.

Results: The group receiving aptamer-isolated EPCs demonstrated significantly more large-sized capillaries than the other groups ($p \leq 0.05$). Four weeks after myocardial infarction, the change in LVEF did not show any significance within or between all four groups.

Conclusions: Our results showed that transplantation of aptamer-isolated EPCs after myocardial infarction improves angiogenesis. This new therapeutic method may bring greater efficacy of cellular cardiomyoplasty after myocardial infarction.

Key words: cardiac stem cell therapy, aptamers, myocardial ischaemia.

Adres do korespondencji: Hans P. Wendel, Ph.D., Department of Thoracic, Cardiac, and Vascular Surgery, University Hospital Tuebingen, Calwerstr. 7/1, 72076 Tuebingen, Germany, tel. +49 70 712 986 605; e-mail: hans-peter.wendel@med.uni-tuebingen.de

Wstęp

Transplantacja komórek macierzystych stanowi obiecującą metodę leczenia w terapii choroby niedokrwiennej serca i profilaktyce przewlekłej niewydolności serca [1], ponieważ transplantowane komórki macierzyste są zdolne różnicować się w kardiomiocyty i dojrzałe komórki endotelialne oraz mogą indukować regenerację mięśnia sercowego poprzez mechanizmy parakryne [2]. W naszym badaniu podaliśmy dosercowo endotelialne komórki progenitorowe (EPCs). Są to dojrzałe komórki, które mogą być izolowane ze szpiku kostnego, krwi obwodowej lub pępowinowej oraz tkanki tłuszczowej [3]. Komórki te mają zdolność proliferacji, samoponawiania się, różnicowania się w endotelialną linię komórkową oraz wykazują oporność na zmiany środowiskowe [4]. W ostatnich latach celem przewodnim badań zdaje się być izolacja optymalnego typu komórek do transplantacji komórkowej. Do klasycznych metod izolacji EPCs należy m.in. metoda adherencyjna i negatywna selekcja. Jednak wystarczającą liczbę EPCs można uzyskać wyłącznie w wyniku hodowli komórkowej na mediach z określonymi czynnikami wzrostu [5]. Zatem jest potrzebna szybka i skuteczna metoda do izolacji komórek macierzystych zarówno w celach terapeutycznych, jak i w inżynierii tkankowej. W ostatnich naszych badaniach opracowaliśmy szybką i skuteczną metodę bezpośredniej izolacji EPCs przy udziale aptamerów ze szpiku kostnego świni [6, 7]. W porównaniu z przeciwciałami aptamery wykazują wysokie powinowactwo, specyficzność i selektywność wiązania określonych cząsteczek docelowych, jak również nie wywołują odpowiedzi immunologicznej i są szybciej syntezowane, a ich biodostępność i farmakokinetyka może być modyfikowana [8]. Ze względu na korzystne właściwości i łatwy proces syntezy i selekcji aptamery znajdują zastosowanie w diagnostyce i terapii.

Cel pracy

Celem pracy było zbadanie wpływu EPCs, wyizolowanych przy udziale aptamerów, na unaczynienie i funkcję serca *in vivo*.

Materiał i metody

Charakterystyka ogólna projektu badawczego

Wszystkie badania zostały przeprowadzone zgodnie z rekomendacją Federacji Europejskiego Towarzystwa Badań na Zwierzętach Laboratoryjnych (FELASA) oraz zatwierdzone przez Komisję Etyczną do spraw Doświadczeń na Zwierzętach przy Uniwersytecie w Tuebingen. Zwierzęta były randomizowane do 4 grup. W grupie I (4 zwierzęta) został sztucznie wywołany zawał serca, natomiast w grupie II (u kolejnych 4 zwierząt) dodatkowo wstrzyknięto 0,9-procentowy roztwór NaCl w obszar zainicjowanego zawału serca. Obydwie grupy służyły jako grupa kontrolna dla 2 grup badawczych (grupa III i IV). Przy czym w grupie III (6 zwierząt) podano dosercowo EPCs wyizolowane ze szpiku kostnego przy użyciu aptamerów, zaś w grupie IV (5 zwierząt) EPCs z krwi obwodowej, wyizolowane przy

użyciu przeciwciał CD31. We wszystkich grupach przeprowadzono badanie echokardiograficzne w celu oceny frakcji wyrzutowej lewej komory serca (LVEF) przed zawałem serca oraz pooperacyjnie w tygodniowych odcinkach czasu. Po 4-tygodniowym okresie obserwacji zwierzęta zostały podane eutanazji.

Izolacja i barwienie Epos

Przed interwencją chirurgiczną pobrano szpik kostny poprzez punkcję kości udowej w grupie III, a w grupie IV krew obwodową z żyły głównej doczaszkowej. Komórki szpiku i krwi obwodowej bezpośrednio po pobraniu izolowano metodą wirowania w gradiencie gęstości na Histopaque 1.077 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Wyizolowane EPCs inkubowano z 5 mg M280 Streptavidin Dynabeads® (Invitrogen, D-Karlsruhe), które były pokryte 20 μ l (100 μ M) aptameru 36 albo przeciwciałami CD31 skierowanymi przeciwko EPCs, zgodnie z badaniami Hoffmanna i wsp. [7]. 4×10^7 komórek barwiono przyżyciowym barwnikiem fluorescencyjnym PKH26 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Sztuczne wywołanie zawału serca i transplantacja komórkowa

Interwencję chirurgiczną przeprowadzono w znieczuleniu ogólnym z intubacją dotchawiczą i wentylacją kontrolowaną objętością. Dostęp operacyjny uzyskano poprzez boczną torakotomię lewostronną. Sztuczny zawał serca wywołano poprzez podwiązanie pierwszej gałęzi diagonalnej odchodzącej od gałęzi międzykomorowej przedniej (LAD). W godzinnym odstępie czasu wstrzyknięto dosercowo 1 ml 0,9-procentowego NaCl (grupa II) albo 4×10^7 EPCs (grupa III i IV) w obrębie strefy granicznej niedokrwienia mięśnia sercowego.

Ocena histologiczna

Cztery tygodnie po zabiegu chirurgicznym zwierzęta podano eutanazji poprzez podanie letalnej dawki NaCl, którą poprzedzono głęboką sedacją. Po eksplantacji serca pobrano 4 biopsje z obszaru mięśnia sercowego zaopatrywanego przez pierwszą gałąź diagonalną i 2 kontrolne z prawej komory serca ($5 \times 5 \times 5$ mm). W naszym badaniu nie przeprowadzono oceny wielkości obszaru sztucznego zawału serca za pomocą diagnostyki obrazowej. Cztery biopsje zamrożono w płynnym azocie, a następnie utrwalono w Tissue Freezing Medium i pocięto mikrotomem na skrawki 10-mikrometrowe. Zamrożone skrawki oceniano pod mikroskopem fluorescencyjnym (powiększenie 20 \times). Natomiast 2 pozostałe biopsje utrwalono w 4-procentowym formaldehydzie, po czym pocięto na 5-mikrometrowe skrawki i zabarwiono odczynnikiem Masson Trichrome (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). W mikroskopie świetlnym (powiększenie 40 \times) oceniano gęstość kapilar w 5 polach każdego preparatu parafinowego. Wyróżniono 2 rodzaje kapilar: o średniej i dużej średnicy światła, które oceniono na podstawie zawartości erytrocytów w świetle kapilary; odpowiednio 2–5 i 6–10 erytrocytów. Przy czym średnica erytrocytu wynosi 7–8 μ m.

Analiza statystyczna

Uzyskane dane przedstawiono jako wartość średnią \pm odchylenie standardowe. Gęstość kapilar oceniono za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji. Natomiast pomiar powtarzalny analizy wariancji zastosowano do porównania LVEF pomiędzy kolejnymi pomiarami. Za pomocą testu Bonferroni analizowano zależność pomiędzy LVEF a gęstością kapilar. Jeżeli test jednorodności wariancji nie był znaczący, użyto nieparametrycznego testu *U* Manna-Whitneya albo Kruskala-Wallisa. Za poziom istotności przyjęto $p \leq 0,05$. Analizę statystyczną wykonano przy użyciu Excel 2007 i SPSS software (wersja 15.0).

Wyniki

Funkcja serca

Pomiary tygodniowe frakcji wyrzutowej lewej komory serca różniły się istotnie zarówno wewnątrz ($p \leq 0,001$), jak i pomiędzy grupami ($p \leq 0,01$), ale nie wykazano żadnych statystycznie istotnych interakcji pomiędzy grupami. Znalaziono również istotną różnicę w pomiarze LVEF przed zawałem serca i kolejnymi pomiarami po zawale ($p \leq 0,05$). Natomiast pomiary LVEF pomiędzy tygodniem drugim a trzecim i trzecim a czwartym nie różniły się istotnie. We wszystkich grupach wartość LVEF wzrosła istotnie po zawale serca w dwutygodniowym okresie czasu, a następnie nie zmieniła się istotnie statystycznie aż do czwartego tygodnia (ryc. 1).

Ocena angiogenezy

Ilościową ocenę neowaskularyzacji przeprowadzono cztery tygodnie po zawale serca. Średnica światła naczynia włosowatego wynosiła 0,014–0,035 mm oraz 0,056–0,070 mm dla kapilar o średniej i dużej średnicy. W grupie III, która otrzymała EPCs wyizolowane przy udziale aptamerów, znaleziono istotnie większą liczbę kapilar o dużej średnicy w porównaniu z pozostałymi grupami ($p \leq 0,05$). Natomiast liczba kapilar o średniej i dużej średnicy w grupie I, II i IV nie wykazały istotnych różnic (ryc. 2).

Śledzenie znakowanych fluorescencyjnie

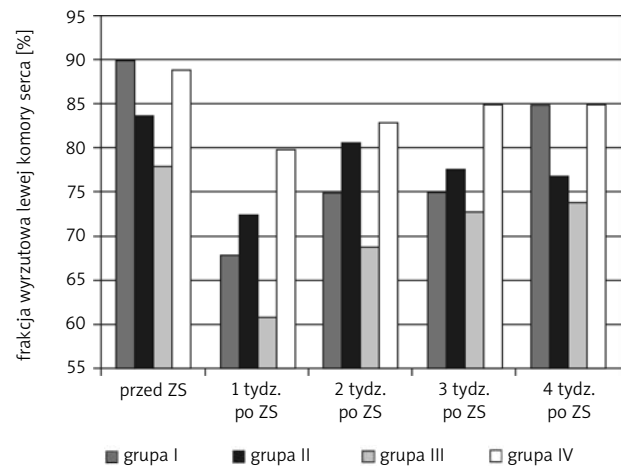
Epos

Jedynie w grupie III wykazano luźno rozproszone barwione EPCs w obszarze perfuzji. W żadnej z grup nie zaobserwowano Dynabeads pod mikroskopem fluorescencyjnym.

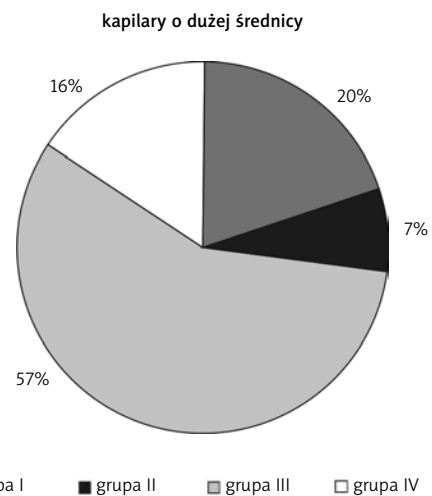
Dyskusja

Bezpośrednia izolacja komórek macierzystych stanowi obecnie duży problem w transplantacji komórek macierzystych u osób z chorobą niedokrwienną mięśnia sercowego. W naszym badaniu zastosowaliśmy po raz pierwszy opisaną powyżej metodę izolacji EPCs *in vivo*, przy czym porównaliśmy ją z klasyczną techniką separacji z zastosowaniem przeciwciał. Tylko w grupie z przeszczepionymi EPCs wyizolowanymi przy udziale aptamerów wykazaliśmy istotny wzrost gęstości naczyń włosowatych, podobnie jak Kawamoto i wsp. [9] i Schuster i wsp. [10]. W naszym ba-

daniu oceniliśmy także frakcję wyrzutową lewej komory serca. Choć we wszystkich grupach LVEF wzrosła do wartości wyjściowej sprzed zawału serca, pomiar LVEF w grupie z wyizolowanymi przy udziale aptamerów EPCs nie wykazał statystycznej istotności w porównaniu z pozostałymi grupami. Nasze wyniki dotyczące LVEF pokrywają się z badaniami Strauera i wsp., Janssensa i wsp., ASTAMI oraz BOOST [11–14], ale nie z wynikami Assmusa i wsp., Bartunek i wsp., Chena i wsp., Fernandez-Aviles i wsp., Meluzina i wsp. oraz Schachingera i wsp. [15–20]. Na wyżej wymienioną rozbieżność wyników mogą wpływać następujące czynniki: metody izolacji, liczba komórek czy czas transplantacji komórek macierzystych. W większości badań klinicznych zastosowano tę samą metodę izolacji komórek – wirowanie w gradiencie Ficoll [12–14, 16, 17, 20]. Jedynie w badaniach ASTAMI i BOOST użyto całkowicie odmiennych technik izolacji, co mogłoby wyjaśnić istotnie mniejszą liczbę komórek mezenchymalnych uzyskanych w badaniu ASTAMI [21]. W naszym badaniu użyliśmy aptameru 36 do izolacji EPCs, który wykazuje wysoką zdolność wiązania EPCs (72,8%), za-



Ryc. 1. Frakcja wyrzutowa lewej komory serca przed zawałem serca (ZS) i po nim



Ryc. 2. Ocena neowaskularyzacji 4 tyg. po zawale serca

równie *in vitro*, jak i *in vivo* [7]. Ponadto transplantowaliśmy EPCs w dniu izolacji bez dodatkowej inkubacji, która mogłaby wpłynąć na funkcję komórek. Odmienne wyniki końcowe przeprowadzonych badań można tłumaczyć również liczbą przeszczepionych komórek macierzystych. W naszym badaniu transplantowaliśmy 4×10^7 EPCs. Dla porównania Kawamoto i wsp. podali przy użyciu katetera NOGA taką samą liczbę komórek (autologiczne EPCs) i wykazali istotny wzrost zarówno neowaskularyzacji, jak i LVEF w badanej grupie [9]. W badaniach klinicznych z mniejszą liczbą transplantowanych komórek tylko Strauer potwierdził istotny wpływ MNCs na funkcję serca [13]. Natomiast w badaniach TOPCARE-AMI i BOOST, w których podano większą liczbę komórek, nie znaleziono żadnej korelacji między liczbą komórek i skutecznością leczenia [11, 14]. W przeciwieństwie do powyższych badań Meluzin i wsp. i Lipinski i wsp. wykazują związek między liczbą wstrzykiwanych komórek a funkcją serca [15, 22].

Również czas transplantacji komórek może odgrywać ważną rolę w terapii komórkowej. W naszym badaniu przeszczepialiśmy komórki bezpośrednio po ich wyizolowaniu, podobnie jak Kawamoto i wsp. [9]. W innych badaniach klinicznych podawano MNCs dowieńcowo w ciągu 7 dni albo po 14 dniach. Tylko w tych ostatnich badaniach osiągnięto istotny wzrost funkcji serca [16, 18, 19], natomiast pozostałe badania kliniczne różniły się wynikami [11–15, 17, 20]. Dotychczas idealny czas transplantacji komórek nie został zdefiniowany. Strauer i wsp. sugerują, że okres między 7. a 14. dniem jest najlepszy na transplantację komórek, gdyż bezpośrednio po zawale serca reakcja zapalna dominuje nad fazą zdrowienia [13]. Natomiast Janssens i wsp. twierdzą, że zwężenie naczyń po reperfuzji oraz ograniczony *homing* w pierwszych dniach po zawale może sprzyjać transplantacji komórek [12]. Ponadto kwestionuje się zdolność komórek progenitorowych szpiku do różnicowania się w kardiomiocyty [23, 24], a dokładny mechanizm poprawy funkcji i perfuzji serca nie jest jeszcze znany. W 2008 r. Flaherty przedstawił badanie, w którym pierwszy raz wykazano zdolność różnicowania się niefrakcjonowanych MNCs *in vitro* bez hodowli z kardiomiocytami [25]. Również *homing* EPCs może mieć wpływ na LVEF. Chociaż w badaniu Schäfera i wsp. wykazano gęste nagromadzenie komórek w obszarze krioblizny, w naszym badaniu *homing* był niewielki, a *beads* nie zaobserwowano. Należy dodać, że nasze badanie przeprowadziliśmy cztery tygodnie po transplantacji komórek, a Schäfer po 20 godzinach [26]. Podsumowując, w naszym badaniu wykazaliśmy istotną neowaskularyzację w grupie, w której przeszczepiliśmy wyizolowane przy udziale aptamerów EPCs.

Wnioski

W naszym badaniu wykazaliśmy, że wyizolowane przy udziale aptamerów EPCs w porównaniu z EPCs wyizolowanymi przy użyciu przeciwciał przyczyniły się do istotniejszego wzrostu gęstości naczyń włosowatych o dużej średnicy, ale nie wpłynęły na poprawę funkcji serca. Na powyższe wyniki mógł wpłynąć niewielki *homing* komórek. Poza tym

należy zauważyć, że w przeprowadzeniu naszego badania posłużyliśmy się młodymi świniąmi, które wykazały dużą zdolność regeneracji funkcji serca. Nasze badanie jest pierwszym, które zastosowało nową technikę izolacji komórek macierzystych *in vivo*, dlatego są konieczne dalsze badania, które ulepszyłyby i wyjaśniły mechanizmy transplantacji komórek macierzystych izolowanych przy udziale aptamerów. W przyszłości technika izolacji przy udziale aptamerów może przynieść nowe perspektywy w zakresie terapii komórkowej.

Piśmiennictwo

- Chachques JC, Acar C, Herreros J, Trainini JC, Prosper F, D'Attellis N, Fabiani JN, Carpentier AF. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Ann Thorac Surg* 2004; 73: 1121-1130.
- van den Bos EJ, van der Giessen WJ, Duncker DJ. Cell transplantation for cardiac regeneration: where do we stand? *Neth Heart J* 2008; 16: 88-95.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasclogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 288-293.
- Dernbach E, Urbich C, Brandes RP, Hofmann WK, Zeiher AM, Dimmeler S. Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* 2004; 104: 3591-3597.
- Hristov M, Erl W, Weber PC. Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1185-1189.
- Guo KT, Schäfer R, Paul A, Gerber A, Ziemer G, Wendel HP. A new technique for the isolation and surface immobilization of mesenchymal stem cells from whole bone marrow using high-specific DNA aptamers. *Stem Cells* 2006; 24: 2220-2231.
- Hoffmann J, Paul A, Harwardt M, Groll J, Reeswinkel T, Klee D, Moeller M, Fischer H, Walker T, Greiner T, Ziemer G, Wendel HP. Immobilized DNA aptamers used as potent attractors for porcine endothelial precursor cells. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84: 614-621.
- Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu Rev Med* 2005; 56: 555-583.
- Kawamoto A, Tkebuchava T, Yamaguchi J, Nishimura H, Yoon YS, Milliken C, Uchida S, Masuo O, Iwaguro H, Ma H, Hanley A, Silver M, Kearney M, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107: 461-468.
- Schuster MD, Kocher AA, Seki T, Martens TP, Xiang G, Homma S, Itescu S. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H525-H532.
- Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, Hecker H, Schaefer A, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006; 113: 1287-1294.
- Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, Kalantzi M, Herbots L, Sinnaeve P, Dens J, Maertens J, Rademakers F, Dymarkowski S, Gheysens O, Van Cleemput J, Bormans G, Nuyts J, Belmans A, Mortelmans L, Boogaerts M, Van de Werf F. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet* 2006; 367: 113-121.
- Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg RV, Kögler G, Wernet P. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-1918.
- Lunde K, Solheim S, Forfang K, Arnesen H, Brinch L, Bjørnerheim R, Ragnarsen A, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Aakhus S. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1199-1209.

15. Meluzin J, Mayer J, Groch L, Janousek S, Hornáček I, Hlinomaz O, Kala P, Panovský R, Prásek J, Kamínek M, Staníček J, Klabusay M, Korístek Z, Navrátil M, Dusek L, Vinklárková J. Autologous transplantation of mononuclear bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction: the effect of the dose of transplanted cells on myocardial function. *Am Heart J* 2006; 152: 975.e9-15.
16. Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J, Fernández ME, Peñarubia MJ, de la Fuente L, Gómez-Bueno M, Cantalapiedra A, Fernández J, Gutierrez O, Sánchez PL, Hernández C, Sanz R, García-Sancho J, Sánchez A. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95: 742-748.
17. Assmus B, Honold J, Schächinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006; 355: 1222-1232.
18. Bartunek J, Vanderheyden M, Vandekerckhove B, Mansour S, De Bruyne B, De Bondt P, Van Haute I, Lootens N, Heyndrickx G, Wijns W. Intracoronary injection of CD133-positive enriched bone marrow progenitor cells promotes cardiac recovery after recent myocardial infarction: feasibility and safety. *Circulation* 2005; 112 (Suppl.): I178-183.
19. Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. 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.
20. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, Honold J, Lehmann R, Teupe C, Abolmaali ND, Vogl TJ, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. 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.
21. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2007; 28: 766-772.
22. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, Vanderheyden M, Kim HS, Kang HJ, Strauer BE, Vetrovec GW. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1761-1767.
23. 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: 669-673.
24. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, Pasumarthi KB, Virag JJ, Bartelmez SH, Poppa V, Bradford G, Dowell JD, Williams DA, Field LJ. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 2004; 428: 664-668.
25. Flaherty MP, Abdel-Latif A, Li Q, Hunt G, Ranjan S, Ou Q, Tang XL, Johnson RK, Bolli R, Dawn B. Noncanonical Wnt11 signaling is sufficient to induce cardiomyogenic differentiation in unfractionated bone marrow mononuclear cells. *Circulation* 2008; 117: 2241-2252.
26. Schäfer R, Wiskirchen J, Guo K, Neumann B, Kehlbach R, Pintaske J, Voth V, Walker T, Scheule AM, Greiner TO, Hermanutz-Klein U, Claussen CD, Northoff H, Ziemer G, Wendel HP. Aptamer-based isolation and subsequent imaging of mesenchymal stem cells in ischemic myocardium by magnetic resonance imaging. *Rofo*, 2007; 179: 1009-1015.