

Aus der Klinik für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie
am Deutschen Herzzentrum Berlin
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. mult. Roland Hetzer

HABILITATIONSSCHRIFT

Translationale Aspekte der Zelltherapie bei Herzinsuffizienz

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Herzchirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Boris A. Nasser

Eingereicht: Mai 2014
Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr.h.c. Friedhelm Beyersdorf
2. Gutachter: Prof. Dr. Christof Schmid

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Herz-Kreislaferkrankungen als Todesursache Nummer eins	4
1.2. Pathogenese der Herzinsuffizienz	4
1.3. Remodeling des Herzens	6
1.3.1. Die Rolle von Stickstoffmonoxid beim ventrikulären Remodeling	6
1.3.2. Die Rolle von Statinen auf das ventrikuläre Remodeling	8
1.4. Behandlungsmethoden der ischämischen Herzinsuffizienz	10
1.5. Organtransplantation und mechanische Kreislaufunterstützung	10
1.6. Myokardiale Regeneration	11
1.7. Zelltherapie zur kardialen Regeneration	13
1.7.1. Allgemein	13
1.7.2. Transplantation von Kardiomyozyten	13
1.7.3. Transplantation von Skelettmyoblasten	13
1.7.4. Kardiale Stammzellen	14
1.7.5. Embryonale Stammzellen und Alternativen	15
1.7.6. Knochenmarkzellen	16
1.7.7. Klinische Anwendung von Zelltherapie im Herzen	17
1.7.7.1. Mononukleäre Knochenmarkzellen beim akuten Myokardinfarkt	18
1.7.7.2. Mononukleäre Knochenmarkzellen bei der chronischen Ischämie	18
1.7.7.3. Angereicherte Stammzellprodukte	19

1.7.7.4. Fragen und Hürden bei der Anwendung von Zellprodukten für kardiale Erkrankungen	21
2. Eigene Arbeiten	23
2.1. Katheterbasierte Zelltransplantation	23
2.2. Echokardiographische Evaluation von regionalen Wandbewegungen nach Zelltransplantation	32
2.3. Klinische Studien zur myokardialen Regeneration bei chronischer Herzinsuffizienz	50
3. Diskussion	73
4. Schlussfolgerung	82
5. Literaturverzeichnis	84
6. Terminologie und Abkürzungsverzeichnis	101
7. Danksagung	103
8. Eidesstattliche Versicherung	106

1. Einleitung

1.1. Herz-Kreislaufkrankungen als Todesursache Nummer eins

Die häufigste Todesursache in Deutschland und Europa sind die Herz-Kreislaufkrankungen. Die Zahlen des Statistischen Bundesamtes belegen zwar für den Zeitraum von 1980 bis 2012 eine Abnahme von 500.481 auf 349.217 Erkrankungen, für 2012 entsprach dies aber immer noch 40,2 % aller Sterbefälle in Deutschland. Besonders betroffen sind ältere Menschen, bei den über 65-jährigen betrug der Anteil 92 %.

Unter den Herz-Kreislaufkrankungen (ICD-10: I0-99) nehmen die ischämischen Herzerkrankungen (ICD-10: I20-25) mit 128.171 Todesfällen in 2012 den größten Anteil ein. Es verstarben 71.655 Menschen an den Folgen einer chronisch ischämischen Herzerkrankung (ICD-10: I25), 52.516 an einem akuten Myokardinfarkt (ICD-10: I21), 2909 an einem rezidivierenden Myokardinfarkt (ICD-10: I22) und 46.410 an Herzinsuffizienz (ICD-10: I50).

Obwohl in beiden Geschlechtergruppen der größte Anteil an der Gesamtsterblichkeit auf die Herz-Kreislaufkrankungen zurückzuführen ist (Männer: 36,1 %, Frauen: 43,9 %) gibt es Geschlechterunterschiede hinsichtlich chronischer und akuter Verläufe der ischämischen Herzerkrankungen. Lag bei einem akuten oder rezidivierenden Myokardinfarkt die Sterblichkeit der Männer bei 55,7 % betrug sie bei Frauen nur 44,3 %, während es hingegen bei der chronisch ischämischen Herzkrankheit kaum einen prozentualen Unterschied gab (Männer: 48,8 %, Frauen: 51,2 %).

Andere Ursachen für ein Herzversagen sind inflammatorische, toxische oder auch strukturelle Schäden, wie sie bei den unterschiedlichen Herzklappenerkrankungen oder kongenitalen Herzfehlern auftreten, sowie genetische Prädispositionen. Diese werden als non-ischämische Herzinsuffizienz zusammengefasst. Die zugrundeliegende Ursache ist nicht immer zu eruieren, dann spricht man von einer idiopathischen Kardiomyopathie.

Beim ischämischen Herzversagen führt der pathophysiologische Mechanismus zum Zelltod.

1.2. Pathogenese der Herzinsuffizienz

Wenn die Auswurfleistung des Herzens nicht mehr genügt, alle Organe auch unter Belastung ausreichend mit Blut zu versorgen, sprechen wir von einer Herzinsuffizienz. Durch erhöhte Katecholaminausschüttung und dadurch entstehende Tachykardie und Vasokonstriktion versucht der Körper, auf das verminderte Herz-Minuten-Volumen zu reagieren. Ein weiterer Kompensationsmechanismus ist die Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie, jedoch

kommt es im weiteren Verlauf, noch vor Beginn des Stadiums der Dekompensation, bei den meisten Patienten zur Ventrikeldilatation. In diesem Zusammenhang weichen die Aktin-Myosin-Filamente auseinander, die daraufhin nicht mehr effizient ineinander greifen und nur eingeschränkte Kontraktionskraft entwickeln können. Zusätzlich entsteht eine Dehiszenz der Glanzstreifen, welche für die elektromechanische Koppelung beziehungsweise die interzelluläre Kommunikation der Kardiomyozyten dringend benötigt werden. Dadurch und durch eine Verminderung energiereicher Phosphatverbindungen verliert das Herz an Muskelkraft und es kommt zur Eskalation der oben erwähnten Kammerdilatation. Bei der akuten Herzinsuffizienz geschieht dies, ohne dass das Herz mit Hypertrophie gesunder Kardiomyozyten reagieren kann. Im Gegensatz dazu entsteht bei der chronischen Herzinsuffizienz zuerst eine Anpassungshypertrophie. Dabei ändert sich das Verhältnis von Kardiomyozytenquerschnitt zu Kapillarquerschnitt, was zur Hypoxie und Ischämie weiterer Kardiomyozyten und zum Zelltod dieser führt. Dieses „*mismatch*“ und die abnorme Druck- und Zugbelastung bilden einen *Circulus vitiosus* bei der Herzinsuffizienz.

Sinkt bei der koronaren Herzerkrankung die koronare Durchblutung um mehr als 75% der Norm oder besteht in Folge der Hypertrophie ein Kardiomyozyten-Kapillar-*mismatch* treten irreversible Schäden für die Kardiomyozyten auf. Es kommt zur Umstellung von der aeroben auf die anaerobe Glykolyse. Außerdem werden durch die verminderte Durchblutung toxisch wirksame Stoffwechselprodukte (wie z.B. Laktat, Acyl-Coenzym A, langkettiges Acyl-Karnitin, CO₂ und NADH) angereichert, so dass es zur Schädigung der Zellmembran, von Mitochondrien und des sarkoplasmatischen Retikulum kommt. Die erhöhte Konzentration von Kalziumionen bewirkt eine Entspannung der Aktin-Myosin-Fibrillen und Zerstörung der Zellmembran.. Es entsteht eine Nekrosezone, welche von einer perinekrotischen Zone aus noch vitalem aber nicht kontraktilem Myokard umgeben ist.

1.3. Remodeling des Herzens

Die Abweichung der normalen ventrikulären Architektur wird als ventrikuläres Remodeling bezeichnet. Diese architektonischen Abweichungen beinhalten makroskopische sowie histopathologische Veränderungen besonders nach Myokardinfarkten. Dabei ist zum einen die normale ventrikuläre Geometrie im Sinne von Veränderungen von Volumen, Wanddicke und Form und zum anderen die myozytäre Hypertrophie und Fibrose gemeint, welche sich nicht nur im Infarktareal und dem infarktbenachbarten Myokard (*Border Zone*) abspielt, sondern auch in infarktfernen Arealen stattfindet und dem Erhalt des Herzminutenvolumens und der Begrenzung der Wandspannung dient (1-4). In einigen Fällen führt aber das anhaltende, meist linksventrikuläre (LV) Remodeling zur Minderung der LV-Kontraktilität, welche sich echokardiographisch als eingeschränkte LV-Ejektionsfraktion (LVEF) darstellt und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität einhergeht (5). Neue therapeutische Strategien, das ventrikuläre Remodeling nach Herzinfarkt zu begrenzen, können die Inzidenz einer Herzinsuffizienz senken und ein Überleben verbessern (6). Um solche neuen therapeutischen Ansätze zu entwickeln ist es essentiell, die Mechanismen zu verstehen, die das ventrikuläre Remodeling regulieren.

1.3.1. Die Rolle von Stickstoffmonoxid beim ventrikulären Remodeling

Das Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst viele der Prozesse, welche in das ventrikuläre Remodeling eingreifen. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass die Langzeitgabe von NO-haltigen Medikamenten das LV-Remodeling nach Herzinfarkt begrenzen kann (7). Endotheliales NO senkt den systemischen Gefäßwiderstand und damit Vor- und Nachlast des Herzens (8). Auch wird dem NO eine die Angiogenese stimulierende (9) und antifibrotische Wirkung (10) sowie eine Verminderung der Angiotensin-II-induzierten myozytären Hypertrophie zugeschrieben (11). Die Inhibition der drei bekannten NO-Synthetasen (NOS) hat verschiedene Effekte auf die myokardiale Struktur und Funktion (12-14). Wir untersuchten die spezifische Rolle der endothelialen NOS (NOS3) auf die ventrikuläre Funktion und das Remodeling im nicht-infarzierten Myokard nach Herzinfarkt in Mäusen (15). Nach permanenter Ligatur des Ramus interventrikularis anterior (RIVA) bei Wildtyp-Mäusen (WT) und NOS3-knock-out-Mäusen (NOS3^{-/-}) verglichen wir diese Gruppen hinsichtlich echokardiographischer und hämodynamischer Parameter, des LV-Gewichts und der Infarktgröße, der LV-Kapillardichte und

Kardiomyozytengröße sowie des Überlebens nach Myokardinfarkt. Zusätzlich wurde der Einfluss einer reduzierten Nachlast auf das LV Remodeling bei den NOS3^{-/-}-Mäusen untersucht.

Vor der Ligatur des RIVA und zwei Tage nach induziertem Herzinfarkt zeigten sich keine Unterschiede der LV-Geometrie und -Funktion der beiden Mäuse-Gruppen. Achtundzwanzig Tage nach dem Infarkt zeigt sich echokardiographisch eine größere LV-Dilatation und Einschränkung der LV-Funktion bei den NOS3^{-/-} als bei den WT-Mäusen. Die hämodynamischen Untersuchungen konnten die deutlich verminderte systolische und diastolische LV-Funktion der NOS3^{-/-}-Mäuse bestätigen. Auch war die LV-Hypertrophie deutlich ausgeprägter in der NOS3^{-/-}-Gruppe als in der WT-Gruppe. Ein Fehlen des NOS3 ging außerdem mit einer deutlich erhöhten Mortalität einher.

NOS3^{-/-}-Mäuse haben einen höheren Blutdruck als WT-Mäuse und damit eine erhöhte Nachlast. Um dem negativen Effekt der erhöhten Nachlast auf das LV-Remodeling entgegen zu wirken, welcher zu schlechteren Ergebnissen bei den NOS3^{-/-}-Mäusen hätte führen können, erhielten einige NOS3^{-/-}-Tiere eine Langzeittherapie mit Hydralazin. Obwohl sich der Blutdruck dieser Tiere nicht von denen der WT-Gruppe unterschied bestätigten sich die schlechteren Ergebnisse der NOS3^{-/-}-Mäuse hinsichtlich der erhobenen Parameter. Sowohl die *Fraction of Shortening* (FS) und die LVEF als auch das Überleben nach Herzinfarkt waren besser in Hydralazin-behandelten NOS3^{-/-}-Mäusen als in nicht-behandelten. Trotz einer LV-Dilatation und Verminderung der Kardiomyozytenkerndichte in den untersuchten Gewebeschichten bei WT-Mäusen nach Herzinfarkt blieben LV-Gewicht und Kardiomyozytendiameter in den nicht-infarzierten Arealen unverändert. Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass in nicht-infarzierten Arealen in Gegenwart von NOS3, über welches die WT-Mäuse verfügen, das Myokard nach Infarkt elongiert. Im Gegensatz dazu war bei NOS3^{-/-}-Mäusen auch nach Hydralazin-Therapie das LV-Gewicht und die Kardiomyozytendiameter deutlich angestiegen. Dies führte uns zu der Schlussfolgerung, dass in Gegenwart von NOS3 die LV-Hypertrophie reduziert wird. Der genaue Mechanismus dahinter ist jedoch weiterhin unklar. Ebenfalls unklar ist, warum trotz größerer Hypertrophie bei den NOS3^{-/-}-Mäusen die LV-Funktion stärker eingeschränkt ist als bei den WT-Mäusen. Die Beobachtung, dass in den nicht-infarzierten Arealen die Kapillardichte bei den WT-Mäusen erhalten bleibt, bei den NOS3^{-/-}-Mäusen dagegen abnimmt, könnte ein Erklärungsansatz der schlechteren LV-Funktion der NOS3^{-/-}-Mäuse sein.

Zusammenfassend konnten unsere Ergebnisse die Rolle von NOS3 bei der LV-Dilatation, Dysfunktion und Hypertrophie bei Mäusen durch den Einfluss auf die Hypertrophie nach Myokardinfarkt zeigen und damit Wege für neue Therapieansätze zur Eindämmung des LV-Remodeling weisen.

1.3.2. Die Rolle von Statinen auf das ventrikuläre Remodeling

Ein positiv kardiovaskulärer Effekt der Statine liegt nicht allein in ihrem Serumfettspiegel senkenden Mechanismus. So konnte zum Beispiel durch die Gabe von Simvastatin nach einem Herzinfarkt die Ventrikeldilatation, die sich negativ auf die Ventrikelfunktion auswirkt, gemindert werden (16). Statine erhöhen die Expression und Aktivität von NOS3 nicht nur in vitro in Zellkulturen sondern auch in vivo in den Koronararterien (17-20). Dimmeler und Kollegen konnten zeigen, dass Statine das Potential zur Differenzierung von endothelialen Progenitorzellen in im Blut zirkulierenden mononukleären Zellen und CD34⁺-hämatopoetischen Stammzellen steigern können. Sie konnten auch zeigen, dass mit Statinen behandelte Mäuse eine größere Anzahl von c-kit(+)/Sca-1(+)-positiven hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und eine größere Anzahl von differenzierten endothelialen Progenitorzellen (EPCs) aufweisen (21). Auch in Ratten geht die Gabe von Statinen mit einer Erhöhung der Anzahl der zirkulierenden EPCs einher (22). Diese Beobachtungen und ein durch sie verminderter Ischämie-Reperfusionsschaden, welcher durch neutrophile Zellen induziert wird, weisen daraufhin, dass Statine einzigartige Mechanismen induzieren, welche einem kardialen Remodeling nach myokardialer Ischämie entgegenwirken können. Diese vielversprechenden Daten scheinen besonders dann zu greifen, wenn auf eine Ischämie eine Reperfusion folgt und nicht ein permanenter Koronarverschluss vorliegt (18,23-26). Durch frühzeitige Diagnostik und verbesserte interventionelle Maßnahmen können viele Patienten mit einem akuten Herzinfarkt einer schnellen myokardialen Reperfusion zugeführt werden.

Ein direkter Vergleich der protektiven Wirkung von Rosuvastatin auf das kardiale Remodeling nach einem permanenten Koronararterienverschluss und einer temporären Ischämie mit folgender Reperfusion wurde jedoch bis 2004 nicht unternommen. Wir untersuchten deshalb erstmals in einer randomisierten und blinden Studie den Effekt von Rosuvastatin auf die LV-Infarktgröße und das postischämische Remodeling nach permanenten Verschluss im Gegensatz zum temporären Verschluss (60 min) des RIVA mit anschließender Reperfusion im Mäusemodell (27). Es wurde postuliert, dass die Gabe von Rosuvastatin zu einer Verkleinerung der Infarktgröße nach Wiedereröffnung des RIVA durch eine Verminderung von neutrophilen Zellen im reperfundierten Myokard, einer Erhöhung der NOS3-Expression und einer Stammzellmobilisation führt.

Dazu randomisierten wir männliche 10–14 Wochen alte C57BL/6-Mäuse in eine Gruppe, welche einmal täglich 20 mg/kg/d Rosuvastatin subkutan erhielt und eine Gruppe, welche Natriumchlorid erhielt. Die Therapie wurde 2 Tage vor dem Herzinfarkt begonnen und bis zum

Tod weitergeführt. Ein Myokardinfarkt wurde chirurgisch entweder durch eine permanente Ligatur oder durch eine 60-minütige Okklusion des RIVA mit anschließender Wiedereröffnung der Ligatur zur Reperfusion induziert. Zur Evaluation der LV-Funktion und -Geometrie wurde am 2. und 28. Tag nach RIVA-Ligatur eine Echokardiographie durchgeführt. Anschließend wurden die Mäuse getötet, die Herzen gewogen und in 4%iger Formaldehyd-Lösung konserviert. Anhand von Paraffinschnitten wurde die Infarktgröße bestimmt. Zusätzlich erfolgten immunhistochemische Untersuchungen zur Bestimmung von neutrophilen Zellen und Leukozyten, eine Blutflusszytometrie zur Bestimmung von c-Kit⁺-, CD34⁺- und Sca-1⁺-Zellen (Stammzellmarker) und die Bestimmung von NOS3-Ribonukleinsäure (RNA) und -Protein im LV.

Aufgrund unserer Resultate konnten wir keinen positiven Effekt von Rosuvastatin auf die Infarktgröße nach permanenten RIVA-Okklusion feststellen. Diese Beobachtung war auch unabhängig vom Vorhandensein der NOS3. Bei Mäusen mit einer temporären RIVA-Okklusion und anschließender Reperfusion konnten wir feststellen, dass die Infarktgröße bei den mit Rosuvastatin behandelten Mäusen signifikant kleiner (18 %, P = 0.03) war als bei den Mäusen, welche mit Natriumchlorid behandelt wurden. Rosuvastatin kann somit die myokardiale Nekrose bei Reperfusion eindämmen. Durch die durchgeführte Immunhistochemie konnte der von Jones (18) postulierte hemmender Effekt von Rosuvastatin auf die neutrophilen Zellen und Leukozyten entkräftet werden. Die Anzahl dieser Zellen unterschied sich in der mit Rosuvastatin und Natriumchlorid behandelten Gruppe nicht signifikant. Weiter konnten wir unter der in unserer Studie durchgeführten Rosuvastatin-Dosierung keinen Anhaltspunkt dafür finden, dass der positive Effekt von Rosuvastatin auf die Infarktgröße durch eine vermehrte Mobilisation von Stammzellen bzw. Progenitorzellen ins periphere Blut zustande kommt, wie es von einigen Forschergruppen beschrieben wurde (21,22,28,29). Die Konzentration der für die getesteten Stammzellmarker positiven Zellen unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Unsere Daten zeigen auch, dass die verminderte Infarktgröße in mit Rosuvastatin behandelten Mäusen nach Reperfusion nicht durch einen Anstieg der NOS3 RNA oder Proteinexpression zustande kommt.

1.4. Behandlungsmethoden der ischämischen Herzinsuffizienz

Der Rückgang der Sterbefälle in den letzten Jahrzehnten und die verbesserte Lebenserwartung und -qualität sind das Resultat verbesserter medikamentöser und chirurgischer Behandlungsmethoden bei den ischämischen Herzerkrankungen.

Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass Patienten von der medikamentösen Therapie mit *Angiotensin-Converting-Enzyme*-Hemmern (ACE), Beta-Rezeptorenblockern (β -Blockern) und Aldosteron-Rezeptorblockern hinsichtlich Mortalität und Morbidität profitieren (30).

Solche offensichtlich für den Patienten relevanten Endpunkte wie Mortalität und Morbidität sind auch besonders relevant für die Aufsichtsbehörden bei der Zulassung neuer Medikamente und Behandlungsmethoden. Im englischen Sprachgebrauch ist der Terminus *Surrogate* für einen Endpunkt entstanden, der zwar für den Patienten nicht direkt relevant ist, dafür aber einen biologisch relevanten und bleibenden Zusammenhang mit einem klinischen Vorteil aufweist (31). Beispiele solcher *Surrogate*-Endpunkte sind medikamentös-induzierte Blutdrucksenkung und Serum-Cholesterin-Konzentrationen. Konstam und Kollegen warfen die berechnete Frage auf, ob die Beeinflussung des ventrikulären Remodeling einen weiteren *Surrogate*-Endpunkt darstellen soll (30).

1.5. Organtransplantation und mechanische Kreislaufunterstützung

Seit der 1954 von Murray durchgeführten ersten erfolgreichen Organtransplantation in eineiigen Zwillingen (32) ist die Organtransplantation ein etabliertes und weltweit anerkanntes Verfahren für Patienten im Endstadium bei Organversagen geworden. In den darauffolgenden Jahrzehnten überstieg der Bedarf an Organen das Organangebot um ein vielfaches. Waren es in den USA 1989 noch 19.095 Patienten, die auf ein Spenderorgan warteten, vervielfachte sich diese Zahl bis August 2012 auf 124.672 (United Network for Organ Sharing National Patient Waiting List).

Die erste erfolgreiche orthotope Herztransplantation führte Barnard 1967 durch (33). Seither stieg nicht nur die Anzahl der durchgeführten Herztransplantationen drastisch an, sondern auch die Überlebensdauer der Patienten, nicht zuletzt dank verbesserter immunsuppressiver Therapie.

Trotz dieser Fortschritte wächst die Kluft zwischen Organangebot und -nachfrage. Im Jahr 2012 konnten im Eurotransplant-Raum nur 607 Patienten von 1287 Patienten auf der aktiven Warteliste herztransplantiert werden (34). Im gleichen Jahr verstarben 231 Patienten auf der

Eurotransplant-Warteliste und allein in Deutschland erhielten > 800 Patienten ein mechanisches Kreislaufunterstützungssystem (DGHTG-Leistungsstatistik 2012).

Mechanische Kreislaufunterstützungssysteme helfen Patienten über eine kritische Zeit zu kommen, während sie auf ein Organ warten. Der Verbesserung dieser Systeme und der Antikoagulationstherapie ist es zu verdanken, dass Patienten viele Jahre ein relativ normales Leben führen können, während sie auf ein geeignetes Spenderorgan warten (Überbrückung bis zur Transplantation) oder sogar bei Überschreiten der Altersgrenze für Herztransplantationen (endgültige Therapie), welche in Deutschland bei 65 Jahren liegt, ihren Lebensabend mit einem solchen System verbringen. Bei einigen wenigen Patienten hat sich gezeigt, dass sich durch eine mechanische Kreislaufunterstützung eine myokardiale Regeneration im Sinne einer Verbesserung der linksventrikulären Funktionsparameter einstellen kann und dies sogar zur Explantation des Ventricular Assist Device (VAD, Überbrückung zur Erholung) führen kann. Trotz dieser Verbesserung im Bereich von Herztransplantation und mechanischer Kreislaufunterstützung sind die Nachteile dieser Therapien nicht außer acht zu lassen. So ist nach einer Herztransplantation eine lebenslange immunsuppressive Therapie nötig, gepaart mit einem erhöhten Risiko für Infektionen, Tumorwachstum und unerwünschten Nebenwirkungen. Bei der mechanischen Kreislaufunterstützung erhöht eine antikoagulative Therapie das Risiko eines thromboembolischen oder Blutungsereignisses (35,36). Somit sind beide Verfahren nicht nur suboptimal, sondern auch kostenintensiv.

Im Gegensatz zur Organtransplantation und mechanischen Kreislaufunterstützung wird in der regenerativen Medizin versucht, durch biologische Ansätze eine Organfunktion aufrecht zu erhalten. Zu diesen Ansätzen gehört die Stimulation von intrinsischen regenerativen Prozessen, die Transplantation von Zellen und das Herstellen von Gewebe bzw. ganzen Organen.

1.6. Myokardiale Regeneration

Als althergebrachte Lehrmeinung gilt, dass eine myokardiale Regeneration nicht möglich ist, da post partum die Kardiomyozyten unwiederbringlich in einer G1/G0-Phase des Zellzyklus verweilen. Demnach wäre eine kardiomyozytäre Zellteilung, mit anderen Worten eine Hyperplasie, post partum nicht mehr möglich. Die myokardiale Reaktion auf eine erhöhte Arbeitsbelastung des Herzens, wie sie bei den meisten Herzerkrankungen zu erwarten ist, ist eine Massenzunahme der Kardiomyozyten – eine Hypertrophie.

Dieser Lehrmeinung zufolge und nach der allgemeinen Auffassung, dass jede Zelle nach einiger Zeit apoptotischen Prozessen unterliegt, müssten nach nicht genau definierter Zeit die

Gesamtheit aller Kardiomyozyten verschwinden, es sei denn Kardiomyozyten werden kontinuierlich ersetzt (37). Sollte ein solches regeneratives Potential im Herzen vorhanden sein, stellt sich die Frage, wie eine solche Regeneration erfolgt. Denkbar wäre, dass existierende Kardiomyozyten doch über ein mitotisches Potential verfügen, dass kardiomyozytäre Vorläuferzellen doch im Myokard vorhanden sind, oder dass solche Vorläuferzellen in anderen Organen warten, um dann ins Herz zu migrieren, um dort zu proliferieren und sich zu differenzieren. Für die zuletzt genannte Möglichkeit einer myokardialen Regeneration sprechen auch Beobachtungen aus der Transplantationsmedizin. Nach der Transplantation von männlichem Knochenmark in einen weiblichen Empfänger konnten noch nach Jahren Spenderzellen, die auf Grund ihres Y-Chromosoms als männliche identifiziert wurden, sowohl im koronaren Gefäßsystem als auch im Interstitium und im Myokard nachgewiesen werden (38-41). Laflamme und Kollegen konnten ebenfalls zeigen, dass sich Y-chromosomale Zellen, unter anderem auch Kardiomyozyten, in weiblichen Spenderherzen bei männlichen Empfängern nachweisen lassen (42). Im Gegensatz dazu ist es schwer vorstellbar, dass Kardiomyozyten, welche eine sehr komplexe Aufgabe haben, nämlich die der kontinuierlichen und regelmäßigen Kontraktion und diese in einem Verbund von Zellen, in der Lage sind sich dabei zu teilen.

In der Skelettmuskulatur existieren Myoblasten, die in der Lage sind, Skelettmuskulatur zu regenerieren. Die Existenz residierender Zellen im Myokard wurde lange Zeit negiert, jedoch zeigen Publikationen der letzten Jahre, dass bestimmte Zellen, vornehmlich im Myokard von Nagetieren, welche Oberflächenmarker wie z.B. c-Kit, Sca-1, Isl-1, CD 34, CD 31, FLK-1 und GATA-4 exprimieren, in die physiologische Regeneration vom Myokard involviert sind (43-46). Solche Nagetier-Stammzellen konnten isoliert, ex vivo expandiert werden und in genetischen und allogenen Infarktmodellen zur erfolgreichen myokardialen Regeneration eingesetzt werden. Des Weiteren konnte bei in vitro Versuchen gezeigt werden, dass humane c-Kit-positive Zellen das Potential haben, sich zu Kardiomyozyten zu differenzieren. Diese Zellen konnten erfolgreich zur myokardialen Regeneration in xenogenen Modellen eingesetzt werden (47-50).

1.7. Zelltherapie zur kardialen Regeneration

1.7.1. Allgemein

Ziel einer klinischen Zelltherapie am Herzen ist in erster Linie, die Anzahl kontraktiler Zellen im Myokard zu erhöhen und damit eine Verbesserung der globalen Ejektionsfraktion des Patienten bzw. ein Reverse Remodeling zu bewirken. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Stammzelltherapie andere indirekte positive Effekte auf das erkrankte Myokard haben kann. Zu diesen gehören unter anderem die Stimulation der Angiogenese bzw. Neoangiogenese durch parakrine Effekte, ein Einfluss auf die Regulierung des extrazellulären Bindegewebes, ein unterstützender Effekt für ischämische Kardiomyozyten und eine Interaktion mit lokalen Stamm- bzw. Progenitorzellen (51-54). Als Grundlage der folgenden Abschnitte (1.7.2 bis 1.7.7.3) diene unsere Übersichtsarbeit aus 2009 (55).

1.7.2. Transplantation von Kardiomyozyten

In einigen experimentellen Studien wurden neonatale Kardiomyozyten und immortalisierte Myozyten angewendet (56-58). Die Idee, dass in vitro kontraktile Zellen sich in das arbeitende Myokard integrieren könnten und dann zu einer Verbesserung der myokardialen Kontraktion beitragen würden, war revolutionär. Jedoch zeigte sich schnell, dass solche transplantierten Kardiomyozyten nicht in der Lage sind, in ischämischen Arealen des Herzens zu überleben. Im Gegensatz zu Kardiomyozyten weisen Skelettmyoblasten eine wesentlich bessere Ischämietoleranz auf und bleiben auch unter anaerober Stoffwechsellage kontraktile. Damit schien eine Lösung in Sicht.

1.7.3. Transplantation von Skelettmyoblasten

Erstmals transplantierte Menasche 2001 kontraktile Skelettmyoblasten während einer chirurgischen Revaskularisation ins menschliche Myokard (59). Die vielversprechenden Ergebnisse dieser Machbarkeitsstudie waren der Initiator für eine Fülle von experimentellen und klinischen Folgestudien zur Skelettmyoblasten-Transplantation. Jedoch wurde schnell klar, dass Skelettmyoblasten sich nicht mit den umgebenden Kardiomyozyten elektrisch verbinden, da sie, anders als Kardiomyozyten, nicht in der Lage sind, das für die interzelluläre Kommunikation nötige Protein Connexin 43 zu exprimieren. Skelettmyoblasten bleiben somit nicht nur isoliert vom umgebenden Myokard sondern können vielmehr als arrhythmogener Fokus fungieren. Auch wenn dieses arrhythmogene Potential von einigen Autoren nie beobachtet wurde (60), war der

Effekt von transplantierten Skelettmyoblasten auf die globale Kontraktilität doch so gering, dass die meisten Forschergruppen diese Art der Zelltherapie nicht weiter verfolgt haben.

Kongenitale Herzfehler gehören zu den häufigsten angeborenen Anomalien und gehen regelmäßig mit myokardialen Defekten einher. Bei einem muskulären Ventrikelseptumdefekt (VSD) zum Beispiel fehlen Teile der kontraktilen Scheidewand und bei einem Hypoplastischen Linksherzsyndrom (HLHS) der gesamte linke Ventrikel. Wir postulierten, dass ein konstruierter Patch aus autologen fetalen Skelettmyoblasten sich in das native Myokard einfügen kann und dabei die Skelettmyoblasten einer Milieu-abhängigen Transdifferenzierung zu Kardiomyozyten-ähnlichen Zellen unterliegen (61).

Es wurden in utero Skelettmuskel-Biopsien von fetalen Schafen ($n = 9$) entnommen. Skelettmyoblasten wurden dann ex vivo isoliert, expandiert und mit einem retroviralen Vektor markiert, welcher ein grün fluoreszierendes Protein (GFP) exprimiert. Anschließend wurden die expandierten Zellen auf einem kollagenen Hydrogel angesiedelt.

Nach der Geburt der Lämmer wurden die autologen Skelettmyoblasten-Patches subepikardial auf das Myokard genäht. Vier bis 30 Wochen postoperativ wurden die Herzen inklusive der Patches untersucht. Es zeigt sich eine gute Vitalität der GFP-markierten Zellen. Einige dieser Zellen exprimierten zwar Troponin I, zeigten jedoch nicht die typische Morphologie von Kardiomyozyten. Andererseits bildeten sie auch nicht die für die Skelettmuskulatur typischen Myotuben, blieben mononukleär und ließen sich nicht für Skelettmyosin markieren. Auch schien keine elektromechanische Koppelung zwischen den Spenderzellen und dem Myokard stattgefunden zu haben.

1.7.4. Kardiale Stammzellen

Lange Zeit wurde angenommen, dass im postnatalen Myokard muskuläre Stammzellen bzw. Vorläuferzellen, wie sie in Form von Myoblasten in der Skelettmuskulatur vorhanden sind, nicht existieren. Diese Annahme konnte sowohl für das Myokard von Mäusen als auch für das humane Myokard durch verschiedene Autoren widerlegt werden (43,44,47,49,62). Diese kardialen Stammzellen konnten anhand verschiedenster Oberflächenmarker (wie z.B. c-kit, Scd-1 und Isl-1) identifiziert werden. Experimentell wurden diese Zellen von Nagern isoliert, ex vivo expandiert und erfolgreich in in-vivo-Modellen zur kardialen Regeneration angewendet (44,47,49). Neben diesen myokardialen Vorläuferzellen scheinen auch im Perikard, im Epikard und im subepikardialen Fettgewebe Vorläuferzellen vorhanden zu sein, welche einen Einfluss

auf die myokardiale Regeneration haben können. So fanden sich c-kit⁺ und CD34⁺-Zellen im Epikard von Mäusen und Menschen, welche in vitro neben endothelialen Eigenschaften auch in der Lage waren, Kardiomyozyten-spezifische Transkriptions-Faktoren zu exprimieren. Diese Zellen waren in der Lage, nach einem induzierten Herzinfarkt bei Mäusen zu proliferieren und ins Myokard zu migrieren (63).

Der anfängliche Enthusiasmus, autologe kardiale Stammzellen zum klinischen Einsatz zu bringen, wurde durch viele offene Fragen gedämpft:

1. In welchen Mengen liegen solche Zellen im humanen Herzen vor? Denn sollten sie in ausreichender Menge vorhanden sein, müssten sie doch zur Regeneration des Myokards in Patienten nach Herzinfarkt führen.
2. Wird die Funktion dieser Stammzellen durch Herzerkrankungen oder durch das Alter der Patienten negativ beeinflusst? Denn sollte dies so sein, stellt sich die Frage, ob eine autologe Stammzelltherapie überhaupt von Nutzen sein kann.

Dies sind nur zwei von vielen offenen Fragen, die durch eine intensiverte Basisforschung vor einem klinischen Einsatz beleuchtet werden müssen.

1.7.5. Embryonale Stammzellen und Alternativen

Behfar und Kollegen konnten zeigen, dass unter dem Einfluss von TGF- β und BMP-2 das kardiale Genprogramm in embryonalen Stammzellen (ESC) induziert wird (64). ESCs, die in Mäuseherzen nach einem Herzinfarkt transplantiert wurden, differenzierten zu Kardiomyozyten, welche mit den Kardiomyozyten des Empfängers elektrisch über Gap junctions kommunizierten und somit auch eine Verbesserung der kardialen Funktion bewirkten. Nichtsdestotrotz haben ESCs das Potential, Tumoren im Herzen auszubilden. Dies ist sicherlich auch der Grund, dass sowohl Industrie als auch Wissenschaftler nun primär an *ex vivo* vordifferenzierten Kardiomyozyten aus ESCs forschen (65-67). Die Gründe für die zögerliche klinische Umsetzung sind an mehreren Faktoren festzumachen:

1. Die ethische Debatte, ESCs aus vitalen humanen Embryonen zu gewinnen, ist sicherlich eine, die die Gesellschaft spalten kann. Zwar ist es möglich, ESC-ähnliche Zellen durch therapeutisches Klonen, Reprogrammierung somatischer Zellen oder von Keimzellen herzustellen, ohne ein Embryo zu zerstören, jedoch sind auch bei diesen Methoden noch viele ungelöste Fragen offen (68,69).

2. Es ist bekannt, dass eine einzelne embryonale Stammzelle in der Lage ist, Tumoren zu bilden, so dass sichergestellt werden muss, dass ein Zellprodukt zu 100 % rein ist.
3. Nicht zuletzt ist wenig über die Immunität von ESCs bekannt, so dass eine allogene Transplantation unsicher ist.

Es ist sicherlich nötig, diese fundamentalen Fragen vor einem klinischen Einsatz eindeutig geklärt zu haben.

Vor einigen Jahren ist es Forschern gelungen, aus adulten Fibroblasten ESC-ähnliche herzustellen, sogenannte *induced Pluripotent Stem Cells* (iPS). Durch virale Transfektion wurden diese Zellen genetisch reprogrammiert. Welche Folgen diese viral-induzierte Reprogrammierung in vivo haben wird ist unklar und eröffnet ein neues Feld für die embryonale Stammzellforschung.

1.7.6. Knochenmarkzellen

Im Knochenmark befinden sich hämatopoetische und nicht hämatopoetische Stammzellen. Lange wurde angenommen, dass die nicht hämatopoetischen Stammzellen lediglich einen proliferativen Einfluss auf die hämatopoetischen Stammzellen haben (70). Inzwischen weiß man, dass diese sogenannten Stromazellen des Knochenmarks in der Lage sind, sich selbst zu erneuern und in verschiedene Gewebe zu differenzieren, so wie es vom embryonalen Mesenchym bekannt ist (71). Im Englischen werden diese als *Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells* (MSCs) bezeichnet. Durch Induktion werden MSCs zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen differenziert und klinisch zur Behandlung von Knochen- und Knorpeldefekten in der orthopädischen Chirurgie eingesetzt. Unter dem Einfluss von 5-Azacytidin bilden sich aus MSCs eine Bandbreite von verschiedenen Phentypen und unter anderem auch spontan schlagende Myozyten-ähnliche Zellen, welche isoliert und vermehrt werden können (72). Dabei bewirkt das 5-Azacytidin eine DNA-Demethylierung, was zu einer unspezifischen Genaktivierung führt.

Diese Myozyten-ähnliche Zellpopulation zeigt viele morphologische, proteomische und funktionelle Charakteristika von Kardiomyozyten (72). Ob eine solche Differenzierung von MSCs in vivo auch ohne einen exogenen Trigger möglich ist, bleibt fraglich (73,74).

Hämatopoetische Stammzellen (HSCs) aus dem Knochenmark partizipieren an der Regeneration von ischämischem Gewebe, indem sie zusammen mit endothelialen Vorläuferzellen zur Neoangiogenese beitragen. Die Kolonisation des menschlichen Herzens mit Zellen aus dem Knochenmark konnte bei Organtransplantationen mit einer Geschlechterdiskrepanz beobachtet werden. Es konnten die Y-Chromosomen männlicher

Spenderzellen in weiblichen Herzen nach einer Knochenmarktransplantation nachgewiesen werden. Diese Zellen siedelten sich nicht nur im koronaren Gefäßsystem an, sondern auch im Interstitium und dem Myokard (38-40).

Auch konnten in weiblichen Spenderherzen Y-Chromosomen des Empfängers festgestellt werden (41,42).

Seit Ende des letzten Jahrtausends werden Knochenmarkstammzellen zur Therapie bei Herzerkrankungen untersucht. Es zeigte sich, dass aus dem Knochenmark gewonnene CD34⁺-Zellen nach Herzinfarkt bei Ratten zur Neoangiogenese und einer LV-Funktionsverbesserung führte (53). Mit der in Nature publizierte revolutionäre Forschungsarbeit von Orlic und Kollegen 2001 an Mäusen (75) kam der Stein für die ersten klinischen Pilotstudien mit HSCs zur Therapie der ischämischen Herzerkrankung ins Rollen. In dieser Arbeit gelang es den Forschern, c-kit⁺ lin⁻-Zellen aus dem Knochenmark von GFP⁺-transgenen Mäusen zu isolieren und in das Infarktareal von nicht-GFP-exprimierenden Mäusen zu injizieren. Anschließend zeigten sich GFP⁺-Zellen in der Wand von Kapillaren und in kontrahierenden Zellen bei den Empfängern. Die Autoren schlussfolgerten, dass adulte Knochenmarkstammzellen unter dem Einfluss des Empfänger-Myokards in der Lage sind, sich sowohl in Endothelzellen als auch in Kardiomyozyten zu differenzieren. Anderen Forschungsgruppen war es allerdings nicht möglich, diese Ergebnisse zu reproduzieren (76). Doch muss man davon ausgehen, dass selbst wenn sich humane HSCs zu Kardiomyozyten differenzieren lassen die Anzahl dieser zu gering ausfallen würde, als das sie einen klinisch bedeutsamen Effekt nach Infarkt hätten.

1.7.7. Klinische Anwendung von Zelltherapie im Herzen

Trotz einer Vielzahl unterschiedlichster Zellprodukte liegt der klinische Fokus doch hauptsächlich auf adulten Stammzellen, welche unselektiert oder selektiert und angereichert für bestimmte Oberflächenmarker, mit und ohne in vitro Vermehrung, zur Studienanwendung kommen. Auch wurden in den letzten 15 Jahren, im Wesentlichen aus immunogenen Gründen, autologe Zellprodukte eingesetzt. Neuere, komplexere und zum Teil auch allogene Zellprodukte werden zurzeit für den klinischen Gebrauch entwickelt.

Obwohl die klinische Zelltherapie zur Regeneration bei Herzerkrankungen nun schon im zweiten Jahrzehnt betrieben wird ist immer noch unklar, welches beziehungsweise welche Zellprodukte zur Anwendung kommen sollen, und auch definitive Aussagen zu ihrer Effizienz sind bisher nicht möglich und werden heftig diskutiert.

1.7.7.1. Mononukleäre Knochenmarkszellen beim akuten Myokardinfarkt

Mononukleäre Knochenmarkstammzellen (MNCs) werden in der Regel bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eingesetzt. Nach einer interventionellen Revaskularisation mittels Ballonkatheter und gegebenenfalls intrakoronarem Stent werden autologe MNCs meist intrakoronar injiziert. Der BOOST-Trial war die erste randomisierte kontrollierte Studie, in der Patienten nach einem akuten Myokardinfarkt und interventioneller Revaskularisation entweder eine MNC-Injektion erhielten oder nur einer optimalen medikamentösen Therapie zugeführt wurden (77). Dabei zeigte sich, dass die MNC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Verbesserung der globalen LVEF nach 6 Monaten aufwies ($p = 0,0026$). Statistisch ist der Unterschied zwar signifikant, jedoch ist kaum davon auszugehen, dass der prozentuale Unterschied in der globalen LVEF eine klinische Rolle spielt, zumal der signifikante 6 Monate-Unterschied nach 18 Monaten keine Signifikanz erreichte ($p = 0,27$) (78). Dem BOOST-Trial folgten ähnliche Studien mit kontroversen Ergebnissen (79-88). Einige dieser Studien zeigten negative Ergebnisse ohne einen Unterschied in der globalen LVEF zwischen der MNC-Gruppe und der Kontrollgruppe (82,84,87,88). Andere Arbeitsgruppen konzentrieren sich auf Belastungstests und Lebensqualität nach Zelltherapie und es scheint, dass eine MNC-Therapie eine leichte Verbesserung bewirken kann (85).

1.7.7.2. Mononukleäre Knochenmarkszellen bei der chronischen Ischämie

Während die Zelltherapie beim akuten Myokardinfarkt eindeutig die Domäne der kardiologischen Interventionalisten ist, bietet es sich an, bei chronischer Myokardischämie Zellen während der chirurgischen Revaskularisation intramyokardial zu applizieren. Zwar gibt es Berichte, dass die Gabe von Zellen mit speziellen Kathetern auch transendokardial in das Myokard des LV möglich ist (89), doch ist dieser Zugang umständlich und nicht alle LV-Wandsegmente können mit den herkömmlichen Kathetern erreicht werden. Auch bei der chronischen Myokardischämie sind die bisher veröffentlichten Ergebnisse der interventionellen Studien kontrovers (89,90).

Galananes und Kollegen publizierten 2004 die Ergebnisse einer Pilotstudie, in der Patienten während einer aortokoronaren Bypassoperation unselektionierte MNCs intramyokardial injiziert bekamen (91). Neben der Sicherheit dieser Kombinationstherapie beobachteten die Autoren eine Verbesserung der regionalen ventrikulären Funktion der

beobachteten die Autoren eine Verbesserung der regionalen ventrikulären Funktion der therapierten Myokardareale. Ein Unterschied hinsichtlich der globalen LVEF war aber gegenüber einer alleinigen Bypassoperation nicht nachweisbar.

1.7.7.3. Angereicherte Stammzellprodukte

Klinisch anwendbare, angereicherte Zellprodukte können mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) oder durch in vitro Expansion hergestellt werden. Mit MACS, welche Anfang der 1990er Jahre entwickelt wurde, lassen sich Zellen aus einer Suspension isolieren, die bestimmte Oberflächenmarker besitzen. Dazu wird die Zellsuspension mit sogenannten *Microbeads* inkubiert. Microbeads sind superparamagnetische Partikel, welche mit Antikörpern gegen bestimmte zellmembrangebundene Antigene beladen sind. Nach Bindung der Microbeads an die Zielzellen wird die Zellsuspension durch eine Separationssäule geführt, welche mit ferromagnetischen Strukturen befüllt ist, die in ein lokalisiertes Magnetfeld platziert werden. Die markierten Zellen bleiben in der Säule haften, während die nicht-beladenen Zellen das Magnetfeld ungehindert passieren. Wir sprechen nun von einer positiven Selektion, wenn die am Magnet haftenden Zellen diejenigen sind, bei denen es sich um die Zielzellen handelt. Diese werden nach Beendigung des Magnetfeldes durch Waschen der Säule wieder freigesetzt und zur Therapie eingesetzt. Bei dem von uns eingesetzten Verfahren (CliniMACS®, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) verbleiben die antikörpergebundenen Microbeads auf der Zelloberfläche. Auch eine negative Selektion ist möglich, wenn die nicht-beladenen Zellen die zur Therapie eingesetzten Zielzellen sind (92).

Zur Herstellung von aus dem Knochenmark oder dem Blut gewonnen, angereicherten, hämatopoetischen und EPC-Stammzellproduktionen für die Therapie bei Herzerkrankungen werden am häufigsten CD34⁺ und CD133⁺ Zelleneingesetzt, da für diese für die klinische Verwendung zugelassene Separationssysteme verfügbar sind. Mit diesen lassen sich die CD34⁺ oder CD133⁺-Zellprodukte zeitnah mit einem hohen Reinheitsgrad und gut definierten Charakteristika herstellen, jedoch ist die Zellzahl meist gering. Auch eine negative Selektion mit Hilfe von anti-CD45-gekoppelten Microbeads ist möglich, wobei damit alle reifen Leukozyten herausgefiltert werden.

Auf der anderen Seite lässt sich durch die in vitro Expansion von Knochenmarkzellen zwar eine hohe Zellzahl erreichen, doch ist die Herstellung zeitaufwändig (Tage bis Wochen) und das Produkt enthält ggf. unvollständig charakterisierte Zellen (93).

Die intramyokardiale Gabe von CD34⁺-Knochenmarkstammzellen während einer chirurgischen Revaskularisation kann zu einer deutlichen Verbesserung der globalen LVEF (präoperativ 29,4 % +/- 3,6 % auf 46,1 % +/- 1,9 %; p = 0.001) führen (94). Stamm und Kollegen waren die ersten, die CD133⁺-Zellprodukte unter der Annahme, dass diese im Gegensatz zu CD34⁺-Zellen noch undifferenzierte Zellen beinhalten, während einer aortokoronaren Bypassoperation direkt ins Myokard spritzten (95,96). Nach dieser initialen Machbarkeits- und Sicherheitsstudie konnten sie in einer kontrollierten Studie zeigen, dass die Patienten, die eine Bypassoperation und die Gabe von CD133⁺-Zellen erhielten, nach 6 Monaten eine signifikant bessere LVEF aufwiesen als die Patienten, die nur Bypässe erhielten (97). Auch die Perfusion im infarzierten Myokard verbesserte sich deutlich nach Zelltherapie. Eine Analyse aller mit CD133⁺-Zellen therapierten Patienten – Patienten aus der Machbarkeits- und Sicherheitsstudie mit eingeschlossen – ergab, dass Patienten mit einer präoperativen LVEF < 35 % mehr von einer Zelltherapie profitieren als die mit einer LVEF > 35 % (97). Im Langzeitverlauf von bis zu 9 Jahren zeigte sich jedoch, dass die positiven Effekte der CD133⁺-Zelltherapie nach 6 Monaten sich nicht mehr signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden (98). Dabei muss darauf hingewiesen werden, dass diese Studien nicht blind, nicht streng randomisiert und auch nicht placebokontrolliert waren.

Ein weiterer Ansatz ist die Isolierung von CD133⁺-Zellen aus dem Blut. Da die Anzahl der zirkulierenden CD133⁺-Zellen jedoch äußerst gering ist, wählen einige Forschergruppen den Ansatz, dies mit Hilfe eines sogenannten Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktors (G-CSF) aus dem Knochenmark zu mobilisieren. G-CSF ist ein hämatopoetischer Wachstumsfaktor, welcher 1985 erstmals beim Menschen von Nicola et al identifiziert wurde (99). G-CSF stimuliert dosisabhängig die neutrophile Granulopoese und erhöht die Konzentration von zirkulierenden Progenitorzellen im Blut bei Krebspatienten, um die Phase der Neuropenie nach Chemotherapie zu verkürzen (100). Angereicherte Knochenmarkszellprodukte wurden auch schon interventionell zur Therapie am Herzen eingesetzt und zeigten eine Verbesserung der LV-Funktion im Vergleich zur Placebogabe bei Patienten (101).

Insgesamt scheinen also angereicherte Stammzellprodukte aus dem Knochenmark tatsächlich einen Vorteil gegenüber MNCs zu haben, doch bleiben definitive Beweise noch zu erbringen.

1.7.7.4. Fragen und Hürden bei der Anwendung von Zellprodukten für kardiale Erkrankungen

Trotz der enormen Anstrengungen von Wissenschaftlern unterschiedlichster Fachdisziplinen auf dem Gebiet von Remodeling und Reverse Remodeling des Herzens, besonders im Hinblick auf die myokardiale Zelltherapie, sind viele grundlegende Prozesse, die sich bei einer Zelltherapie im Herzen abspielen, weiterhin unklar. Nichtsdestotrotz hat die klinische Therapie mit unterschiedlichsten Zellprodukten und unterschiedlichsten Ansätzen längst begonnen. Der Hoffnung, durch den klinischen Ansatz offene Fragen zu lösen, konnte dabei nur zum Teil Rechnung getragen werden, denn es tauchten weitere Fragen und Hürden auf:

1. Bei welchen Herzerkrankungen ist eine Zelltherapie überhaupt von Nutzen? Profitieren nicht nur Patienten mit ischämischer Herzerkrankung, sondern auch anderen Herzkrankheiten von einer Zelltherapie?
2. Wie soll eine Patientenauswahl getroffen werden? Spielen Alter, Geschlecht, ethnische Zugehörigkeit eine Rolle und wie erreicht man in klinischen Studien ein möglichst konformes Patientenkollektiv?
3. Welche Kriterien sollte man in klinischen Studien als primäre beziehungsweise sekundäre Endpunkte wählen? Wie aussagekräftig und klinisch relevant sind diese Endpunkte?
4. Mit welchen Methoden sollte der Erfolg der Zelltherapie gemessen werden? Ist das MRT beispielsweise der Echokardiographie überlegen oder sind neuere Methoden der Echokardiographie, beispielsweise die Bestimmung der regionalen Wandbewegung, sensitiv genug?
5. Welchen Einfluss hat eine Begleittherapie auf den Erfolg der Zelltherapie? Wie kann man zwischen dem Effekt einer Begleittherapie und der Zelltherapie unterscheiden und ist dies überhaupt möglich?
6. Welche Zelle ist die Richtige für welche Erkrankung? Kann eine bestimmte Zelle überhaupt den Erwartungen einer Zelltherapie am Herzen gerecht werden oder ist es gar notwendig, die richtige Mischung verschiedener Zellen zu finden?
7. Wie soll man die Zellen dem Patienten zuführen? Ist beispielsweise eine intramyokardiale Applikation der intrakoronaren überlegen oder sind beide als gleichwertig anzusehen?
8. Wann ist der geeignete Zeitpunkt, die Therapie durchzuführen, und ist eine einmalige Gabe ausreichend oder muss sie wiederholt werden? Falls sie wiederholt werden muss, wie

oft und in welchen Abständen sollte dies geschehen? Wie lange hält ein positiver Effekt an?

9. Welche Faktoren beeinflussen die Vitalität der Zellen? Kann man diese beeinflussen und auf welche Weise?
10. Durch welchen Mechanismus wirkt das Zellprodukt? Differenzieren die Zellen zu den benötigten Zellen im Herzen oder wirken sie durch parakrine Effekte? Wie lassen sich Zellen in vivo verfolgen?
11. Welches ist die richtige Dosis des Zellproduktes? Bedeuten mehr Zellen mehr Effekt oder kann ein Zellprodukt auch überdosiert werden?
12. Welche Rolle spielen die gesetzlichen und regulatorischen Behörden? Ist jedes Zellprodukt auch ein Medizinprodukt? Sind die behördlichen Auflagen zum Einsatz eines Zellproduktes im klinischen Alltag umsetzbar oder stehen diese dem wissenschaftlichen Fortschritt im Weg?
13. Wer kann, soll und muss die erforderlichen Studien finanzieren?

Um die Zelltherapie am Herzen zum Erfolg zu bringen ist die Klärung dieser Fragen von essentieller Bedeutung. Im Folgenden werden einige ausgewählte Publikationen, welche sowohl während meines Aufenthaltes als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Massachusetts General Hospital, Boston als auch während meiner Tätigkeit am Deutschen Herzzentrum Berlin entstanden sind, im Original angehängt und kurz zusammengefasst. Alle Arbeiten sind unter meiner Mitarbeit entstanden und sind nur kleine Steine eines großen Puzzles, welches dazu dient, ein bisschen mehr Licht ins Dunkel der Zelltherapie am Herzen zu bringen.

2. Eigene Arbeiten

2.1. Katheterbasierte Zelltransplantation

Thompson CA, Nasser BA, Makower J, Houser S, McGarry M, Lamson T, Pomerantseva I, Chang JY, Gold HK, Vacanti JP, Oesterle SN.

Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation.

J Am Coll Cardiol 2003;41(11):1964-71.

Impact Factor 7.599

Es wurden schon verschiedene katheterbasierte Methoden zur Zelltransplantation vorgestellt, darunter die intrakoronare Infusion, die retrograde Infusion über den Koronarsinus und die intramyokardiale endoventrikuläre Injektion. Die Effektivität der beiden erstgenannten Applikationsarten ist aufgrund der unspezifischen Gabe in den Blutstrom fraglich. Bei der intramyokardialen endoventrikulären Injektion sind mehrere Areale wie z.B. die submitralen Areale des linken Ventrikels nur schwer oder gar nicht zugänglich.

In dieser Arbeit experimentellen Arbeit wurden an Schweinen die Möglichkeiten eines neuartigen Katheters zur transvenösen, intramyokardialen Injektion von Zellprodukten über den Koronarsinus getestet. Dieser Katheter wird retrograd in den Koronarsinus eingebracht, wo unter zu Hilfenahme von intravaskulärem Ultraschall (IVUS) und extendierbarer Nitinol-Nadel transvenös und intramyokardial Zellen in das Zielareal appliziert werden. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass dieser perkutane intramyokardiale Zugang machbar und sicher ist, sondern auch, dass über das koronarvenöse System eine intramyokardiale Zellinjektion in die anteriore, laterale, septale, apikale und inferiore Wand des linken Ventrikels möglich ist.

Percutaneous Transvenous Cellular Cardiomyoplasty

A Novel Nonsurgical Approach for Myocardial Cell Transplantation

Craig A. Thompson, MD,*†‡|| Boris A. Nasser, MD,†‡ Joshua Makower, MD,¶|| Stuart Houser, MD,§
Michael McGarry, MSc,§ Theodore Lamson, PhD,§ Irina Pomerantseva, MD, PhD,*†
John Y. Chang, MS ME,¶|| Herman K. Gold, MD, FACC,* Joseph P. Vacanti, MD,†‡
Stephen N. Oesterle, MD, FACC*†‡

Boston and Cambridge, Massachusetts; and Menlo Park, California

OBJECTIVES	The study evaluated a nonsurgical means of intramyocardial cell introduction using the coronary venous system for direct myocardial access and cell delivery.
BACKGROUND	Direct myocardial cell repopulation has been proposed as a potential method to treat heart failure.
METHODS	We harvested bone marrow from Yorkshire swine (n = 6; 50 to 60 kg), selected culture-flask adherent cells, labeled them with the gene for green fluorescence protein, expanded them in culture, and resuspended them in a collagen hydrogel. Working through the coronary sinus, a specialized catheter system was easily delivered to the anterior interventricular coronary vein. The composite catheter system (TransAccess) incorporates a phased-array ultrasound tip for guidance and a sheathed, extendable nitinol needle for transvascular myocardial access. A microinfusion (IntraLume) catheter was advanced through the needle, deep into remote myocardium, and the autologous cell-hydrogel suspension was injected into normal heart. Animals were sacrificed at days 0 (n = 2), 14 (n = 1, + 1 control/collagen biogel only), and 28 (n = 2), and the hearts were excised and examined.
RESULTS	We gained widespread intramyocardial access to the anterior, lateral, septal, apical, and inferior walls from the anterior interventricular coronary vein. No death, cardiac tamponade, ventricular arrhythmia, or other procedural complications occurred. Gross inspection demonstrated no evidence of myocardial perforation, and biogel/black tissue dye was well localized to sites corresponding to fluoroscopic landmarks for delivery. Histologic analysis demonstrated needle and microcatheter tracts and accurate cell-biogel delivery.
CONCLUSIONS	Percutaneous intramyocardial access is safe and feasible by a transvenous approach through the coronary venous system. The swine offers an opportunity to refine approaches used for cellular cardiomyoplasty. (J Am Coll Cardiol 2003;41:1964-71) © 2003 by the American College of Cardiology Foundation

Nearly 5 million Americans currently live with congestive heart failure (CHF). This disease accounts for 962,000 hospitalizations and 287,200 deaths annually. In 1998, over \$3.6 billion was paid to Medicare beneficiaries for CHF expenditures, and the prevalence of this disease continues to increase (1). Orthotopic cardiac transplantation remains limited by donor supply, and by need for lifelong immunosuppression, invasiveness, and cost. Both cell- and gene-based therapies have been proposed as potential alternatives for treatment of this often recalcitrant patient population (2-7).

Current methods of direct cell and gene delivery have notable limitations. The target patient populations, those with recent myocardial infarction (MI) or advanced heart failure, typically are at higher risk for conventional surgical

approaches and for general anesthesia. Furthermore, open surgical approaches have limited septal wall access. Several catheter-based methods, including endoventricular (8-11), intracoronary infusion (12), and coronary vein retroinfusion (13) are being evaluated. Intracoronary and coronary venous infusions are less specific than direct injections and may potentially decrease the therapeutic yield. Endoventricular methods may have limited access to the myocardium in the area of the submitral valve apparatus and may be unstable in the mobile ventricular wall.

We introduce a new concept for direct myocardial access using the coronary venous system as a roadmap to the heart (Fig. 1) and a composite catheter system to allow direct and stable access to remote myocardium (Figs. 2 and 3) with intravascular ultrasound (IVUS) and fluoroscopic guidance. This method provides an alternate platform for cell-, gene-, and drug-based cardiovascular bioengineering therapies (14). The objective of this study was to test feasibility, accuracy, and safety (death, cardiac tamponade, sustained arrhythmia) of this transvenous delivery method.

METHODS

This investigation was approved by the Massachusetts General Hospital and United States Army Subcommittee

From the *Cardiovascular Division, †Department of Surgery, ‡Tissue Engineering Laboratory, and §Pathology Department, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; the ||Massachusetts Institute of Technology, Division of Health Sciences and Technology, Cambridge, Massachusetts; and ¶TransVascular, Inc., Menlo Park, California. Joshua Makower, Michael McGarry, Theodore Lamson, and John Y. Chang are employees of TransVascular, Inc. This work was supported by the Center for Integration of Medicine and Innovative Technology (CIMIT), Cambridge, Massachusetts, and by TransVascular, Inc., Menlo Park, California. Craig A. Thompson received grant support from the Clinical Investigator Training Program: Harvard/MIT Health Sciences and Technology-Beth Israel Deaconess Medical Center, in collaboration with Pfizer Inc.

Manuscript received August 15, 2002; revised manuscript received November 2, 2002, accepted December 18, 2002.

Abbreviations and Acronyms

AIV	= anterior interventricular coronary vein
CHF	= congestive heart failure
CS	= coronary sinus
GCV	= great cardiac vein
GFP	= green fluorescence protein
IVUS	= intravascular ultrasound
MI	= myocardial infarction

on Animal Research Care, and was in compliance with the 1996 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and with the Animal Welfare Act. This study was designed primarily to assess the safety and feasibility of percutaneous, trans(coronary)venous, direct myocardial cell delivery using an engineered substrate of an autologous bone marrow subpopulation within a biodegradable polymer.

Bone marrow harvest and cell preparation. Six Yorkshire swine (~50 kg) received sedation with intramuscular (IM) acepromazine 5 mg/atropine 1 mg and intravenous telazol 110 mg/Xylazine 250 mg. Five of the six animals were subject to bone marrow harvest (the sixth as a negative control). The iliac crest was accessed with a bone marrow aspiration needle (MD Tech, Gainesville, Florida), and ~50 cc of bone marrow was aspirated into a sterile, heparinized syringe. These cells were injected through a 50- μ m filter to exclude large particles and into a 75-cm² uncoated, vented polystyrene Falcon flask (Corning, Inc., Corning, New York). The adherent population was cultured in high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (GIBCO, Auckland, New Zealand) to 80% to 90% confluence. This population of adherent cells was intended to be analogous to the putative mesenchymal stem cell population (15,16), but was not further characterized for this study.

These adherent cells were distributed to 30% confluence on six-well plates (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) and transduced with murine green fluorescence protein (GFP) using a vesiculostomatitis vector. These cells were qualitatively assessed under direct fluorescence within three days for GFP expression. All animals had 70% to 75% of cells expressing GFP determined by qualitative assessment of two independent observers. The cells were expanded in culture by serial advancement through 25-cm², 75-cm², and 150-cm² Falcon flasks and passaged in 1:2 fashion when 90% confluence was reached.

At the time of procedure, the autologous cells were recombined and resuspended in 0.3% collagen biogel (Collagen, ICN Biomedicals, Aurora, Ohio), with the addition of tissue dye for gross pathologic identification (n = 5 pigs). An aliquot of cells was evaluated for fluorescence using flow cytometry. This cell-biogel preparation of $\sim 2.0 \times 10^7$ cells/ml was divided evenly into 1 cc luer-tipped syringes. Collagen biogel/tissue dye without cells was used in the negative control animal.

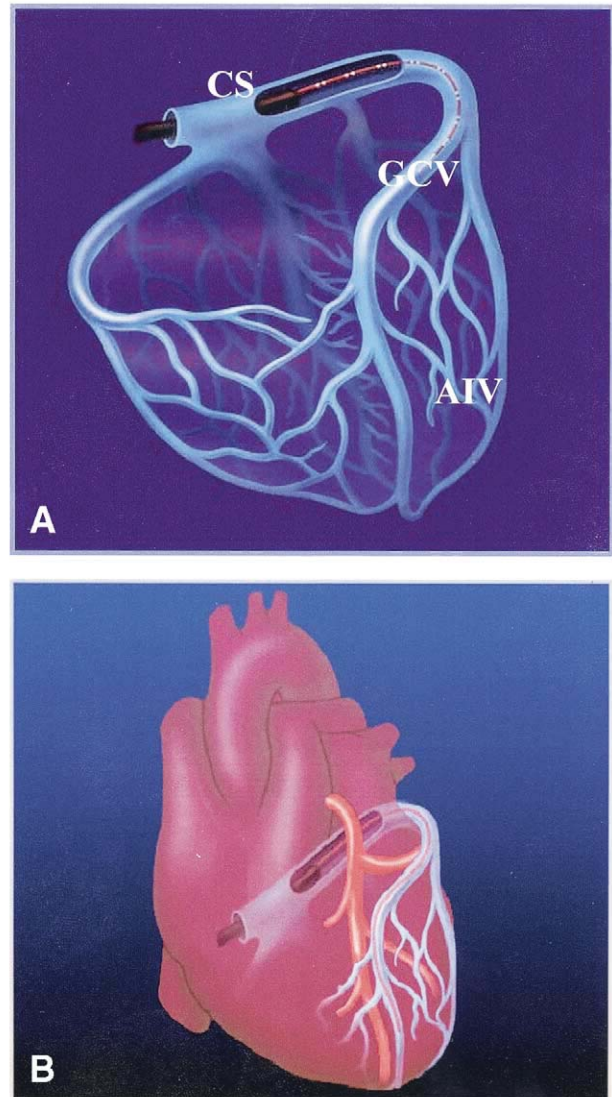


Figure 1. The coronary venous system. Coronary veins parallel the major epicardial coronary arteries, but are free of obstructive disease, and thus can provide a platform for myocardial access. The anterior, septal, and lateral walls are drained by branching vessels from the anterior interventricular coronary vein (AIV) (which parallels the left anterior descending artery), which drains into the great cardiac vein (GCV) (paralleling the left circumflex artery) and through the coronary sinus (CS) into the right atrium. (A) Anterior and (B) posterior views. AIV = anterior interventricular coronary vein; CS = coronary sinus; GCV = great cardiac vein. Courtesy of Transvascular, Inc.

Trans(coronary)venous myocardial access procedure.

The swine were sedated, ventilated, and monitored (cardiac rhythm, oxygenation, and blood pressure), and then prepped and draped in standard surgical fashion. Six French (F) arterial (Cordis, Miami, Florida) and 14F venous (Transvascular, Menlo Park, California) femoral sheaths were placed percutaneously. The left main coronary artery was selectively engaged with a 6F Hockeystick diagnostic catheter (Medtronic) and angiography performed with emphasis on venous follow-through phases to determine coronary venous anatomy, anomalies, and coronary sinus location.

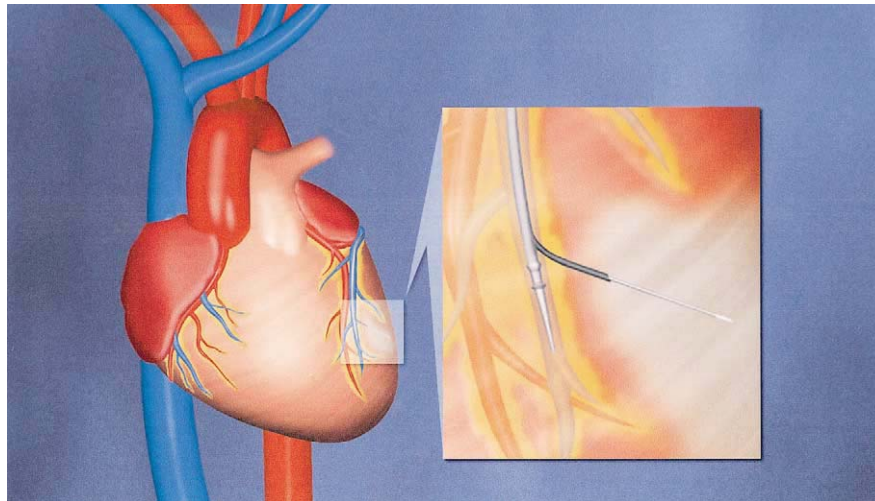


Figure 2. Transcoronary venous myocardial access can be achieved by intravascular, ultrasound-guided, transvenous needle puncture into targeted areas of the myocardium (infarct area depicted in gray), providing a stable and accurate platform for direct myocardial therapeutic agent delivery. AIV = anterior interventricular coronary vein. Courtesy of Transvascular, Inc.

The coronary sinus (CS) was accessed by placing a 7F Porcine 3 catheter into the right ventricle, withdrawing with clockwise torque across the tricuspid valve. Using this technique, the catheter tends to fall into, or near, the CS. An exchange length, 0.035-inch hydrophilic angled wire (Teruma) with J-tip was advanced into the CS, through the great cardiac vein (GCV), and into the anterior interventricular coronary vein (AIV) (Fig. 4A). The diagnostic catheter was withdrawn, with the guide wire in place, and a 14F CS guiding catheter (Transvascular) and introducer were placed with conventional over-the-wire technique. After removal of introducer, a subselective catheter (Transvascular) was then placed over the wire, through the CS

guide, and into the AIV (Fig. 4B). The hydrophilic guide wire was then exchanged for a 0.014-inch HiTorque floppy (Guidant, Temecula, California) guide wire. The TransAccess catheter is a 6F, monorail, composite catheter system combining a phased-array IVUS (compatible with JOMED IVUS, JOMED, NV) and a pre-shaped, sheathed, extendable 24-gauge nitinol needle (Fig. 3A). This TransAccess catheter was advanced over the 0.014-inch guide wire and into the AIV in preparation for myocardial access (Fig. 4C).

Intravascular orientation was performed using the corresponding artery, pericardium, and ventricular chamber as landmarks with IVUS imaging (Figs. 4D and 4E). After confirmation of position within the coronary vein and with

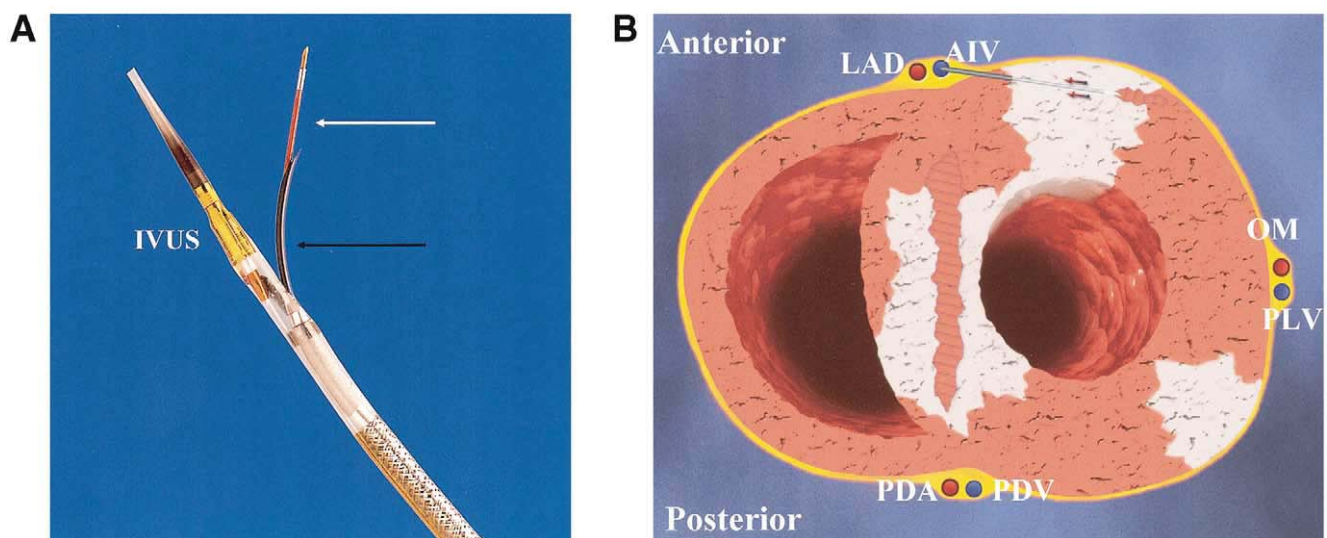


Figure 3. TransAccess composite catheter (A) incorporates phased-array intravascular ultrasound (IVUS) to accurately guide transvenous myocardial puncture with a sheathed, extendable nitinol needle (black arrow). Once the myocardium is accessed, (B) the IntraLume microinfusion catheter (white arrow) can be advanced to remote areas of myocardium for targeted therapeutic agent delivery. AIV = anterior interventricular coronary vein; IVUS = intravascular ultrasound; LAD = left anterior descending coronary artery; OM = obtuse marginal artery; PDA = posterior descending artery; PDV = posterior descending vein, or middle cardiac vein; PLV = posterolateral vein. Courtesy of Transvascular, Inc.

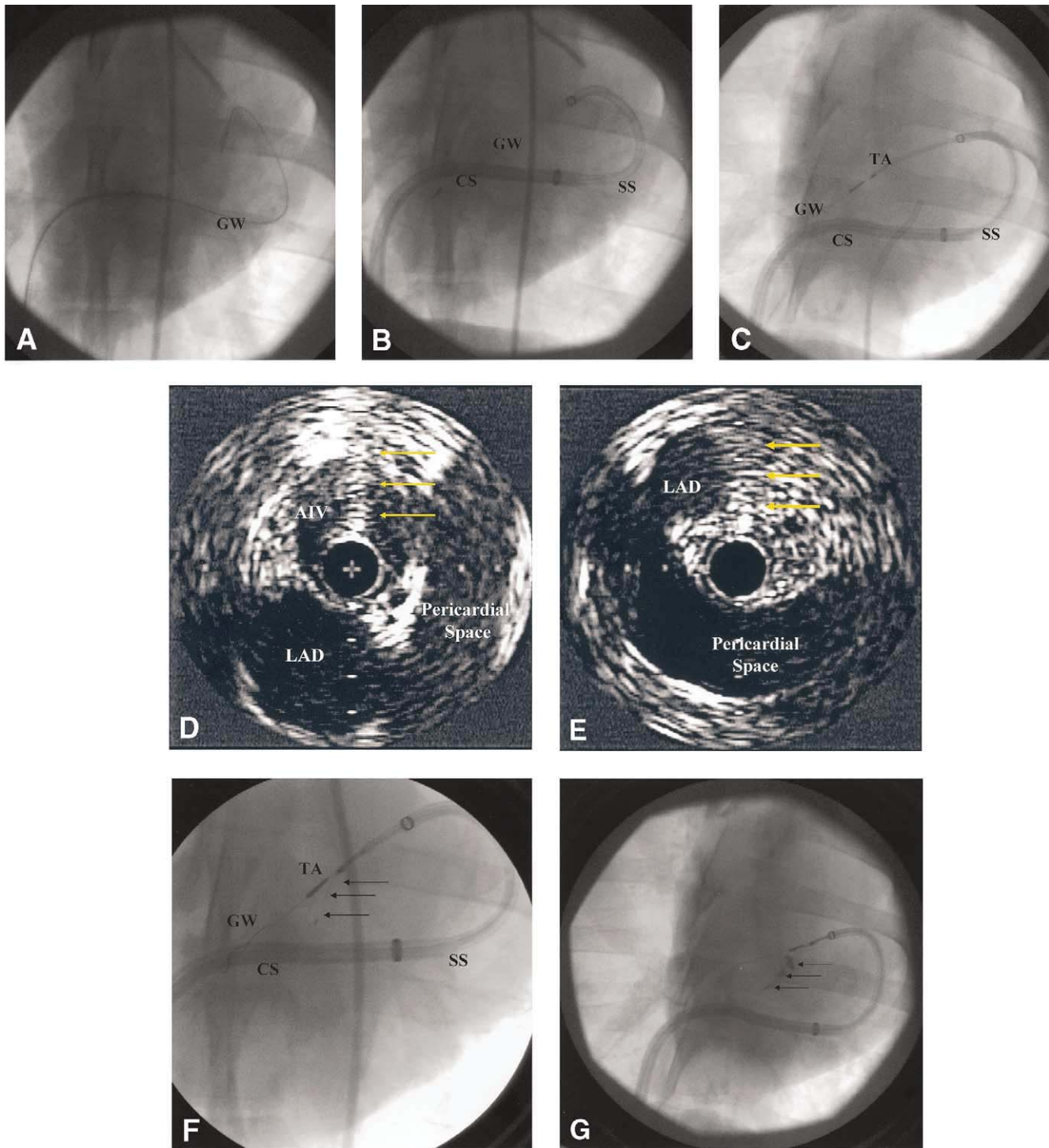


Figure 4. Trans(coronary) venous cell delivery. (A) The coronary sinus (CS) is engaged, and a J-tipped hydrophilic guide wire is placed into the anterior interventricular coronary vein (AIV). (B) The CS and SS guiding catheters are placed using conventional over-the-wire wire technique. (C) The hydrophilic wire is exchanged for a 0.014-inch guidewire, and the TransAccess catheter is advanced into position. (D,E) IVUS provides anatomic orientation for transvenous, myocardial puncture into the anterior (D) and septal (E) (IVUS pointer marker delineated by yellow arrows) walls from the AIV with (F) an extendable nitinol needle (arrows). The IntraLume microinfusion catheter is advanced to targeted areas for cell delivery (G, arrows delineate contrast-enhanced cell injections). This method allows contiguous “beads” of cell substrate to be placed. AIV = anterior interventricular coronary vein; CS = coronary sinus; GW = guide wire; IVUS = intravascular ultrasound; LAD = left anterior descending coronary artery; SS = subselective; TA = TransAccess catheter.

respect to surrounding structures, the nitinol needle was extended into the myocardium (Fig. 4F). A 27-gauge microinfusion (IntraLume) catheter was advanced through the needle and into the myocardial tissue (Figs. 4G and 4H). Because the myocardial tissue is a potential space, and without room for prolapse, all of the force for the otherwise floppy IntraLume catheter is forward, essentially allowing this catheter tip to become a drill capable of tunneling through remote myocardium in plane with the needle puncture (Fig. 3B).

The animals (n = 6) were sacrificed at 0- (n = 2), 14- (n = 2), and 28-day (n = 2) timepoints with IV potassium chloride 40 mEq overdose. All animals received cell/collagen biogel/tissue dye except the negative control animal (collagen biogel/tissue dye without cells), which was one of the animals sacrificed at the 14-day timepoint. Accuracy was assessed by correlating the dye stains identified by gross examination with intended anatomic and fluoroscopic landmarks. Histologic sections of the injection sites were subdivided into basal, mid- and apical subsegments of the: 1) anterior, 2) lateral, 3) anteroseptal, and 4) inferoseptal walls to allow for correlation with the respective angiographic counterparts.

Tissue processing and staining. Portions of porcine myocardium acquired from injection sites were frozen in Tissue Tek optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, California) and stored at -80°C for subsequent histologic analysis. Histopathologic evaluation was performed on 5- μ m cryosections of the tissue. Sections were examined with a fluorescence microscope, using an NIB filter, and subsequently stained with hematoxylin-eosin (H&E) and Masson's trichrome stains for study by light microscopy.

Immunohistochemical study of additional sections was performed using anti-mouse GFP primary antibody (clone-20, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) that cross-reacts with pig. Binding was visualized by using a horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (Vector, Burlingame, California). Bound antibody was revealed by incubation of cryopreserved sections in aminoethylcarbazole (Dako, Carpinteria, California) or diaminobenzidine (Zymed, San Francisco, California). Sections were counterstained with hematoxylin solution (Sigma). Negative controls were checked by omitting the primary antibody. Cryosections of skin from a GFP transgenic mouse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) were used as a positive control for the immunohistochemical analysis. Given the relatively poor expression of GFP in animals from each timepoint, we focused histologic evaluation on the animal with the highest percentage GFP expression at each timepoint.

RESULTS

Coronary venous access and direct myocardial injection was successful in 100% (6/6) of the animals attempted. Access was gained via the AIV approach to the basal-, mid-, and apical-anterior, lateral, anteroseptal, and inferoseptal left ventricular myocardium. Eighty-eight transvenous punctures were performed (mean 14.6/animal). No death, car-

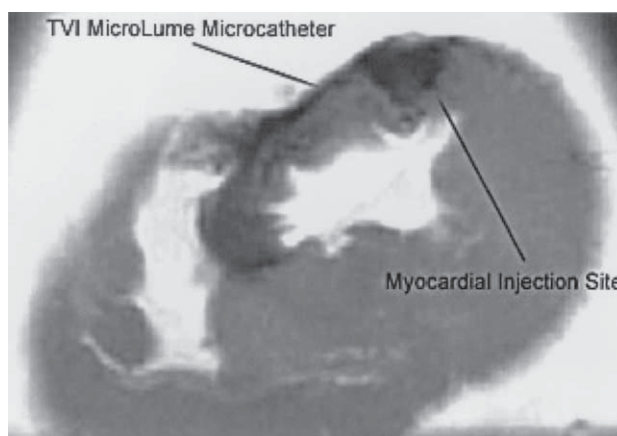


Figure 5. Cardiac magnetic resonance imaging of microvolume infusion catheter and injection site (gadolinium contrast enhancement in black) performed in ex vivo pig heart.

diac tamponade, or sustained arrhythmia occurred during the procedure or the follow-up periods to time of sacrifice (range 0 to 28 days).

Dye correlation on gross examination with angiographic landmarks was 100% (Figs. 5 and 6). After cell recombination, GFP expression determined by flow cytometry was relatively poor in several animals (51% and 5% GFP% expression for the two 28-day animals, 5% GFP% expression for the 14-day animal, and 45% and 2% GFP% expression for the two acute sacrifice animals). We suspect that this decrement in GFP% expression is due to a disproportionate expansion of the initial unlabeled cell fraction. The GFP-positive, autologous "donor" bone marrow cells were determined to be present at the 0-, 14-, and 28-day timepoints, based on expression of signal on fluorescence microscopy (Fig. 7) or density of expression above background levels by immunohistochemistry, using light microscopy on sampled sections of targeted myocardium that were demarcated with the biogel/tissue dye (Figs. 8 and 9). Excessive fibrosis was not seen in comparison with control areas of normal myocardium (Fig. 8). Determining cell proliferation and transdifferentiation was outside the scope of this study.

DISCUSSION

Conventional medical and surgical approaches are often inadequate to treat patients with myocardial disease. Both cell- and gene-based bioengineering approaches have been proposed as potential alternate therapies to augment or substitute damaged heart tissue (2,3). We present the initial experience of a novel, catheter-based endovascular platform for direct myocardial cell delivery using the coronary venous system as a "roadmap to the heart" and a composite catheter system to allow a direct, transvenous puncture and access to the myocardium. We hypothesize that this method will have advantages over presently utilized approaches.

Currently available methods for cardiovascular cell and/or gene delivery have potential limitations. Direct surgical injection can provide a high level of substrate per unit area, but this

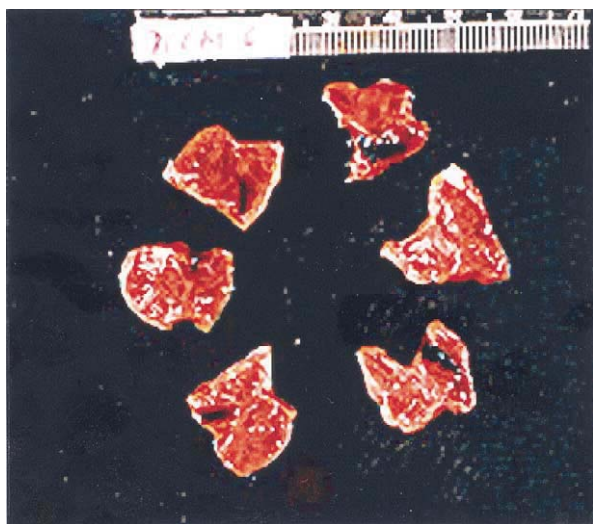


Figure 6. Gross examination of the myocardium demonstrated rows of cell-biogel substrate, identified macroscopically with black tissue dye.

may result in high morbidity, and potential mortality, in the target patient populations with recent MI or advanced CHF. Furthermore, standard, transeptal surgical approaches do not grant free access to the septal wall and do not afford the opportunity for real-time, contrast-enhanced assessment of the microcirculation. The TransAccess catheter system shares the advantages associated with surgical transeptal access regarding accuracy and substrate deposition, but it only requires local anesthesia at the femoral access site. In addition, the septal wall is readily accessed, and "online" microcirculatory assessment is readily available. Endoventricular approaches are limited primarily by platform "stability." Endoventricular catheter systems do not rotate with the heart, which can minimize target accuracy. The pressure of syringe injection with these systems can be destabilizing and cause expulsion of the needle tip from the myocardial interface. Needle withdrawal provides an exit point for cells, gene therapy substrates, and so forth to be released to the systemic circulation. Thinned myocardial tissue (<5 mm) is currently considered a contraindication because of concerns for transeptal perforation.

The TransAccess system overcomes these hurdles because the needle and Microlume catheter are advanced in a coaxial direction with the myocardial tissue. The catheter is therefore well seated deep within the heart muscle, rotates with the heart, and is not subject to needle expulsion or cell loss directly from the exit tract. Preliminary data suggest that acute retention efficiency with this transvenous method and fluoroscopic guidance is superior to electromechanical mapping-guided endoventricular approaches (17). We hypothesize that the deeper penetration into the myocardium and the stability of the IntraLume microinfusion catheter are largely responsible for this observation. In theory, the risk of stroke from ventricular embolization or excessive catheter manipulations and dwell time is reduced by access and delivery from the venous side. Furthermore, thinned tissue, in concept, is no more a limitation for IntraLume

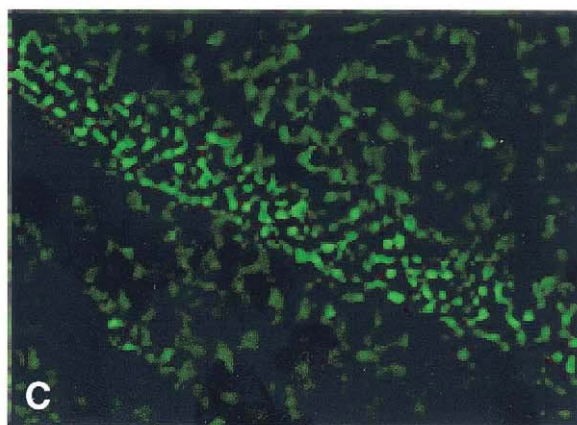
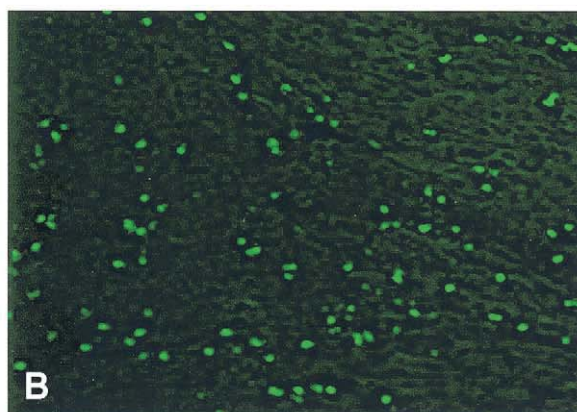
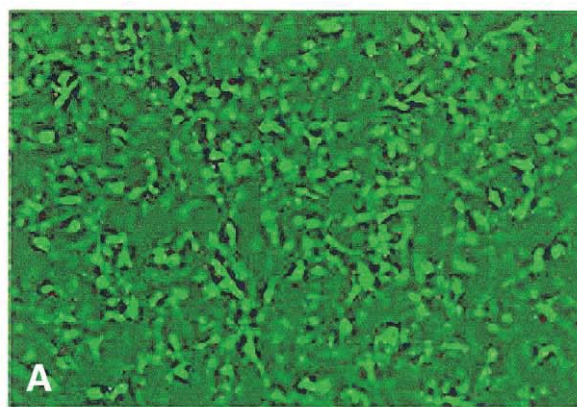


Figure 7. A bone marrow cell subpopulation was transduced with green fluorescence protein (GFP) using vesiculostomatitis virus, expanded in culture, and resuspended in a collagen biogel (A, *in vitro* imaging, 200 \times magnification), and demonstrated *in vivo* at 14 days (B, FITC conjugation, 200 \times magnification), and 28 days (C, direct green fluorescence, 400 \times magnification) in myocardial tissue demarcated by marker dye.

injections than is standard open surgical approaches. We are currently evaluating the second-generation CrossPoint TransAccess catheter, which has a much more flexible shaft. This new catheter system can easily track over a 0.014-inch guide wire, obviating the need for the subselective catheter component. The flexibility of this catheter is well suited for subselective vein access, such as the middle cardiac vein

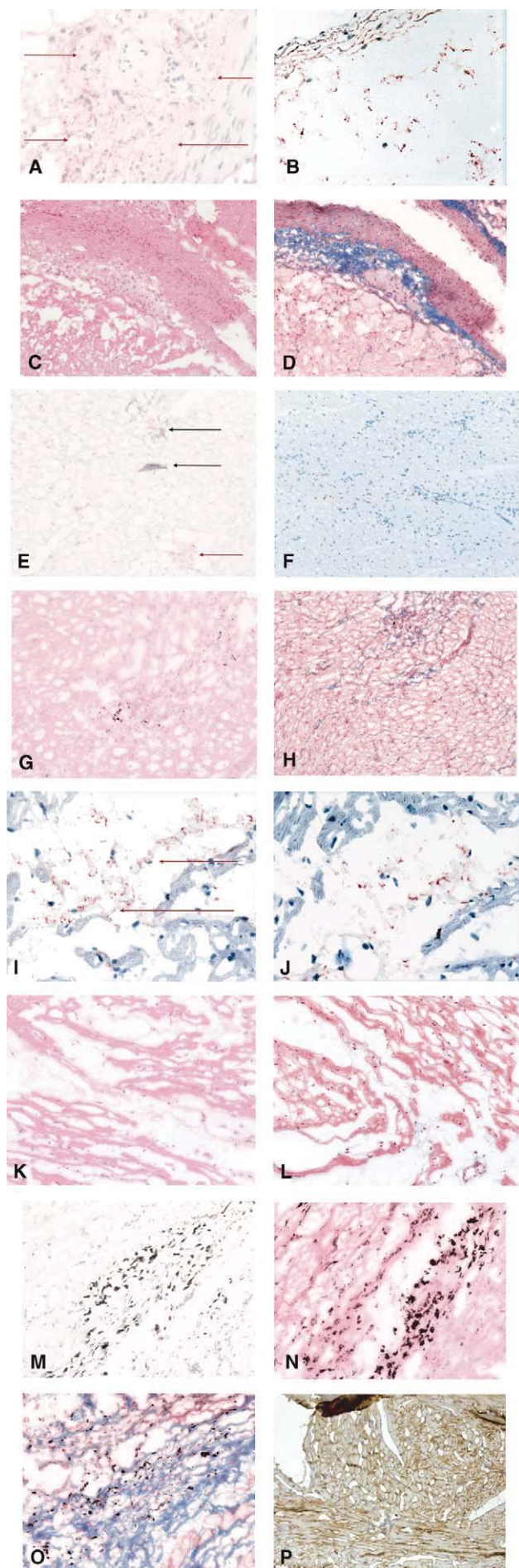


Figure 8. Immunohistologic confirmatory analysis demonstrated evidence of transplanted, autologous, “donor” bone marrow cells at 0 (A–D), 14 (E–H), and 28 (I–L) days in targeted myocardial tissue demarcated by tissue dye. Primary antibody versus green fluorescence protein (GFP), and secondary antibody conjugated to HRP, DAB chromagen (A, E, I, red arrows) were used to determine cell presence. Negative controls (B, F, J) had nonspecific immunoglobulins used as primary antibody. Hematoxylin-eosin (H&E) stains (C, G, K) show preserved myocardial architecture, and minimal fibrosis is seen on trichrome staining (D, H, L). The animal that received collagen biogel alone did not react nonspecifically to similar antibody staining (M) and had similar preservation of myocardial architecture by H&E (N). Note the collagen biogel fragments (E, closed black arrows) and interstitial biogel deposition (O, blue coloration, trichrome stain). The black (M, N, O) are tissue dye remnants. Positive control for the immunostain was assured using myocardial tissue from a transgenic mouse, positive for GFP (C–D, E–H, K–P, 200× magnification; A–B, I–J, 400× magnification).

(which parallels the posterior descending artery) for enhanced inferior wall access.

We used a collagen biogel as a cell “delivery vehicle.” The role of biogels and biodegradable polymers is poorly understood in cardiovascular applications. Our bias is that cell packaging and delivery may be as important as the cell sourcing for cardiovascular bioengineering applications (4–7,18–21). We hypothesize that biogels and biodegradable polymers may provide protection from physical compression and lysis of the cells during their harsh transition to the myocardium, provide architectural and nutritional support during the engraftment process, and facilitate vascular ingrowth and/or passive cell nutrition via diffusion processes. Our experience with biodegradable polymers for the application of cellular cardiomyoplasty is that they may create ambiguity with the distinction of donor-host cellular relationships, a factor that must be carefully considered and circumvented when designing investigations in which such relationships are the primary outcome measure. The utility of such biopolymers to facilitate cellular cardiomyoplasty is subject to ongoing investigation.

We identified what we believe to be autologous bone marrow cell implants in normal porcine myocardium at 0-, 2-, and 4-week timepoints, based on GFP expression using a variety of complementary histologic modalities in selected myocardial sites that clearly retained the tissue dye and biopolymer gel. Bone marrow cell subpopulations that are adherent to uncoated flasks may contain mesenchymal stem cells capable of multilineage potential through mesenchymal pathways (muscle, bone, adipose, stroma) (15). Murine investigations suggest that such bone marrow cell subpopulations can be differentiated into a cardiomyocyte phenotype *in vitro* and, perhaps, *in vivo* (22,23).

In addition, studies with conditioned media suggest that bone marrow cell subpopulations may secrete high levels of vascular endothelial growth factor and MCP-1, and potentially can recruit vascular supply (8). Our cell population was cultured in a similar fashion (15), but the cells were not characterized prior to injection with cell surface markers, and interspecies differences may certainly exist. This investigation was designed primarily to assess the catheter delivery system, and not transdifferentiation potential of our cell source. We observed labeled cell orientation with the porcine myocardium at the four-week timepoint. It is interesting to speculate about the potential of this cell

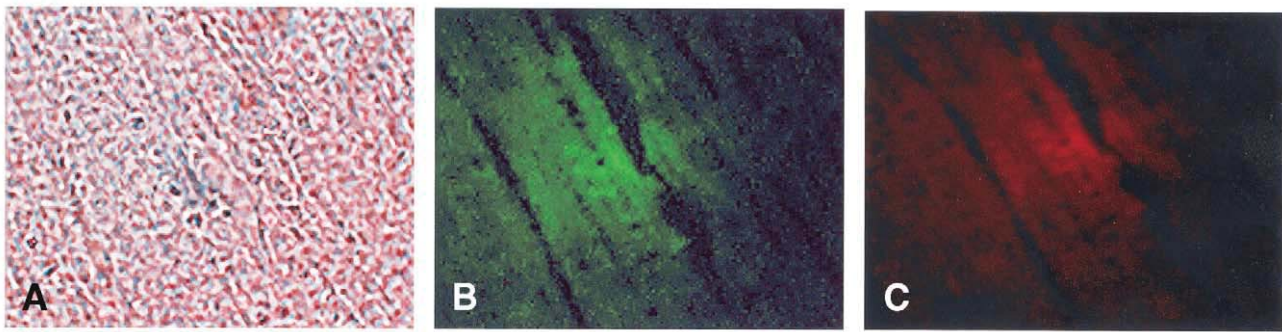


Figure 9. Longitudinal section in targeted myocardial tissue demarcated by tissue dye of (A) unstained, (B) direct green fluorescence, and (C) immunostain versus green fluorescence protein (GFP) (phycoerythrin secondary antibody, red immunofluorescence) demonstrating GFP+ cell structures morphologically at 28 days (400 \times magnification).

population to transdifferentiate into myotubules as a milieu-dependent process. However, this is clearly not proof of concept and must be subject to rigorous investigation specifically designed to assess such end points.

In summary, we present the initial experience of intracardiac, autologous bone marrow cell transplantation with a new catheter-based system that allows direct myocardial access with IVUS-guided needle punctures through the coronary venous system and infusion catheter placement into remote myocardium. This method of cell delivery may have potential advantages over currently available approaches, and it provides a new, stable platform for cardiovascular bioengineering therapies. Autologous cell populations from adult bone marrow may have a potential role for in vivo tissue engineering strategies for cardiac angiomyogenesis.

Acknowledgments

We appreciate the assistance of Tom Aretz, MD, Susan Boucher, Farouc Jaffer, MD, PhD, and Luis Guerrero in the conduct of this investigation.

Reprint requests and correspondence: Dr. Craig A. Thompson, Knight Center for Cardiac Catheterization and Intervention, Massachusetts General Hospital, 55 Fruit Street, Blake 950, Boston, Massachusetts 02114. E-mail: cathompson@partners.org.

REFERENCES

1. American Heart Association. 2002 Statistical Update. Dallas, TX: American Heart Association.
2. Thompson C, Oesterle S. Biointerventional cardiology: the future interface of interventional cardiovascular medicine and bioengineering. *Vasc Med* 2002;7:135-40.
3. Isner JM. Myocardial gene therapy. *Nature* 2002;415:234-9.
4. Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 1999;354:SI32-4.
5. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP. Tissue engineering: a 21st-century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 2001;72:577-91.
6. Nasser BA, Ogawa K, Vacanti JP. Tissue engineering: an evolving 21st-century science to provide biologic replacement for reconstruction and transplantation. *Surgery* 2001;130:781-4.
7. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-6.
8. 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.
9. Losordo DW, Vale PR, Hendel RC, et al. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor two gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation* 2002;105:2012-8.
10. Park SW, Gwon HC, Jeong JO, et al. Intracardiac echocardiographic guidance and monitoring during percutaneous endomyocardial gene injection in porcine heart. *Hum Gene Ther* 2001;12:893-903.
11. Yang X, Atalar E, Li D, et al. Magnetic resonance imaging permits in vivo monitoring of catheter-based vascular gene delivery. *Circulation* 2001;104:1588-90.
12. Taylor DA, Silvestry SC, Bishop SP, et al. Delivery of primary autologous skeletal myoblasts into rabbit heart by coronary infusion: a potential approach to myocardial repair. *Proc Assoc Am Physicians* 1997;109:245-53.
13. Bockstegers P, von Degenfeld G, Giehl W, Kupatt C, Franz W, Steinbeck G. Selective pressure-regulated retroinfusion of coronary veins as an alternative access of ischemic myocardium: implications for myocardial protection, myocardial gene transfer and angiogenesis. *Z Kardiol* 2000;89:IX/109-12.
14. Thompson C, Nasser B, Makower J, et al. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty: a novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation (abstr). *J Am Coll Cardiol* 2002;39:75A.
15. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284;284:143-7.
16. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR. Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;251:3-11.
17. Smits P, Reijs A, van der Giessen W, et al. Efficiency and retention of a percutaneous transendomyocardial injection of VEGF165 by a fluoroscopy guided transendomyocardial injection catheter. In: XIVth World Congress of Cardiology, Sydney, Australia, 2002.
18. Vacanti JP, Langer R, Upton J, Marler JJ. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;33:165-82.
19. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, et al. Evaluation of biodegradable, three-dimensional matrices for tissue engineering of heart valves. *ASAIO J* 2000;46:107-10.
20. Shum-Tim D, Stock U, Hrkach J, et al. Tissue engineering of autologous aorta using a new biodegradable polymer. *Ann Thorac Surg* 1999;68:2298-304.
21. Isogai N, Landis WJ, Mori R, et al. Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells. *Plast Reconstr Surg* 2000;105:953-63.
22. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705.
23. Hakuno D, Fukuda K, Makino S, et al. Bone marrow-derived regenerated cardiomyocytes (CMG cells) express functional adrenergic and muscarinic receptors. *Circulation* 2002;105:380-6.

2.2. Echokardiographische Evaluation von regionalen Wandbewegungen nach Zelltransplantation

Kukucka M, Nasserri B, Tscherkaschin A, Mladenow A, Kuppe H, Habazettl H.

The feasibility of speckle tracking for intraoperative assessment of regional myocardial function by transesophageal echocardiography.

J Cardiothorac Cardiovasc Anesth 2009;23(4):462-7.

Impact Factor 1.062

Nasserri BA, Kukucka M, Dandel M, Knosalla C, Choi YH, Ebell W, Hetzer R, Stamm C.

Two-dimensional speckle tracking strain analysis for efficacy assessment of myocardial cell therapy.

Cell Transplant 2009;18(3):361-70.

Impact Factor 5.126

Der Einfluss der Stammzelltherapie auf die globale linksventrikuläre Kontraktilität hat nur einen geringen Effekt, weswegen die Zelltherapie mit Zurückhaltung gesehen wird. Mit herkömmlichen Methoden wie der Echokardiographie und der Magnetresonanztomographie (MRT) können morphologische Messungen zur Wandbewegung und Wanddicke erfasst werden, jedoch kann nicht zwischen passiver und aktiver Einwärtsbewegung des Myokards unterschieden werden. Goldstandard zur Beurteilung der globalen und regionalen Wandbewegung ist das MRT in Kombination mit der Methode der Gewebemarkierung (*Tissue Tagging*). Diese Untersuchung ist allerdings Patienten mit metallischen Implantaten wie z.B. Herzschrittmachern nicht zugänglich.

In den folgenden zwei Arbeiten wurde eine neue Methode zur *Strain*-Kalkulation (*Strain* ist ein dimensionsloser Parameter, welcher die Deformation eines Objekts relativ zu seiner Ausgangsform darstellt) an Patienten getestet, die eine aortokoronare Bypassoperation erhielten. Diese Methode basiert auf hochauflösenden 2D-Echokardiographiebildern und der Bewegungsanalyse von stabilen akustischen Markern (*Speckles*).

Ziel der ersten Arbeit war es, die Anwendbarkeit von *Speckle-Tracking-Strain*-Analysen aus intraoperativen transösophagealen echokardiographischen (TEE) Bildern zu testen und die gewonnenen Daten mit qualitativen Wandbewegungsanalysen sowie intra- und inter-Untersuchervariabilität zu korrelieren. Es konnte festgestellt werden, dass *Speckle-Tracking-Strain*-Analysen intraoperativ möglich sind und das radiale *Strain* gut mit den visuell

beobachteten Wandbewegungs-Scores (WMS) korreliert; die intra- und inter-Untersuchervariabilität geringer bei der Verwendung der Strain-Analyse als beim WMS ist; und durch die Strain-Analyse präoperative Dysfunktionen der Kontraktilität in Wandsegmenten mit angiographisch Perfusionsdefiziten detektiert werden können.

Als Folgearbeit der ersten war die zweite Arbeit als Pilotstudie angelegt um zu testen, ob mit Hilfe der Speckle-Tracking-Strain-Analyse Zelltherapie-induzierte regionale linksventrikuläre Kontraktionsveränderungen detektiert werden können, die mit herkömmlichen Methoden wie dem WMS übersehen würden. Die Studie konnte zeigen, dass die intramyokardiale Applikation von Knochenmarkzellen während einer Bypassoperation die regionale Kontraktilität infarzierten Myokards deutlich verbessert, dieser Effekt jedoch zu klein ist, als dass er sich in einer messbaren Verbesserung der globalen LV-Funktionsparameter widerspiegelt.

Mit beiden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Speckle-Tracking-Strain-Echokardiographie zusätzliche wichtige Informationen zur regionalen Wandbewegungsveränderungen liefert, welche mit herkömmlichen Methoden verloren gehen oder nur unter erheblichem Zeit- und Kostenaufwand möglich sind.

The Feasibility of Speckle Tracking for Intraoperative Assessment of Regional Myocardial Function by Transesophageal Echocardiography

Marian Kukucka, MD,* Boris Nasser, MD,† Alexander Tscherkaschin, MD,* Alexander Mladenow, MD,* Hermann Kuppe, MD, PhD,* and Helmut Habazettl, MD, PhD‡

Objectives: The authors aimed to examine the feasibility of intraoperative transesophageal echocardiography (TEE) acquisition of a non-Doppler-based, speckle tracking-derived myocardial deformation parameter (strain) immediately before and after coronary artery bypass graft (CABG) surgery in patients with reduced left ventricular (LV) function.

Design: A clinical study.

Setting: The cardiac surgery operating room of a tertiary referral institution.

Patients: Ten patients with reduced LV function (ejection fraction lower than 35%) undergoing coronary revascularization were studied before and immediately after the procedure.

Interventions: Perioperative TEE.

Measurements and Results: A total of 120 myocardial segments were analyzed before and after CABG surgery. In visually obtained wall motion scoring (WMS), there were 29 normokinetic (N), 69 hypokinetic (H), 19 akinetic (A), and 3 dyskinetic (D) segments preoperatively and 26 N, 65 H, 21 A, and 8 D segments after CABG surgery. Preoperative radial strain correlated well with WMS ($R = 0.82$, $p < 0.0001$),

whereas longitudinal strain showed only a weak correlation ($R = 0.36$, $p < 0.0001$). Postoperatively, correlations were similar. Interobserver variability as analyzed by κ -statistics showed better agreement for radial ($\kappa = 0.82 \pm 0.05$, $p = 0.001$) and longitudinal strain ($\kappa = 0.73 \pm 0.06$, $p = 0.004$) than for WMS ($\kappa = 0.65 \pm 0.06$). Preoperatively, strain was markedly greater in normally perfused segments than in ischemic segments, whereas the mean WMS revealed only minor differences.

Conclusions: Strain calculation from TEE images is feasible during cardiac surgery and correlates well with WMS but has better interobserver agreement. Strain analysis, but not WMS, detected wall motion differences between normally perfused and ischemic segments. This simple method allows objective intraoperative quantification of myocardial segment function and may become an important monitoring tool in the future.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

KEY WORDS: regional myocardial function, wall motion scoring, quantification, strain/deformation, speckle tracking, inter- and intraobserver variability

IN RECENT YEARS, transesophageal echocardiography (TEE) has become an important perioperative diagnostic and monitoring tool in cardiac anesthesia. Precise and reproducible quantitative assessment of regional left ventricular (LV) function is essential for the evaluation and management of high-risk patients during cardiac surgery. Conventional methods for the analysis of regional function use visual assessment of inward radial motion and wall thickening from 2-dimensional (2D) echocardiographic images. This qualitative approach has known limitations. These include significant expertise required for accurate estimation and potential failure to identify subtle abnormalities.

Doppler-based myocardial velocity, strain, and strain rate analyses have been suggested to quantify regional myocardial function in transthoracic echocardiography.¹ However, important limitations of Doppler-derived parameters are the considerable angle dependency and substantial noise artifacts in the operating room.²

A newer method for strain calculation uses high-quality 2D images and analyzes the movement of stable acoustic markers (speckles) between frames, thus rendering determination of the strain independent of the Doppler technique.³ Strain is a di-

dimensionless parameter representing deformation of an object, relative to its original shape (Fig 1). Compared with myocardial velocity measurements, major advantages of strain analysis are the possibility of differentiating between motion (movement of an object) and deformation (shape change of an object) and the uniformity of measurements throughout the normal LV myocardium.⁴ Although numerous studies analyzed the validity, accuracy, and different applications of speckle tracking-derived strain analyses from transthoracic echocardiography images,⁵⁻⁷ it has not yet been used for intraoperative quantification of myocardial regional function.

Therefore, the aim of the present study was to test the feasibility of intraoperative determination of speckle tracking-derived strain from TEE images. The data were correlated with qualitative wall motion analysis, and intra- and interobserver variability was determined.

METHODS

The study was conducted in 10 patients with coronary heart disease and severely reduced LV function (ejection fraction lower than 35%) presenting for revascularization surgery. The investigation was approved by the local ethics committee, and all subjects gave written informed consent. TEE was performed during general anesthesia in the operating room during steady-state periods immediately before skin incision and after completion of the skin suture.

Anesthesia and surgery were similar in all patients. The patients received routine monitoring including bispectral index monitoring (BIS A2000 System; Aspect Medical Systems, Newton, MA). For the induction of anesthesia, sufentanil (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$), etomidate (0.2 mg/kg), and pancuronium (0.1 mg/kg) were used. Anesthesia was maintained with propofol (3 $\text{mg}/\text{kg}/\text{h}$), sufentanil (0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$), and sevoflurane (1.0%-1.5%). The concentrations of the anesthetics were titrated to maintain a bispectral index of 50 throughout the procedure. After median sternotomy, cardiopulmonary bypass was instituted under mild hypothermia (32°C-33°C). The authors used cardioprotection with

From the Departments of *Anaesthesiology and †Cardiothoracic and Vascular Surgery, Deutsches Herzzentrum, Berlin, Germany; and ‡Institute of Physiology, Charité Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany.

Address reprint requests to Marian Kukucka, MD, Department of Anaesthesiology, Deutsches Herzzentrum Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. E-mail: kukucka@dhzb.de

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1053-0770/09/2304-0004\$36.00/0

doi:10.1053/j.jvca.2008.12.002

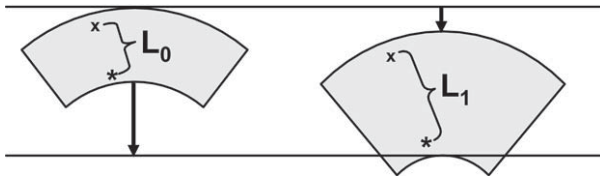


Fig 1. An LV myocardial segment in the short-axis view is schematically represented at end-diastole (left) and end-systole (right). For analysis of radial strain, pairs of stable acoustic markers (speckles, x and *) are identified and followed throughout the cardiac cycle. The distance between these markers is continuously assessed, and end-systolic strain is then calculated from the distance L_0 at end-diastole and L_1 at end-systole by the following formula: strain (S) = $(L_1 - L_0)/L_0 \times 100$ (%). A large number of such pairs of speckles are tracked, and the average of strain values of all such pairs represents the strain of the respective segment. Because the position of one speckle relative to another is analyzed, cardiac motion, represented here as systolic inward motion by the arrows, does not affect the results.

crystalloid cardioplegia based on magnesium and procaine (Cardioplegin; Köhler Chemie, Germany). For hemodynamic management of a low cardiac output after CPB (cardiac index <2.0 L/min/m²), the authors used epinephrine, enoximone, nitroglycerin, and, if necessary, mechanical circulatory support with an intra-aortic balloon pump.

Echocardiography was performed by an experienced (accredited by the American Society of Echocardiography) anesthesiologist using a Vivid Seven digital ultrasound system (General Electric, Horton, Norway). LV end-systolic and end-diastolic volumes were determined by manual tracing of end-systolic and end-diastolic endocardial borders using midesophageal 4-chamber (ME 4C) and 2-chamber (ME 2C) views using the biplane Simpson method. Ejection fraction was calculated from these volumes: ejection fraction (%) = $(EDV - ESV)/EDV \cdot 100$, where EDV is the end-diastolic volume and ESV is end-systolic volume. Stroke volume (SV) was calculated as follows: SV (mL) = CSA (cm²) \cdot VTI (cm), where SV is stroke volume, CSA is cross-sectional area, and VTI is velocity time integral.⁸

End-diastole was defined temporally as the ECG R-wave. End-systole was defined as aortic valve closure in the ME long-axis view. The time difference between the ECG QRS complex and aortic valve closure was measured by the software and used as the marker for systole. Subsequently, this time interval was used to denote the duration of systole in other echo views (ME 4C and ME 2C) that did not show the aortic valve. The authors manipulated the TEE probe (retroflexion and rotation) so that the longest length between base and apex was imaged. The 2D sector image was adjusted to allow visibility of the walls during the whole cardiac cycle. The focusing of the ultrasound beam width was adjusted to the center of the LV cavity to optimize lateral resolution of all segments. These 2D images were recorded and used for off-line visual wall motion scoring as well as for strain determination.

Strain analysis of the 2D echocardiography images was performed off-line on a personal computer with the aid of a customized software package (EchoPAC; General Electric) using 2 consecutive cardiac cycles of acquired loops. This system allows analysis of peak systolic radial and longitudinal strain based on the detection of natural acoustic markers within the myocardium and an algorithm that follows the acoustic markers accurately during several consecutive frames. It is assumed that the natural acoustic markers change their position from frame to frame in accordance with the surrounding tissue motion. The geometric shift of each speckle represents local tissue movement. The frame rate for these studies was between 56 and 92 frames/s. Too low (<40 Hz) and too high (>110 Hz) frame rate makes the speckle

tracking inadequate. To assess regional LV strain, a region of interest was drawn manually at the endocardial-cavity boundary on a single frame at end-systole. The speckle tracking software then automatically created a second larger region at the epicardial level so that the region of interest spans the LV myocardium. The system calculates the average of many individual strain values within each region of interest resulting in instantaneous strain curves for whole predefined LV segments (Fig 2). The maximum of strain during systole was used to denote peak systolic strain.

Peak systolic radial strain as a parameter of radial deformation relates to systolic wall thickening. Peak systolic longitudinal strain, a parameter of longitudinal shortening (from basal to apical segments), relates to longitudinal LV function and depends on the function of longitudinal myocardial fibers. The LV walls in the ME 4C and 2C views were divided into septal, lateral, anterior, and inferior walls, which were additionally subdivided into basal, mid, and apical segments to obtain regional quantitative function parameters from a total of 12 distinct segments in each patient. The analysis package has been described earlier.³ It involves automatic grading by the system of each segment regarding the tracking quality on a scale ranging from 1.0 for optimal to 3.0 for unacceptable. Segments with suboptimal tracking quality (grading >2.0 by the system) were systematically dismissed from the analysis. For the remaining segments, the tracking quality was checked visually to ensure adequate automatic tracking. Strain is dimensionless and expressed as the percent change from the original dimension as follows: S (%) = $(L - L_0)/L_0 \cdot 100$, where L is the

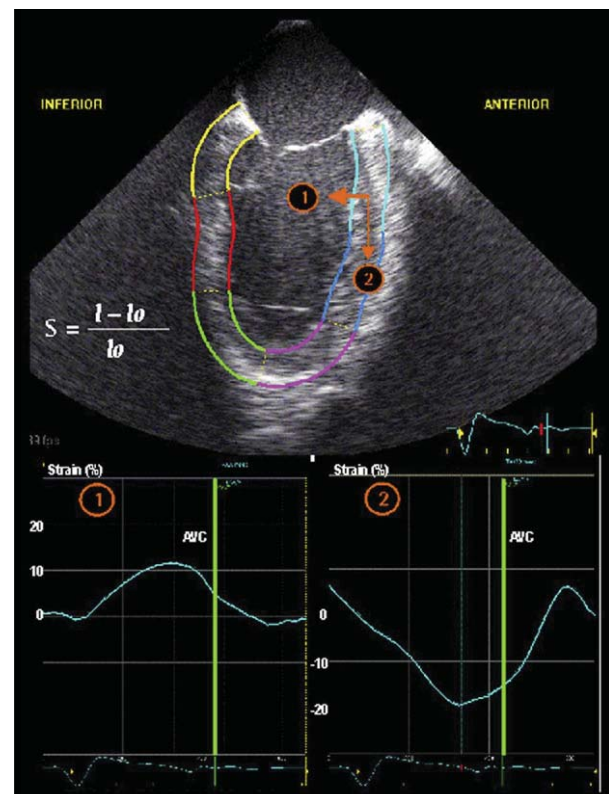


Fig 2. Top: ME 2-chamber view of the LV with the anterior (right) and inferior wall (left). The different colors indicate the separation into, from top to bottom, basal, mid, and apical segments. Bottom: radial (1) and longitudinal (2) strain from the anterobasal segment in this view. Abbreviations: S, strain; l_0 , original length; l, instantaneous length; AVC, aortic valve closure.

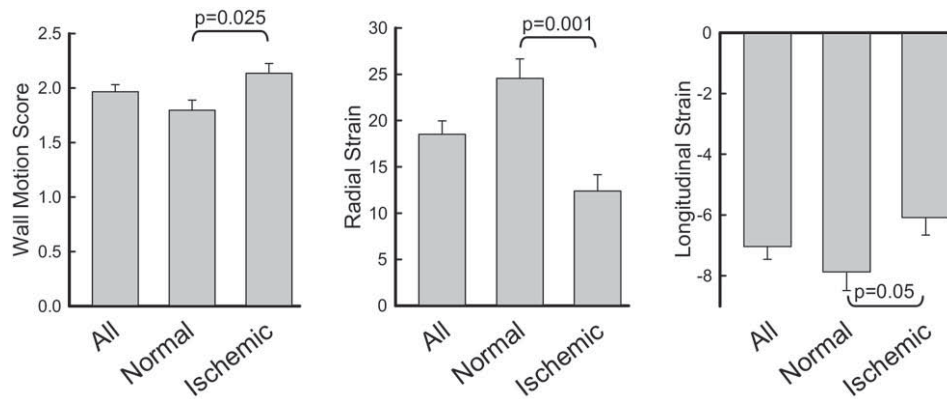


Fig 3. Preoperative WMS, radial strain, and longitudinal strain are presented for all 120 segments (All) and separately for normally perfused (Normal, n = 59) and ischemic segments (preoperatively supplied by stenotic or obstructed coronary artery; ischemic, n = 59).

instantaneous segment length measured at end-systole and L_0 is the segment length at time t_0 (ie, at end-diastole).

Before strain calculation, the 12 myocardial wall segments as defined earlier were analyzed visually and scored on the basis of their inward motion and systolic thickening. Segmental LV systolic function was evaluated by using a scoring system as follows: 1 = normal (>30% thickening in systole), 2 = hypokinetic (<30% thickening), 3 = akinetic (absence of wall thickening), and 4 = dyskinetic (outward motion of the segment in systole).⁹ For quantitative analyses, all individual score values were averaged to provide the mean wall motion score (WMS).

Although there is variability of coronary artery blood supply to myocardial segments, the authors assigned individual segments to specific coronary artery territories as suggested previously¹⁰ after confirming right coronary artery dominance. Depending on preoperative angiography data, the myocardial segments were divided into segments with normal blood supply (normal segments, n = 59 in Figs 3-5) and segments with stenosis (>70%) or total obstruction of the supplying coronary artery (diseased segments). The blood supply of one segment remained unclear. All but one of the diseased segments were revascularized during the procedure.

For estimation of interobserver variability, a second observer who was blinded to the previous results also evaluated the same cine-loops. Differences between observations were evaluated by Bland and Altman plots¹¹ for strain data and by kappa statistics¹² for the categoric WMS data. To enable direct comparison of interobserver variability, strain data were additionally transformed into categoric data.¹³ Cutoff values were selected according to the strain data of observer 1 to produce the same distribution as wall motion scores. The resulting κ values were compared by analysis of variance followed by a Student-Newman-Keuls post hoc test.

Differences between normal and ischemic segments were analyzed with a Mann-Whitney U test. Nonparametric correlation analysis was performed, and the Spearman rank correlation coefficient was calculated.

RESULTS

The mean ejection fraction using conventional biplane measurement was $26\% \pm 8\%$ preoperatively and remained unchanged at $28\% \pm 11\%$ after CABG surgery at the time of skin

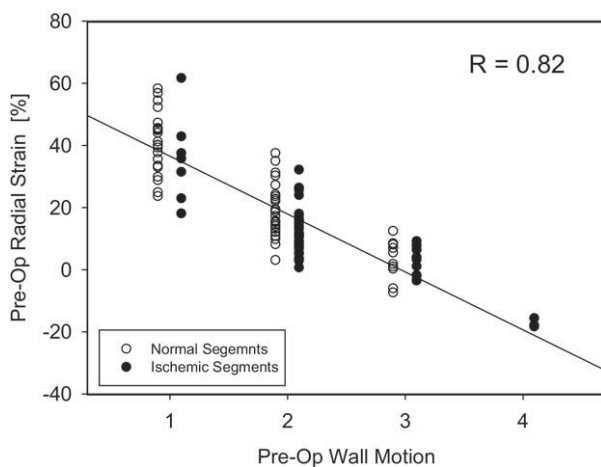


Fig 4. The correlation of preoperative radial strain with WMS in all 120 LV segments. $\text{Strain} = -18.6 \times \text{WMS} + 55.2$; $p < 0.0001$. Mean radial strain was $39.7\% \pm 2.0\%$ for normokinetic, $15.4 \pm 1.0\%$ for hypokinetic, $3.3\% \pm 1.3\%$ for akinetic, and $-17.0\% \pm 0.8\%$ for dyskinetic segments.

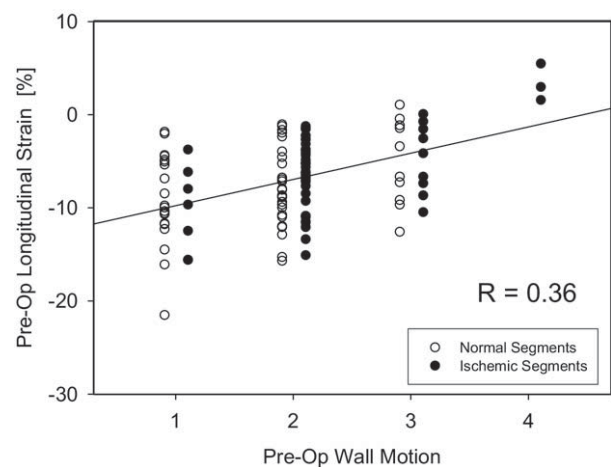


Fig 5. Correlation of preoperative longitudinal strain versus WMS score in all 120 LV segments. $\text{Strain} = 2.8 \times \text{WMS} - 12.6$; $p < 0.0001$. The mean longitudinal strain was $-9.3\% \pm 0.9\%$ for normokinetic, $-7.1\% \pm 0.5\%$ for hypokinetic, $-4.9\% \pm 0.9\%$ for akinetic, and $3.3\% \pm 1.1\%$ for dyskinetic segments.

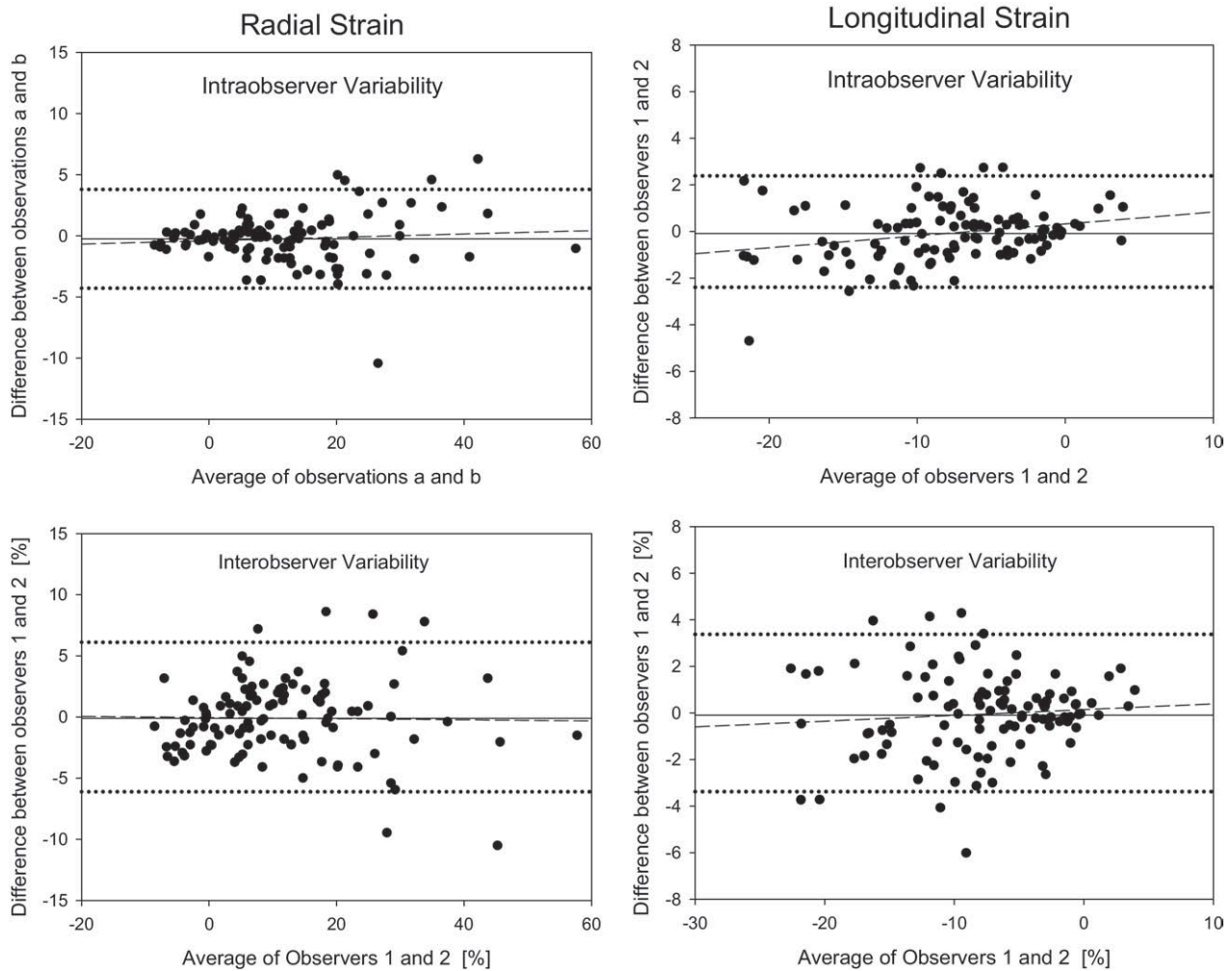


Fig 6. Bland and Altman plots of intra- and interobserver variability of radial strain (left) and longitudinal strain (right). The differences of strain values between both observers of all myocardial segments are plotted against the respective mean value. The mean difference (bias) is represented by the horizontal solid line and is close to 0. The almost negligible slope of the regression curves (dashed line) indicates that bias was similarly small for low and high strain values. The horizontal dotted lines represent the area of agreement (mean \pm 1.96 \times standard deviation of differences).

suture. Stroke volume calculated from CSA and VTI was 39.1 ± 11.8 mL preoperatively and 38.8 ± 12.1 mL postoperatively. Nine of 10 patients required inotropic support (4 epinephrine, 1 epinephrine and enoximone, and 4 received both drugs and an intra-aortic balloon pump).

Visual analysis of regional LV function was possible in all segments. A total of 120 myocardial segments were included in the analysis. Visual segmental analysis of regional myocardial function indicated normokinesia in 29 segments, hypokinesia in 69 segments, akinesia in 19, and dyskinesia in 3 segments preoperatively and 26 normokinetic, 65 hypokinetic, 21 aknetic, and 8 dyskinetic after CABG surgery. The WMS improved in 21, worsened in 31, and remained unchanged in 68 individual segments. The mean preoperative WMS of all segments was 2.0 ± 1 and did not change after surgery. There was a slight difference in the mean WMS between normal and ischemic segments (Fig 3).

Image quality was sufficient to allow strain analysis from ME 4C and 2C views in all 120 segments (tracking quality 1 or 2 as defined by the analysis software). There was no major difference between the segments in the rate of adequate tracking quality.

The mean radial strain of all segments was $18.5\% \pm 1.5\%$ (Fig 3). Preoperative radial strain was twice as high in normally perfused segments as compared with diseased segments ($24.5\% \pm 2.1\%$ v $12.4\% \pm 1.8\%$, $p < 0.001$). Radial strain correlated well with the WMS with $R = 0.82$ preoperatively (Fig 4) and $R = 0.84$ postoperatively (data not shown, $p < 0.0001$ for both).

The mean longitudinal strain of all segments was $-7.0\% \pm 0.4\%$ before surgery. The preoperative longitudinal strain was greater in normally perfused as compared with diseased segments (Fig 3). Longitudinal strain also correlated with WMS, however, not as well as radial strain ($R = 0.36$ preoperatively; Fig 5; $R = 0.46$ postoperatively; data not shown; $p < 0.0001$ for both).

Intraobserver variability of strain data analyzed by Bland-Altman plots (Fig 6) showed good agreement with virtually no bias between observations (−0.24% for radial and −0.08% for longitudinal strain). The areas of agreement are equivalent to 6.1% and 9.0% of, respectively, radial and longitudinal strain data range. Interobserver variability showed similarly little bias (−0.09% for both radial and longitudinal strain) and slightly wider areas of agreement (±9.2% and ±12.8% of, respectively, radial and strain longitudinal strain data range). The agreement of WMS results and strain transformed to categoric data is shown in contingency tables in Table 1. Both observers agreed on 79% of segments for WMS, 90% for radial strain, and 84% for longitudinal strain. The resulting κ -statistics are presented in Table 2; κ can assume values between 0 for no agreement and 1 for perfect agreement and showed significantly better agreement between observers for radial strain (0.82) and longitudinal strain (0.73) than for WMS (0.65).

DISCUSSION

The major results of this study are (1) speckle tracking-derived strain analysis is feasible in an intraoperative setting in cardiac surgery and the radial peak systolic strain correlates well with visually obtained wall motion score, (2) intra- and interobserver variabilities show better agreement for strain data as compared with WMS, and (3) strain analysis detects preoperative contractile dysfunction in wall segments with angiographically defined perfusion deficits.

Table 1. Contingency Tables of Interobserver Variability

WMS		Observer 2				Sum
		1	2	3	4	
Observer 1	1	23	6	0	0	29
	2	2	57	10	0	69
	3	0	5	13	1	19
	4	0	0	1	2	3
	Sum	25	68	24	3	120

Radial Strain		Observer 2				Sum
		1	2	3	4	
Observer 1	1	24	5	0	0	29
	2	0	67	2	0	69
	3	0	2	16	1	19
	4	0	0	2	1	3
	Sum	24	74	20	2	120

Longit Strain		Observer 2				Sum
		1	2	3	4	
Observer 1	1	22	7	0	0	29
	2	3	61	5	0	69
	3	0	3	16	0	19
	4	0	0	1	2	3
	Sum	25	71	22	2	120

NOTE. In the contingency tables, the diagonal fields show the number of observations on which both observers agreed, whereas the neighboring fields represent the observations with disagreement by 1 category. Disagreement by more than 1 category did not occur in the present study.

Table 2. Unweighted κ of Interobserver Variability

	κ	SD	95% CI	<i>p</i> v WMS
WMS	0.65	0.06	0.53-0.77	
Radial strain	0.82	0.05	0.73-0.92	0.001
Longitudinal strain	0.73	0.06	0.61-0.84	0.004

NOTE. κ -statistic relates the observed agreement between observations to the agreement expected by chance. The resulting κ -value can assume values between 0 representing no agreement and 1 representing perfect agreement between both observers. Landis and Koch¹² classified agreement according to the values of κ : slight: 0.00 to 0.20, fair: 0.21 to 0.40, moderate: 0.41 to 0.60,; substantial: 0.61 to 0.80; and almost perfect: 0.81-1.00. Thus, interobserver agreement was almost perfect for radial strain but only substantial for longitudinal strain and WMS.

Accurate identification of regional myocardial dysfunction is crucial for the diagnosis and management of patients with coronary artery disease. Currently applied methods rely on a subjective visual graduation of endocardial excursion and wall thickening, which requires considerable experience of the operator. Results depend on the individual user, and significant interobserver variability in the interpretation of regional function has been documented.¹⁴ In addition, myocardial deformation during a cardiac cycle occurs in several axes (ie, radially, longitudinally, and circumferentially),¹⁵ whereas the conventional qualitative approach only assesses radial inward motion and myocardial thickening. Accordingly, radial strain in the present study correlated well with WMS, which reflects radial inward motion of the myocardium. In contrast, longitudinal strain that reflects shortening in the long axis correlated only poorly with WMS.

Quantitative analysis of regional LV function by calculation of myocardial strain from frame-to-frame tracking of acoustic markers (speckles) in 2D echocardiographic images requires full visibility of defined myocardial walls and high-quality 2D images with an adequate frame rate.¹⁶ Off-line calculation of myocardial strain with non-Doppler-based software can be performed after a brief learning curve and is largely user independent with low intraobserver and interobserver variability of 5% and 8%, respectively.^{6,16} The authors show that intraoperative assessment of longitudinal and radial strain from transthoracic 2D images is feasible during cardiac surgery, and the results of radial strain analysis correlated well with the wall motion score obtained from the same images by an experienced echocardiographer. Interobserver variability was similarly low in the present study as described previously for transthoracic assessment.^{6,16}

Although normal values for 2D strain in healthy subjects have not been published, 2D strain correlates well with Doppler-based strain,³ and with this technique normal values for radial and longitudinal strain were 45% ± 12% and 18% ± 6%, respectively, with little differences between basal and apical segments. The values in normally perfused segments in the present study are considerably lower, which is attributed to myocardial remodeling in these patients with severe ischemic cardiomyopathy.

The mean wall motion score did not reveal major preoperative differences between normally perfused and potentially

ischemic myocardial segments as defined by preoperative angiography, but these segments differed considerably in radial and, to a lesser extent, in longitudinal strain, indicating that strain analysis may be more sensitive in detecting such functional deficits. The underlying reason may simply be that this quantitative measure is presented on a continuous scale, whereas wall motion score is presented in only 4 categories.

Several limitations of the present study are to be acknowledged. The authors evaluated the applicability of strain analysis in an intraoperative setting and therefore limited the analysis to peak systolic strain for practical reasons. Several studies have shown that the combination of reduced peak systolic strain with significant increase in postsystolic strain (deformation in early diastole after aortic valve closure) is a more sensitive marker for acute ischemia.¹⁷⁻²⁰ By dividing the myocardium into normal and diseased segments according to preoperative angiography data, the authors did not consider the possible impact of collateral circulation on myocardial function²¹ nor did they account for interindividual variations in coronary artery perfusion territories. Rather, segments were assigned to perfusion territories according to a fixed scheme as previously sugges-

ted,¹⁰ albeit after confirming that the inferior segments were perfused by the right coronary artery (right dominance) in all cases. Thus, some segments or parts of segments may have been falsely judged to be normally perfused or ischemic. Strain calculation is currently possible only in off-line analysis, which requires several minutes but can be performed easily in the operating room. Further development of the software can be expected to allow real-time strain analysis in the near future, which would resolve this limitation.

In conclusion, the authors showed that calculation of speckle tracking-derived myocardial strain from intraoperatively obtained 2D TEE images is feasible. Radial strain correlated well with visually obtained wall motion scores, whereas interobserver variability of strain data is lower than for wall motion scores. The authors suggest that strain analysis has the potential to become a valuable tool for intraoperative monitoring of patients in whom quantitative assessment of regional myocardial function is desired.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Anne M. Gale for editorial assistance.

REFERENCES

1. Sutherland GR, Di Salvo G, Claus P, et al: Strain and strain rate imaging: A new clinical approach to quantifying regional myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr* 17:788-802, 2004
2. Simmons LA, Weidemann F, Sutherland GR, et al: Doppler tissue velocity, strain, and strain rate imaging with transesophageal echocardiography in the operating room: A feasibility study. *J Am Soc Echocardiogr* 15:768-776, 2002
3. Leitman M, Lysyansky P, Sidenko S, et al: Two-dimensional strain—a novel software for real-time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr* 17:1021-1029, 2004
4. Kowalski M, Kukulski T, Jamal F, et al: Can natural strain and strain rate quantify regional myocardial deformation? A study in healthy subjects. *Ultrasound Med Biol* 27:1087-1097, 2001
5. Teske AJ, De Boeck BW, Melman PG, et al: Echocardiographic quantification of myocardial function using tissue deformation imaging, a guide to image acquisition and analysis using tissue Doppler and speckle tracking. *Cardiovasc Ultrasound* 5:27, 2007
6. Perk G, Tunick PA, Kronzon I: Non-Doppler two-dimensional strain imaging by echocardiography—From technical considerations to clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr* 20:234-243, 2007
7. Pavlopoulos H, Nihoyannopoulos P: Strain and strain rate deformation parameters: from tissue Doppler to 2D speckle tracking. *Int J Cardiovasc Imaging* 24:479-491, 2008
8. Otto CM: Left and right ventricular systolic function, in Otto CM (ed): *Textbook of Clinical Echocardiography*. New York, NY, Elsevier 2004, pp 131-165
9. Shanewise JS, Cheung AT, Aronson S, et al: ASE/SCA guidelines for performing a comprehensive intraoperative multiplane transesophageal echocardiography examination: recommendations of the American Society of Echocardiography Council for Intraoperative Echocardiography and the Society of Cardiovascular Anesthesiologists Task Force for Certification in Perioperative Transesophageal Echocardiography. *Anesth Analg* 89:870-884, 1999
10. Cerqueira MD, Weissman NJ, Dilsizian V, et al: Standardized myocardial segmentation and nomenclature for tomographic imaging of the heart: A statement for healthcare professionals from the Cardiac Imaging Committee of the Council on Clinical Cardiology of the American Heart Association. *Circulation* 105:539-542, 2002
11. Bland JM, Altman DG: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1:307-310, 1986
12. Landis JR, Koch GG: The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159-174, 1977
13. Corriveau MM, Johnston KW: Interobserver variability of carotid Doppler peak velocity measurements among technologists in an ICAVL-accredited vascular laboratory. *J Vasc Surg* 39:735-741, 2004
14. Hoffmann R, Lethen H, Marwick T, et al: Analysis of interinstitutional observer agreement in interpretation of dobutamine stress echocardiograms. *J Am Coll Cardiol* 27:330-336, 1996
15. Lunkenheimer PP, Redmann K, Westermann P, et al: The myocardium and its fibrous matrix working in concert as a spatially netted mesh: A critical review of the purported tertiary structure of the ventricular mass. *Eur J Cardiothorac Surg* 29:S41-S49, 2006 (suppl 1)
16. Becker M, Bilke E, Kuhl H, et al: Analysis of myocardial deformation based on pixel tracking in two-dimensional echocardiographic images enables quantitative assessment of regional left ventricular function. *Heart* 92:1102-1108, 2006
17. Kukulski T, Jamal F, Herbots L, et al: Identification of acutely ischemic myocardium using ultrasonic strain measurements. A clinical study in patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 41:810-819, 2003
18. Edvardsen T, Urheim S, Skulstad H, et al: Quantification of left ventricular systolic function by tissue Doppler echocardiography: Added value of measuring pre- and postejecction velocities in ischemic myocardium. *Circulation* 105:2071-2077, 2002
19. Skulstad H, Urheim S, Edvardsen T, et al: Grading of myocardial dysfunction by tissue Doppler echocardiography: A comparison between velocity, displacement, and strain imaging in acute ischemia. *J Am Coll Cardiol* 47:1672-1682, 2006
20. Jamal F, Szilard M, Kukulski T, et al: Changes in systolic and postsystolic wall thickening during acute coronary occlusion and reperfusion in closed-chest pigs: Implications for the assessment of regional myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr* 14:691-697, 2001
21. Cohen M, Rentrop KP: Limitation of myocardial ischemia by collateral circulation during sudden controlled coronary artery occlusion in human subjects: a prospective study. *Circulation* 74:469-476, 1986

Two-Dimensional Speckle Tracking Strain Analysis for Efficacy Assessment of Myocardial Cell Therapy

Boris A. Nasser¹, Marian Kukucka¹, Michael Dandel^{*}, Christoph Knosalla^{*}, Yeong-Hoon Choi[§], Wolfram Ebell[‡], Roland Hetzer^{*¶} and Christof Stamm^{*¶¶}

^{*}Department of Cardiothoracic and Vascular Surgery, Deutsches Herzzentrum Berlin, Berlin, Germany

[†]Department of Anaesthesiology, Deutsches Herzzentrum Berlin, Berlin, Germany

[‡]Pediatric Bone Marrow Transplant Program, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

[§]Cardiothoracic Surgery, University of Cologne, Cologne, Germany

[¶]BCRT-Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies, Berlin, Germany

The subtle effects of transplanted bone marrow cells (BMC) on regional myocardial behavior in patients with ischemic heart disease are difficult to assess. Novel echocardiographic techniques can quantify regional myocardial deformation (strain) and distinguish between passive and active wall motion. We hypothesized that this technique may help delineate cell therapy-induced changes in regional LV contractility that escape clinical routine studies. Twelve patients with coronary artery disease and impaired LV function (LVEF <35%) underwent CABG surgery plus intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells. Between two and five predefined segments of ischemic myocardium per patient received BMCs, and untreated ischemic segments served as internal controls. Segmental echocardiographic analysis of peak systolic strain by speckle tracking was performed before and 1 year after surgery and compared with standard wall motion analysis. Two patients died during the follow-up period. In the remaining 10 patients, mean LVEF increased from $24.5 \pm 10\%$ to $32.1 \pm 11\%$ ($p = 0.02$). A moderate improvement of systolic function was noted in ischemic control segments by both wall motion score (WMS) and 2D strain echocardiography (2DSE). In BMC-treated segments, WMS improved slightly, but the data failed to reach statistical significance. As assessed by 2DSE, however, systolic function of BMC-treated segments improved by nearly 100%. 2DSE proved to detect BMC-induced change with 30-fold higher sensitivity than WMS, and the Receiver Operating Characteristic curve (ROC) confirmed the diagnostic precision of 2DSE (area-under-the-ROC = 0.87). We conclude that echocardiographic speckle tracking two-dimensional strain analysis can detect cell therapy-induced changes in regional contractile function that may escape detection by standard wall motion assessment. Thus, 2DSE may be a useful tool for the further development of clinical cardiac cell therapy.

Key words: Speckle tracking; Myocardial cell therapy; Two-dimensional strain analysis

INTRODUCTION

Clinical cell therapy for treatment of heart disease is currently viewed with reluctance, because its effect on standard parameters of left ventricular contractility is moderate or even undetectable. The opponents of cardiac cell therapy in its present form (mainly relying on marrow-derived adult progenitor cells) may argue that the concept is not worthwhile pursuing if a striking impact on global heart function cannot be achieved. On the other hand, it may well be that cell therapy has beneficial effects on local myocardial structure and function that escape the routinely used outcome measurements. Magnetic resonance imaging (MRI) and echocardiogra-

phy are predominantly morphologic measurements of wall motion and thickening, and cannot distinguish between active and passive inward motion of the myocardium. MRI, especially in combination with tissue tagging, is considered the gold standard for assessment of global and regional left ventricular contractility (9), but it is difficult if not impossible in patients who have implants such as pacemakers or implantable defibrillators (ICDs). Here, Doppler-based echocardiographic myocardial velocity and strain analyses have been suggested to give more detailed quantitative information on regional myocardial function (14). Compared to myocardial velocity measurements, major advantages of strain analysis are the possibility of differentiating between motion

¹Both authors contributed equally to this study.

Address correspondence to Boris A. Nasser, M.D., Cardiothoracic and Vascular Surgery, Deutsches Herzzentrum Berlin, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. Tel: +49-30 4593 9238; E-mail: nasser@dhzb.de

(movement of an object) and deformation (shape change of an object) and the uniformity of measurements throughout the normal LV myocardium (4). However, an important limitation of Doppler-derived strain is the considerable angle dependency. A newer method for strain calculation utilizes high-quality 2D images and analyzes the movement of stable acoustic markers (speckles) between frames, thus rendering determination of strain independent of the Doppler technique (5). Therefore, we have performed a clinical pilot study to test the hypothesis that echocardiographic strain analysis with speckle tracking helps delineate cell therapy-induced changes in regional LV contractility that may otherwise be overlooked.

MATERIALS AND METHODS

The study was approved by the local ethics committee and conforms to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. All patients gave informed consent.

Twelve patients with chronic ischemic heart disease and impaired left ventricular function [left ventricular ejection fraction (LVEF) <35%] who were scheduled for elective coronary artery bypass (CABG) surgery were enrolled in the study. All patients had a history of myocardial infarction and suffered from dyspnoea and/or angina. Care was taken not to include patients with more recent (<weeks) myocardial infarction, because those are known to undergo significant spontaneous remodeling processes. All but one patient were male and the average patient age was 64 ± 9 years.

Cell Preparation

Bone marrow aspiration was performed in local anesthesia several hours prior to the operation, either in the morning when surgery was scheduled for the afternoon, or on the previous day when surgery was scheduled for the next morning. On average, 70 ml of marrow was collected in heparinized syringes (range 60–100 ml). The marrow was taken to the hematology clean room facility on campus, where a mononuclear cell product was prepared by Ficoll density centrifugation. Cells were resuspended in 8 ml autologous serum and filled in standard insulin syringes. When overnight storage was necessary, this was done at 4°C. Cells were not labeled for detection in vivo or on histology. Quality control measurements included sterility and viability testing as well as FACS analysis with labeling of CD45 and CD34.

Surgery

The heart was accessed via a median sternotomy and the left internal thoracic artery (ITA) and greater saphenous vein were harvested. All patients were placed on cardiopulmonary bypass. After cross-clamping of the as-

ending aorta cardiac arrest was initiated with warm blood cardioplegia. Saphenous vein grafts were implanted to the right and/or circumflex artery system, and the ITA was anastomosed to the left anterior descending artery (LAD) in all patients. Prior to release of the aortic cross-clamp, 24 intramyocardial injections of cell suspension were performed in the ischemic area of interest that had previously been defined based on the echocardiography data. The goal was to create three groups of myocardial segments per patient: i) noninfarcted segments with normal wall thickness, with or without impaired wall motion; ii) segments of infarcted myocardium (proximal coronary artery stenosis or occlusion, thinned wall, impaired wall motion) that received no cell injection; iii) segments of infarcted myocardium that were treated with bone marrow cells. A minimum of two segments and a maximum of five segments per patient were treated by cell injection (mean 3.1 ± 1.1 segments), and between 8 and 15 segments per patients were defined as ischemic control segments (mean 12.3 ± 2.2 segments). Once the CABG operation was completed, patients were transferred to the ICU. When hemodynamics had stabilized and catecholamine support was weaned, patients were transferred to the normal ward.

Echocardiography

Echocardiography was performed using a Vivid Seven digital ultrasound system (General Electrics, Horton, Norway). LV end-systolic and end-diastolic volume was determined by manual tracing of end-systolic and end-diastolic endocardial borders using apical four chamber (4C) and apical two chamber (2C) views, employing the biplane Simpson method. Ejection fraction (EF) was calculated as follows: $EF(\%) = (EDV - ESV) / EDV \times 100$, where EDV is the end-diastolic volume and ESV is end-systolic volume.

End-diastole was defined by the ECG R-wave. End-systole was defined as aortic valve closure in the apical long axis view (Lax). The time difference between the ECG QRS complex and aortic valve closure was measured by the software and used as marker for systole. Subsequently, this time interval was used to denote the duration of systole in other echo views (4C and 2C) that did not show the aortic valve. The 2D sector image was optimized to allow visibility of the walls during the whole cardiac cycle. Strain analysis of the 2D echocardiography images was performed off-line on a personal computer with the aid of a customized software package (EchoPAC, General Electrics, Horton, Norway) using two consecutive cardiac cycles of acquired loops. This system allows analysis of peak systolic longitudinal strain based on detection of natural acoustic markers within the myocardium and an algorithm, which follows the acoustic markers accurately during several consecu-

tive frames (2). It is assumed that the natural acoustic markers change their position from frame to frame in accordance with the surrounding tissue motion. The geometric shift of each speckle represents local tissue movement. To assess regional LV strain, a region of interest was drawn manually at the endocardial–cavity boundary on a single frame at end-systole. The speckle tracking software then automatically created a second larger region at the epicardial level, so that the region of interest spans the LV myocardium. The system calculates the average of many individual strain values within each region of interest, resulting in instantaneous strain curves for whole predefined LV segments. The maximum of strain during systole was used to denote peak systolic strain.

Peak systolic longitudinal strain, a parameter of longitudinal shortening (from basal to apical segments), relates to longitudinal LV function and depends on function of longitudinal myocardial fibers. The LV walls in the 4C, 2C, and Lax views were divided into lateral, septal, anterior, inferior, anteroseptal, and posterior walls, which were additionally subdivided into basal, mid, and apical segments to obtain regional quantitative function parameters from a total of 18 distinct segments in each patient. Strain is dimensionless and is expressed as the percent change from the original dimension, calculated using the following equation: $S(\%) = (L - L_0)/L_0 \times 100$, where L is the instantaneous segment length measured at end-systole and L_0 is the segment length at time t_0 (i.e., at end-diastole). In normal myocardium, longitudinal shortening results in a negative strain value of approximately -18% . In ischemic and infarcted segments the baseline strain values vary considerably, so that we chose to express the data as the percent change in strain over the follow-up period.

Prior to strain calculation, the 18 myocardial wall segments as defined above were analyzed visually and scored on the basis of their inward motion and systolic thickening. Segmental LV systolic function was evaluated using a scoring system as follows: 1 = normal ($>30\%$ thickening in systole), 2 = hypokinetic ($<30\%$ thickening), 3 = akinetic (absence of wall thickening), 4 = dyskinetic (outward motion of the segment in systole).

Statistics

Data are expressed as mean \pm SD or as median and interquartile range (IQR). Strain data are expressed as the percent change in strain (ϵ) between preoperatively and 1 year postoperatively in a given myocardial segment. Normal distribution of individual datasets was tested by the Shapiro-Wilk test (Analyze-it® for MS Excel). For further analysis, the SPSS® 10.1 software package was used. LV dimension data (LVEF, LVEDV, LVESV) fitted a normal distribution, and pre- and post-

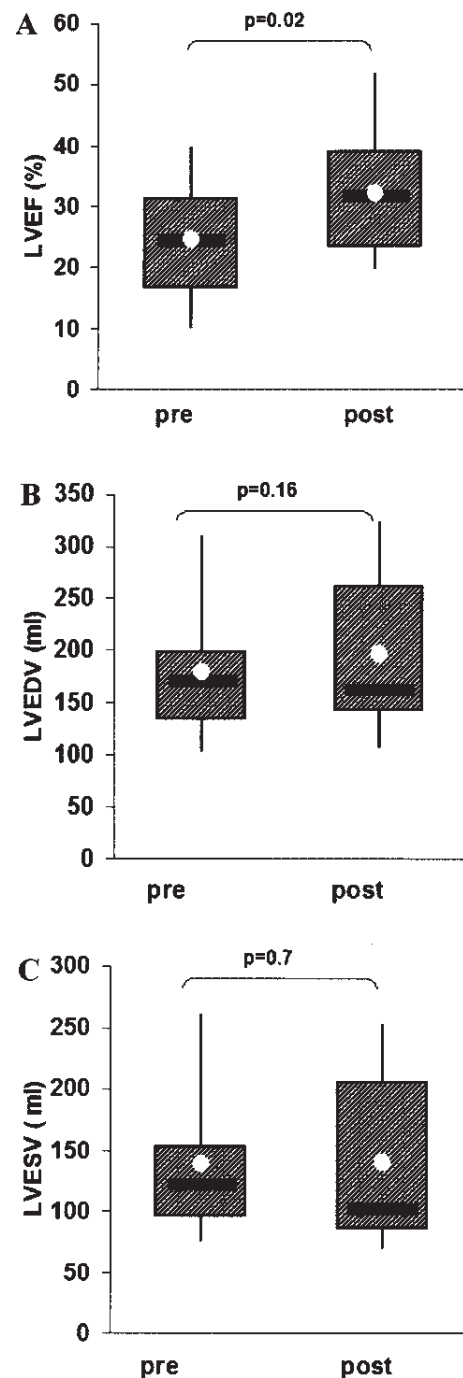


Figure 1. Left ventricular (LV) dimensions preoperatively (pre) and 1 year after (post) CABG surgery and intramyocardial bone marrow cell implantation. (A) Left ventricular ejection fraction (LVEF) improved significantly, while (B) end-diastolic (LVEDV) and (C) end-systolic volume (LVESV) remained essentially unchanged. The box plots show median (solid bar), mean (white dot), first and third quartile (box), and range (whiskers).

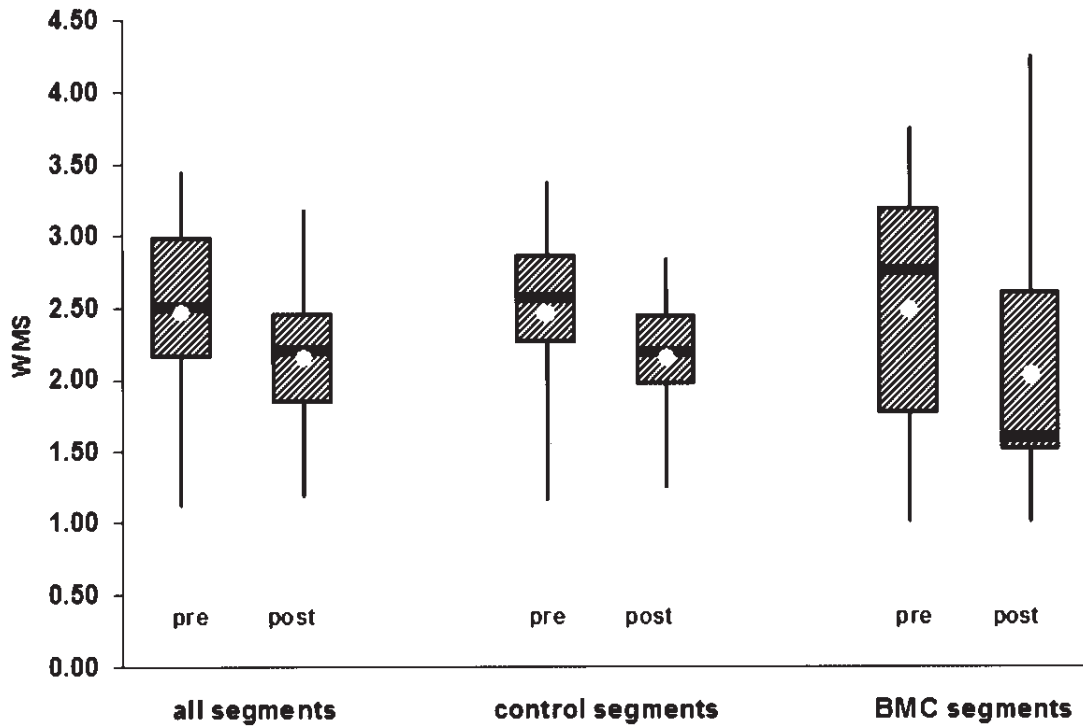


Figure 2. Wall motion score (WMS) before (pre) and 1 year after (post) CABG surgery and intramyocardial BMC injection. When all segments are taken together (all segments), median WMS improved significantly by approximately 0.5 score points. The improvement in WMS was less pronounced but still statistically significant in infarcted control segments that underwent revascularization but no BMC implantation. In BMC-treated segments, median WMS improved by >1 score point, but due to the higher variability of the data, the statistical significance level was not reached. The box plots show median (solid bar), mean (white dot), first and third quartile (box), and range (whiskers).

operative values were compared using paired Student's *t*-test (two-tailed). Longitudinal strain data did not fit a normal distribution, and data were compared using non-parametric tests (Mann-Whitney *U*-test for independent samples, and Wilcoxon's signed rank test for related data such as pre- and postoperative LS). To demonstrate the relationship between wall motion score (WMS) and 2D strain echocardiography (2DSE), strain change data were grouped according to the observed change in WMS in a given segment. Here, both ANOVA (parametric) and the Kruskal-Wallis test (nonparametric) were applied to test the overall significance. To test the precision of 2DSE for detection of BMC-induced changes in contractility, a Receiver Operating Characteristic curve (ROC) was constructed using SPSS® and the area-under-the ROC (AUROC) was computed.

RESULTS

Cell Product

All cell products met the release criteria in terms of bacterial contamination, viability, and stem cell content. Serologic studies indicated previous Ebstein Barr virus

infection in three patients. These were not considered exclusion criteria and had no impact on patient survival. The median total nucleated cell count in the crude marrow preparation was 177×10^7 (range $89\text{--}291 \times 10^7$), and the median mononuclear cell count in the final product was 28×10^7 (range $12.5\text{--}70 \times 10^7$). Of those, 5.4×10^6 (range $2.1\text{--}10 \times 10^6$) cells were CD34⁺ by FACS analysis. There was no evident association between the total or CD34⁺ cell count and the patients' age or severity of disease.

Surgery

An average of three bypass grafts (range two to four grafts) per patient were implanted. Complete revascularization was achieved in all patients (i.e., all three major coronary artery branches were bypassed provided they had a >50% stenosis). In one patient with grade III mitral incompetence, mitral valve repair was required; in another patient with grade III tricuspid incompetence and persistent foramen ovale, concomitant tricuspid valve repair and closure of the oval foramen was performed. Cell suspension was injected into the anterior-

lateral segments of the LV free wall in five patients, and into the posterior/inferior ventricular wall in seven patients. Segments within the interventricular septum were not treated with BMC. All patients received inotrope infusion for up to 5 days (median 1 day). Intra-aortic balloon pump support was necessary in two pa-

tients for 1 and 3 days, respectively. Patients were weaned off mechanical ventilation after an average of 1 day (range 0–14), and the average ICU stay was 1.5 days (1–18 days).

In seven patients, no major complication occurred during the 1-year follow-up period. One patient devel-

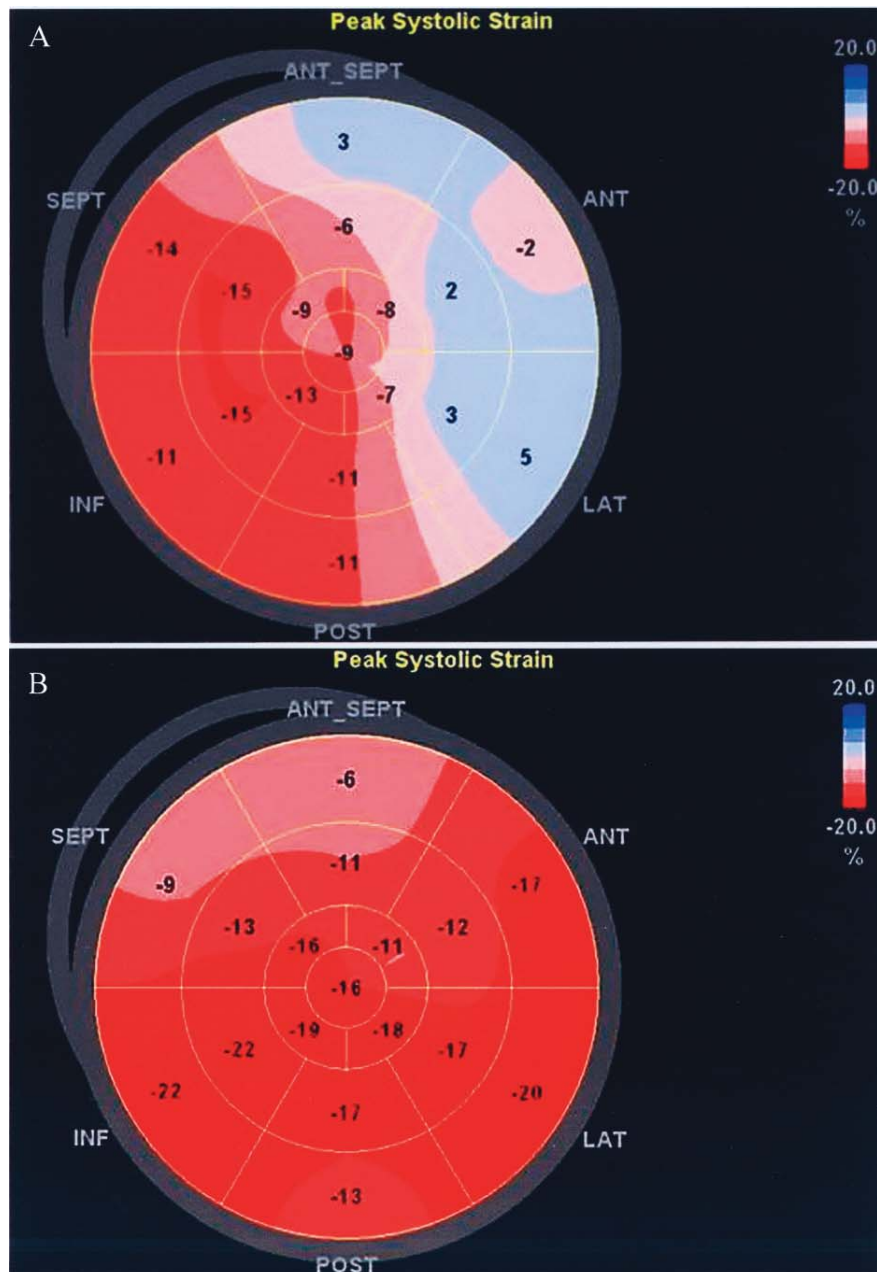


Figure 3. Bulls-eye image of peak systolic longitudinal strain in a patient before (A) and 1 year after (B) CABG and intramyocardial bone marrow cell implantation in anterolateral segments. Note that normal values of longitudinal strain are negative because of systolic shortening in long axis. Normal values for longitudinal strain are $-18 \pm 6\%$ (4).

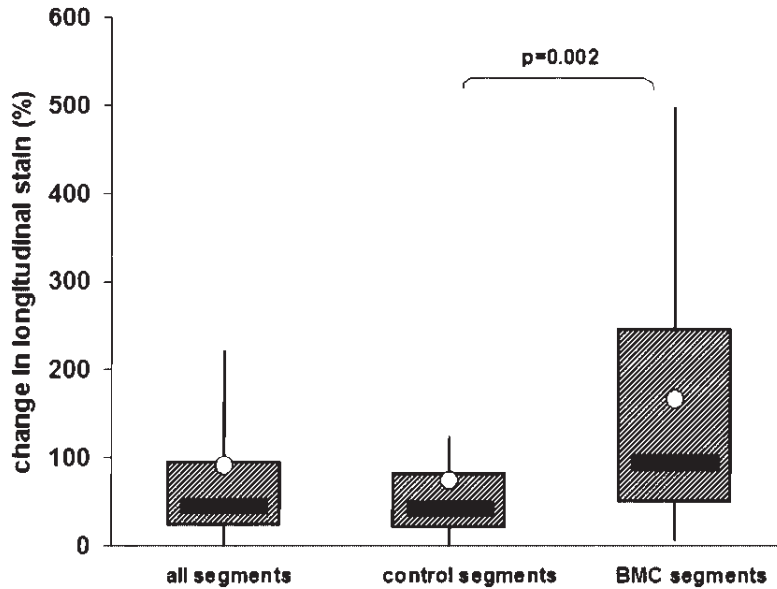


Figure 4. Change in segmental longitudinal strain 1 year after CABG surgery and intramyocardial BMC injection, compared to the preoperative studies and expressed in percent. When all segments are taken together (all segments), median strain change is approximately 40%, and the data are similar for infarcted control segments that underwent revascularization but no BMC implantation (control segments). In BMC-treated segments, however, the change in longitudinal strain was much more pronounced, and proved to be statistically significant. The box plots show median (solid bar), mean (white dot), first and third quartile (box), and range (whiskers).

oped a deep sternal wound infection, and was treated using a vacuum-assisted closure system and subsequent pectoral muscle plasty. Two patients had an episode of ventricular tachycardia that was terminated by electro-conversion and antiarrhythmic medication. In one of these patients, thromboembolic occlusion of the right radial artery occurred and was treated surgically, the other patient developed chronic renal failure requiring dialysis beginning 6 months postoperatively. Two other patients developed recurrent heart failure and died during follow-up; one patient on postoperative day 48, and the other patient 5 months after the operation.

Echocardiography Data

All surviving patients underwent echocardiographic follow-up examination. Over the 1-year follow-up period, LVEF rose from $24 \pm 9\%$ to $32 \pm 10\%$ ($p = 0.02$) as determined by the biplane Simpson method. Preoperatively, median LVEDV was 170 ± 63 ml, and LVESV was 121 ± 61 ml, and were not significantly different at follow-up (Fig. 1).

Overall, WMS improved by approximately 0.5 score points (Fig. 2). The improvement in WMS effect was slightly less pronounced but still statistically significant in ischemic control segments that underwent revascularization but no BMC implantation. In BMC-treated seg-

ments, however, the median WMS improved by >1 score point, but due to the higher variability of the data, the statistical significance level was not reached.

Representative images depicting segmental longitudinal strain data in one of our patients before and 1 year after surgery are shown in Figure 3. Overall, speckle tracking strain analysis produced similar qualitative results as WMS with respect to the change in contractile function when all segments are taken together. The median longitudinal strain change was approximately 45% (IQR 21–94%) (Fig. 4). In infarcted control segments that underwent revascularization but no BMC implantation, strain change was 40% (IQR 19–80%). In BMC-treated segments, however, the change in longitudinal strain was much more pronounced, with a median of 93% (IQR 48–243%, $p = 0.002$ compared with control segments).

We then examined the correlation between the change in WMS (Δ WMS) and the change in longitudinal strain rate in cell-treated myocardial segments. Here, a direct correlation analysis with linear regression would not be meaningful, because WMS is a semicategorical scoring system, while 2DSE produces continuous data and needs to be normalized for each patient. Instead, the segmental strain data were grouped in those with Δ WMS < 0 (worsening of wall motion), Δ WMS = 0

(unchanged wall motion), and $\Delta\text{WMS} > 0$ (improved wall motion), and the strain change data of the respective segments were summarized (Fig. 5). In segments with a negative change in WMS, indicating decreased contractile function, the median strain change was also negative. In segments with no change in WMS, indicating unchanged contractile function, the strain change was slightly positive. In segments with improved wall motion, however, longitudinal strain rate improved by a median of approximately 200%. Overall, the difference between the WMS-stratified 2DSE data was not statistically significant ($p = 0.6$ by ANOVA and $p = 0.8$ by Kruskal-Wallis test). We also performed a direct comparison of the change in wall motion and in longitudinal strain analysis (2DSE) in BMC-treated segments before and 1 year after the operation (Fig. 6). As assessed by conventional wall motion measurement, segmental myocardial contractility increased by a mean of 5% (median 0%). Based on 2DSE, however, regional myocardial contractility increased by a mean of 159% (median 72%, $p = 0.0001$).

To quantify the diagnostic precision of the longitudinal strain analysis, we constructed a ROC curve and computed the AUROC (Fig. 7). Based on the assumption that contractile function in BMC-treated segments with a >1 change in wall motion score did indeed improve, 2DSE detected these changes with high reliability (AUROC = 0.87).

DISCUSSION

In this pilot study, we tested the hypothesis that speckle tracking strain analysis can identify cell therapy-induced regional changes of left ventricular contractility. Both traditional wall motion analysis and 2DSE produced a similar picture with respect to the change in contractile function in control segments without cell injection, indicating a heterogenous but overall mild improvement of contractility that is readily explained by the effects of CABG revascularization. In cell-treated segments, however, 2DSE indicated a much more pronounced and consistent improvement of systolic function, and we will therefore include 2DSE in all future

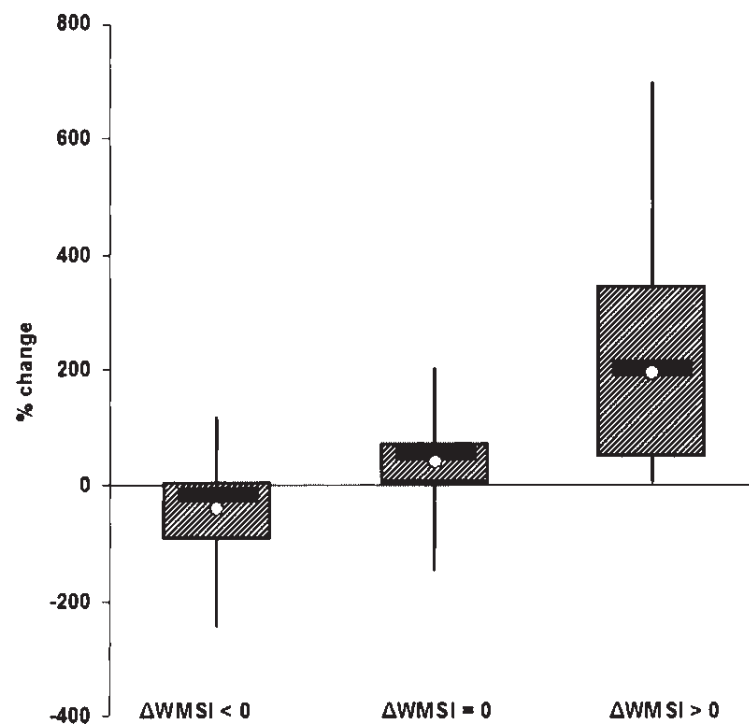


Figure 5. Correlation between the change in wall motion score (ΔWMS) and the change in longitudinal strain rate in cell-treated myocardial segments. The change in strain rate is expressed in percent. The segmental strain data have been grouped in those with $\Delta\text{WMS} < 0$ (worsening of wall motion), $\Delta\text{WMS} = 0$ (unchanged wall motion), and $\Delta\text{WMS} > 0$ (improved wall motion). In segments with improved wall motion, the longitudinal strain rate improved by a median of approximately 200%. Although this stratification helps illustrate the diagnostic power of 2DSE, neither analysis of variance ($p = 0.6$) nor the Kruskal-Wallis test ($p = 0.8$) reached the statistical significance level. The box plots show median (solid bar), mean (white dot), first and third quartile (box), and range (whiskers).

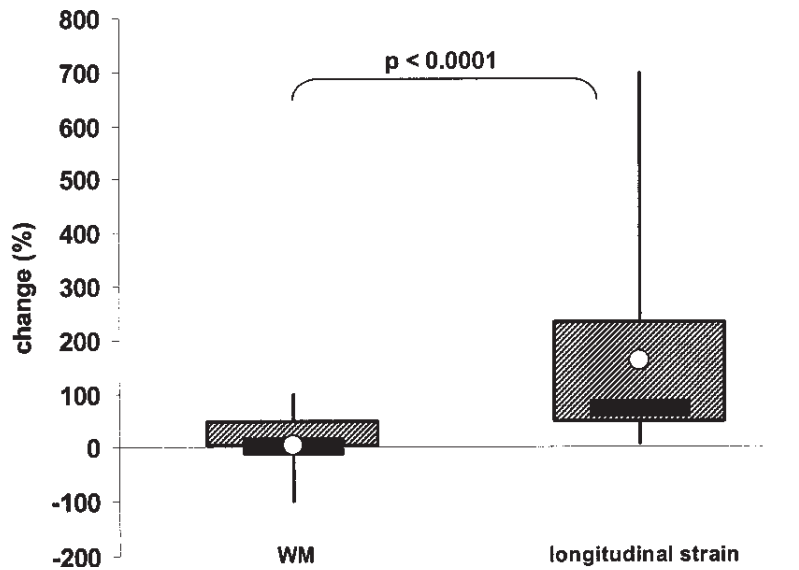


Figure 6. Comparison of the change in wall motion (WM) and in longitudinal strain analysis (2DSE) in BMC-treated segments before and 1 year after CABG surgery and intramyocardial BMC injection. As assessed by 2DSE, segmental myocardial contractility increased by a mean of 5% (median 0%). Based on 2DSE, however, regional myocardial contractility increased by a mean of 159% (median 72%). The box plots show median (solid bar), mean (white dot), first and third quartile (box), and range (whiskers).

studies that involve localized manipulation of myocardial biology.

Myocardial cell therapy has initially caused tremendous excitement, and hopes were high that infarcted myocardium can be regenerated by using relatively simple autologous bone marrow-derived cell products. Today, it has become clear that the cell-based induction of myocardial regeneration in man requires a much more detailed understanding of the underlying biology and pathophysiology (13). Therefore, sensitive methods to follow the fate of cell-treated myocardium are needed. Magnetic resonance imaging (MRI) is considered the gold standard for measurement of global and regional LV contractility, but has several limitations that call for additional diagnostic means: MRI in patients with implanted electrical devices (ICD, pacemakers), although not impossible, is technically demanding; claustrophobic patients may refuse MRI studies; the availability of cardiac MRI, especially in combination with 3D tissue tagging, is still limited to specialized centers; and the costs of MRI can be substantial. Moreover, conventional cardiac MRI as well as routine echocardiography are essentially morphologic studies that visualize the gross morphology of the myocardium but give no insight in its internal physical dynamics.

Wall motion score analysis of 2D echocardiograms relies on a subjective visual graduation of radial inward

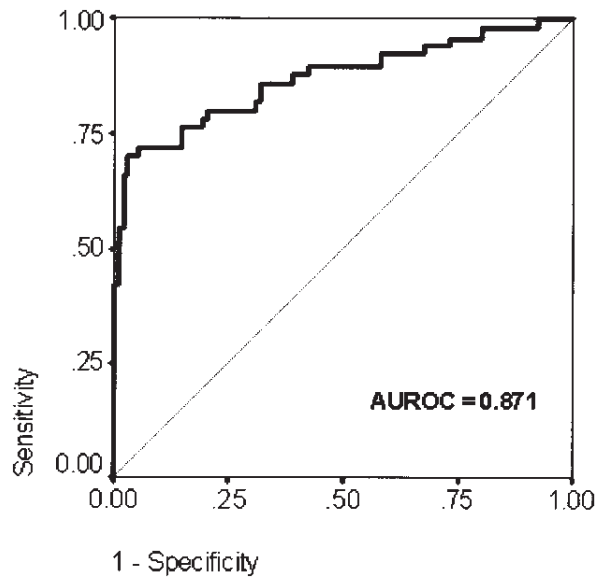


Figure 7. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve indicating the relationship of test sensitivity and specificity of longitudinal strain analysis. The Area-under-the-ROC (AUROC) is 0.871 (95% confidence interval 0.8–0.94). The ROC indicates that longitudinal strain detects BMC-induced changes in segmental systolic function with high reliability.

thickening, it requires extensive training and remains highly subjective. Unidimensional M-mode measurement of wall thickening and its velocity is influenced by the insonation angle and gives no information on longitudinal or circumferential myocardial function. In contrast, echocardiographic tissue deformation imaging allows for an objective measurement of regional myocardial deformation. As Teske et al. have summarized, the additional value of 2DSE tissue deformation imaging is the unmasking of subtle pathology, the quantification of myocardial function, and the detection of subtle changes over time (15). Especially the latter point may be helpful in the context of cardiac cell therapy studies. Moreover, 2DSE data are highly reproducible and have a small intra- and interobserver variability of approximately 4% and 7%, respectively (2). 2DSE data have been shown to correlate well with sonomicrometry measurements in experimental models as well as with cardiac MRI data, including MRI tagging for 3D myocardial deformation measurement.

In patients undergoing catheter-based intracoronary bone marrow cell infusion in acute myocardial infarction or in chronic ischemia, several controlled clinical trials have shown a modest but reproducible benefit in terms of an improvement in global LV function (1,10). In this situation, with cells being more or less evenly distributed in a large portion of the coronary vasculature, analysis of regional myocardial function is of secondary importance. In our series, global LV function did not improve more than expected after routine CABG surgery, and this is in line with several other studies of localized injection of bone marrow mononuclear cells in postinfarction myocardium. Soon after the advent of clinical cardiac cell therapy, there were a number of reports on improved segmental wall motion and/or thickening (3,16), but no larger phase II or III analogous trials have confirmed a substantial benefit in terms of global LV function or other clinically relevant outcome parameters. Similarly, localized intramyocardial implantation of autologous skeletal myoblasts was first shown to improve regional echocardiographic wall motion parameters (7), but a subsequent multicenter study showed no difference between myoblast-treated and control patients in terms of global LV function (6). Our data demonstrate that intramyocardial bone marrow cell therapy clearly changes the functional behavior of infarcted myocardium, but the effect is still too small to translate into measurably improved global LV function parameters. The reasons for this are probably manifold and include the characteristics of the cell product, cell dose, timing, and the “responsiveness” of the target myocardium. Other, more potent, cell products for clinical use are currently being evaluated and may hold greater

promise (8,12). From the clinician’s point of view, the impact on global LV contractility and dimensions is clearly most important, and needs to be interpreted in conjunction with functional data in terms of exercise capacity, heart failure symptoms, and ultimately survival (11). From the scientist’s point of view, however, a better understanding of the subtle effects of cell therapy on regional myocardial behavior in humans is needed to aid the development of more efficient cell therapy strategies.

The aim of this study was not to collect collateral evidence supporting the concept of using bone marrow mononuclear cells for myocardial regeneration. We are well aware that this strategy is currently not able to significantly change the outlook of heart failure patients undergoing cardiac surgery. Instead, we sought to investigate if 2DSE technology can produce additional information in patients undergoing cell therapy, and we feel that we have provided sufficient evidence supporting this notion. Therefore, we will employ 2DSE in our ongoing and future studies of myocardial cell therapy.

REFERENCES

1. Assmus, B.; Honold, J.; Schachinger, V.; Britten, M. B.; Fischer-Rasokat, U.; Lehmann, R.; Teupe, C.; Pistorius, K.; Martin, H.; Abolmaali, N. D.; Tonn, T.; Dimmeler, S.; Zeiher, A. M. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 355: 1222–1232; 2006.
2. Becker, M.; Bilke, E.; Kuhl, H.; Katoh, M.; Kramann, R.; Franke, A.; Bucker, A.; Hanrath, P.; Hoffmann, R. Analysis of myocardial deformation based on pixel tracking in two dimensional echocardiographic images enables quantitative assessment of regional left ventricular function. *Heart* 92:1102–1108; 2006.
3. Galinanes, M.; Loubani, M.; Davies, J.; Chin, D.; Pasi, J.; Bell, P. R. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant.* 13:7–13; 2004.
4. Kowalski, M.; Kukulski, T.; Jamal, F.; D’Hooge, J.; Weidemann, F.; Rademakers, F.; Bijmens, B.; Hatle, L.; Sutherland, G. R. Can natural strain and strain rate quantify regional myocardial deformation? A study in healthy subjects. *Ultrasound Med. Biol.* 27:1087–1097; 2001.
5. Leitman, M.; Lysyansky, P.; Sidenko, S.; Shir, V.; Peleg, E.; Binenbaum, M.; Kaluski, E.; Krakover, R.; Vered, Z. Two-dimensional strain—a novel software for real-time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 17:1021–1029; 2004.
6. Menasche, P.; Alfieri, O.; Janssens, S.; McKenna, W.; Reichenspurner, H.; Trinquart, L.; Vilquin, J. T.; Marolleau, J. P.; Seymour, B.; Larghero, J.; Lake, S.; Chatellier, G.; Solomon, S.; Desnos, M.; Hagege, A. A. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: First randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117:1189–1200; 2008.
7. Menasche, P.; Hagege, A. A.; Scorsin, M.; Pouzet, B.;

- Desnos, M.; Duboc, D.; Schwartz, K.; Vilquin, J. T.; Marolleau, J. P. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357:279–280; 2001.
8. Patel, A. N.; Geffner, L.; Vina, R. F.; Saslavsky, J.; Urschel, Jr., H. C.; Kormos, R.; Benetti, F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: A prospective randomized study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130:1631–1638; 2005.
 9. San Roman, J. A.; Fernandez-Aviles, F. The role of noninvasive imaging techniques in the assessment of stem cell therapy after acute myocardial infarction. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3(Suppl. 1):S38–41; 2006.
 10. Schachinger, V.; Erbs, S.; Elsasser, A.; Haberbosch, W.; Hambrecht, R.; Holschermann, H.; Yu, J.; Corti, R.; Mathey, D. G.; Hamm, C. W.; Süselbeck, T.; Assmus, B.; Tonn, T.; Dimmeler, S.; Zeiher, A. M.; REPAIR-AMI Investigators. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 355:1210–1221; 2006.
 11. Schachinger, V.; Erbs, S.; Elsasser, A.; Haberbosch, W.; Hambrecht, R.; Holschermann, H.; Yu, J.; Corti, R.; Mathey, D. G.; Hamm, C. W.; Süselbeck, T.; Werner, N.; Haase, J.; Neuzner, J.; Germing, A.; Mark, B.; Assmus, B.; Tonn, T.; Dimmeler, S.; Zeiher, A. M.; REPAIR-AMI Investigators. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: Final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. *Eur. Heart J.* 27:2775–2783; 2006.
 12. Stamm, C.; Kleine, H. D.; Choi, Y. H.; Dunkelmann, S.; Lauffs, J. A.; Lorenzen, B.; David, A.; Liebold, A.; Nienaber, C.; Zurakowski, D.; Freund, M.; Steinhoff, G. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: Safety and efficacy studies. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 133:717–725; 2007.
 13. Stamm, C.; Liebold, A.; Steinhoff, G.; Strunk, D. Stem cell therapy for ischemic heart disease: Beginning or end of the road? *Cell Transplant.* 15(Suppl. 1):S47–56; 2006.
 14. Sutherland, G. R.; Di Salvo, G.; Claus, P.; D’Hooge, J.; Bijnens, B. Strain and strain rate imaging: A new clinical approach to quantifying regional myocardial function. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 17:788–802; 2004.
 15. Teske, A. J.; De Boeck, B. W.; Melman, P. G.; Sieswerda, G. T.; Doevendans, P. A.; Cramer, M. J. Echocardiographic quantification of myocardial function using tissue deformation imaging, a guide to image acquisition and analysis using tissue Doppler and speckle tracking. *Cardiovasc. Ultrasound* 5:27; 2007.
 16. Tse, H. F.; Kwong, Y. L.; Chan, J. K.; Lo, G.; Ho, C. L.; Lau, C. P. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361:47–49; 2003.

2.3. Klinische Studien zur myokardialen Regeneration bei chronischer Herzinsuffizienz

Nasseri BA, Kukucka M, Dandel M, Knosalla C, Potapov E, Lehmkuhl HB, Meyer R, Ebell W, Stamm C, Hetzer R.

Intramyocardial delivery of bone marrow mononuclear cells and mechanical assist device implantation in patients with end-stage cardiomyopathy.

Cell Transplant 2007;16(9):941-50.

Impact Factor 3.871

Nasseri BA, Ebell W, Dandel M, Kukucka M, Gebker R, Doltra Magarolas A, Knosalla C, Choi YH, Hetzer R, Stamm C.

Autologous CD133+ Bone Marrow Cells and Bypass Grafting For Regeneration Of Ischemic Myocardium: The Cardio133 Trial.

Eur Heart J 2014;35(19):1263-74.

Impact Factor 14.097

Seit 1990 wurden zahlreiche experimentelle und klinische Studien zur Regeneration des Herzens durch applizierte Stammzellen durchgeführt. Dabei kamen besonders autologe Knochenmarkstammzellen nach einem akuten Myokardinfarkt zum Einsatz. Diese wurden in den meisten klinischen Studien innerhalb weniger Stunden bis Tagen nach einer akuten Ischämie und der interventionellen Wiedereröffnung eines oder mehrerer Koronararterien von Kardiologen intravaskulär injiziert. In mehreren dieser Studien konnte ein positiver Effekt auf die Herzfunktion gezeigt werden; jedoch gibt es wenige Informationen zu den Effekten von intramyokardial applizierten Stammzellen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz.

In den folgenden zwei klinischen Studien sollte der Einfluss von intramyokardial injizierten autologen Knochenmarkstammzellen auf die Herzfunktion während gleichzeitiger chirurgischer Prozeduren überprüft werden.

In der ersten Arbeit wollten wir als Pilotstudie die aufgestellte Hypothese testen, dass die Wahrscheinlichkeit, Patienten mit einem linksventrikuläres Assist Device (LVAD) von der mechanischen Kreislaufunterstützung abtrainieren zu können, mit der Gabe von intraoperativ applizierten nicht-selektionierten autologen Knochenmarkstammzellen steigt. Diese Studie zeigte weltweit die erste Serie von Patienten (n = 10) an einem LVAD, welche intraoperativ intramyokardial applizierte Stammzellen erhielten. Obwohl während der routinemäßig durchgeführten Pumpen-Stopp-Echokardiographie eine leichte Verbesserung der globalen

linksventrikulären Kontraktilität und Abnahme des linksventrikulären Durchmessers beobachtet werden konnte, erfüllten sieben der acht überlebenden Patienten nicht die erforderlichen Kriterien zur Explantation der mechanischen Kreislaufunterstützung. Bei einem 14-jährigen Patienten zeigte sich schon nach zwei Monaten eine signifikante Verbesserung der Kontraktilität und Geometrie des linken Ventrikels. Dieses positive Reverse Remodeling des Herzens führte nach weiteren zwei Monaten zum erfolgreichen Entwöhnen vom LVAD. Vier Monate nach Explantation des LVAD zeigte sich unter weitergeführter medikamentöser Therapie eine Normalisierung von Geometrie und Pumpfunktion. Trotz dieser einen erfolgreichen LVAD Explantation konnten wir aus den Ergebnissen nur schlussfolgern, dass die Zellinjektion von autologen Knochenmarkstammzellen zu keiner sichtbaren Veränderung des klinischen Verlaufs von Patienten im terminalen Herzversagen, die mit einem LVAD behandelt werden, beiträgt.

Die zweite Studie ist die erste Publikation einer randomisierten doppelblinden placebokontrollierten Studie zur Regeneration ischämischen Myokards durch autologe CD133+-Knochenmarkzellen und aortokoronare Bypassoperation. Andere Arbeitsgruppen konnten die Durchführbarkeit und Sicherheit der Gabe von CD133+-Knochenmarkvorläuferzellen während der chirurgischen Revaskularisation zeigen. In einigen Studien konnte ein signifikanter Vorteil für Patienten, welche zusätzlich zur aortokoronaren Bypassoperation intramyokardial injiziert CD133+-Knochenmarkszellen erhielten, festgestellt werden. Diese Studien waren jedoch nicht blind, nicht placebokontrolliert und auch nicht strikt randomisiert. In unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass zwar einige lokale myokardiale Veränderungen wahrscheinlich auf die Gabe von CD133+-Zellen zurückzuführen sind, was ein Indiz dafür sein kann, dass sich die Transplantation von Zellen auf die Erholung des ischämischen Myokards auswirken kann, die intramyokardiale Injektion von CD133+-Zellen aber keinen klinisch relevanten Vorteil zusätzlich zur Bypassoperation bringt.

Intramyocardial Delivery of Bone Marrow Mononuclear Cells and Mechanical Assist Device Implantation in Patients With End-Stage Cardiomyopathy

Boris A. Nasser^{*}, Marian Kukucka[†], Michael Dandel^{*}, Christoph Knosalla^{*}, Evgenij Potapov^{*},
Hans B. Lehmkuhl^{*}, Rudolph Meyer^{*}, Wolfram Ebell[‡], Christof Stamm^{*,§} and Roland Hetzer^{*,§}

^{*}Department of Cardiothoracic and Vascular Surgery, Deutsches Herzzentrum Berlin, Berlin, Germany

[†]Department of Anesthesiology, Deutsches Herzzentrum Berlin, Berlin, Germany

[‡]Pediatric Bone Marrow Transplant Program, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

[§]BCRT—Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies, Berlin, Germany

In end-stage heart failure, mechanical ventricular assist devices (VAD) are being used as bridge-to-transplantation, as a bridge-to-recovery, or as the definitive therapy. We tested the hypothesis that myocardial implantation of autologous bone marrow mononuclear cells (BMNC) increases the likelihood of successful weaning from left VAD (LVAD) support. Ten patients (aged 14–60 years) with deteriorating heart function underwent LVAD implantation and concomitant implantation of autologous BMNC. Bone marrow was harvested prior to VAD implantation and BMNC were prepared by density centrifugation. Two patients received a pulsatile, extracorporeal LVAD and eight a nonpulsatile implantable device. Between 52 and 164×10^7 BMNC containing between 1 and 12×10^6 CD34⁺ cells were injected into the LV myocardium. There was one early and one late death. The median time on LVAD support was 243 days (range 24–498 days). Repeated echocardiographic examinations under increased hemodynamic load revealed a significant improvement of LV function in one patient. Three patients underwent heart transplantation, and four patients remain on LVAD support >1 year without evidence of recovery. Only one patient was successfully weaned from LVAD support after 4 months, and LV function has remained stable ever since. In patients with end-stage cardiomyopathy, intramyocardial injection of BMNC at the time of LVAD implantation does not seem to increase the likelihood of successful weaning from VAD support. Other cell-based strategies should be pursued to harness the potential of cell therapy in LVAD patients.

Key words: Heart failure; Bone marrow; Assist device; Regeneration; Myocardium; Surgery

INTRODUCTION

Cell-based regenerative medicine for heart disease has recently gained widespread attention. Although the initial hypothesis—transdifferentiation of bone marrow stem cells into cells with cardiomyocyte phenotype—has never been conclusively proven (20), there is a large body of information indicating that, via several other mechanisms, marrow-derived cells do have beneficial effects on diseased myocardium. Clinical trials have so far mainly focused on patients with myocardial infarction, and a moderate improvement of heart function has been shown in some, but not all, studies (1,23). There is very little information, however, on cell therapy for patients who need novel therapeutic approaches most urgently, namely those with end-stage heart failure. When

pharmacologic treatment options have been exhausted, the only chance to prevent cardiogenic shock and imminent death is the immediate implantation of a mechanical cardiac assist device. This is often planned as a bridge-to-transplantation or as the definitive therapy; in some instances, however, heart function recovers and allows for weaning from the mechanical support and ultimately explantation of the device (5,7,10). The likelihood of successful weaning is small and depends on an unknown number of patient-, disease-, and device-related factors. Theoretically, bone marrow-derived progenitor cells may aid the recovery of failing myocardium by promoting angiogenesis, suppressing cardiomyocyte apoptosis, and modulating extracellular matrix turnover (8, 13,16,18).

We therefore designed a pilot study to test the hypothesis that the likelihood of successful weaning from

Address correspondence to Christof Stamm, M.D., Deutsches Herzzentrum Berlin, Cardiothoracic and Vascular Surgery, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, Germany. Tel: +49-30 4593 9238; E-mail: stamm@dhzb.de

mechanical support in patients with terminal heart failure is increased when autologous bone marrow mononuclear cells (BMNC) are implanted in the myocardium.

MATERIALS AND METHODS

Ten consecutive patients with end-stage heart failure, who were admitted to our hospital due to the onset of acute decompensation, were enrolled in the study. Their preoperative characteristics are summarized in Table 1. The underlying disease had been classified as idiopathic dilative cardiomyopathy, although one patient also had a history of ischemic heart disease and another patient anamnestic evidence of previous virus infection. All patients were male, and the median age was 50.5 years, ranging from 14 to 60 years. The interval between known onset of the disease and admission to our institution ranged between 2 and 163 months (median 53 months). All patients required catecholamine infusions to maintain hemodynamic stability. The decision for assist device implantation was made because cardiac output remained insufficient for adequate organ perfusion, while all pharmacologic treatment options had been exhausted. In principle, all patients were considered subsequent candidates for heart transplantation, should LV function not recover during VAD support. One patient, a 14-year-old boy, had initially presented to a referring center in cardiogenic shock requiring cardiopulmonary resuscitation, where he was placed on a device for short-term mechanical circulatory support (centrifugal pump system). Because LV function did not immediately recover and the need for long-term mechanical support was anticipated, this patient was referred to our center

after 2 weeks for implantation of a long-term compatible assist device and evaluation for heart transplantation.

The study was approved by the local ethics committee and conforms with the principles outlined in the Declaration of Helsinki.

Cell Preparation

Bone marrow aspiration was performed in local anesthesia several hours prior to the operation, either in the morning when surgery was scheduled for the afternoon, or on the previous day when surgery was scheduled for the next morning. On average, 74 ml marrow was collected in heparinized syringes (range 45–115 ml). The marrow was taken to the clean room facility of the Pediatric Bone Marrow Transplant Program at Charité Universitätsmedizin, where a mononuclear cell product was prepared by Ficoll density centrifugation. Cells were resuspended in 8 ml autologous serum and filled in standard insulin syringes. When overnight storage was necessary, this was done at 4°C. Cells were not labeled for detection in vivo or on histology.

Surgery

The techniques of left ventricular assist device implantation have been summarized elsewhere (4,6,11). Briefly, a median sternotomy was performed and the patients were placed on cardiopulmonary bypass. The outflow cannula was connected with the ascending aorta by end-to-side anastomosis, and the inflow cannula was inserted into the apex of the left ventricle (Fig. 1). This concept was the same for all LVAD modifications. When an extracorporeal pump chamber was used (Berlin Heart EXCOR, Berlin Heart Mediprodukt GmbH, Ber-

Table 1. Summary of Relevant Patient-Related and Procedural Data

Patient	Age (Years)	Diagnosis	Known Disease Duration (Months)	LVEF Pre-LVAD Implantation (%)	Inotrope Score Before LVAD	Type of LVAD	LVAD Support (in Days)	Current Clinical Status
1	14	DCMP	12	15	2*	BH Excor LVAD	122	Weaned from LVAD
2	55	DCMP	163	11	12	Cor Aid	221	HTx
3	49	DCMP	152	20	12	BH Incor	305	HTx
4	49	DCMP	2	18	33	BH Excor BVAD	104	Died
5	25	DCMP	11	24	4	BH Incor	498	On HTx waiting list
6	57	DCMP	62	24	8	BH Incor	371	On HTx waiting list
7	18	DCMP	4	18	6	BH Incor	84	HTx
8	52	DCMP	78	15	19	BH Incor	266	On HTx waiting list
9	56	DCMP	45	18	17	BH Incor	265	On HTx waiting list
10	60	DCMP	87	20	5	BH Incor	24	Died

LVAD, left ventricular assist device; DCMP, dilative cardiomyopathy; Known duration of disease, interval between first diagnosis and LVAD implantation; Inotrope score, scoring system that indicates degree of differential inotrope support in a given patient [the higher the number the higher the dose and potency of the inotropic drugs required to maintain cardiac output (14)]; HTx, heart transplantation; BH, Berlin Heart™.

*Centrifugal pump.

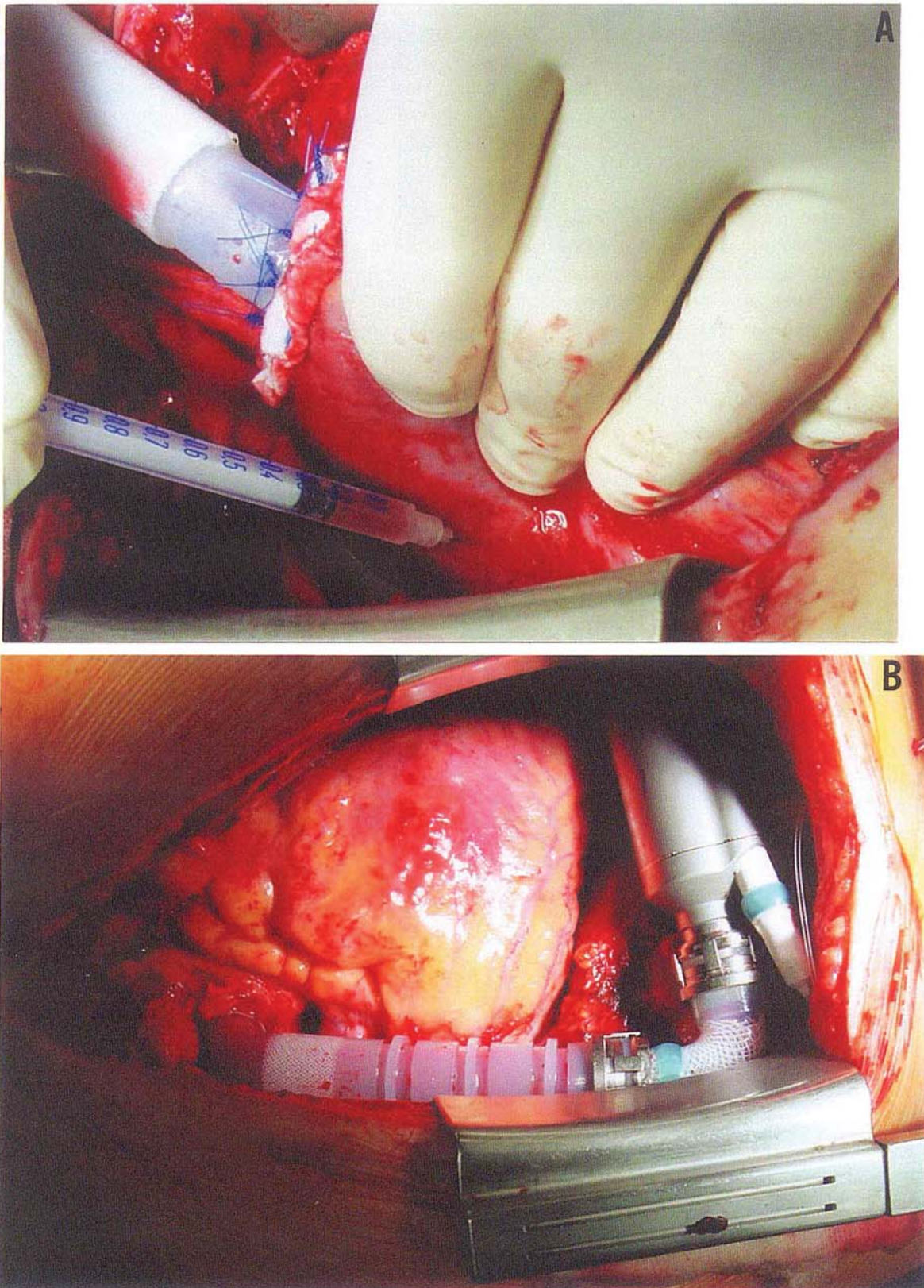


Figure 1. (A) Intramyocardial injection of bone marrow mononuclear cells at the time of implantation of a left ventricular assist device (LVAD). (B) Here a Berlin Heart Incor LVAD was implanted. It produces nonpulsatile blood flow, and only a power line penetrates the skin. In other patients, the Berlin Heart Excor pneumatic assist device was used. There, the pump chamber is placed outside the body, and the inflow and outflow cannulae penetrate the skin.

lin, Germany), the cannulas were guided through the skin below the ribcage, and were connected with a pneumatically driven pump chamber. When an implantable LVAD was used, the cannulas were connected with a turbine-driven continuous flow pump that was placed within the chest (Berlin Heart INCOR). Then 24 injections of cell suspension were distributed all over the accessible free wall of the left ventricle. Initially, 24 separate syringes with 0.3 ml cell suspension each were used. Later, the cell product was loaded in eight syringes per 1 ml. Once the procedure was completed, patients were brought to the ICU and transferred to the normal ward when hemodynamics and hemostasis had stabilized. Particular care was taken to monitor right ventricular function, and pharmacologic therapy including nitric oxide inhalation was used liberally whenever impaired right heart output was suspected.

Echocardiography

Echocardiography was performed before the operation and on a daily basis during the ICU stay, followed by weekly examinations until discharge. Studies were done using a Vivid Seven digital ultrasound system (General Electrics, Horton, Norway). Left ventricular ejection fraction was determined by manual tracing of end-systolic and end-diastolic endocardial borders using four-chamber (4Ch) and two-chamber (2Ch) views, employing biplane Simpson's method. Left ventricular end-diastolic (LVEDD) and end-systolic (LVESD) diameter were measured on M-mode echocardiograms using standard techniques, and the shortening fraction was calculated accordingly. In addition, geometric parameters such as left ventricular inner diastolic diameter (LVIDd), short to long axis ratio, sphericity index, and changes in regional myocardial deformation using radial strain measurements were assessed when the possibility of weaning from LVAD support was seriously considered (15).

In every patient, a "pump-stop" echocardiogram was performed 2 months after LVAD implantation to evaluate the recovery of left ventricular function, both at rest and under dobutamine stress. Here, LVAD support was incrementally reduced under continuous echocardiographic and hemodynamic monitoring. If possible, LVAD support was turned off for approximately 30 min, and LV as well as RV function and dimensions were recorded. To assess the possibility of successful permanent weaning off LVAD support, we used an algorithm that is mainly based on echocardiographic criteria such as left ventricular ejection fraction and left ventricular end-diastolic diameter (6). When a patient is considered suitable for LVAD weaning and repeated pump-stop echos have produced similar results, he is taken to the operating room for device explantation. If LVAD wean-

ing is not possible, patients are placed on the waiting list for heart transplantation, which is performed as soon as an organ becomes available. The waiting time to transplantation for a patient depends on the listing status (transplantable, urgent, or high urgent) and can range between a few months and several years.

Histology

At the time of LVAD implantation, LV myocardium samples were obtained from the apical cannulation site, fixed in formalin, embedded in paraffin, and sectioned for histologic analysis. In four patients, tissue was available during follow-up, at the time of device explantation or heart transplantation, respectively. Sections were routinely stained by hematoxylin & eosin and studied by light microscopy. To assess the degree of compensatory cardiomyocyte hypertrophy, the diameter of cross-sectioned individual cardiomyocytes was measured, and the average cardiomyocyte diameter was calculated for each patient. Moreover, myocardial fibrosis was quantified following Sirius red staining of tissue sections. Images were digitalized, and a customized software was used to quantify the amount of interstitial collagen deposition in a defined area of 1 mm².

Statistics

Data are expressed as mean and SD or as median and range when appropriate. Serial quantitative echocardiography and histology data were compared by paired *t*-test. Intergroup comparisons were not performed in this pilot study.

RESULTS

Cell Product

All cell products met the release criteria in terms of bacterial contamination, viability, and stem cell content. Serologic studies indicated previous cytomegalovirus infection in one patient and Epstein Barr virus persistence in another. These were not considered exclusion criteria and had no impact on patient survival. The median total nucleated cell count in the crude marrow preparation was 128×10^7 (range $52\text{--}164 \times 10^7$), and the median mononuclear cell count in the final product was 20×10^7 (range $14\text{--}47 \times 10^7$). Of those, 3.2×10^6 (range $1\text{--}12 \times 10^6$) cells were CD34⁺ by FACS analysis. There was no apparent association between the total or CD34⁺ cell count and the patients' age or severity of disease.

Surgery

LVAD implantation was carried out as planned in nine patients. In one patient (patient number 4 in Table 1), it turned out that, despite maximum inotropic support and afterload reduction, the right ventricle was not able to maintain sufficient output after implantation of the

LVAD, so that an additional right ventricular assist device was implanted (biventricular assist device, BVAD). All patients survived the surgical procedure and received inotrope infusion for support of right ventricular function and regulation of peripheral blood pressure. Inotropic support could be discontinued after an average of 3 days (range 0–6 days). Patients were weaned off mechanical ventilation after a median of 3 days, ranging from 0 to 14 days. The average ICU stay was 15 days, ranging from 3 to 30 days. In eight patients, no major complications (i.e., thrombembolism, cerebral infarction, hemorrhage, or device-related infections) occurred during postoperative follow-up. Two patients, however, suffered serious complications in terms of pneumonia and/or wound/device infection. Despite maximum antibiotic therapy, the infection could not be eliminated or contained, and both patients died from multiorgan failure on postoperative day 24 or 104, respectively.

Heart Function

The key echocardiographic left ventricular function data before the operation and at 2 months follow-up are summarized in Figure 2 and Figure 3. Two months after LVAD implantation, pump-stop echocardiography was performed under full anticoagulation. Overall, the median LVEF had minimally increased from 18.1% (range 11–24%) to 22.3% (range 8–56%, $p = 0.3$). The average LVEDD had decreased from 78 ± 10 mm to 65 ± 12 mm ($p = 0.02$). LVESD had decreased from 70 ± 11 mm to 59 ± 13 mm ($p = 0.05$), and the shortening fraction had slightly increased from $9 \pm 2\%$ to $12 \pm 8\%$ ($p = 0.2$).

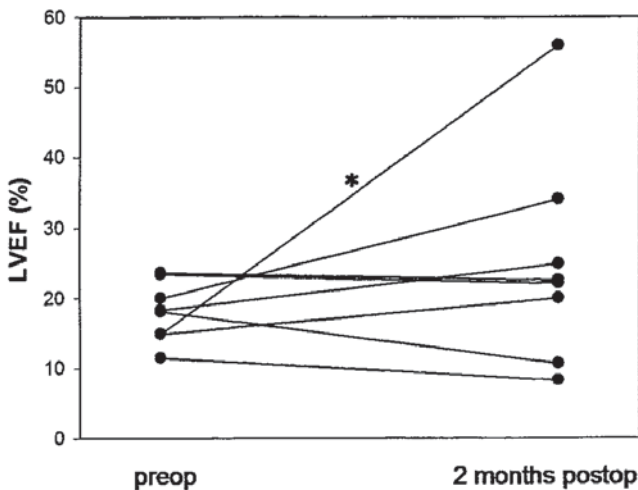


Figure 2. Left ventricular ejection fraction (LVEF) as a standard measure of global left ventricular contractility in eight surviving patients. Data were obtained by echocardiography before the operation (preop), and 2 months after LVAD implantation during a brief period of pump-stop (2 months postop). The asterisk indicates the data of the one patient who could be successfully weaned off LVAD support.

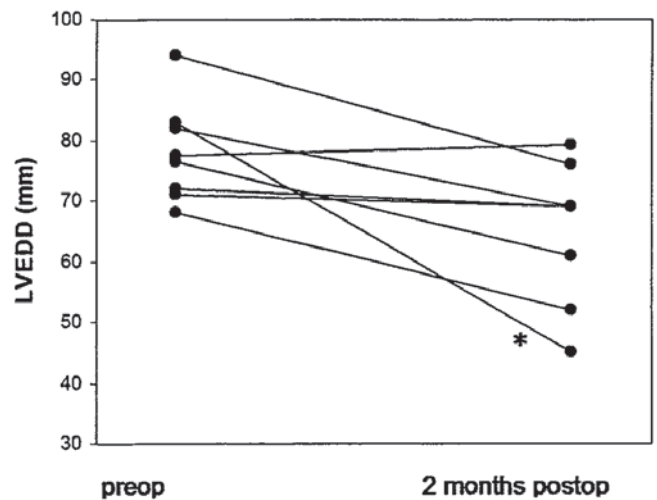


Figure 3. Left ventricular enddiastolic diameter (LVEDD) indicating the dimension of the failing and dilated left ventricle. In our experience, LVEDD is of paramount importance for assessing the recovery of heart function during LVAD support, and the data are used in our algorithm to identify LVAD patients who can be weaned successfully. Data were obtained by echocardiography before the operation (preop) and 2 months after LVAD implantation during a brief period of pump-stop. The asterisk indicates the data of the one patients who could be successfully weaned off LVAD support.

In seven of the eight surviving patients, however, left ventricular contractility and dimensions during pump-stop echocardiography did not meet the criteria that indicate suitability for successful weaning off LVAD support. In three of those, heart transplantation was performed after 84, 221, and 305 days on LVAD support, respectively. All three patients survived the transplantation procedure and were discharged home. At present, four patients are still on LVAD support, for 335, 336, 441, and 568 days, respectively. In all of them, repeated pump-stop echocardiograms showed no sign of recovery of LV function. Having been on LVAD support for at least 10 months without change in LV function, no recovery is expected anymore. All four patients are listed for heart transplantation, which will be carried out as soon as a matching organ becomes available.

Only one patient, the 14-year-old boy who was referred to us in cardiogenic shock on short-term extracorporeal support, met the LVAD weaning criteria during the 2-month pump-stop echocardiography study. Two further pump-stop echocardiograms were performed on a monthly basis in this patient, and the sustained changes in left ventricular geometry and regional deformation confirmed positive reverse remodeling with the possibility of LVAD weaning. Four months after bone marrow cell application and complete left ventricular unloading with the Berlin Heart EXCOR, the LVAD was explanted. The patient recovered well from the ex-

plantation procedure and was extubated on postoperative day 1. Medical treatment was continued with ACE inhibitors and diuretics, and 4 months after LVAD explantation the patient presented with near normal left ventricular geometry and a further improvement in regional function. At present, his follow-up covers 2 years and has been uneventful.

Histology

In four patients, post-cell therapy myocardial tissue samples could be compared with those obtained prior to cell injection and LVAD implantation. Because the autologous cells were not labeled, it was not possible to determine the fate of the injected marrow cells or their progeny. The data on cardiomyocyte diameter and interstitial collagen deposition are summarized in Figure 4. Interestingly, the only patient in whom an increase in cardiomyocyte diameter indicated hypertrophic myocyte growth was the one who could be successfully weaned off LVAD support (from 15 to 20 μm). In two other cases, cardiomyocyte diameter markedly decreased (from 26 to 15 μm , and from 23 to 11 μm , respectively), intuitively consistent with the concept of reducing the work load of the heart. Cardiomyocyte diameter remained unchanged in the fourth patient. The data on myocardial fibrosis are equally puzzling. Again, only the patient who could eventually be weaned showed a marked increase in interstitial collagen deposition (from 6 to 19 arbitrary units). In the other patients, interstitial collagen content remained largely unchanged.

DISCUSSION

In this pilot study we tested the hypothesis that autologous bone marrow mononuclear cells injected directly into the myocardium of patients with end-stage heart failure can increase the likelihood of weaning from LVAD support. This hypothesis was not confirmed. Only 1 out of 10 patients was successfully weaned, and this patient was a) the youngest of our cohort, and b) had probably postinflammatory heart failure with acute decompensation. Considering the available data on patients weaned from VAD support as well as our clinical experience, this patient had a reasonable chance to recover even without cell therapy. In the other nine patients, the clinical course, ultimately leading to heart transplantation, was not perceptibly altered by the cell injection.

To collect more solid scientific data, a controlled prospective study would obviously be necessary. This is not impossible, but would involve tremendous logistic and ethical burdens in this rare cohort of extremely sick patients. It has been known for some time that weaning from LVAD support is feasible in selected patients with myocarditis or idiopathic dilative cardiomyopathy (7,

10). Long-term results in these patients have been satisfactory for up to 9 years of follow-up after explantation (5). Occasionally, there is also a patient with end-stage ischemic heart disease and a history of multiple myocardial infarctions who recovers during LVAD support, although this is exceedingly rare. The mechanisms of myocardial recovery remain elusive. Adjuvant therapies, including immunoabsorption, pharmacologic heart failure treatment, and administration of antioxidants and microelements (19) or clenbuterol (2) during LVAD support, have been used to promote cardiac recovery during ventricular unloading. In heart failure, myocytes are damaged and cellular as well as extracellular tissue components are deharmonized, leading to functional and structural remodeling. First and foremost, rapid LVAD implantation ensures survival of the patient. Secondly, unloading of the heart enables the myocardium to recover without further damage to tissue components and to achieve reverse remodeling. Because dead cardiomyocytes cannot be replaced by new cardiomyocytes—unless cell therapy would induce a net increase in cardiomyocyte number—repair will hypothetically be performed through moderate symmetrical hypertrophy of the myocytes and by filling the intercellular spaces with extracellular matrix. A picture such as this was indeed observed in our one “successful” patient. Such “reverse ventricular remodeling” has been demonstrated during routine LVAD support before, especially with regard to geometry, function, cytokine levels, collagen content, and myocyte size (9,17,27,28). To what extent the observed histologic changes in our weaned patient might have been induced by the cell injection remains unclear. The histologic findings are particularly surprising because an increase in myocardial fibrosis is believed to indicate disease progression (3). It has indeed been suggested that bone marrow-derived cells can modulate extracellular matrix turnover in the heart and thereby improve its function (8), but it is not clear whether a net increase in interstitial fibrosis in the clinical setting is beneficial or deleterious.

Cell therapy for heart disease has a brief but eventful history (25). The large-scale clinical introduction of skeletal myoblasts for heart failure patients seems to have been abandoned, but data obtained in patients with LVAD devices gave valuable insight into the behavior of those cells in human myocardium (21). More promising evidence came from studies that used enriched bone marrow stem cell products in cardiac surgical patients (12,22,24,26). Here, a significant additional gain in contractile function was noted by independent groups, and multicenter, phase III analogous studies are currently being conducted. Because of their ease of manufacturing and relative inexpensiveness, autologous bone marrow mononuclear cells have been used in the by far largest

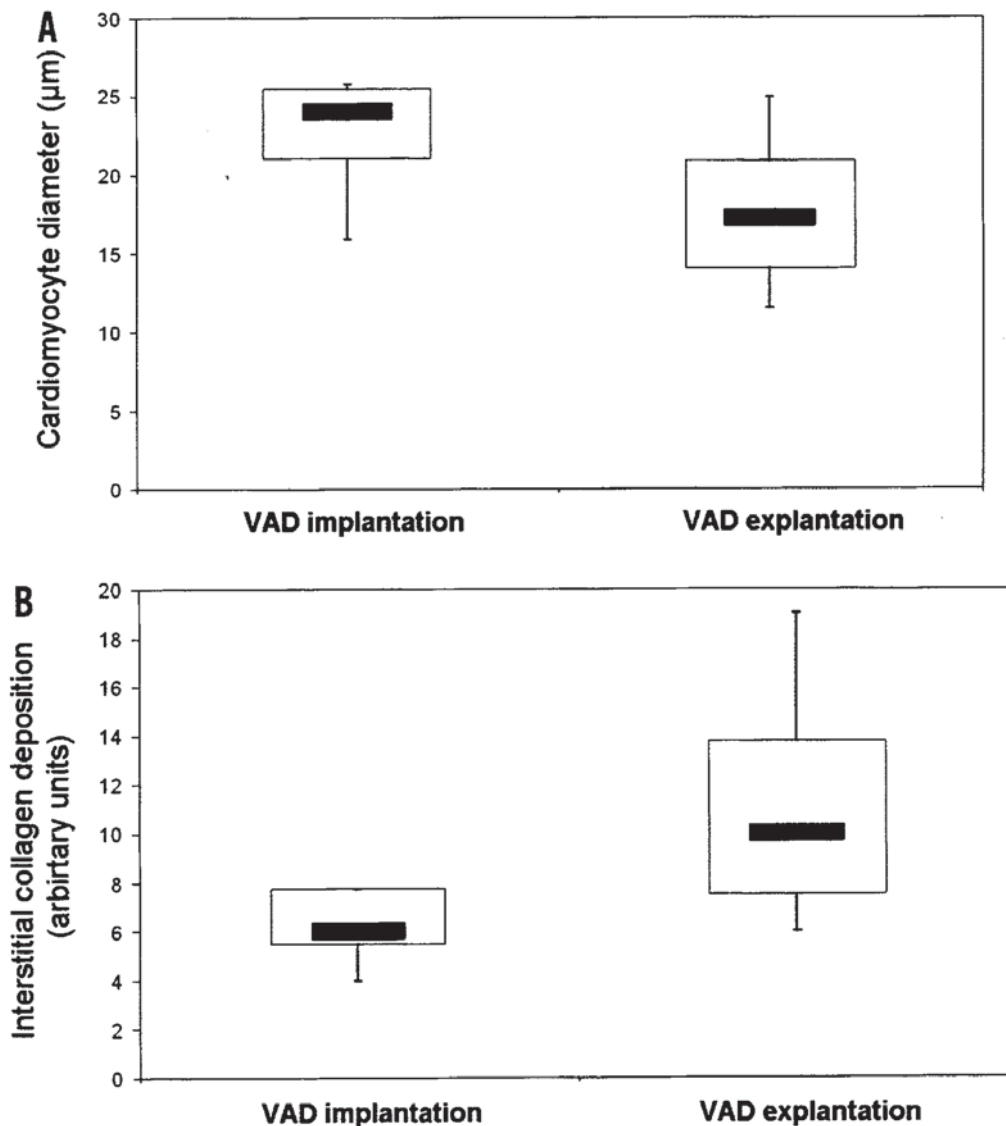


Figure 4. Histologic analysis of left ventricular myocardium at the time of LVAD implantation (VAD implantation) and at heart transplantation or LVAD explantation (VAD explantation), respectively. The boxplots show median (solid bar), interquartile range (open box), minimum and maximum value (whiskers). (A) Overall, cardiomyocyte diameter tended to decrease during LAVD support, reflecting the reduced work load of the myocardium during LVAD support, whereas it clearly increased on the one patient who could be weaned. Cardiomyocyte diameter was measured on H&E-stained sections by computerized morphometry. (B) Interstitial fibrosis (collagen content) tended to increase during LVAD support. This phenomenon was particularly pronounced in the one patient who could be successfully weaned off LVAD support. The y-axis indicates arbitrary unit derived from computerized color-coded image analysis. The pathophysiologic relevance of these data, and how they may have been influenced by the bone marrow cell injection, remains unclear.

number of patients with ischemic heart disease and acute myocardial infarction (1,23). While their proangiogenic capacity in solid organs is undisputed, the resulting clinical benefit proved difficult to determine. One intrinsic problem is that most of those studies include many patients with only moderately impaired heart function and thus little or no clinical symptoms and good prognosis

with standard treatment. The net "healing" capacity of BMC is therefore difficult to determine. In keeping with the overall restraint view of bone marrow mononuclear cells for cardiac regenerative medicine, we found that such cell products do not visibly change the course of patients with end-stage heart disease. Although this notion is based on a small-scale pilot study, it may serve

as a rationale for development and clinical testing of more elaborate—and hopefully more efficient—cell products. We are currently collecting experience with CD133⁺ bone marrow cells as well as with ex vivo expanded endothelial progenitor cells in LVAD patients, and other groups have begun to use allogenic or autologous mesenchymal stem cell-type cell products in similar trials. For each of those cell products, there is supporting evidence from preclinical experimental studies, but provisional translation into the clinical setting is hampered by many obstacles. In addition to the tremendous regulatory demands, issues such as free access to GMP-grade cell isolation and expansion facilities, or discrepancies in the timing of cell production and surgery are often problematic for cardiac surgeons and cardiologists. Progress of the field will therefore most likely be slow.

We conclude that autologous bone marrow mononuclear cell injection in the heart does not visibly change the clinical course of patients with end-stage heart failure who have to undergo assist device implantation. This finding must not be interpreted as further evidence against the concept of cardiac cell therapy, but should encourage the preclinical development and proper clinical testing of other, more potent, cell products. The expectations of often desperate patients suffering from advanced chronic disease are high when it comes to highly publicized developments such as cell-based regenerative medicine. In this context, even a study with a “negative” outcome helps to lift the discussion among colleagues and with patients on a more solid scientific foundation.

REFERENCES

- Assmus, B.; Honold, J.; Schachinger, V.; Britten, M. B.; Fischer-Rasokat, U.; Lehmann, R.; Teupe, C.; Pistorius, K.; Martin, H.; Abolmaali, N. D.; Tonn, T.; Dimmeler, S.; Zeiher, A. M. Transcatheter transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 355: 1222–1232; 2006.
- Birks, E. J.; Tansley, P. D.; Hardy, J.; George, R. S.; Bowles, C. T.; Burke, M.; Banner, N. R.; Khaghani, A.; Yacoub, M. H. Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. *N. Engl. J. Med.* 355:1873–1884; 2006.
- Bruckner, B. A.; Stetson, S. J.; Perez-Verdia, A.; Youker, K. A.; Radovancevic, B.; Connelly, J. H.; Koerner, M. M.; Entman, M. E.; Frazier, O. H.; Noon, G. P.; Torre-Amione, G. Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support. *J. Heart Lung Transplant.* 20:457–464; 2001.
- Chen, J. M.; Naka, Y.; Rose, E. A. The future of left ventricular assist device therapy in adults. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3:346–347; 2006.
- Dandel, M.; Weng, Y.; Siniawski, H.; Potapov, E.; Lehmkühl, H. B.; Hetzer, R. Long-term results in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy after weaning from left ventricular assist devices. *Circulation* 112:137–145; 2005.
- Drakos, S. G.; Charitos, E. I.; Nanas, S. N.; Nanas, J. N. Ventricular-assist devices for the treatment of chronic heart failure. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 5:571–584; 2007.
- Farrar, D. J.; Holman, W. R.; McBride, L. R.; Kormos, R. L.; Icenogle, T. B.; Hendry, P. J.; Moore, C. H.; Loisanche, D. Y.; El-Banayosy, A.; Frazier, H. Long-term follow-up of thoratec ventricular assist device bridge-to-recovery patients successfully removed from support after recovery of ventricular function. *J. Heart Lung Transplant.* 21:516–521; 2002.
- Fedak, P. W.; Szmítko, P. E.; Weisel, R. D.; Altamentova, S. M.; Nili, N.; Ohno, N.; Verma, S.; Fazel, S.; Strauss, B. H.; Li, R. K. Cell transplantation preserves matrix homeostasis: A novel paracrine mechanism. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130:1430–1439; 2005.
- Goldstein, D. J.; Moazami, N.; Seldomridge, J. A.; Laio, H.; Ashton, Jr., R. C.; Naka, Y.; Pinsky, D. J.; Oz, M. C. Circulatory resuscitation with left ventricular assist device support reduces interleukins 6 and 8 levels. *Ann. Thorac. Surg.* 63:971–974; 1997.
- Hetzer, R.; Müller, J. H.; Weng, Y.; Meyer, R.; Dandel, M. Bridging-to-recovery. *Ann. Thorac. Surg.* 71:S109–113; 2001.
- Hetzer, R.; Stiller, B. Technology insight: Use of ventricular assist devices in children. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3:377–386; 2006.
- Klein, H. M.; Ghodsizad, A.; Marktanner, R.; Poll, L.; Voelkel, T.; Mohammad Hasani, M. R.; Piechaczek, C.; Feifel, N.; Stocksclaeder, M.; Burchardt, E. R.; Kar, B. J.; Gregoric, I.; Gams, E. Intramyocardial implantation of CD133⁺ stem cells improved cardiac function without bypass surgery. *Heart Surg. Forum* 10:E66–E69; 2007.
- Kocher, A. A.; Schuster, M. D.; Szabolcs, M. J.; Takuma, S.; Burkhoff, D.; Wang, J.; Homma, S.; Edwards, N. M.; Itescu, S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* 7:430–436; 2001.
- Kormos, R. L.; Gasior, T. A.; Kawai, A.; Pham, S. M.; Murali, S.; Hattler, B. G.; Griffith, B. P. Transplant candidate's clinical status rather than right ventricular function defines need for univentricular vs. biventricular support. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 111:773–783; 1996.
- Leitman, M.; Lysyansky, P.; Sidenko, S.; Shir, V.; Peleg, E.; Binenbaum, M.; Kaluski, E.; Krakover, R.; Vered, Z. Two-dimensional strain—a novel software for real-time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function. *J. Am. Soc. Echocardiogr.* 17:1021–1029; 2004.
- Li, W.; Ma, N.; Ong, L. L.; Nesselmann, C.; Klopsch, C.; Ladilov, Y.; Furlani, D.; Piechaczek, C.; Moebius, J. M.; Lützwow, K.; Lendlein, A.; Stamm, C.; Li, R. K.; Steinhoff, G. Bcl-2 engineered MSCs inhibited apoptosis and improved heart function. *Stem Cells* 25:2118–2127; 2007.
- Liang, H.; Müller, J.; Weng, Y. G.; Wallukat, G.; Fu, P.; Lin, H. S.; Bartel, S.; Knosalla, C.; Pregla, R.; Hetzer, R. Changes in myocardial collagen content before and after left ventricular assist device application in dilated cardiomyopathy. *Chin. Med. J. (Engl.)* 117:401–407; 2004.
- Ma, N.; Ladilov, Y.; Moebius, J. M.; Ong, L.; Piechaczek, C.; David, A.; Kaminski, A.; Choi, Y. H.; Li, W.; Egger, D.; Stamm, C.; Steinhoff, G. Intramyocardial delivery of human CD133⁺ cells in a SCID mouse cryoinjury model: Bone marrow vs. cord blood-derived cells. *Cardiovasc. Res.* 71:158–169; 2006.
- Müller, J.; Wallukat, G.; Dandel, M.; Bieda, H.; Brandes, K.; Spiegelsberger, S.; Nissen, E.; Kunze, R.; Hetzer, R. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 101:385–391; 2000.
- Murry, C. E.; Soonpaa, M. H.; Reinecke, H.; Nakajima,

- H.; Nakajima, H. O.; Rubart, M.; Pasumarthi, K. B.; Virag, J. I.; Bartelmez, S. H.; Poppa, V.; Bradford, G.; Dowell, J. D.; Williams, D. A.; Field, L. J. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428:664–668; 2004.
21. Pagani, F. D.; DerSimonian, H.; Zawadzka, A.; Wetzel, K.; Edge, A. S.; Jacoby, D. B.; Dinsmore, J. H.; Wright, S.; Aretz, T. H.; Eisen, H. J.; Aaronson, K. D. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 41:879–888; 2003.
 22. Patel, A. N.; Geffner, L.; Vina, R. F.; Saslavsky, J.; Urschel, Jr., H. C.; Kormos, R.; Benetti, F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: A prospective randomized study. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 130:1631–1638; 2005.
 23. Schachinger, V.; Erbs, S.; Elsasser, A.; Haberbosch, W.; Hambrecht, R.; Holschermann, H.; Yu, J.; Corti, R.; Mathey, D. G.; Hamm, C. W.; Suselbeck, T.; Assmus, B.; Tonn, T.; Dimmeler, S.; Zeiher, A. M. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 355:1210–1221; 2006.
 24. Stamm, C.; Kleine, H. D.; Choi, Y. H.; Dunkelmann, S.; Lauffs, J. A.; Lorenzen, B.; David, A.; Liebold, A.; Nienaber, C.; Zurakowski, D.; Freund, M.; Steinhoff, G. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and CABG surgery for chronic ischemic heart failure: Safety and efficacy studies. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 133:717–725; 2007.
 25. Stamm, C.; Liebold, A.; Steinhoff, G.; Strunk, D. Stem cell therapy for ischemic heart disease: Beginning or end of the road? *Cell Transplant.* 15(Suppl. 1):47–56; 2006.
 26. Stamm, C.; Westphal, B.; Kleine, H. D.; Petzsch, M.; Kittner, C.; Klinge, H.; Schumichen, C.; Nienaber, C. A.; Freund, M.; Steinhoff, G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361:45–46; 2003.
 27. Thompson, L. O.; Skrabal, C. A.; Loebe, M.; Lafuente, J. A.; Roberts, R. R.; Akgul, A.; Jones, V.; Bruckner, B. A.; Thohan, V.; Noon, G. P.; Youker, K. A. Plasma neurohormone levels correlate with left ventricular functional and morphological improvement in LVAD patients. *J. Surg. Res.* 123:25–32; 2005.
 28. Torre-Amione, G.; Stetson, S. J.; Youker, K. A.; Durand, J. B.; Radovancevic, B.; Delgado, R. M.; Frazier, O. H.; Entman, M. L.; Noon, G. P. Decreased expression of tumor necrosis factor- α in failing human myocardium after mechanical circulatory support: A potential mechanism for cardiac recovery. *Circulation* 100:1189–1193; 1999.

Autologous CD133⁺ bone marrow cells and bypass grafting for regeneration of ischaemic myocardium: the Cardio133 trial[†]

Boris A. Nasser¹, Wolfram Ebell², Michael Dandel¹, Marian Kukucka³, Rolf Gebker⁴, Adelina Doltra⁴, Christoph Knosalla¹, Yeong-Hoon Choi⁵, Roland Hetzer¹, and Christof Stamm^{1,5*}

¹Department of Cardiothoracic and Vascular Surgery, Deutsches Herzzentrum Berlin, Augustenburger Platz 1, Berlin 13353, Germany; ²Pediatric Bone Marrow Transplant Program, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Berlin 10117, Germany; ³Department of Anesthesiology, Deutsches Herzzentrum Berlin, Berlin 13353, Germany; ⁴Department of Internal Medicine/Cardiology, Deutsches Herzzentrum Berlin, Berlin 13353, Germany; and ⁵Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies, Berlin 13353, Germany

Received 5 July 2013; revised 19 December 2013; accepted 9 January 2014; online publish-ahead-of-print 3 February 2014

See page 1231 for the editorial comment on this article (doi:10.1093/eurheartj/ehu117)

Aims

Intra-myocardial transplantation of CD133⁺ bone marrow stem cells (BMC) yielded promising results in clinical pilot trials. We now performed the double-blinded, randomized, placebo-controlled CARDIO133 trial to determine its impact on left ventricular (LV) function and clinical symptoms.

Methods and results

Sixty patients with chronic ischaemic heart disease and impaired LV function (left ventricular ejection fraction, LVEF < 35%) were randomized to undergo either coronary artery bypass grafting (CABG) and injection of CD133⁺ BMC in the non-transmural, hypokinetic infarct border zone (CD133), or CABG and placebo injection (placebo). Pre-operative LVEF was 27 ± 6% in CD133 patients and 26 ± 6% in placebo patients. Outcome was assessed after 6 months, and the primary endpoint was LVEF measured by cardiac magnetic resonance imaging (MRI) at rest. The incidence of adverse events was similar in both groups. There was no difference in 6-min walking distance, Minnesota Living with Heart Failure score, or Canadian Cardiovascular Society (CCS) class between groups at follow-up, and New York Heart Association class improved more in the placebo group ($P = 0.004$). By cardiac MRI, LVEF at 6 months was 33 ± 8% in the placebo group and 31 ± 7% in verum patients ($P = 0.3$), with an average inter-group difference of -2.1% (95% CI -6.3 to 2.1). Systolic or diastolic LV dimensions at 6 months were not different, either. In the CD133 group, myocardial perfusion at rest recovered in more LV segments than in the placebo group (9 vs. 2%, $P < 0.001$). Scar mass decreased by 2.2 ± 5 g in CD133⁺ patients ($P = 0.05$), but was unchanged in the placebo group (0.3 ± 4 g, $P = 0.7$; inter-group difference in change = 2 g (95% CI -1.1 to 5)). By speckle-tracking echocardiography, cell-treated patients showed a better recovery of regional wall motion when the target area was posterior.

Conclusion

Although there may be some improvements in scar size and regional perfusion, intra-myocardial injection of CD133⁺ BMC has no effect on global LV function and clinical symptoms. Improvements in regional myocardial function are only detectable in patients with posterior infarction, probably because the interventricular septum after anterior infarction is not accessible by trans-epicardial injection.

Clinical Trial Registration

This trial was registered at <http://www.clinicaltrials.gov> under NCT00462774.

Keywords

Infarction • Ischaemic heart disease • Impaired LV function • Bypass • Cells

[†]The abstract was presented at the American College of Cardiology 61st Annual Scientific Session and ACC-i2 with TCT, 24–27 March 2012 in Chicago, IL, USA and received an award as the 'highest ranking abstract that was received from Germany'

* Corresponding author. Tel: +49 30 4593 2109, Fax: +49 30 4593 2100, Email: stamm@dhzb.de

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2014. For permissions please email: journals.permissions@oup.com

Introduction

Chronic ischaemic heart disease with deteriorating left ventricular (LV) function remains an essentially incurable disease, and the only definitive treatment options, heart transplantation or mechanical assist device implantation, have significant intrinsic morbidity. Induced regeneration of the failing heart by transplantation of cells has been intensively studied since the 1990s. Numerous publications describe beneficial effects of cells from various sources in animal models of heart disease,^{1–3} but clinical trials have so far produced inconsistent results.⁴ In patients with acute myocardial infarction, intra-coronary delivery of autologous bone marrow (BM) cells has been shown to result in improvements of LV function and clinical symptoms including mortality,^{5–7} but much less information is available on the outcome of cell transplantation in chronic ischaemic heart disease.^{8–13} A number of groups have focused on intra-myocardial injection of CD133⁺ BM progenitor cells in patients undergoing surgical re-vascularization.^{14,15} After determining feasibility and safety of the approach, a significant benefit of coronary artery bypass grafting (CABG) combined with CD133⁺ cell transplantation over CABG alone was detected in a previous clinical trial.^{16,17} However, that study was not blinded, not placebo-controlled, and not completely randomized. We therefore decided to conduct a similar trial at our institution in a strictly randomized, placebo-controlled, and double-blinded fashion.

Methods

The study protocol conforms to the ethical principles contained in the Declaration of Helsinki and was approved by the institutional review board and ethics committee of the Charité Medical University. All patients provided written, informed consent for all of the study-related procedures including the BM aspiration, and the trial was listed at <http://clinicaltrials.gov> (NCT00462774). The main inclusion criteria were as follows: (i) coronary artery disease with indication for CABG surgery; (ii) reduced global left ventricular ejection fraction (LVEF) by transthoracic echocardiography at rest (LVEF \leq 35%); (iii) presence of akinetic or hypokinetic and hypoperfused LV myocardium on magnetic resonance imaging (MRI) for defining the target area. Exclusion criteria included the need for emergency operation, acute myocardial infarction ($<$ 14 days), presence of valve disease requiring concomitant valve surgery, contraindication for MRI (pacemaker or implantable cardioverter-defibrillator implanted), history of ventricular arrhythmia (\geq Lown III), and debilitating other diseases. Patients scheduled for CABG surgery were screened based on pre-admission history and in-house test results. If LVEF of $<$ 35% was reported, informed consent was obtained and cardiac MRI was performed. Upon confirmation of LVEF $<$ 35% by MRI, all patients underwent bone marrow aspiration, and the marrow was taken to the cell production facility. Group allocation was then performed according to a pre-defined, non-blockwise 1:1 randomization plan that was accessible only to the external cell processing team (W.E.), which prepared either the CD133 cell product or placebo solution. Both contained autologous patient serum and were directly filled in the 1 mL syringes to be used for injection. The syringes were packed in containers labelled with the patient identification number and brought to the operating room at DHZB. Therefore, the patient, the surgical team, and all investigators performing diagnostic tests were unaware of the therapy assignment of a given patient. On the following day, patients were taken to the operating room and CABG surgery as well as delivery

of the investigational product or placebo was performed. The primary endpoint of the CARDIO133 trial was LVEF at rest, measured 6 months post-operatively by cardiac MRI in patients who received CD133 cells and those who received placebo. Pre-specified secondary outcome parameters were the following: change in LVEF compared with pre-operatively; regional contractility in the area of interest (AOI); physical exercise capacity determined by 6-min walk test; perfusion in the AOI, change in LV dimensions; New York Heart Association (NYHA) and Canadian Cardiovascular Society (CCS) class; Minnesota Living with Heart Failure Score; death, myocardial infarction, or need for re-intervention during follow-up. Infarct scar size was analysed *post hoc*. Study visits were scheduled before surgery, at the time of discharge to cardiac rehabilitation, and at 3 and 6 months post-operatively. Cardiac MRI was done before surgery and at 6-month follow-up, and echocardiography at all visits. Because of poor image quality, the echocardiography data obtained at the time of discharge were not analysed. The Consort flow chart is given in Figure 1.

Bone marrow aspiration

All patients underwent BM aspiration from the left posterior iliac crest with local anaesthesia and analgesia. An average BM volume of 196 ± 28 mL was harvested and diluted with 20 mL saline solution containing 1000 U Heparin.

CD133⁺ cell sorting and placebo production

For the CD133 group, the BM solution was filtered, transferred into a plastic bag, washed with PBS/EDTA solution containing 0.5% human serum albumin. This cell suspension was incubated with human IgG 5% as blocking reagent, labelled with 7.5 mL reconstituted CD133 MicroBeads[®], murine anti-human CD133 monoclonal antibodies conjugated to superparamagnetic iron dextran particles (Miltenyi Biotec). Then, CD133⁺ cells were separated using the CliniMACS[®] Magnetic Separation device (Miltenyi Biotec).¹⁸ The enriched cell fraction was reconstituted with 13 mL saline containing 10% autologous serum. Samples were drawn for cell numbers, purity, viability, and proof of sterility. Finally, cells were aliquoted into 1 mL syringes and stored at 4°C without heparin. For quality control, flow cytometry assessment was done using a FACSCalibur[™] flow cytometer (BD Biosciences) (Table 1). For the placebo group, 1 mL syringes were filled with isotonic NaCl solution containing 10% autologous serum. For the surgical team, syringes filled with CD133 cells or placebo were indistinguishable.

Surgery

Within 36 h after BM aspiration, CABG surgery was performed. On cardio-pulmonary bypass, the ascending aorta was cross-clamped, and the heart was arrested with warm blood cardioplegia. Re-vascularization was performed in all patients using left mammary artery for anastomosis with the left anterior descending coronary artery (LAD) or dominant diagonal branch, and saphenous vein grafts for other coronary arteries. Whenever possible, complete re-vascularization was performed, including bypass grafts to the infarcted AOI which was defined for cell injection, and 3.2 ± 0.5 bypass grafts per patient were implanted. Following completion of the distal anastomoses, the investigational product was injected in the border zone of the pre-defined hypo-kinetic and hypo-perfused infarct area, which was identified by its location according to the 17-segment LV model, visible scarring, and discolouration of the epicardial musculature, and, if possible, by palpation of the thinned myocardium in the centre of the scar. Using a 25G needle, 20 injections per 0.5 mL were distributed in the AOI \sim 1 cm apart. A swab was used to occlude the injection channel for several seconds to minimize reflux of cell suspension. Then, the cross-clamp was released, the proximal anastomoses

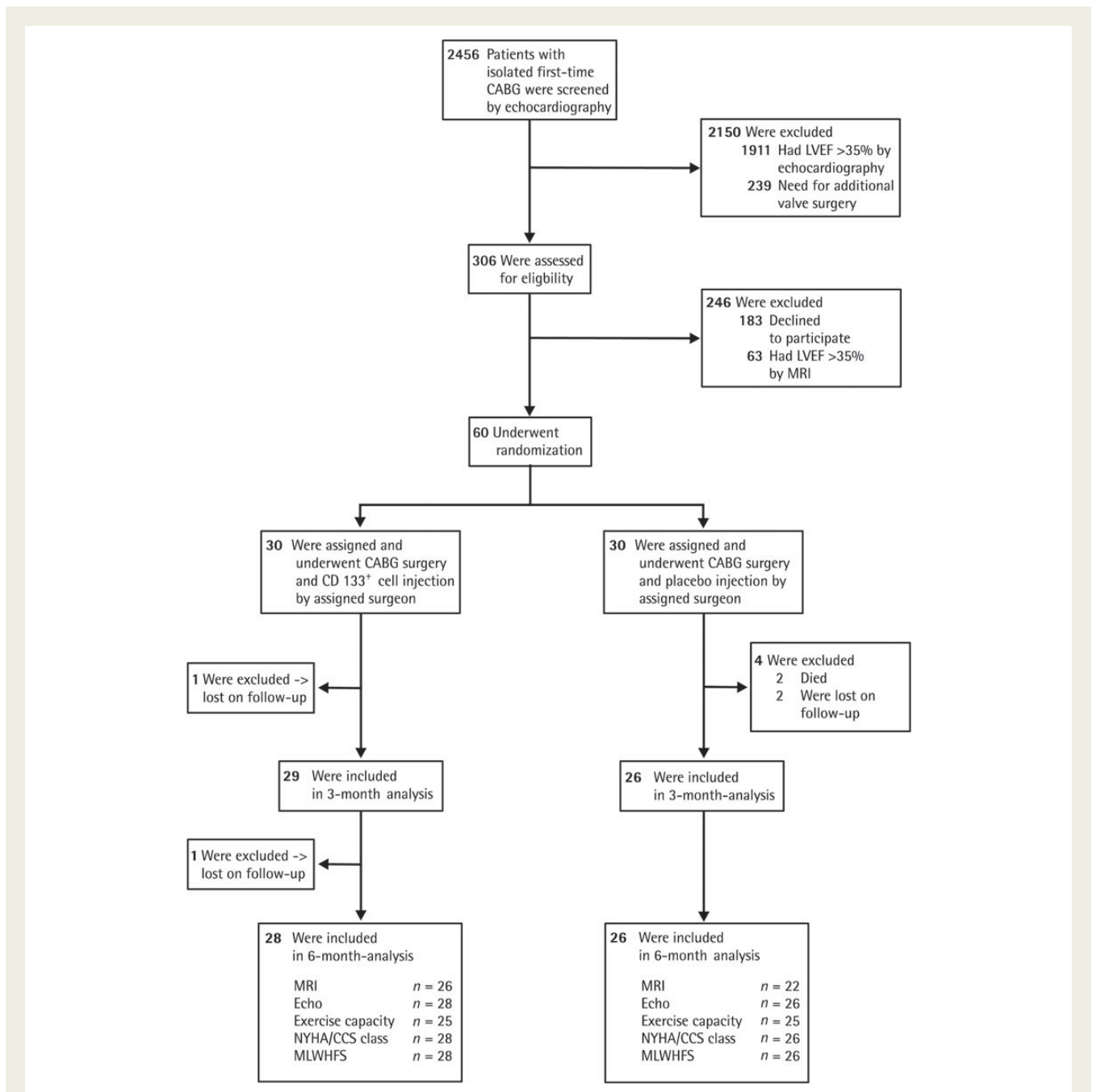


Figure 1 Study design: Consort flow chart of the CARDIO133 trial.

to the ascending aorta were constructed, and the operation was completed as usual.

Magnetic resonance imaging and analysis

A 3-Tesla whole-body MR imaging system (Achieva 3T; Philips) equipped with a Quasar Dual gradient system (80 mT/m, 200 T/m/s slew rate) was used. Cine imaging was performed using balanced steady-state free precession and retrospective gating (40 phases per cardiac cycle) during an end-expiratory breath hold of 10 s (TR/TE/flip = 3/1.5 ms/40°). For comparison of regional contractile behaviour, seven LV regions were defined (apical, anterior, septal, anteroseptal, inferior, lateral, and

posterior), and akinesia was noted on pre- and post-operative cine sequences. Perfusion deficits at rest were determined by Gadolinium first-pass imaging and analysed in the standard 17-segment model. Infarct size was measured by late gadolinium enhancement (LGE). An inversion-prepared 3D-spoiled-gradient-echo sequence (TR/TE/FA = 3.6/1.7 ms/15°, voxel size: 1.5 × 1.7 × 5 mm³) was applied with an individually adapted IR delay (200–250 ms). Left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) and left ventricular end-systolic volume (LVESV) were measured and LVEF was calculated. The myocardial mass of LGE was quantified by an experienced reader blinded to group assignment. A semi-automatic detection method was applied using a signal intensity threshold of >2 SD above a remote reference region.¹⁹

Table 1 Characteristics of the cell product^a

Processing steps	Median	IQR (25–75%)
Volume of initial BM (mL)	190	1–201
Viable CD45 ⁺ cells in initial BM aspirate ($\times 10^8$)	21.5	16–31
CD133 ⁺ cells in the initial BM (%)	0.47	0.34–0.63
CD133 ⁺ cells in the initial BM ($\times 10^6$)	11.7	7.5–14.6
Viable CD45 ⁺ cells in end product ($\times 10^6$)	83.2	72–91.5
CD133 ⁺ cells in the end product (%)	73.6	66.6–81.5
CD133 ⁺ cells in the end product ($\times 10^6$)	5.1	3.0–9.1
CD133 ⁺ recovery in the end product (%)	46.6	35–71.4

^aGiven are the characteristics of the cells administered in the CD133 cell-treated group. Flow cytometry assessment was done from the initial unmanipulated bone marrow as well as the purified CD133⁺ cell product by using a FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences), and a hierarchical gating strategy for CD45⁺/PI⁻/CD133⁺ cells. BM, bone marrow; IQR, inter-quartile range.

Two-dimensional echocardiography

Using a Vivid 7 GE ultrasound system, M-Mode, 2D, and Doppler echocardiography were performed according to ASE guidelines. For myocardial deformation imaging, which has the advantage to reveal alterations in myocardial function with higher sensitivity and allows the differentiation between active and passive regional wall motion, speckle-tracking was performed.¹³ Radial, circumferential, and longitudinal strain and strain rate were calculated from parasternal and apical views, respectively. Off-line analysis was performed using EchoPAC v.7 (GE Vingmed Ultrasound).

Exercise testing

The endpoint of bicycle cardiopulmonary exercise testing was exhaustion, but testing was also terminated in the following circumstances: heart rate 220 beats/min-age, arrhythmia, lack of ventilatory reserve, respiratory exchange rate >1.15, ventilatory equivalent >35, VO₂ increase <150 mL/min⁻¹, or discomfort. VO₂ was monitored continuously, and VO₂ max and ventilation perfusion mismatch (VE/CO₂-slope) were recorded. Exercise capacity was also quantified by 6-min walk test, New York Heart Association (NYHA) Functional CCS grading of angina pectoris.

Quality of life

The Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire was used to systematically assess quality of life before and after surgery. Questions refer to emotions, work, physical and sexual activity, signs and symptoms of heart failure and social relationships.²⁰ Forms were filled by the patient.

Statistics

The cohort size of the CARDIO133 trial was determined based on the available data of the previous study on CABG and CD133⁺ cell therapy, where LVEF rose by 9.7% in the CD133 group and by 3.4% in the control group.¹⁶ Because in the current trial, we modified the inclusion criteria with an upper limit of 35%, we expected an average pre-operative LVEF of ~27–28%. Given a similar increase in LVEF as in the previous study, LVEF at 6 months was assumed to be 31% in the placebo group and 37% in the CD133 group, with a standard deviation

of 7%. Based on the computerized sample size estimation and confirmed by the sample size tables provided by Machin et al.,²¹ 22 patients per group were required to demonstrate the inter-group difference in LVEF with a power (β) of 80% at a two-sided α level of <0.05 in a non-blockwise trial design. Based on our experience with post-operative drop-out rate, we decided to include 60 patients with equal randomization. Categorical data are presented as number (*n*) and percent. For continuous data mean \pm standard deviation or median and range or quartiles (inter-quartile range, IQR) were calculated. Odds ratios with 95% CI are given for relevant data with significant between- or within-group differences. The change between baseline and 6 months and the effect estimates of the difference in scar size and LVEF at 6 months are given as mean and 95% CI. For analysis of global and regional LV function data and their change over time, repeated-measures analysis of variance was performed in a general linear model, with Greenhouse–Geisser test used to assess the effect of time. The primary outcome LVEF (%) by MRI was also analysed by ANCOVA with group assignment as factor and preceding time points and patient-related variables as covariates. The Jonckheere–Terpstra test was used for inter-group comparison of categorical (NYHA and CCS) data.²² The proportions of LV segments with unchanged, worsened, or improved perfusion and LV regions with changes in wall motion at follow-up were compared by two-tailed Fisher's exact test. A *P*-value of $\alpha < 0.05\%$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with the SPSS software packages (SPSS 18.0).

Results

Patient characteristics

Fifty-seven patients were male and three were female. The mean age was 62.7 \pm 10.6 years in the placebo group and 61.9 \pm 7.3 years in the CD133 group, and all other pre-operative characteristics were also similar between groups. The last documented myocardial infarction event was 2.3 months ago (median, range: 21 days to 28.5 years), and the average LVEF was 26.2 \pm 5.6% (range: 15–35%) (Table 2). Nine patients in the CD133 group and nine in the placebo group had the last documented myocardial infarction <3 months before surgery. The decision for surgical re-vascularization was made in accordance with the guidelines on the management of stable angina pectoris of the European Society of Cardiology.²³ Fifty-six patients had three-vessel disease and 4 had two-vessel disease. After surgery, re-vascularization was incomplete in five patients. In three of those, an occluded right coronary artery could not be grafted and, in two, the occluded LAD was not graftable. Two of the incompletely re-vascularized patients were in the CD133 group and three were in the placebo group. By gadolinium first-pass imaging, the proportion of LV myocardial segments with perfusion deficit at rest was similar between the groups (placebo, 23%; CD133, 23%).

Primary outcome

Six-month MRI follow-up was performed in 48 patients, 22 patients in the placebo group and 26 in the CD133 group. Three patients refused the examination, two had died early post-operatively, one developed dyspnoea in the MRI scanner, and two patients had post-operative pacemaker implantation. At 6-month follow-up, ejection fraction at rest as determined by MRI was 31 \pm 7% in the CD133 group and 33 \pm 8% in the placebo group (*P* = 0.3), with an average inter-group difference of -2.1% (95% CI -6.3 to 2.1).

Table 2 Baseline characteristics of the patients^a

	Placebo	CD133 ⁺
<i>n</i>	30	30
Gender ♂:♀	29:1	28:2
Age (years)	62.7 ± 10.6	61.9 ± 7.3
Last myocardial infarction	1.5 months	2.6 months
	(14 days to 28.5 years)	(17 days to 17.1 years)
Bone marrow aspiration (mL)	194 ± 32	199 ± 23
MRI		
LVEF (%)	26 ± 6	27 ± 6
LVEDD (mm)	64 ± 6	63 ± 5
LVEDV (mL)	250 ± 50	248 ± 53
Scar size (g)	27 ± 15	32 ± 16
Scar size in total myocardial mass (%)	20 ± 10	24 ± 10
Echocardiography		
LVEF	30 ± 8	32 ± 8
LVFS	16 ± 7	15 ± 6
LVEDD	61 ± 5	62 ± 7
LVESD	51 ± 7	54 ± 7
LVEDV	186 ± 42	178 ± 39
LVESV	131 ± 41	120 ± 37
VO ₂ max (mL/min/kg)	12.6 ± 4.6	14 ± 3.7
VE/CO ₂ -slope	30.3 ± 6	33.4 ± 6
6-min walk test (m)	348 ± 138	395 ± 138
NYHA		
Grade I	3	5
Grade II	12	8
Grade III	12	15
Grade IV	3	2
CCS		
Grade 0	7	10
Grade I	4	6
Grade II	8	8
Grade III	10	5
Grade IV	1	1
Minnesota Living with Heart Failure Score	32 ± 17	30 ± 22

^aPatients were randomly assigned to CABG with autologous CD133⁺ cell injection or to CABG with placebo injection. There were no significant differences between the groups in the baseline characteristics listed here.

CABG, coronary artery bypass grafting; CCS, Canadian Cardiovascular Society; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVFS, left ventricular fractional shortening; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVESD, left ventricular end-systolic diameter; LVESV, left ventricular end-systolic volume; MRI, magnetic resonance imaging; NYHA, New York Heart Association.

Secondary outcomes

Mortality

Thirty-day mortality was 3.3%, with two deaths in the placebo group and none in the CD133 group. In one patient with pre-operative LVEF

Table 3 Frequency of AEs and SAEs in the placebo and the CD133 cell-treated group

	Placebo	CD133 cell treated
Number of patients with AEs	29	27
Number of patients with SAEs	8	7
Pleural effusion	24	23
Pericardial effusion	15	16
Anaemia	9	6
Atrial fibrillation/SVT	11	13
Sinus bradycardia	1	–
Interm. AVB	–	1
Retrosternal haematoma	6	3
Septic MOF/death	2	–
Post-operative bleeding	1	1
Progressiv dyspnoea	–	2
Respiratory insufficiency/cardiac shock	–	1
Sternal wound secretion	–	1
Ventricular tachycardia	1	1
Ventricular fibrillation/flutter	1	1
Pulmonary infection	1	1
Deterioration of PAD	2	1
Decompensative cardiac insufficiency	1	1
Bronchial tumour	1	–
SIRS with circulatory failure	1	–
TIA	–	1
HIT 2	–	1
Prostate carcinoma	–	1
Ventricular thrombus	1	–
Pneumothorax	1	–
Thrombocytosis	1	–
Gastrointestinal bleeding/cholecystitis/paralytic ileus	3	–
Unstable sternum	–	1
Dislocation of pacemaker	–	1
Myocardial insufficiency	1	1
Left chest swelling	1	–
Hypotension	1	–
Wound healing disorder	2	–
All AEs	88	78
Included SAEs	13	12

AEs, adverse events; AVB, atrioventricular block; HIT 2, heparin-induced thrombocytopenia; MOF, multi-organ failure; PAD, peripheral arterial disease; SAEs, serious adverse events; SIRS, systemic inflammatory response syndrome; SVT, supraventricular tachyarrhythmia; TIA, transient ischemic attack.

of 20%, the LV failed despite intra-aortic balloon pump and catecholamine treatment, and implantation of a mechanical assist device was necessary. Later, the patient developed *Candida* sepsis with and died on POD 8. The other patient developed pneumonia, mediastinitis, and sepsis, and died on POD 22 although LVEF had increased from 25 to 35%. Beyond the follow-up period, two more patients died 31 and 34 months post-operatively, one in the CD133 and one in the placebo group. The causes of death

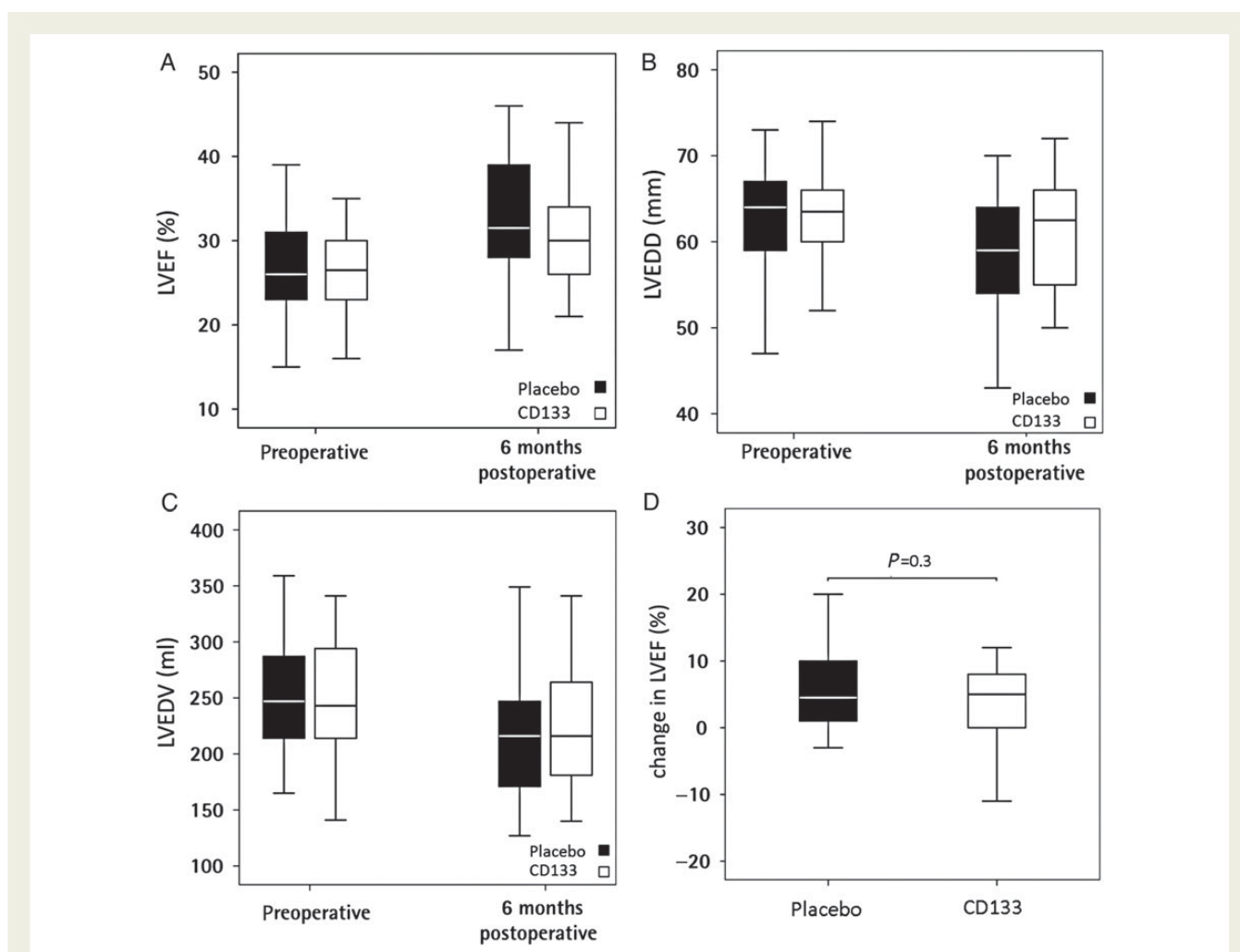


Figure 2 Left ventricular function by MRI: (A–C) LV function and dimension parameters measured by cardiac magnetic resonance imaging (MRI) before surgery and at 6-month follow-up. (A) Left ventricular ejection fraction (LVEF): time effect $P < 0.001$; group effect $P = 0.5$, interaction $P = 0.3$. (B) Left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD): time effect $P < 0.001$; group effect $P = 0.6$, interaction $P = 0.2$; (C) left ventricular end-diastolic volume (LVEDV): time effect $P < 0.001$; group effect $P = 0.9$, interaction $P = 0.4$. (D) Change in LVEF 6 months after CABG surgery and CD133 or placebo injection, compared with pre-operative.

were given as heart failure and/or sudden cardiac death but autopsies were not performed.

Adverse events

The similarity of AE and SAE frequency between the groups demonstrates the safety of the cell treatment Table 3. The overall high incidence of AE reflects the invasiveness of CABG surgery in patients with severely impaired heart function.

Magnetic resonance imaging

The pre-operative LV function parameters were similar between the groups. Overall, global LV function improved after surgery (Figure 2). However, in line with the LVEF data (see above), there were no significant between-group differences in LVEDD or LVEDV measured at 6-month follow-up (placebo vs. CD133: 59 ± 7 vs. 61 ± 6 mm, $P = 0.4$; 218 ± 50 vs. 224 ± 57 mL, $P = 0.7$). Similarly, there was no significant difference in the change of LVEF (2.3% (-2.0 to 6.6),

$P = 0.3$) (Figure 2D). Per qualitative assessment of regional contractile function in the placebo group, akinesia was documented in 97 LV regions pre-operatively and 72 regions post-operatively. It improved in 42 regions, worsened in 17. In the CD133 group, this pattern was similar (106 akinetic regions pre-operatively, 84 post-operatively, improvement in 39 ($P = 0.8$), worsening in 17 ($P = 0.9$)). The proportions of LV myocardial segments with a perfusion deficit that changed after surgery were different between groups. In placebo patients, perfusion deficit at rest was unchanged in 19% of all analysed segments, better in 2% and worse in 7%. In the CD133 group, the perfusion deficit was unchanged in 15% ($P = 0.2$ vs. placebo), improved in 9% ($P = 0.001$, OR 4.0, 95% CI 1.6–9.8), and worse in 1% of all analysed segments ($P = 0.0007$, OR 0.2, 95% CI 0.07–0.5). However, the perfusion improvement in the CD133 group did not always correlate with the location of the cell injection. Scar size was not a pre-specified outcome but was quantified *post hoc*. Pre-operative scar mass was 27 ± 15 g ($20 \pm 10\%$ of the total myocardial mass) in the placebo

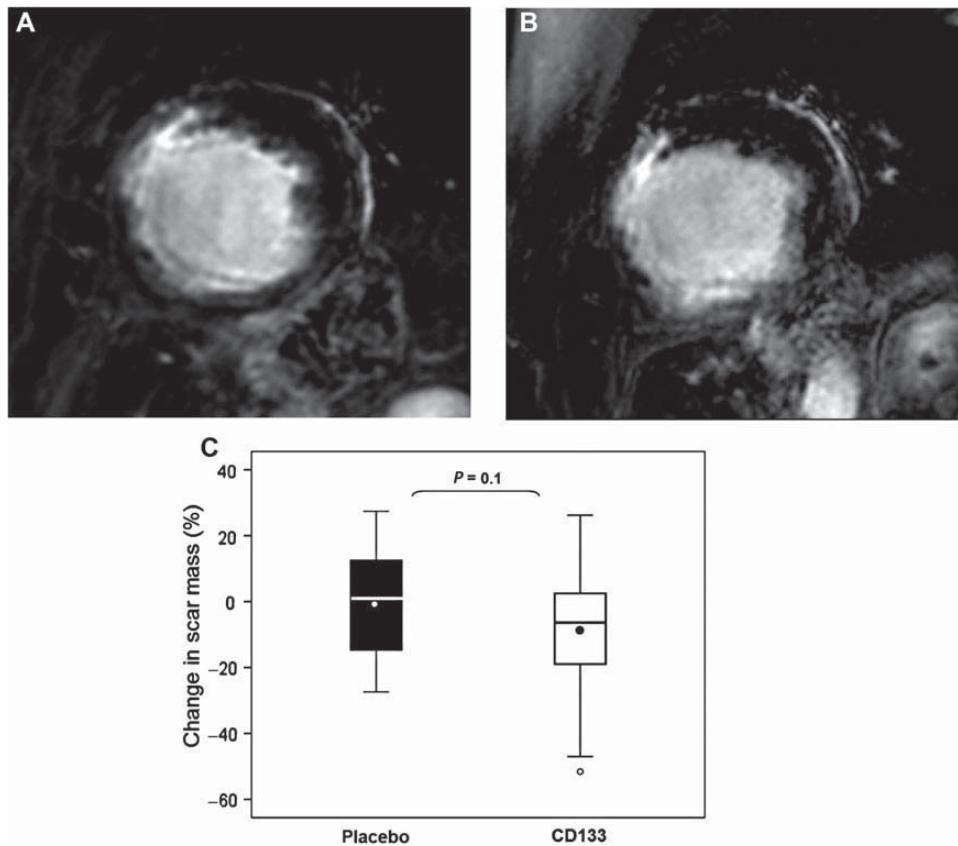


Figure 3 Infarct scar size: late gadolinium enhancement images in the short-axis orientation of the heart at baseline (A) and 6 months after injection of CD133⁺ bone marrow stem cells (B) demonstrating a slight reduction in scar size (-4 g or 6.3% of total LV myocardial mass in this patient). Scar tissue appears as areas of hyperintensity (bright signal) whereas viable myocardium appears dark. (C) Change in scar size from between pre-operative and 6-month follow-up expressed in % of the pre-operative scar mass.

group and 32 ± 16 g ($24 \pm 10\%$) in the CD133 group. At 6-month follow-up, scar mass was 27 ± 15 ($22 \pm 11\%$) in the placebo group and 30 ± 17 ($23 \pm 10\%$) in the CD133 group (inter-group $P = 0.5$ (mass) and $P = 0.7$ (%)). On average, scar mass had decreased by 2.2 ± 5 g in CD133 patients ($P = 0.05$), but was unchanged in the placebo group (0.3 ± 4 g, $P = 0.7$). In relation to the pre-operative measurements, scar mass decreased by 9.7% (IQR -20 to 2%) in CD133 patients, and by 0.6% (IQR -15 to 12%) in placebo patients (inter-group $P = 0.1$) (Figure 3). The between-group difference of the change in scar mass at follow-up was 2.0 g (95% CI -1.1 to 5.0), $P = 0.2$.

Echocardiography

Again, most global LV function and dimension parameters improved after surgery irrespective of the group assignment, but there were no significant differences between groups at follow-up (Figure 4). Regarding regional contractility, there were no differences in the average 2D strain between groups, pre-operatively or at follow-up (pre-specified secondary endpoint). When the speckle-tracking echocardiography data were stratified according to the location of the AOI (*post hoc* subgroup analysis), we observed a tendency

towards better improvement of regional LV function in patients with posterior or inferior infarction and CD133 cell injection, which was not apparent in the placebo group (group effect $P = 0.1$, Figure 5A). When the proportions of segments with improved longitudinal strain were compared between the groups, regional contractile function recovery was better in the CD133 group at 3 months ($P = 0.03$, OR = 2.2 95% CI 1.1–4.6) but not at 6 months ($P = 0.4$). Figure 5B summarizes the 2D longitudinal strain data in CD133 patients according to the location of the AOI and illustrates that regional contractile function recovered only when the AOI was posterior or inferior (localization effect $P = 0.02$). However, there was no correlation between AOI location and LVEF at 6 months or the change in global LV function.

Exercise capacity

At 6-month follow-up, 50 patients underwent exercise testing (placebo vs. CD133: 25 vs. 25 patients). By spirometry, all tested patients reached the anaerobic threshold of $RER > 1.01$. Prior to the operation peak oxygen uptake (VO_2 max) and ventilation perfusion mismatch (VE/CO_2 -slope) were 12.6 ± 4.6 mL/min/kg and 30.3 ± 6 in the placebo group and 14 ± 3.7 mL/min/kg and

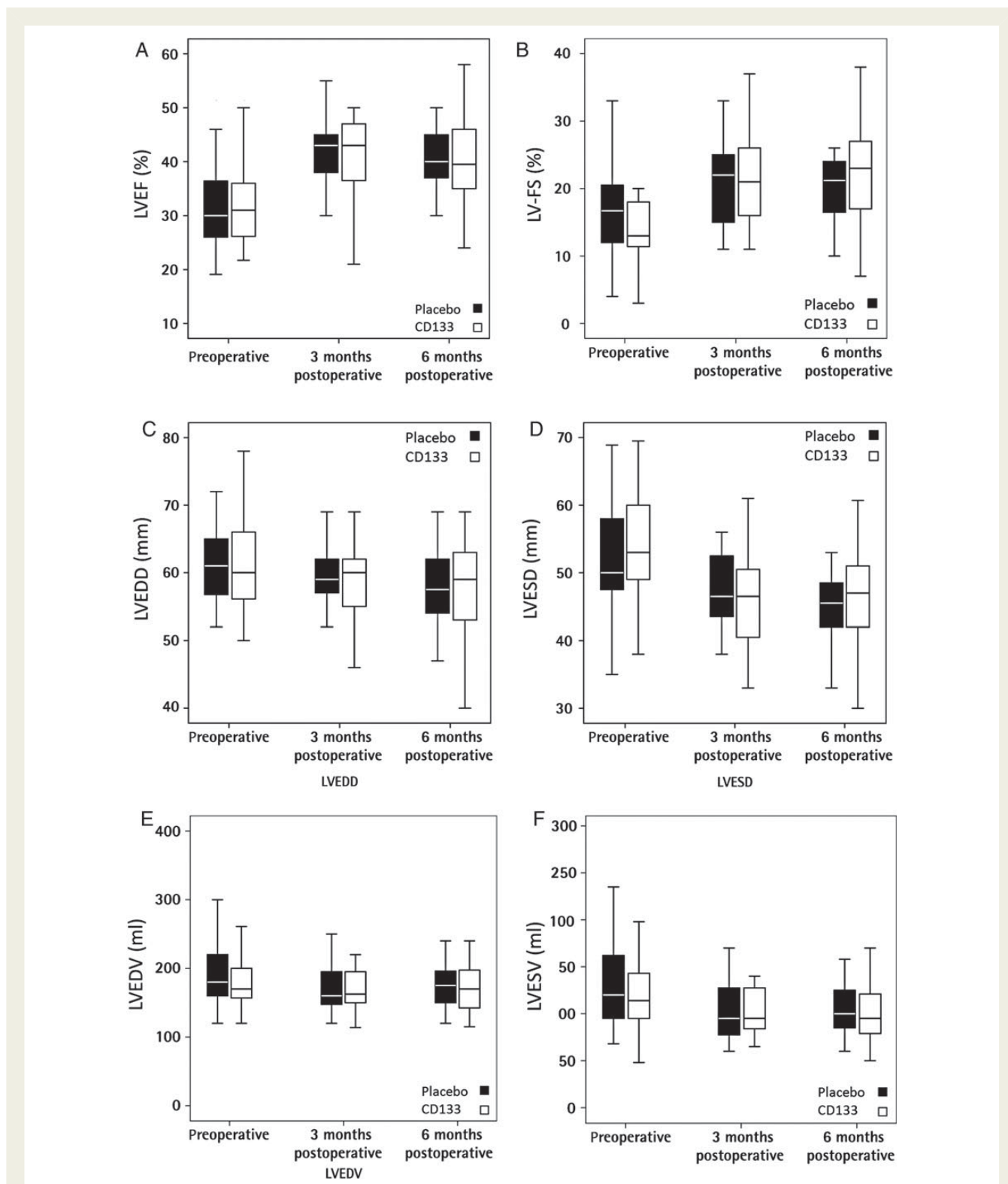


Figure 4 Left ventricular function by echocardiography: global left ventricular function and dimension parameters measured by echocardiography before surgery and at 3- and 6-month follow-ups. (A) Left ventricular ejection fraction (LVEF): time effect $P < 0.001$, group effect $P = 0.9$, interaction $P = 0.8$; (B) fractional shortening (LV-FS): time effect $P = 0.01$, group effect $P = 0.7$, interaction $P = 0.08$; (C) end-diastolic diameter (LVEDD): time effect $P = 0.001$, group effect $P = 0.9$, interaction $P = 0.8$; (D) end-systolic diameter (LVESD): time effect $P = 0.001$; group effect $P = 0.7$, interaction $P = 0.7$. (E) End-diastolic volume (LVEDV): time effect $P = 0.1$, group effect $P = 1$, interaction $P = 0.6$; (F) end-systolic volume (LVESV): time effect $P = 0.001$, group effect $P = 0.6$, interaction $P = 0.9$.

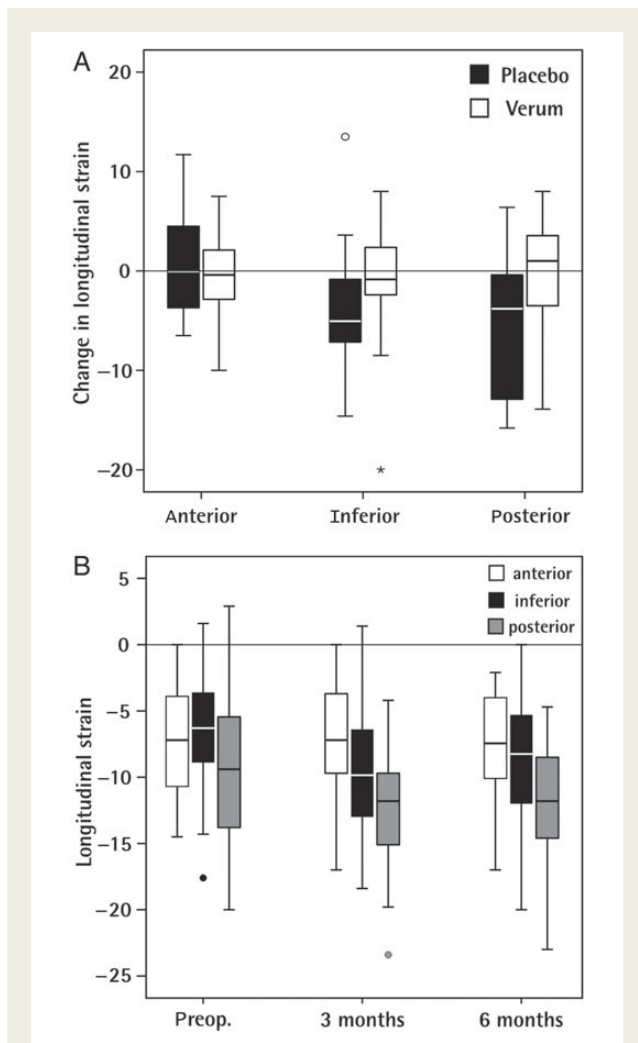


Figure 5 Regional left ventricular function: (A) change in regional longitudinal strain between pre-operative and 3-month follow-up in the area of interest that received CD133 or placebo injection stratified according to the localization of the area of interest. Recovery of myocardial function was better in the CD133 group when the area of interest was posterior or inferior (time effect $P = 0.2$; group effect $P = 0.1$, interaction $P = 0.08$). (B) Longitudinal strain data measured by speckle tracking echocardiography in CD133 patients before surgery and at 3- and 6-month follow-ups, stratified according to the localization of the area of interest. Time effect $P = 0.5$; localization effect $P = 0.02$, interaction $P = 1$.

33.4 ± 6.3 in the CD133 group. At 6-month follow-up testing VO_2 max and VE/VCO_2 -slope were not significantly different between groups (placebo vs. CD133: 14.4 ± 4.3 vs. 14.9 ± 6 mL/min/kg ($P = 0.7$) and 31.5 ± 6.8 vs. 31.3 ± 5.6 ($P = 0.9$)). Although the mean and median values of the 6-min walk at follow-up (Figure 6) or their change from pre-operatively (placebo vs. CD133: 28.7 (-15.9 to 73.3) vs. -2.3 (-35.3 to 34.8 m), $P = 0.3$)) were not significantly different, the data spread was much larger in the CD133 group than in the placebo group (Figure 6). While range was similar (CD133, 120–661 m; placebo, 153–600 m), the inter-quartile range was approximately three times greater, indicating a larger inter-individual variability in the CD133 group.

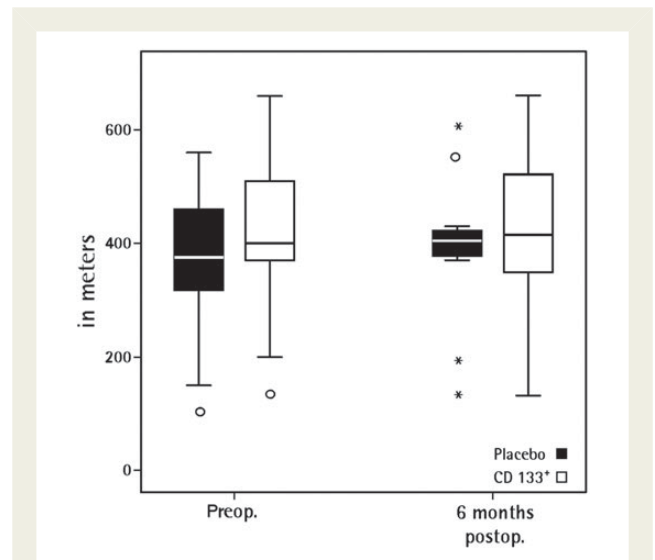


Figure 6 Exercise capacity: exercise capacity assessed by 6-min walking distance before surgery and at 6-month follow-up. Time effect $P = 0.3$; group effect $P = 0.3$, interaction $P = 0.8$.

New York Heart Association and Canadian Cardiovascular Society class

The majority of patients had less heart failure symptoms and angina at 6-month follow-up (NYHA, $P < 0.001$; CCS, $P = 0.006$) (Figure 7). However, inter-group comparison of the proportions of patients in the different NYHA classes revealed between-group differences at 6 months, suggesting that NYHA class had improved more in the placebo group than in the CD133 group ($P = 0.004$). For CCS class, this was not the case ($P = 0.2$).

Quality of life

CABG surgery led to an improvement of quality of life as assessed by Minnesota Living with Heart Failure Score at 6 months post-operatively, with no significant difference between groups (placebo vs. CD133: 12.7 (3.5–21.9) vs. 2.4 (-5.0 to 9.8); time effect $P = 0.001$; group effect $P = 0.08$, interaction $P = 0.1$).

Discussion

Although the results of the first clinical trials did not live up to expectations, cardiac cell therapy remains a concept worth investigating, let alone for want of better alternatives in patients with significantly reduced LV function. The vast majority of patients received cells of BM origin injected into the coronary vasculature, mainly in the setting of acute or sub-acute myocardial. Several groups have also implemented protocols for cell therapy of chronic ischaemic heart disease, where the target tissue is not always via the intracoronary route, and where surgical re-vascularization may be indicated. The majority of surgical cell therapy studies were done with unmodified BM mononuclear cell preparations. Few have used cell products enriched for progenitor cells, using surface markers that were originally developed for haematopoietic stem cell transplantation. For instance, Patel et al. reported the results of a small pilot study in

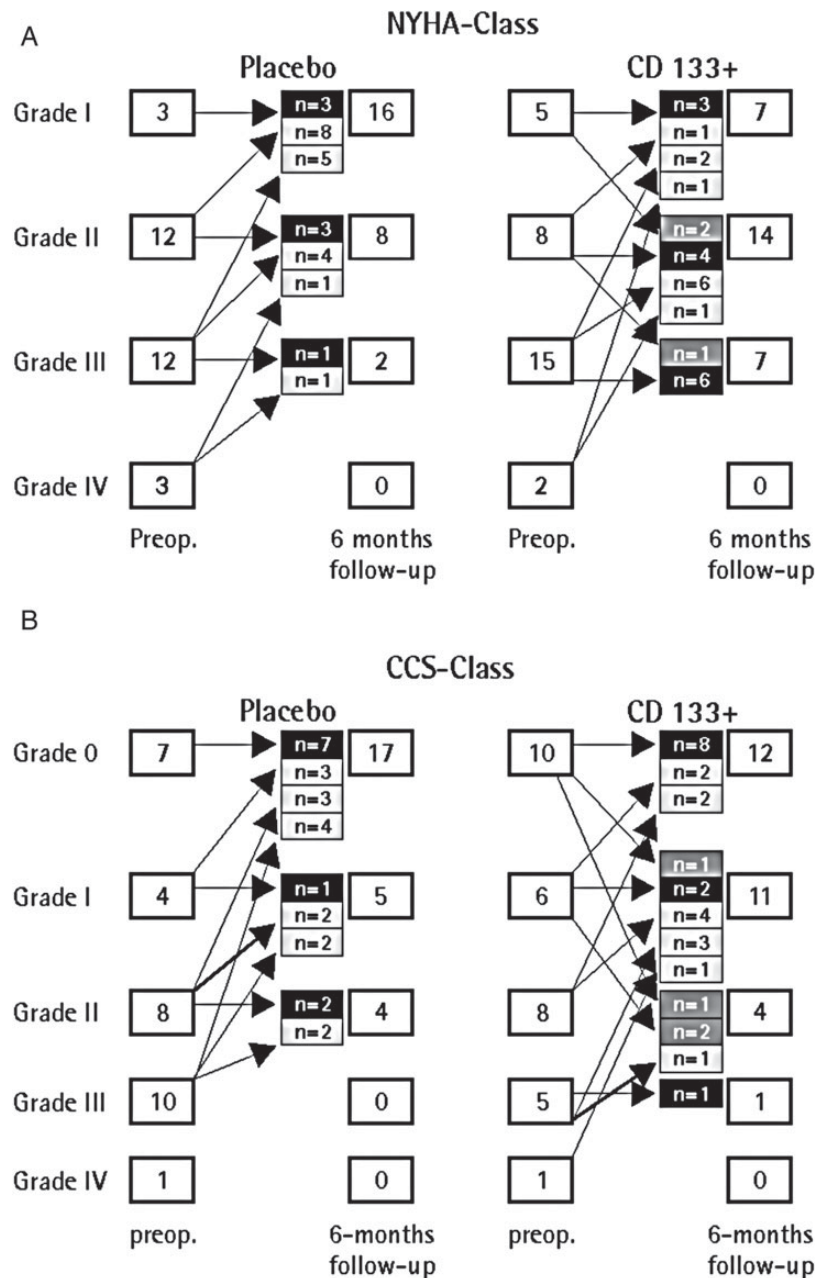


Figure 7 Symptoms: (A) severity of heart failure symptoms before surgery and at 6-month follow-up quantified according to the New York Heart Association classification (NYHA). (B) Angina symptoms according to the Canadian Cardiovascular Society (CCS).

CABG patients, where autologous BM CD34⁺ cells were injected intra-myocardially, and the LV contractile function was clearly better in those who received cells.¹⁵

The CD133 protein is a trans-membrane cell surface receptor of currently unknown function that is expressed in immature haematopoietic stem cells and is also found on endothelial progenitor cells, tissue-specific stem cells, cancer stem cells, and possibly cardiomyogenic pluripotent cells.^{24–27} Among markers available for clinical stem cell isolation, CD133 is considered to yield the most immature somatic stem cell population and was shown to efficiently regenerate ischaemic myocardium in pre-clinical models.³ Promising data were

published for CABG patients receiving CD133⁺ cells from peripheral blood,²⁸ and patients undergoing CD133⁺ cell therapy with concomitant trans-myocardial laser re-vascularization.^{29,30} One of the authors of this paper (C.S.) with colleagues at Rostock University reported a significant benefit in terms of contractile function and clinical outcome parameters in twenty patients having CABG and intra-myocardial CD133⁺ BM cell injection, when compared with 20 patients having CABG alone.¹⁶ However, at that time, a placebo injection in the control group was not possible, cardiac MRI was done only in few patients, and the trial was not blinded. This prompted us to essentially repeat the study with a randomized, double-blinded,

placebo-controlled design. Taken together, we failed to demonstrate a beneficial impact of CD133⁺ cells on LV function and clinical symptoms. Some may be tempted to argue that this study was 'underpowered', with too small a cohort size. We feel that this is not the case for the following reasons: First, the outcome is uniformly negative for all global heart function parameters and symptoms, and there is not even a tendency that may have reached statistical significance had the cohort size been larger. Second, the previous study provided evidence that cell therapy is more effective in patients with LVEF <35%.¹⁶ Therefore, we now included only patients with LVEF <35% and expected an even better results. However, this was not the case. Two findings that are difficult to explain are that NYHA class improved more in the placebo group, and that the inter-individual variability of the 6-min walk test result at 6 months was much higher in the CD133 group. Both may be interpreted as evidence of a better outcome in the placebo group, but this is not supported by the heart function data. Why did this trial fail although experimental data and clinical pilot studies showed positive results? A uniform problem of autologous cell therapy for tissue regeneration is the age- and disease-related impairment of progenitor cell function in older patients with ischaemic heart disease and/or chronic heart failure.³¹ Numerous studies have demonstrated a negative correlation between heart disease and regenerative capacity of BM- or blood-derived cells, and haematopoietic stem cell function is actively down-regulated in the aging organism. Here, juvenile, possibly allogenic cell products may be advantageous. Another limitation is the dose of CD133⁺ cells that are available according to our protocol. An average of 5 million cells were injected, which is probably insufficient given that usually 500 000 or 1 million cells are used in comparable mouse models of heart disease. This is the maximum cell dose that can be obtained from a unilateral bone marrow aspiration in local anaesthesia, and significantly higher cell doses have only been obtained from peripheral blood after cytokine-induced bone marrow cell mobilization.²⁸ Other confounding factors may include timing (we treated ~2.3 months after myocardial infarction, when local inflammatory and regenerative signals have largely abated), composition of the medium, responsiveness of the recipient myocardium, and insufficient cell retention. Perhaps, we would have seen a more positive outcome had the inclusion criteria been slightly different (younger patients, more recent infarction, lesser impairment of LV function), but we sought to evaluate this therapeutic concept in a 'real world' scenario. Obviously, in such combination therapy trials, it is not possible to clearly distinguish between the effects of CABG surgery and those of the cell injection. Only the controlled design with CABG being done in both groups helps account for the CABG effects. Cell delivery to specific areas that are not re-vascularized by CABG may theoretically help distinguish between CABG and cell therapy effects, but we feel that such data are of limited relevance and do not reflect clinical reality, where complete re-vascularization is always the goal.

However, we noted changes in regional myocardial behaviour that may indicate that cell transplantation had at least some biological effects. Myocardial perfusion improved in more LV segments in the CD133 group than in the placebo group, in line with the notion that haematopoietic/endothelial progenitor cells support angiogenesis processes. However, the localization of the segments with improved perfusion did not always correlate with the cell injection

site, so that only remote effects of the transplanted cells would explain this finding. Also, we could not perform stress testing and only segments with impaired perfusion at rest could be analysed. Another interesting observation is the correlation between the change in regional myocardial function and the location of the infarct, which we attribute to the inaccessibility of the intraventricular septum in patients with anterior infarction following LAD occlusion, when cell are injected trans-epicardial. Therefore, when the infarct extends far into the septum, as is often the case after LAD occlusion with anterior infarction, a significant portion target tissue is systematically left untreated. We feel that this phenomenon may have contributed to the unsatisfactory outcome of the trial, and better patient selection or novel cell delivery techniques may help overcome this problem in the future. On the other hand, the results of the FOCUS-CCTRN trial showed that trans-endocardial delivery of BM cells did not result in a measurable improvement regional wall motion or perfusion, either, although the entire LV wall is accessible with this technique.⁸ Finally, the recently published CELLWAVE trial clearly demonstrated an improvement of regional contractile function and scar size in patients who had anterior myocardial infarction, provided intracoronary bone marrow cell infusion was combined with targeted shock wave application, and remains to be seen whether this concept can be applied to patients requiring CABG surgery as well.³²

In summary, we found that, although there may be some changes in local myocardial behaviour indicating that cell transplantation has some impact on the recovery of ischaemic myocardium, intramyocardial injection of autologous CD133⁺ BM cells did not result in a clinically relevant benefit on top of CABG surgery. Given the well-known irreversibility of chronic ischaemic heart failure and the non-myogenic character of haematopoietic BM stem cells, this may not be surprising. Other cell products with greater potential for cardiomyocyte regeneration, such as cardiac stem cells, may be better suited here.^{33,34} In view of the potent angiogenesis-inducing capacity of BM-derived cells, they may be more helpful as therapeutic agents for chronic angina, but specific trial designs are required to address this.

Acknowledgements

We thank Dr Sabine Hübler and Elke Wenzel for the invaluable help co-ordinating the study and Julia Stein for conducting the statistical analysis. We also appreciate the continuing advice of Prof. Gustav Steinhoff, University of Rostock.

Funding

This work was in part supported by Miltenyi Biotec and by the German Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Grant Number: 0315848A (to BCRT).

Conflict of interest: B.N. and C.S. received lecture fees from Miltenyi Biotec. Miltenyi Biotec partially covered the costs of this study.

References

1. Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao RL, Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992;1:383–390.
2. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. 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.

3. Ma N, Ladilov Y, Moebius JM, Ong L, Piechaczek C, David A, Kaminski A, Choi YH, Li W, Egger D, Stamm C, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of human CD133+ cells in a SCID mouse cryoinjury model: Bone marrow vs. cord blood-derived cells. *Cardiovasc Res* 2006;**71**:158–169.
4. Stamm C, Nasser B, Choi YH, Hetzer R. Cell therapy for heart disease: great expectations, as yet unmet. *Heart Lung Circ* 2009;**18**:245–256.
5. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobern N, Grunwald F, Aicher A, Urbich C, Martin H, Hoelzer D, Dimmeler S, Zeiher AM. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002;**106**:3009–3017.
6. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;**364**:141–148.
7. Jeevanantham V, Butler M, Saad A, Abdel-Latif A, Zuba-Surma EK, Dawn B. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2012;**126**:551–568.
8. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, Silva GV, Lai D, Thomas JD, Kronenberg MW, Martin AD, Anderson RD, Traverse JH, Penn MS, Anwaruddin S, Hatzopoulos AK, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Smith D, Westbrook L, Chen J, Handberg E, Olson RE, Geither C, Bowman S, Francescon J, Baraniuk S, Piller LB, Simpson LM, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moye LA, Simari RD. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA* 2012;**307**:1717–1726.
9. Perin EC, Silva GV, Zheng Y, Gahremanpour A, Canales J, Patel D, Fernandes MR, Keller LH, Quan X, Coulter SA, Moore WH, Herlihy JP, Willerson JT. Randomized, double-blind pilot study of transendocardial injection of autologous aldehyde dehydrogenase-bright stem cells in patients with ischemic heart failure. *Am Heart J* 2012;**163**:415–421.
10. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Mesquita CT, Rossi MI, Carvalho AC, Dutra HS, Dohmann HJ, Silva GV, Belem L, Vivacqua R, Rangel FO, Esporcatte R, Geng YJ, Vaughn WK, Assad JA, Mesquita ET, Willerson JT. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003;**107**:2294–2302.
11. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, Seiffried E, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res* 2007;**100**:1234–1241.
12. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Bartsch T, Schannwell C, Antke C, Sorg RV, Kogler G, Wernet P, Muller HW, Kosterling M. Regeneration of human infarcted heart muscle by intracoronary autologous bone marrow cell transplantation in chronic coronary artery disease: the IACT Study. *J Am Coll Cardiol* 2005;**46**:1651–1658.
13. Nasser B, Kukucka M, Dandel M, Knosalla C, Choi YH, Ebelt W, Hetzer R, Stamm C. Two-dimensional speckle tracking strain analysis for efficacy assessment of myocardial cell therapy. *Cell Transplant* 2009;**18**:361–370.
14. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;**361**:45–46.
15. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC Jr, Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;**130**:1631–1638.
16. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, David A, Liebold A, Nienaber C, Zurakowski D, Freund M, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;**133**:717–725.
17. Yerebakan C, Kaminski A, Westphal B, Donndorf P, Glass A, Liebold A, Stamm C, Steinhoff G. Impact of preoperative left ventricular function and time from infarction on the long-term benefits after intramyocardial CD133(+) bone marrow stem cell transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;**142**:1530–1539.
18. Gaipa G, Tilenni M, Straino S, Burba I, Zaccagnini G, Belotti D, Biagi E, Valentini M, Perseghin P, Parma M, Campli CD, Biondi A, Capogrossi MC, Pompilio G, Pesce M. GMP-based CD133(+) cells isolation maintains progenitor angiogenic properties and enhances standardization in cardiovascular cell therapy. *J Cell Mol Med* 2010;**14**:1619–1634.
19. Kim RJ, Wu E, Rafael A, Chen EL, Parker MA, Simonetti O, Klocke FJ, Bonow RO, Judd RM. The use of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to identify reversible myocardial dysfunction. *N Engl J Med* 2000;**343**:1445–1453.
20. Guyatt GH. Measurement of health-related quality of life in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1993;**22**(4 Suppl A):185A–191A.
21. Machin D, Campbell MJ, Fayers P, Pinol A. *Sample Size Tables for Clinical Studies*. 2nd ed. Oxford: Blackwell Science; 1997.
22. Conover WJ. *Practical Nonparametric Statistics*. 3rd ed. New York: Wiley; 1999.
23. Fox K, Garcia MA, Ardissino D, Buszman P, Camici PG, Crea F, Daly C, De Backer G, Hjelm Dahl P, Lopez-Sendon J, Marco J, Morais J, Pepper J, Sechtem U, Simoons M, Thygesen K, Priori SG, Blanc JJ, Budaj A, Camm J, Dean V, Deckers J, Dickstein K, Lekakis J, McGreggor K, Metra M, Morais J, Osterspey A, Tamargo J, Zamorano JL. Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary: the task force on the management of stable angina pectoris of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2006;**27**:1341–1381.
24. Wojakowski W, Tendera M, Kucia M, Zuba-Surma E, Milewski K, Wallace-Bradley D, Kazmierski M, Buszman P, Hrycek E, Cybulski W, Kaluza G, Wiecek P, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Cardiomyocyte differentiation of bone marrow-derived Oct-4+/-CXCR4+/-SSEA-1+ very small embryonic-like stem cells. *Int J Oncol* 2010;**37**:237–247.
25. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997;**90**:5002–5012.
26. Uchida N, Buck DW, He D, Reitsma MJ, Masek M, Phan TV, Tsukamoto AS, Gage FH, Weissman IL. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:14720–14725.
27. Grosse-Gehling P, Fargeas CA, Dittfeld C, Garbe Y, Alison MR, Corbeil D, Kunz-Schughart LA. CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol* 2013;**229**:355–378.
28. Pompilio G, Cannata A, Peccatori F, Bertolini F, Nascimbene A, Capogrossi MC, Biglioli P. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg* 2004;**78**:1808–1812.
29. Babin-Ebell J, Sievers HH, Charitos EL, Klein HM, Jung F, Hellberg AK, Depping R, Sier HA, Marxsen J, Stoelting S, Kraatz EG, Wagner KF. Transmyocardial laser revascularization combined with intramyocardial endothelial progenitor cell transplantation in patients with intractable ischemic heart disease ineligible for conventional revascularization: preliminary results in a highly selected small patient cohort. *Thorac Cardiovasc Surg* 2010;**58**:11–16.
30. Reyes G, Allen KB, Alvarez P, Alegre A, Aguado B, Olivera M, Caballero P, Rodriguez J, Duarte J. Mid term results after bone marrow laser revascularization for treating refractory angina. *BMC Cardiovasc Disord* 2010;**10**:42.
31. Stamm C, Nasser B, Drewe T, Hetzer R. Cardiac cell therapy: a realistic concept for elderly patients? *Exp Gerontol* 2008;**43**:679–690.
32. Assmus B, Walter DH, Seeger FH, Leistner DM, Steiner J, Ziegler I, Lutz A, Khaled W, Klotsche J, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Effect of shock wave-facilitated intracoronary cell therapy on LVEF in patients with chronic heart failure: the CELLWAVE randomized clinical trial. *JAMA* 2010;**309**:1622–1631.
33. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marban L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo AC, Gerstenblith G, Marban E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012;**379**:895–904.
34. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, Beache GM, Wagner SG, Leri A, Hosoda T, Sanada F, Elmore JB, Goichberg P, Cappetta D, Solankhi NK, Fahsah I, Rokosh DG, Slaughter MS, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011;**378**:1847–1857.

3. Diskussion

Obwohl die absolute Anzahl der Patienten, die an den Folgen von Herz-Kreislaufkrankungen in den letzten Jahrzehnten in Deutschland verstarben, abgenommen hat, sind sie nach wie vor Todesursache Nummer 1 bei beiden Geschlechtern. Weltweit wird der zunehmende sogenannte westliche Lebensstil mit mangelnder Bewegung, enormer Kalorienzufuhr und den daraus resultierenden Folgen wie Übergewicht und metabolisches Syndrom sowie der weiterhin steigende Konsum von Tabak und Alkohol, besonders im asiatischen Raum, auch in den folgenden Jahrzehnten die Neuerkrankungen des Herz-Kreislaufsystems global nach oben schrauben. Neue Medikamente und verbesserte Therapiemöglichkeiten haben und werden das Überleben und die Lebensqualität dieser Patienten weiter verbessern. Doch meist handelt es sich bei der Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen um palliative Ansätze, welche zu einer Verschiebung von akut Herzkranken zu Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz führen wird. Auch bei der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz wurden enorme Fortschritte erzielt, beispielsweise durch die orthotope Herztransplantation und die mechanische Kreislaufunterstützung. Doch auch hier handelt es sich wiederum um palliative Therapieformen mit ihren eigenen Problemen und Grenzen. So ist es klar, dass weiterhin die Wissenschaftler aller Disziplinen dem Traum der Entschlüsselung regenerativer Prozesse im Menschen nacheifern.

Die regenerative Medizin hat inzwischen ihren festen Platz in der Humanmedizin eingenommen und es entstehen neue Institutionen wie zum Beispiel das „Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies“, die mit eigenen Lehrstühlen und Budgets ausgestattet sind. In interdisziplinärer Zusammenarbeit soll besonders die Basisforschung in den Klinikalltag integriert und somit Forschungsergebnisse schneller klinisch umgesetzt werden.

Tissue Engineering ist eine Technik der regenerativen Medizin zur Herstellung von funktionalem Gewebe, welches bei Patienten mit Organversagen oder Gewebeerlusten implantiert werden kann. Tissue Engineering wurde als ein Ansatz zur selektiven Zelltransplantation entwickelt und hat den Sprung in den klinischen Alltag schon in einigen Fachdisziplinen geschafft. So ist es zum Beispiel möglich, Knochen oder auch Knorpel in der Petrischale aus Vorläuferzellen herzustellen und diese bei entsprechenden Gewebedefekten zu implantieren.

Die Idee der allogenen Zelltransplantation ist es, die Zellen eines Spenders bei verschiedenen Empfängern einzusetzen, somit könnte sie ein Ausweg aus dem stetigen Organmangel der Transplantationsmedizin sein. Doch auch hier stellt die Immunogenität der

Spenderzellen eine nicht ganz unerhebliche Hürde da. Die logische Schlussfolgerung bietet die Transplantation autologer Zellen, und die Forscher sind auf der Suche nach geeigneten Zellreservoirien pluripotenter Zellen im menschlichen Körper. Neben dem Knochenmark sind auch andere Zellreservoirien wie zum Beispiel das Fettgewebe in den Fokus der Wissenschaftler gerückt.

Der Enthusiasmus der Forscher ist groß und die Hoffnung der Patienten noch viel größer. Doch kritisch betrachtet sind viele der sich stellenden Fragen die gleichen Fragen, die wir uns schon vor zwei Jahrzehnten gestellt haben, nämlich bei wem, wann und wie die Zelltherapie erfolgreich sein kann. Im Folgenden werden einige dieser offenen Fragen, die schon in der Einleitung dieser Arbeit aufgeführt wurden, unter Einbindung der eigenen Arbeiten kritisch beleuchtet und diskutiert.

Die Zelltherapie im Herzen wurde in erster Linie bei der ischämischen Herzerkrankung eingesetzt. Dabei wurden meist autologe, hämatopoetische oder mesenchymale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark nach akutem oder subakutem Myokardinfarkt und interventioneller Revaskularisation mittels Ballondilatation und Stent-Implantation eingesetzt (81-87,102-114). Einige dieser Studien zeigten signifikant positive Effekte auf LVEF, Mortalität und Progression des Herzversagens nach intrakoronarer Zellgabe im Vergleich mit placebobehandelten Patienten (77,102,103). Jedoch gab es auch Arbeitsgruppen, die klare negative Resultate publizierten, in denen keine Unterschiede zwischen zelltherapierten und placebotherapierten Patienten nachweisbar waren (82,84,104) oder nur ein geringer positiver Effekt im Belastungstest beobachtet wurde (81).

Auch für die chronisch ischämische Herzerkrankung wurden Zelltransplantationsstudien entwickelt und durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, entweder intrakoronar (79,80,115,116) oder intramyokardial, transendokardialer Katheterapplikation (117-122) oder transepikardial, während einer chirurgischen Revaskularisation mit aortokoronaren Bypässen verabreicht (94-97,123-128).

Obwohl mit den verwendeten transendokardialen transventrikulären Kathetersystemen, welche zur Zellapplikation oder zum Gentransfer eingesetzt werden, große Teile des LV-Myokards inklusive des interventrikulären Septums erreicht werden können, sind sie in ihrem Einsatz beschränkt. Diese Systeme drehen sich nicht mit dem Herzen, was die Zielgenauigkeit einschränken kann. Der enorme Druck, der bei der Spritzeninjektion durch solche Katheter entsteht, wirkt destabilisierend auf die Katheterspitze und kann zum Abrutschen der Injektionsnadel und damit zu einer Fehlinjektion in den LV beziehungsweise in den

Systemkreislauf führen. Die myokardiale Ausdünnung (< 5 mm), welche nach Herzinfarkten durch Narbenbildungen entsteht, stellt aufgrund der ventrikulären Perforationsgefahr eine Kontraindikation für eine transendokardiale transventrikuläre Zellapplikation dar. Des Weiteren besteht bei einer transventrikulären Katheterinjektion die Gefahr, maligne ventrikuläre Arrhythmien auszulösen. Der transarterielle Zugang, der für diese Applikation benötigt wird, birgt außerdem die Gefahr der iatrogenen Verletzung des arteriellen Systems inklusive einer Aortendissektion. Diese Nachteile der transendokardialen Zelltherapie gaben Anlass zur Eruierung neuer interventioneller Applikationsarten. Nahe liegt da der retrograde Zugang über den Koronarsinus. Mit dem Einsatz des *TransAccess*-Systems lassen sich einige Hürden der transendokardialen, transventrikulären Katheterapplikation überspringen (129). Wir präsentierten die ersten Erfahrungen mit einem neuartigen, katheterbasierten endovaskulären Applikationssystem zur Zellinjektion über das koronarvenöse System. Das *TransAccess*-System benötigt lediglich einen venösen Zugang, so dass Kollateralschäden am arteriellen System eher unwahrscheinlich sind und eigentlich nur durch Fehlfunktion entstehen können. Die expandierbare Nitinol-Nadel und der Mikrolumen-Katheter wurden in koaxialer Richtung mit dem Myokardgewebe vorgeschoben. Hierdurch konnte die Nadel mit dem Mikrolumen-Katheter transvenös (durch die Koronarvenen) tief in den Herzmuskel eingebracht werden und bewegte sich mit dem Herzen. Dies gewährleistete die Stabilität der Nadel bei der Zellinjektion und damit einen geringeren Zellverlust. Die Orientierung innerhalb des Herzens erfolgte mit Hilfe von IVUS, wobei die korrespondierende Koronararterie, das Perikard und die ventrikuläre Kammer als Landmarken dienten. In den Tierexperimenten konnten wir zeigen, dass es mit dieser Methode möglich ist, alle Teile des LV zu erreichen. Diese neue interventionelle Methode der Zelltransplantation hat gegenüber den herkömmlichen katheterbasierten Zugängen einige Vorteile. Ob sie sich durchsetzen wird bleibt abzuwarten.

Wie auch immer, es liegt nahe, dass die direkte intramyokardiale Zellapplikation während eines chirurgischen Eingriffs wie der Anlage von aortokoronaren Bypässen eine einfache, nicht zeitaufwändige Methode ist und somit einen wichtigen Beitrag besonders zur Therapie des chronisch ischämischen Herzens darstellt. Stamm und Kollegen publizierten schon 2003 die erste chirurgische Studie zur begleitenden Stammzelltherapie bei Patienten mit einer Indikation zur koronaren Bypassoperation (96). Sie beobachteten, dass die Gabe von CD133⁺-Zellen zwar nur einen geringen positiven Effekt auf die LV-Kontraktion, dafür aber einen deutlichen Effekt auf die Myokardperfusion hatte. Patel und Kollegen injizierten intraoperativ bei Bypass-Patienten autologe CD34⁺-Zellen intramyokardial und es zeigte sich eine deutliche Verbesserung der LVEF bei den zelltherapierten Patienten (94). Nach diesen initialen Studien zeigte die

Rostocker Arbeitsgruppe, dass 20 Patienten, die zusätzlich zur Bypassoperation CD133⁺-Zellen erhielten, nach 6 Monaten eine signifikant bessere LVEF aufwiesen als 20 Patienten, die nur Bypässe erhielten (97). Auch zeigte sich, dass Patienten mit einer präoperativ deutlich eingeschränkten LV-Funktion mehr von einer Zelltherapie profitieren als die mit einer LVEF > 35 % (97). In dieser nicht blinden Studie wurde jedoch keine Placeboinjektion in der Kontrollgruppe durchgeführt und auch ein MRT war nur bei wenigen Patienten möglich. Dies war der Anlass für unsere Arbeitsgruppe, den Cardio 133 Trial zu initiieren (130). Dieser wurde als randomisierte, doppelblinde und placebokontrollierte Studie durchgeführt. Die Ergebnisse der Studie waren sehr ernüchternd, denn es konnte kein positiver Effekt der applizierten autologen CD133⁺-Knochenmarkzellen auf die LV-Funktion und die klinischen Symptome des Patienten festgestellt werden. Natürlich kann von Kritikern dieser Studie argumentiert werden, dass das untersuchte Patientenkollektiv zu gering war. Aus mehreren Gründen glauben wir jedoch, dass dies nicht der Fall war, da zum einen die Ergebnisse bei allen angewandten Untersuchungsmethoden bzw. bei allen betrachteten Parametern gleichermaßen negativ waren und nicht einmal ein Trend in irgendeinem der Parameter zu beobachten war, der zu einer statistischen Signifikanz geführt hätte, wäre die Patientenkohorte größer gewesen. Zum anderen wurden im Cardio 133 Trial nur Patienten mit einer LVEF < 35 % rekrutiert, von denen man laut der Studie aus Rostock (97) annehmend müsste, dass diese Patienten mehr von einer CD133⁺-Gabe profitieren würden. Dies war jedoch nicht der Fall. Betrachtet man die NYHA-Daten und die Daten aus dem 6-Minuten-Gehtest, so zeigt sich eine größere Erholung der NYHA-Klassifikation und eine kleinere inter-individuelle Variabilität des 6-Minuten Gehtests bei den placebobehandelten Patienten. Beides könnte im Sinne eines besseren Abschneidens der placebobehandelten Patienten interpretiert werden, ist aber mit den LV-Funktionsdaten nicht zu korrelieren.

Warum es trotz positiver Resultate in experimentellen und klinischen Studien zu negativen Ergebnissen im Cardio 133 Trial kam kann unterschiedlichste Ursachen haben. Ein homogenes Problem mit der Transplantation autologer Zellen in der regenerativen Medizin ist die durch das Patientenalter und die Erkrankung eingeschränkte Funktion der Vorläuferzellen (131). Es besteht nicht nur ein negativer Zusammenhang zwischen der Herzerkrankung und der regenerativen Funktion von zirkulierenden oder aus dem Knochenmark gewonnenen Vorläuferzellen, sondern es liegt auch eine eingeschränkte hämatopoetische Stammzellfunktion im alternden Menschen vor. Ob allogene Zellprodukte junger Spender dieses Problem überwinden werden, gilt es erst noch zu beweisen.

Eine weitere Einschränkung unserer Studie könnte die applizierte CD133⁺-Zelldosis gewesen sein. Es wurden im Mittel 5 Millionen Zellen injiziert. Diese Dosis mag unzureichend sein, besonders unter dem Aspekt, dass im vergleichbaren Mäusemodell zur ischämischen Herzerkrankung schon 500.000 bis 1 Millionen Zellen benötigt wurden. Jedoch ist dies die Zellzahl von CD133⁺-Zellen, welche nach einmaliger, unilateraler Beckenkammaspiration unter Lokalanästhesie und MACS gewonnen werden können. Signifikant höhere CD133⁺-Zelldosen konnten nur aus dem im peripheren Blut zirkulierenden Zellen nach Zytokin-induzierter Mobilisation aus dem Knochenmark gewonnen werden (132).

Auch der Zeitpunkt der Zelltransplantation kann zu den Negativergebnissen des Cardio 133 Trials beigetragen haben. Der Zeitpunkt von Bypassoperation und intramyokardialer CD133⁺-Gabe lag bei unseren Patienten im Mittel bei 2,3 Monaten nach dem letzten bekannten Herzinfarkt, zu einem Zeitpunkt also, wo lokale Inflammation und regenerative Signale abklingen.

Weitere Einflussfaktoren können auch die Zusammensetzung des Zellmediums oder die Empfindlichkeit des Empfängerherzens sein. Auch stellt sich in solcherlei Studien immer die Frage nach den gewählten Einschlusskriterien. Vielleicht hätte man mit leicht veränderten Einschlusskriterien wie zum Beispiel jüngeres Alter, geringerer Abstand zum letzten Myokardinfarkt und weniger eingeschränkter LV-Funktion positive Ergebnisse erzielen können, doch glauben wir, dass die von uns gewählten Kriterien ein realistischeres klinisches Szenario widerspiegeln.

Trotz aller Bemühungen, bei der Kombinationstherapie von chirurgischer Revaskularisation und Zelltherapie zwischen den Effekten beider zu unterscheiden, bleibt dies nur schwer möglich und kann, wenn überhaupt, nur in solch einer kontrollierten, randomisierten und blinden Studie erfolgen, in der beide Gruppen gleichermaßen mit Bypässen versorgt werden. Natürlich könnte auch bei inkompletter Revaskularisation und Zellapplikation in die nicht revaskularisierten Areale eine Unterscheidung zwischen Effekt der Zelltherapie und Effekt der Bypasschirurgie möglich sein. Aus unserer Sicht sind solcherlei Daten von untergeordneter Bedeutung, da sie meist nicht die klinische Realität darstellen, in der eine komplette Revaskularisation immer das Ziel ist. Nichtsdestotrotz haben auch wir regionale Veränderungen beobachtet, welche sich möglicherweise auf die Zelltherapie zurückführen lassen. Die myokardiale Perfusion hat sich in mehr LV-Segmenten bei den CD133⁺-zelltherapierten Patienten verbessert als in der Placebogruppe, jedoch korrelierte die verbesserte Perfusion nicht mit den zelltherapierten Segmenten. Ob dieser Effekt durch eine parakrine Wirkung der transplantierten Zellen zu erklären ist, bleibt weiterhin offen.

Die transösophageale Echokardiographie (TEE) hat sich in den letzten 10 Jahren als ein wichtiges Instrument zur peri- und intraoperativen Beurteilung des operativen Erfolges entwickelt und ist inzwischen der Standard in der modernen Herzchirurgie. Eine genaue und reproduzierbare quantitative Einschätzung der regionalen LV-Funktion ist von enormer Wichtigkeit nicht nur zur Beurteilung und den Umgang mit Risikopatienten während herzchirurgischer Eingriffe, sondern auch zur Festlegung der myokardialen Zielareale und der Beurteilung regionaler Effekte bei der Zelltherapie. Die herkömmlichen Methoden zur Auswertung der regionalen Myokardfunktion bedienen sich der visuellen Beurteilung von nach innen gerichteter radialer Bewegungen und der Zunahme der Wanddicke aus zweidimensionalen (2D) echokardiographischen Bildern. Die myokardiale Deformation findet aber während des Herzzyklus in verschiedenen Achsen statt (radial, longitudinal und den Umfang betreffend) (133). Somit hat die qualitative Beurteilung der regionalen Wandbewegung ihre Grenzen, welche besonders von der Erfahrung des Untersuchers abhängen (134). Es wurden bereits die auf der Doppler-Methode basierenden Myokardgeschwindigkeiten *Strain* und *Strain Rate* zur Analyse der regionalen Herzfunktion beschrieben (135). Ein gravierender Vorteil von Strain-Analysen im Gegensatz zur Messung der Myokardgeschwindigkeiten ist, dass eine Differenzierung zwischen der aktiven Bewegung eines Objekts und der passiven Deformation eines Objekts möglich ist (136). Außerdem bedient sich die Strain-Methode stabiler akustischer Signale, den sogenannten *Speckles*, mit dessen Hilfe die Bewegung zwischen zwei Einzelbildern analysiert werden kann (137). Die Methode ist im Gegensatz zu Messungen der Myokardgeschwindigkeit winkel- und geräuschunabhängig (138). Auch wenn diverse Studien die Aussagekraft, Genauigkeit und unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten der Speckle-Tracking-Strain-Analyse aus transthorakalen echokardiographischen Daten untersucht haben, gab es bis 2009 wenig Daten zur intraoperativen Quantifizierung der regionalen LV-Funktion mit dieser Methode. In einer ersten Pilotstudie überprüften wir zum einen, ob die intraoperative Bestimmung von Speckle-Tracking-Strain-Daten aus TEE-Bildern möglich ist und zum anderen, ob diese generierten Daten sich mit qualitativen Wandbewegungsanalysen korrelieren lassen (139). Außerdem wurde die intra- und inter-Beobachtervariabilität bestimmt. Wir konnten zeigen, dass 1) die Speckle-Tracking-Strain-Methode intraoperativ während herzchirurgischer Eingriffe möglich ist, 2) der radiale Strain gut mit dem visuell erhobenen Wandbewegungs-Score (*Wall Motion Score* = WMS) korreliert, der longitudinale Strain, welcher die Verkürzung des Myokards in der langen Achse darstellt, jedoch nur schlecht korreliert und 3) dass die intra- und inter-Beobachtervariabilität bei der Strain-Datenanalyse geringer ausfällt als bei der Analyse des WMS. Als zusätzliche wichtige Beobachtung stellten wir fest, dass die Strain-Analyse

präoperative Kontraktionsdefizite in Wandsegmenten aufspüren kann, welche angiographisch ein Perfusionsdefizit aufweisen. Im Gegensatz dazu waren WMS-Daten nicht in der Lage, zwischen normal perfundierten und ischämischen Segmenten zu unterscheiden. Somit sind die radiale und zu einem geringen Maße auch die longitudinale Strain sensitivere Methoden, solche Funktionsdefizite zu detektieren. Der Grund dafür kann natürlich sein, dass Strain in einer durchgehenden Skala angegeben wird, während der WMS auf einer 4-Kategorien-Skala basiert. Zwar benötigt die Speckle-Tracking-Strain-Analyse die volle Einsehbarkeit der definierten Wandabschnitte sowie qualitativ hochwertige 2D-Bilder mit einer genügend hohen Bildfrequenz (140) und ist zurzeit nur im Offline-Betrieb möglich, kann jedoch dafür nach kurzem Anlernen innerhalb von Minuten durchgeführt werden, ohne dass eine große echokardiographische Erfahrung nötig ist und ohne eine große intra- und inter-Untersuchervariabilität aufzuweisen (140,141). Nach diesen Ergebnissen stellten wir die Hypothese auf, dass mit Speckle-Tracking-Strain-Analysen Zelltherapie-induzierte Veränderungen der regionalen Wandbewegung beobachtet werden können, die von den herkömmlichen echokardiographischen Methoden wie dem WMS übersehen werden (142). Es stellte sich heraus, dass mit beiden Methoden eine Veränderung der regionalen Kontraktion in Wandarealen, die nicht mit Zellen behandelt wurden, festzustellen war, welche heterogen waren, sich aber durch die Bypassoperation erklären lassen. In den zellbehandelten Wandabschnitten zeigte sich jedoch, dass die Speckle-Tracking-Strain-Echokardiographie im Gegensatz zum WMS eine deutliche Verbesserung der Kontraktion aufzeigt. Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Speckle-Tracking-Strain-Echokardiographie ein gutes Instrument zur Evaluation der Effekte von Zelltherapie am Herzen ist. Zwar ist die Magnetresonanztomographie (MRT) immer noch der Goldstandard zur Messung der globalen und regionalen Kontraktilität, doch ist sie zeit- und kostenintensiv und einer Reihe von Patienten nicht zugänglich, beispielsweise ICD- und Schrittmacherträgern beziehungsweise Patienten mit Platzangst, die nicht in die MRT-Röhre gelegt werden können. Die Speckle-Tracking-Strain-Echokardiographie hingegen ist in der Lage, auch eine zugrundeliegende komplizierte Pathologie aufzudecken, die Myokardfunktion zu quantifizieren und langsame Veränderungen über einen längeren Zeitraum zu detektieren (143). Letzteres ist besonders bei der kardialen Zelltherapie hilfreich. In den meisten klinischen Zellstudien zur Regeneration des Herzens erfolgte eine Zellgabe katheterunterschützt. Dabei werden die Zellen relativ gleichmäßig im Koronarsystem verteilt. Bei solcherlei Studien mag die globale LVEF ein guter Erfolgsparameter beziehungsweise *Surrogate* sein und die regionale Wandbewegung eine untergeordnete Rolle spielen. Bei der intraoperativen intramyokardialen Zellapplikation werden die Zellen nur regional verabreicht. Neben unseren Studien (130,142) konnten auch andere

Studien, bei denen BMCs verabreicht wurden, keine zusätzliche zur üblicherweise nach einer Bypassoperation zu erwartenden Verbesserung der globalen LVEF feststellen. Unsere Daten zeigen deutlich, dass die intramyokardiale BMC-Therapie die regionale Wandbewegung von infarziertem Myokard verbessert, der Effekt jedoch scheinbar zu gering ist, als dass er sich auf die globale LVEF überträgt (142). Diese Beobachtung geht auch mit den Ergebnissen aus dem Cardio 133 Trial konform, wo sich zeigte, dass sich die regionale Wandbewegung nur dann deutlich verbesserte, wenn das Infarktareal und damit auch die Zellapplikation an der Hinterwand des LV lag. Grund dafür ist wahrscheinlich, dass bei einem Vorderwandinfarkt meist große Teile des interventrikulären Septums mitbetroffen sind, welches jedoch durch eine transepikardiale Zellgabe nicht erreichbar ist und dadurch unbehandelt bleibt. Zwar glauben wir, dass auch dieses Phänomen zu den negativen Ergebnissen des Cardio 133 Trial beigetragen hat, andererseits zeigen die Ergebnisse des FOCUS-CCTRN Trial (120), dass es auch nach transendokardialer Gabe von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark zu keiner messbaren Verbesserung der regionalen Wandbewegung oder Perfusion kam, obwohl alle Wände inklusive des Septums mit dieser Methode erreicht werden. Die intrakoronare Zellinjektion nach einem Vorderwandinfarkt kann aber zu einer Verbesserung der regionalen Kontraktilität und Narbengröße führen. Diese Beobachtungen machten Assmus und Kollegen nach intrakoronarer MNCs-Gabe und gezielter Schockwellentherapie (144).

Abgesehen von der akuten und chronischen Herzerkrankung gibt es nur wenig klinische Erfahrung mit dem Einsatz von Zellprodukten zur Regeneration von nicht ischämischen Herzkrankheiten (145-148). In der ersten, 2007 publizierten Pilotstudie mit Patienten, die eine dekompensierte idiopathische dilatative Kardiomyopathie hatten und ein LVAD benötigten (147), war die Hypothese, dass die Wahrscheinlichkeit der Entwöhnung vom LVAD mittels autologer MNCs verbessert werden kann. Diese Hypothese konnte jedoch nicht bestätigt werden. Zwar war eine Explantation des LVAD nach 122 Tagen schon bei unserem ersten Patienten erfolgreich, doch bei den 9 darauffolgenden Patienten war eine Explantation wegen der ungenügenden Erholung des LV nicht möglich. Gründe für das Erholungspotential des Myokards, welches der erste Patient zeigte, waren unter anderem sein junges Alter (14 Jahre, der jüngste der 10 Patienten) und der Umstand, dass es sich retrospektiv gesehen wahrscheinlich um ein postinflammatorisches Herzversagen mit akuter Dekompensation handelte. Nach den vorliegenden Daten weiß man, dass bei Kindern mit Herzversagen, besonders mit einer ursächlichen Myokarditis, die besten Erholungschancen und damit auch die besten Chancen einer erfolgreichen LVAD-Explantation bestehen (149). Auch der Langzeiterfolg nach LVAD-Explantation bis zu 9 Jahren wurde beschrieben (150). Eine Erholung und eine erfolgreiche

Entwöhnung vom LVAD bei idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie (149) und in seltenen Fällen sogar bei einer ischämischen Kardiomyopathie wurden ebenfalls beschrieben. Der Mechanismus der myokardialen Erholung ist nach wie vor unzureichend verstanden, jedoch zeigte sich, dass eine adjuvante Therapie diese fördern kann. So sollen Immunabsorption, medikamentöse Therapie und die Gabe von Antioxidantien und Mikroelementen (151) oder auch die Gabe von Glenbuterol (152) die kardiale Erholung bei myokardialer Entlastung durch ein LVAD gefördert haben. Das strukturelle und funktionelle Remodeling des LV beim Herzversagen ist auch auf ein Ungleichgewicht zwischen extrazellulärem Gewebe und den Zellkomponenten, in erster Linie zugrunde gehende Kardiomyozyten, zurückzuführen. Ist dieses empfindliche Gleichgewicht erst einmal gestört, führt dies zu einem zunehmenden Pumpversagen beziehungsweise zur erhöhten Belastung des Herzens, welches wiederum das Gleichgewicht noch weiter negativ beeinflusst. Dieser *circulus vitiosus* kann durch die Implantation eines LVAD erfolgreich durchbrochen werden und gewährleistet primär das Überleben des Patienten und eröffnet sekundär die Chance zur myokardialen Erholung, sofern das Herz noch in der Lage ist, dieses Gleichgewicht wieder herzustellen. Untergegangene Kardiomyozyten können nicht ersetzt werden beziehungsweise werden es nur in unzureichendem Maße, es sei denn, dies würde durch eine Zelltherapie geschehen. Vielmehr findet eine Defektheilung statt, in der die restlichen Kardiomyozyten moderat hypertrophieren und der interzelluläre Raum mit extrazellulärer Matrix aufgefüllt wird. Dieses histologische Bild zeigte sich auch in unserem LVAD-explantierten Patienten. Solch eine myokardiale Erholung, besonders in Hinblick auf LV-Geometrie und -Funktion, Zytokinpiegel, Kollagenanteil und Myozytengröße, wurde schon zuvor unter LVAD-Unterstützung nachgewiesen (153-156). Ob und in welchem Ausmaß die beobachteten histologischen Veränderungen in unserem vom LVAD entwöhnten Patienten auf die Zelltherapie zurückzuführen ist bleibt ungeklärt. Von besonderem Interesse sind die beobachteten histologischen Befunde unter dem Aspekt, dass das Fortschreiten der myokardialen Fibrose ein Hinweis für das Fortschreiten der Erkrankung ist (157). Zwar gab es schon Hinweise, dass Knochenmarkvorläuferzellen den extrazellulären Bindegewebsstoffwechsel verändern können und sich dadurch möglicherweise die Herzfunktion verbessert (158), doch ist bisher nicht bekannt, ob eine Zunahme der interstitiellen Fibrose zum Vorteil oder Schaden der Herzfunktion beiträgt. Auch wenn der große Enthusiasmus abgeebbt ist, Skelettmyoblasten zur Regeneration am Herzen einzusetzen, hat der Einsatz dieser Zellen bei LAVD-Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie doch wichtige Informationen zum Verhalten der Zellen im humanen Herzen erbracht (159). Auch wenn die Zelltherapie mit MNCs in unserer kleinen LVAD-Pilotstudie (147) zu keiner klinischen Verbesserung der Herzfunktion

und damit auch nicht sonderlich zum Vorteil der Patienten beigetragen hat, so kann sie doch als ein sicheres Modell zum klinischen Testen ausgearbeiteter und vielleicht auch effizienterer Zellprodukte dienen.

4. Schlussfolgerung

Der initiale Enthusiasmus und die großen Hoffnungen, welche durch die ersten experimentellen und zum Teil auch klinischen Studien bezüglich der kardialen Zelltherapie ausgelöst wurden, ist zunehmend gedämpft. Zu simpel waren und sind zum Teil die Vorstellung der Regeneration des Herzens, stimuliert durch die klinischen Erfolge anderer Fachdisziplinen. Die Komplexität des Herzens wurde schlichtweg unterschätzt. Obwohl in den letzten Jahrzehnten riesige Erfolge bei dem Verständnis von Entwicklung, Aufbau und Zusammenspiel unterschiedlicher Zelltypen im Herzen erzielt wurden, stehen wir dennoch am Anfang.

Der frühe klinische Einsatz von Knochenmarkszellen zur Therapie kardialer Erkrankungen wurde besonders von den Grundlagenforschern stark kritisiert. Doch sollte man verstehen, dass Kliniker ein großes Interesse haben, ihren Patienten neuere und damit vielleicht auch bessere Therapieoptionen anzubieten, immer in der Hoffnung, eine effektive und kurative Therapie zu etablieren. Nichtsdestotrotz muss der Arzt immer zwischen dem Wohl des Patienten und den Erkenntnissen aus neuen Therapien abwägen. So wird auch verständlich, dass in erster Linie einfache Zellprodukte, wie sie mit MNCs und angereicherten Knochenmarkszellen zur Verfügung stehen, zum klinischen Einsatz kamen, bevor nun womöglich zunehmend komplexere, aber auch potentere Zellprodukte zum klinischen Einsatz kommen werden. Obwohl wir im Cardio 133 Trial einige lokale Myokardveränderungen detektieren konnten, welche darauf hindeuten, dass die kardiale Zelltherapie Einfluss auf die Regeneration des Herzens nimmt, hat die intramyokardiale Applikation von autologen CD133+-Zellen keinen zusätzlichen klinisch relevanten Einfluss nach einer Bypassoperation. Dies mag nicht verwundern in der Erkenntnis der Irreversibilität des chronischen Herzversagens und des nicht-myogenen Charakters von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Knochenmark. Obwohl die systematische Evaluation autologer Stammzellprodukte aus dem Knochenmark noch nicht als beendet angesehen werden kann, ist es doch fraglich, ob diese eine kurative Therapie beim akuten oder chronischen Herzversagen darstellen werden. Andererseits schreitet die Technologie zur Herstellung von ESC- und iPS-Zellprodukten weiter voran, und die sich dadurch auftuenden Möglichkeiten geben Anlass zur Hoffnung auf eine effektivere Zelltherapie zur kardialen Regeneration.

Dabei sollte die biologische, medizinische und regulatorische Komplexität nicht außer Acht gelassen werden. Es bedarf großer interdisziplinärer Anstrengungen, neue und effektivere Zellprodukte in der Klinik zur Anwendung zu bringen. Sollte dies gelingen wird die Zelltherapie zur Regeneration von Organfunktionen einen Wandel des klinischen Denkens und Handelns nicht nur im kardiovaskulären Bereich, sondern in der gesamten Medizin bewirken. Auf der Strasse des Erfolges wurden schon immer viele Hindernisse übersprungen und große Rückschläge erlitten, und es werden weitere folgen. Zu den fundamentalsten Fragen gehört sicherlich die Frage, warum das Herz, wenn es doch über eine Anzahl gewebespezifischer Stammzellen verfügt, nicht in der Lage ist, komplett zu regenerieren. Bei dieser und all den anderen offenen Fragen dürfen wir nicht vergessen, dass die zellbasierte kardiale Regeneration erst seit zwei Dekaden intensiver evaluiert wird. Es kann nicht vorausgesehen werden, ob unsere Anstrengungen zu erfolgreicheren, effizienteren und sichereren regenerativen Therapieoptionen führen werden, doch die revolutionären Aussichten sind es wert, unsere Anstrengungen zu intensivieren.

5. Literaturverzeichnis

1. Eaton LW, Weiss JL, Bulkley BH, Garrison JB, Weisfeldt ML. Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography. *N Engl J Med* 1979;300:57-62.
2. Erlebacher JA, Weiss JL, Eaton LW, Kallman C, Weisfeldt ML, Bulkley BH. Late effects of acute infarct dilation on heart size: a two dimensional echocardiographic study. *Am J Cardiol* 1982;49:1120-6.
3. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, Markis JE, Come PC, Nakao S, Alderman JD, Ferguson JJ, Safian RD, Grossman W. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986;74:693-702.
4. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 2000;101:2981-8.
5. White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PW, Whitlock RM, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation* 1987;76:44-51.
6. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Jr., Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, et al. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators. *N Engl J Med* 1992;327:669-77.
7. GISSI-3: effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6-week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'infarto Miocardico. *Lancet* 1994;343:1115-22.
8. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
9. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, Kearney M, Chen D, Symes JF, Fishman MC, Huang PL, Isner JM. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101:2567-78.
10. Kim NN, Villegas S, Summerour SR, Villarreal FJ. Regulation of cardiac fibroblast extracellular matrix production by bradykinin and nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 1999;31:457-66.
11. Ritchie RH, Schiebinger RJ, LaPointe MC, Marsh JD. Angiotensin II-induced hypertrophy of adult rat cardiomyocytes is blocked by nitric oxide. *Am J Physiol* 1998;275:H1370-4.

12. Cotter G, Kaluski E, Blatt A, Milovanov O, Moshkovitz Y, Zaidenstein R, Salah A, Alon D, Michovitz Y, Metzger M, Vered Z, Golik A. L-NMMA (a nitric oxide synthase inhibitor) is effective in the treatment of cardiogenic shock. *Circulation* 2000;101:1358-61.
13. Takemoto M, Egashira K, Usui M, Numaguchi K, Tomita H, Tsutsui H, Shimokawa H, Sueishi K, Takeshita A. Important role of tissue angiotensin-converting enzyme activity in the pathogenesis of coronary vascular and myocardial structural changes induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. *J Clin Invest* 1997;99:278-87.
14. Wildhirt SM, Suzuki H, Horstman D, Weismuller S, Dudek RR, Akiyama K, Reichart B. Selective modulation of inducible nitric oxide synthase isozyme in myocardial infarction. *Circulation* 1997;96:1616-23.
15. Scherrer-Crosbie M, Ullrich R, Bloch KD, Nakajima H, Nasser B, Aretz HT, Lindsey ML, Vancon AC, Huang PL, Lee RT, Zapol WM, Picard MH. Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 2001;104:1286-91.
16. Bauersachs J, Galuppo P, Fraccarollo D, Christ M, Ertl G. Improvement of left ventricular remodeling and function by hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibition with cerivastatin in rats with heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2001;104:982-5.
17. Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8880-5.
18. Jones SP, Gibson MF, Rimmer DM, 3rd, Gibson TM, Sharp BR, Lefer DJ. Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1172-8.
19. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000;6:1004-10.
20. Mital S, Zhang X, Zhao G, Bernstein RD, Smith CJ, Fulton DL, Sessa WC, Liao JK, Hintze TH. Simvastatin upregulates coronary vascular endothelial nitric oxide production in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H2649-57.
21. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001;108:391-7.

22. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002;105:3017-24.
23. Jones SP, Girod WG, Palazzo AJ, Granger DN, Grisham MB, Jourd'Heuil D, Huang PL, Lefer DJ. Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 1999;276:H1567-73.
24. Jones SP, Trocha SD, Lefer DJ. Pretreatment with simvastatin attenuates myocardial dysfunction after ischemia and chronic reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:2059-64.
25. Lefer DJ, Scalia R, Jones SP, Sharp BR, Hoffmeyer MR, Farvid AR, Gibson MF, Lefer AM. HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2001;15:1454-6.
26. Wolfrum S, Grimm M, Heidbreder M, Dendorfer A, Katus HA, Liao JK, Richardt G. Acute reduction of myocardial infarct size by a hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitor is mediated by endothelial nitric oxide synthase. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003;41:474-80.
27. Weinberg EO, Scherrer-Crosbie M, Picard MH, Nasser BA, MacGillivray C, Gannon J, Lian Q, Bloch KD, Lee RT. Rosuvastatin reduces experimental left ventricular infarct size after ischemia-reperfusion injury but not total coronary occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1802-9.
28. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow--derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 2001;108:399-405.
29. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001;103:2885-90.
30. Konstam MA, Udelson JE, Anand IS, Cohn JN. Ventricular remodeling in heart failure: a credible surrogate endpoint. *J Card Fail* 2003;9:350-3.
31. Anand IS, Florea VG, Fisher L. Surrogate end points in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:1414-21.
32. Murray G, Holden R. Transplantation of kidneys, experimentally and in human cases. *Am J Surg* 1954;87:508-15.
33. Barnard CN. Human cardiac transplantation. An evaluation of the first two operations performed at the Groote Schuur Hospital, Cape Town. *Am J Cardiol* 1968;22:584-96.

34. Eurotransplant. Eurotransplant Statistics 2012, 2012. [2014/05/15]; at http://eurotransplant.org/cms/mediaobject.php?file=year_2012.pdf.
35. Sayer G, Naka Y, Jorde UP. Ventricular assist device therapy. *Cardiovasc Ther* 2009;27:140-50.
36. Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA, Russell SD, Conte JV, Feldman D, Sun B, Tatroles AJ, Delgado RM, 3rd, Long JW, Wozniak TC, Ghumman W, Farrar DJ, Frazier OH. Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device. *N Engl J Med* 2009;361:2241-51.
37. Rota M, Hosoda T, De Angelis A, Arcarese ML, Esposito G, Rizzi R, Tillmanns J, Tugal D, Musso E, Rimoldi O, Bearzi C, Urbanek K, Anversa P, Leri A, Kajstura J. The young mouse heart is composed of myocytes heterogeneous in age and function. *Circ Res* 2007;101:387-99.
38. Bittmann I, Hentrich M, Bise K, Kolb HJ, Lohrs U. Endothelial cells but not epithelial cells or cardiomyocytes are partially replaced by donor cells after allogeneic bone marrow and stem cell transplantation. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;12:359-66.
39. 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.
40. Jiang S, Walker L, Afentoulis M, Anderson DA, Jauron-Mills L, Corless CL, Fleming WH. Transplanted human bone marrow contributes to vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:16891-6.
41. Minami E, Laflamme MA, Saffitz JE, Murry CE. Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart. *Circulation* 2005;112:2951-8.
42. 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.
43. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003;114:763-76.
44. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, Nakamura T, Gaussin V, Mishina Y, Pocius J, Michael LH, Behringer RR, Garry DJ, Entman ML, Schneider MD. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12313-8.

45. Oyama T, Nagai T, Wada H, Naito AT, Matsuura K, Iwanaga K, Takahashi T, Goto M, Mikami Y, Yasuda N, Akazawa H, Uezumi A, Takeda S, Komuro I. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol* 2007;176:329-41.
46. Torella D, Ellison GM, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Growth-factor-mediated cardiac stem cell activation in myocardial regeneration. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007;4 Suppl 1:S46-51.
47. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, Yasuzawa-Amano S, Trofimova I, Siggins RW, Lecapitaine N, Cascapera S, Beltrami AP, D'Alessandro DA, Zias E, Quaini F, Urbanek K, Michler RE, Bolli R, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Human cardiac stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:14068-73.
48. Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S, Chien KR. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 2005;433:647-53.
49. Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, Salio M, Battaglia M, Latronico MV, Coletta M, Vivarelli E, Frati L, Cossu G, Giacomello A. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res* 2004;95:911-21.
50. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, Giacomello A, Abraham MR, Marban E. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation* 2007;115:896-908.
51. Du YY, Zhou SH, Zhou T, Su H, Pan HW, Du WH, Liu B, Liu QM. Immuno-inflammatory regulation effect of mesenchymal stem cell transplantation in a rat model of myocardial infarction. *Cytotherapy* 2008;10:469-78.
52. Jin B, Luo XP, Ni HC, Li Y, Shi HM. Cardiac matrix remodeling following intracoronary cell transplantation in dilated cardiomyopathic rabbits. *Mol Biol Rep* 2010;37:3037-42.
53. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. 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.
54. Molina EJ, Palma J, Gupta D, Torres D, Gaughan JP, Houser S, Macha M. Reverse remodeling is associated with changes in extracellular matrix proteases and tissue inhibitors after mesenchymal stem cell (MSC) treatment of pressure overload hypertrophy. *J Tissue Eng Regen Med* 2009;3:85-91.
55. Stamm C, Nasser B, Choi YH, Hetzer R. Cell therapy for heart disease: great expectations, as yet unmet. *Heart Lung Circ* 2009;18:245-56.

56. Chiu RC, Zibaitis A, Kao RL. Cellular cardiomyoplasty: myocardial regeneration with satellite cell implantation. *Ann Thorac Surg* 1995;60:12-8.
57. Leor J, Patterson M, Quinones MJ, Kedes LH, Kloner RA. Transplantation of fetal myocardial tissue into the infarcted myocardium of rat. A potential method for repair of infarcted myocardium? *Circulation* 1996;94:II332-6.
58. Marelli D, Desrosiers C, el-Alfy M, Kao RL, Chiu RC. Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplant* 1992;1:383-90.
59. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, Schwartz K, Vilquin JT, Marolleau JP. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279-80.
60. Dib N, Michler RE, Pagani FD, Wright S, Kereiakes DJ, Lengerich R, Binkley P, Buchele D, Anand I, Swingen C, Di Carli MF, Thomas JD, Jaber WA, Opie SR, Campbell A, McCarthy P, Yeager M, Dilsizian V, Griffith BP, Korn R, Kreuger SK, Ghazoul M, MacLellan WR, Fonarow G, Eisen HJ, Dinsmore J, Diethrich E. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* 2005;112:1748-55.
61. Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti JP, Fauza DO. Postnatal myocardial augmentation with skeletal myoblast-based fetal tissue engineering. *Surgery* 2006;140:100-7.
62. Torella D, Ellison GM, Karakikes I, Nadal-Ginard B. Resident cardiac stem cells. *Cell Mol Life Sci* 2007;64:661-73.
63. Limana F, Zacheo A, Mocini D, Mangoni A, Borsellino G, Diamantini A, De Mori R, Battistini L, Vigna E, Santini M, Loiaconi V, Pompilio G, Germani A, Capogrossi MC. Identification of myocardial and vascular precursor cells in human and mouse epicardium. *Circ Res* 2007;101:1255-65.
64. Behfar A, Zingman LV, Hodgson DM, Rauzier JM, Kane GC, Terzic A, Puceat M. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J* 2002;16:1558-66.
65. Behfar A, Perez-Terzic C, Faustino RS, Arrell DK, Hodgson DM, Yamada S, Puceat M, Niederlander N, Alekseev AE, Zingman LV, Terzic A. Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *J Exp Med* 2007;204:405-20.
66. Dai W, Field LJ, Rubart M, Reuter S, Hale SL, Zweigerdt R, Graichen RE, Kay GL, Jyrala AJ, Colman A, Davidson BP, Pera M, Kloner RA. Survival and maturation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 2007;43:504-16.
67. Menard C, Hagege AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Puceat M, Menasche P. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 2005;366:1005-12.

68. Byrne JA, Pedersen DA, Clepper LL, Nelson M, Sanger WG, Gokhale S, Wolf DP, Mitalipov SM. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 2007;450:497-502.
69. Guan K, Wagner S, Unsold B, Maier LS, Kaiser D, Hemmerlein B, Nayernia K, Engel W, Hasenfuss G. Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 2007;100:1615-25.
70. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6:230-47.
71. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276:71-4.
72. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999;103:697-705.
73. Hattan N, Kawaguchi H, Ando K, Kuwabara E, Fujita J, Murata M, Suematsu M, Mori H, Fukuda K. Purified cardiomyocytes from bone marrow mesenchymal stem cells produce stable intracardiac grafts in mice. *Cardiovasc Res* 2005;65:334-44.
74. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002;105:93-8.
75. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
76. 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;428:664-8.
77. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, Fichtner S, Korte T, Hornig B, Messinger D, Arseniev L, Hertenstein B, Ganser A, Drexler H. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004;364:141-8.
78. 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;113:1287-94.

79. Assmus B, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Tonn T, Seifried E, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of functionally competent BMCs is associated with a decrease in natriuretic peptide serum levels and improved survival of patients with chronic postinfarction heart failure: results of the TOPCARE-CHD Registry. *Circ Res* 2007;100:1234-41.
80. Assmus B, Honold J, Schachinger V, Britten MB, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Teupe C, Pistorius K, Martin H, Abolmaali ND, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1222-32.
81. Beitnes JO, Hopp E, Lunde K, Solheim S, Arnesen H, Brinchmann JE, Forfang K, Aakhus S. Long-term results after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: the ASTAMI randomised, controlled study. *Heart* 2009;95:1983-9.
82. 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;367:113-21.
83. Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schachinger V, Lehmann R, Martin H, Burck I, Urbich C, Dimmeler S, Zeiher AM, Assmus B. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol* 2011;100:925-34.
84. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Fjeld JG, Smith HJ, Taraldsrud E, Groggaard HK, Bjornerheim R, Brekke M, Muller C, Hopp E, Ragnarsson A, Brinchmann JE, Forfang K. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1199-209.
85. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Moum T, Abdelnoor M, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Forfang K. Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) randomized controlled trial. *Am Heart J* 2007;154:710 e1-8.
86. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Suselbeck T, Assmus B, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2006;355:1210-21.

87. Surder D, Manka R, Lo Cicero V, Moccetti T, Rufibach K, Soncin S, Turchetto L, Radrizzani M, Astori G, Schwitter J, Erne P, Zuber M, Auf der Maur C, Jamshidi P, Gaemperli O, Windecker S, Moschovitis A, Wahl A, Buhler I, Wyss C, Kozerke S, Landmesser U, Luscher TF, Corti R. Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function. *Circulation* 2013;127:1968-79.
88. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, Chojnowska L, Kepka C, Tracz W, Musialek P, Piwowarska W, Nessler J, Buszman P, Grajek S, Breborowicz P, Majka M, Ratajczak MZ. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. *Eur Heart J* 2009;30:1313-21.
89. Perin EC, Dohmann HF, Borojevic R, Silva SA, Sousa AL, Silva GV, Mesquita CT, Belem L, Vaughn WK, Rangel FO, Assad JA, Carvalho AC, Branco RV, Rossi MI, Dohmann HJ, Willerson JT. Improved exercise capacity and ischemia 6 and 12 months after transendocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2004;110:II213-8.
90. Brehm M, Strauer BE. Stem cell therapy in postinfarction chronic coronary heart disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;3 Suppl 1:S101-4.
91. Galinanes M, Loubani M, Davies J, Chin D, Pasi J, Bell PR. Autotransplantation of unmanipulated bone marrow into scarred myocardium is safe and enhances cardiac function in humans. *Cell Transplant* 2004;13:7-13.
92. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990;11:231-8.
93. Erbs S, Linke A, Adams V, Lenk K, Thiele H, Diederich KW, Emmrich F, Kluge R, Kendziorra K, Sabri O, Schuler G, Hambrecht R. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res* 2005;97:756-62.
94. Patel AN, Geffner L, Vina RF, Saslavsky J, Urschel HC, Jr., Kormos R, Benetti F. Surgical treatment for congestive heart failure with autologous adult stem cell transplantation: a prospective randomized study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1631-8.
95. Stamm C, Kleine HD, Westphal B, Petzsch M, Kittner C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction. *Thorac Cardiovasc Surg* 2004;52:152-8.
96. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, Petzsch M, Kittner C, Klinge H, Schumichen C, Nienaber CA, Freund M, Steinhoff G. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003;361:45-6.

97. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, David A, Liebold A, Nienaber C, Zurakowski D, Freund M, Steinhoff G. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;133:717-25.
98. Yerebakan C, Kaminski A, Westphal B, Donndorf P, Glass A, Liebold A, Stamm C, Steinhoff G. Impact of preoperative left ventricular function and time from infarction on the long-term benefits after intramyocardial CD133(+) bone marrow stem cell transplant. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2011;142:1530-9.
99. Nicola NA, Begley CG, Metcalf D. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature* 1985;314:625-8.
100. Duhrsen U, Villeval JL, Boyd J, Kannourakis G, Morstyn G, Metcalf D. Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood* 1988;72:2074-81.
101. Losordo DW, Schatz RA, White CJ, Udelson JE, Veereshwarayya V, Durgin M, Poh KK, Weinstein R, Kearney M, Chaudhry M, Burg A, Eaton L, Heyd L, Thorne T, Shturman L, Hoffmeister P, Story K, Zak V, Dowling D, Traverse JH, Olson RE, Flanagan J, Sodano D, Murayama T, Kawamoto A, Kusano KF, Wollins J, Welt F, Shah P, Soukas P, Asahara T, Henry TD. Intramyocardial transplantation of autologous CD34+ stem cells for intractable angina: a phase I/IIa double-blind, randomized controlled trial. *Circulation* 2007;115:3165-72.
102. Assmus B, Leistner DM, Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Sedding D, Yu J, Corti R, Mathey DG, Barth C, Mayer-Wehrstein C, Burck I, Sueselbeck T, Dill T, Hamm CW, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Long-term clinical outcome after intracoronary application of bone marrow-derived mononuclear cells for acute myocardial infarction: migratory capacity of administered cells determines event-free survival. *Eur Heart J* 2014.
103. Assmus B, Rolf A, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Tillmanns H, Yu J, Corti R, Mathey DG, Hamm CW, Sueselbeck T, Tonn T, Dimmeler S, Dill T, Zeiher AM, Schachinger V. Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail* 2010;3:89-96.
104. Beitnes JO, Gjesdal O, Lunde K, Solheim S, Edvardsen T, Arnesen H, Forfang K, Aakhus S. Left ventricular systolic and diastolic function improve after acute myocardial infarction treated with acute percutaneous coronary intervention, but are not influenced by intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: a 3 year serial echocardiographic sub-study of the randomized-controlled ASTAMI study. *Eur J Echocardiogr* 2011;12:98-106.

105. Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Fichtlscherer S, Schachinger V, Dimmeler S, Zeiher AM, Assmus B. Early remodeling processes as predictors of diastolic function 5 years after reperfused acute myocardial infarction and intracoronary progenitor cell application. *Clin Res Cardiol* 2012;101:209-16.
106. Herbots L, D'Hooge J, Eroglu E, Thijs D, Ganame J, Claus P, Dubois C, Theunissen K, Bogaert J, Dens J, Kalantzi M, Dymarkowski S, Bijmens B, Belmans A, Boogaerts M, Sutherland G, Van de Werf F, Rademakers F, Janssens S. Improved regional function after autologous bone marrow-derived stem cell transfer in patients with acute myocardial infarction: a randomized, double-blind strain rate imaging study. *Eur Heart J* 2009;30:662-70.
107. Lunde K, Solheim S, Forfang K, Arnesen H, Brinch L, Bjornerheim R, Ragnarsson A, Egeland T, Endresen K, Ilebakk A, Mangschau A, Aakhus S. Anterior myocardial infarction with acute percutaneous coronary intervention and intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells: safety, clinical outcome, and serial changes in left ventricular function during 12-months' follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2008;51:674-6.
108. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Pirr J, Rager U, Lippolt P, Hahn A, Fichtner S, Schaefer A, Arseniev L, Ganser A, Drexler H. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J* 2009;30:2978-84.
109. Schachinger V, Assmus B, Honold J, Lehmann R, Hofmann WK, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. Normalization of coronary blood flow in the infarct-related artery after intracoronary progenitor cell therapy: intracoronary Doppler substudy of the TOPCARE-AMI trial. *Clin Res Cardiol* 2006;95:13-22.
110. Schaefer A, Zwadlo C, Fuchs M, Meyer GP, Lippolt P, Wollert KC, Drexler H. Long-term effects of intracoronary bone marrow cell transfer on diastolic function in patients after acute myocardial infarction: 5-year results from the randomized-controlled BOOST trial--an echocardiographic study. *Eur J Echocardiogr* 2010;11:165-71.
111. Surder D, Schwitter J, Moccetti T, Astori G, Rufibach K, Plein S, Lo Cicero V, Soncin S, Windecker S, Moschovitis A, Wahl A, Erne P, Jamshidi P, Auf der Maur C, Manka R, Soldati G, Buhler I, Wyss C, Landmesser U, Luscher TF, Corti R. Cell-based therapy for myocardial repair in patients with acute myocardial infarction: rationale and study design of the SWISS multicenter Intracoronary Stem cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI). *Am Heart J* 2010;160:58-64.

112. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, Forder JR, Anderson RD, Hatzopoulos AK, Penn MS, Perin EC, Chambers J, Baran KW, Raveendran G, Lambert C, Lerman A, Simon DI, Vaughan DE, Lai D, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Thomas JD, Olson RE, Bowman S, Francescon J, Geither C, Handberg E, Kappenman C, Westbrook L, Piller LB, Simpson LM, Baraniuk S, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Spoon DB, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moye LA, Simari RD. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *JAMA* 2012;308:2380-9.
113. Traverse JH, Henry TD, Vaughan DE, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Simpson LM, Penn MS, Byrne BJ, Perin EC, Gee AP, Hatzopoulos AK, McKenna DH, Forder JR, Taylor DA, Cogle CR, Baraniuk S, Olson RE, Jorgenson BC, Sayre SL, Vojvodic RW, Gordon DJ, Skarlatos SI, Moye LA, Simari RD. LateTIME: a phase-II, randomized, double-blinded, placebo-controlled, pilot trial evaluating the safety and effect of administration of bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks after acute myocardial infarction. *Tex Heart Inst J* 2010;37:412-20.
114. Traverse JH, McKenna DH, Harvey K, Jorgenson BC, Olson RE, Bostrom N, Kadidlo D, Lesser JR, Jagadeesan V, Garberich R, Henry TD. Results of a phase 1, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of bone marrow mononuclear stem cell administration in patients following ST-elevation myocardial infarction. *Am Heart J* 2010;160:428-34.
115. Honold J, Fischer-Rasokat U, Lehmann R, Leistner DM, Seeger FH, Schachinger V, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM, Assmus B. G-CSF stimulation and coronary reinfusion of mobilized circulating mononuclear proangiogenic cells in patients with chronic ischemic heart disease: five-year results of the TOPCARE-G-CSF trial. *Cell Transplant* 2012;21:2325-37.
116. Honold J, Fischer-Rasokat U, Seeger FH, Leistner D, Lotz S, Dimmeler S, Zeiher AM, Assmus B. Impact of intracoronary reinfusion of bone marrow-derived mononuclear progenitor cells on cardiopulmonary exercise capacity in patients with chronic postinfarction heart failure. *Clin Res Cardiol* 2013;102:619-25.
117. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, Tracy M, Ghersin E, Johnston PV, Brinker JA, Breton E, Davis-Sproul J, Schulman IH, Byrnes J, Mendizabal AM, Lowery MH, Rouy D, Altman P, Wong Po Foo C, Ruiz P, Amador A, Da Silva J, McNiece IK, Heldman AW, George R, Lardo A. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 2012;308:2369-79.

118. Heldman AW, DiFede DL, Fishman JE, Zambrano JP, Trachtenberg BH, Karantalis V, Mushtaq M, Williams AR, Suncion VY, McNiece IK, Ghersin E, Soto V, Lopera G, Miki R, Willens H, Hendel R, Mitrani R, Pattany P, Feigenbaum G, Oskouei B, Byrnes J, Lowery MH, Sierra J, Pujol MV, Delgado C, Gonzalez PJ, Rodriguez JE, Bagno LL, Rouy D, Altman P, Foo CW, da Silva J, Anderson E, Schwarz R, Mendizabal A, Hare JM. Transendocardial mesenchymal stem cells and mononuclear bone marrow cells for ischemic cardiomyopathy: the TAC-HFT randomized trial. *JAMA* 2014;311:62-73.
119. Trachtenberg B, Velazquez DL, Williams AR, McNiece I, Fishman J, Nguyen K, Rouy D, Altman P, Schwarz R, Mendizabal A, Oskouei B, Byrnes J, Soto V, Tracy M, Zambrano JP, Heldman AW, Hare JM. Rationale and design of the Transendocardial Injection of Autologous Human Cells (bone marrow or mesenchymal) in Chronic Ischemic Left Ventricular Dysfunction and Heart Failure Secondary to Myocardial Infarction (TAC-HFT) trial: A randomized, double-blind, placebo-controlled study of safety and efficacy. *Am Heart J* 2011;161:487-93.
120. Perin EC, Willerson JT, Pepine CJ, Henry TD, Ellis SG, Zhao DX, Silva GV, Lai D, Thomas JD, Kronenberg MW, Martin AD, Anderson RD, Traverse JH, Penn MS, Anwaruddin S, Hatzopoulos AK, Gee AP, Taylor DA, Cogle CR, Smith D, Westbrook L, Chen J, Handberg E, Olson RE, Geither C, Bowman S, Francescon J, Baraniuk S, Piller LB, Simpson LM, Loghin C, Aguilar D, Richman S, Zierold C, Bettencourt J, Sayre SL, Vojvodic RW, Skarlatos SI, Gordon DJ, Ebert RF, Kwak M, Moye LA, Simari RD. Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA* 2012;307:1717-26.
121. Willerson JT, Perin EC, Ellis SG, Pepine CJ, Henry TD, Zhao DX, Lai D, Penn MS, Byrne BJ, Silva G, Gee A, Traverse JH, Hatzopoulos AK, Forder JR, Martin D, Kronenberg M, Taylor DA, Cogle CR, Baraniuk S, Westbrook L, Sayre SL, Vojvodic RW, Gordon DJ, Skarlatos SI, Moye LA, Simari RD. Intramyocardial injection of autologous bone marrow mononuclear cells for patients with chronic ischemic heart disease and left ventricular dysfunction (First Mononuclear Cells injected in the US [FOCUS]): Rationale and design. *Am Heart J* 2010;160:215-23.
122. Williams AR, Trachtenberg B, Velazquez DL, McNiece I, Altman P, Rouy D, Mendizabal AM, Pattany PM, Lopera GA, Fishman J, Zambrano JP, Heldman AW, Hare JM. Intramyocardial stem cell injection in patients with ischemic cardiomyopathy: functional recovery and reverse remodeling. *Circ Res* 2011;108:792-6.
123. Donndorf P, Kaminski A, Tiedemann G, Kundt G, Steinhoff G. Validating intramyocardial bone marrow stem cell therapy in combination with coronary artery bypass grafting, the PERFECT Phase III randomized multicenter trial: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 2012;13:99.
124. Forcillo J, Stevens LM, Mansour S, Prieto I, Roy DC, Noiseux N. IMPACT-CABG Trial: Implantation of CD133(+) Stem Cells in Patients Undergoing Coronary Bypass Surgery-Presentation of the First Treated Patient. *Case Rep Transplant* 2011;2011:685394.

125. Forcillo J, Stevens LM, Mansour S, Prieto I, Salem R, Baron C, Roy DC, Larose E, Masckauchan D, Noiseux N. Implantation of CD133+ stem cells in patients undergoing coronary bypass surgery: IMPACT-CABG pilot trial. *Can J Cardiol* 2013;29:441-7.
126. Gowdak LH, Schettert IT, Rochitte CE, Lisboa LA, Dallan LA, Cesar LA, de Oliveira SA, Krieger JE. Early increase in myocardial perfusion after stem cell therapy in patients undergoing incomplete coronary artery bypass surgery. *J Cardiovasc Transl Res* 2011;4:106-13.
127. Hendrikx M, Hensen K, Clijsters C, Jongen H, Koninckx R, Bijmens E, Ingels M, Jacobs A, Geukens R, Dendale P, Vijgen J, Dilling D, Steels P, Mees U, Rummens JL. Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation* 2006;114:1101-7.
128. Karantalis V, Difede DL, Gerstenblith G, Pham SM, Symes JF, Zambrano JP, Fishman J, Pattany PM, McNiece I, Conte JV, Schulman SP, Wu KC, Shah A, Breton E, Davis-Sproul J, Schwarz RP, Feigenbaum G, Mushtaq M, Suncion VY, Lardo A, Borrello I, Mendizabal A, Karas TZ, Byrnes J, Lowery MH, Heldman A, Hare JM. Autologous Mesenchymal Stem Cells Produce Concordant Improvements in Regional Function, Tissue Perfusion and Fibrotic Burden when Administered to Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting - The PROMETHEUS Trial. *Circ Res* 2014.
129. Thompson CA, Nasser BA, Makower J, Houser S, McGarry M, Lamson T, Pomerantseva I, Chang JY, Gold HK, Vacanti JP, Oesterle SN. Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty. A novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1964-71.
130. Nasser BA, Ebell W, Dandel M, Kukucka M, Gebker R, Doltra A, Knosalla C, Choi YH, Hetzer R, Stamm C. Autologous CD133+ bone marrow cells and bypass grafting for regeneration of ischaemic myocardium: the Cardio133 trial. *Eur Heart J* 2014.
131. Stamm C, Nasser B, Drews T, Hetzer R. Cardiac cell therapy: a realistic concept for elderly patients? *Exp Gerontol* 2008;43:679-90.
132. Pompilio G, Cannata A, Peccatori F, Bertolini F, Nascimbene A, Capogrossi MC, Biglioli P. Autologous peripheral blood stem cell transplantation for myocardial regeneration: a novel strategy for cell collection and surgical injection. *Ann Thorac Surg* 2004;78:1808-12.
133. Lunkenheimer PP, Redmann K, Westermann P, Rothaus K, Cryer CW, Niederer P, Anderson RH. The myocardium and its fibrous matrix working in concert as a spatially netted mesh: a critical review of the purported tertiary structure of the ventricular mass. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006;29 Suppl 1:S41-9.

134. Hoffmann R, Lethen H, Marwick T, Arnese M, Fioretti P, Pingitore A, Picano E, Buck T, Erbel R, Flachskampf FA, Hanrath P. Analysis of interinstitutional observer agreement in interpretation of dobutamine stress echocardiograms. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:330-6.
135. Sutherland GR, Di Salvo G, Claus P, D'Hooge J, Bijnens B. Strain and strain rate imaging: a new clinical approach to quantifying regional myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17:788-802.
136. Kowalski M, Kukulski T, Jamal F, D'Hooge J, Weidemann F, Rademakers F, Bijnens B, Hatle L, Sutherland GR. Can natural strain and strain rate quantify regional myocardial deformation? A study in healthy subjects. *Ultrasound Med Biol* 2001;27:1087-97.
137. Leitman M, Lysyansky P, Sidenko S, Shir V, Peleg E, Binenbaum M, Kaluski E, Krakover R, Vered Z. Two-dimensional strain-a novel software for real-time quantitative echocardiographic assessment of myocardial function. *J Am Soc Echocardiogr* 2004;17:1021-9.
138. Simmons LA, Weidemann F, Sutherland GR, D'Hooge J, Bijnens B, Sergeant P, Wouters PF. Doppler tissue velocity, strain, and strain rate imaging with transesophageal echocardiography in the operating room: a feasibility study. *J Am Soc Echocardiogr* 2002;15:768-76.
139. Kukucka M, Nasser B, Tscherkaschin A, Mladenow A, Kuppe H, Habazettl H. The feasibility of speckle tracking for intraoperative assessment of regional myocardial function by transesophageal echocardiography. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2009;23:462-7.
140. Becker M, Bilke E, Kuhl H, Katoh M, Kramann R, Franke A, Bucker A, Hanrath P, Hoffmann R. Analysis of myocardial deformation based on pixel tracking in two dimensional echocardiographic images enables quantitative assessment of regional left ventricular function. *Heart* 2006;92:1102-8.
141. Perk G, Tunick PA, Kronzon I. Non-Doppler two-dimensional strain imaging by echocardiography--from technical considerations to clinical applications. *J Am Soc Echocardiogr* 2007;20:234-43.
142. Nasser BA, Kukucka M, Dandel M, Knosalla C, Choi YH, Ebell W, Hetzer R, Stamm C. Two-dimensional speckle tracking strain analysis for efficacy assessment of myocardial cell therapy. *Cell Transplant* 2009;18:361-70.
143. Teske AJ, De Boeck BW, Melman PG, Sieswerda GT, Doevendans PA, Cramer MJ. Echocardiographic quantification of myocardial function using tissue deformation imaging, a guide to image acquisition and analysis using tissue Doppler and speckle tracking. *Cardiovasc Ultrasound* 2007;5:27.

144. Assmus B, Walter DH, Seeger FH, Leistner DM, Steiner J, Ziegler I, Lutz A, Khaled W, Klotsche J, Tonn T, Dimmeler S, Zeiher AM. Effect of shock wave-facilitated intracoronary cell therapy on LVEF in patients with chronic heart failure: the CELLWAVE randomized clinical trial. *JAMA* 2013;309:1622-31.
145. Benetti F, Penherrera E, Maldonado T, Vera YD, Subramanian V, Geffner L. Direct myocardial implantation of human fetal stem cells in heart failure patients: long-term results. *Heart Surg Forum* 2010;13:E31-5.
146. Fischer-Rasokat U, Assmus B, Seeger FH, Honold J, Leistner D, Fichtlscherer S, Schachinger V, Tonn T, Martin H, Dimmeler S, Zeiher AM. A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail* 2009;2:417-23.
147. Nasser BA, Kukucka M, Dandel M, Knosalla C, Potapov E, Lehmkuhl HB, Meyer R, Ebell W, Stamm C, Hetzer R. Intramyocardial delivery of bone marrow mononuclear cells and mechanical assist device implantation in patients with end-stage cardiomyopathy. *Cell Transplant* 2007;16:941-9.
148. Olgunturk R, Kula S, Sucak GT, Ozdogan ME, Erer D, Saygili A. Peripheral stem cell transplantation in children with dilated cardiomyopathy: preliminary report of first two cases. *Pediatr Transplant* 2010;14:257-60.
149. Hetzer R, Muller JH, Weng Y, Meyer R, Dandel M. Bridging-to-recovery. *Ann Thorac Surg* 2001;71:S109-13; discussion S14-5.
150. Dandel M, Weng Y, Siniawski H, Potapov E, Lehmkuhl HB, Hetzer R. Long-term results in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy after weaning from left ventricular assist devices. *Circulation* 2005;112:I37-45.
151. Muller J, Wallukat G, Dandel M, Bieda H, Brandes K, Spiegelsberger S, Nissen E, Kunze R, Hetzer R. Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2000;101:385-91.
152. Birks EJ, Tansley PD, Hardy J, George RS, Bowles CT, Burke M, Banner NR, Khaghani A, Yacoub MH. Left ventricular assist device and drug therapy for the reversal of heart failure. *N Engl J Med* 2006;355:1873-84.
153. Goldstein DJ, Moazami N, Seldomridge JA, Laio H, Ashton RC, Jr., Naka Y, Pinsky DJ, Oz MC. Circulatory resuscitation with left ventricular assist device support reduces interleukins 6 and 8 levels. *Ann Thorac Surg* 1997;63:971-4.
154. Liang H, Muller J, Weng YG, Wallukat G, Fu P, Lin HS, Bartel S, Knosalla C, Pregla R, Hetzer R. Changes in myocardial collagen content before and after left ventricular assist device application in dilated cardiomyopathy. *Chin Med J (Engl)* 2004;117:401-7.

155. Thompson LO, Skrabal CA, Loebe M, Lafuente JA, Roberts RR, Akgul A, Jones V, Bruckner BA, Thohan V, Noon GP, Youker KA. Plasma neurohormone levels correlate with left ventricular functional and morphological improvement in LVAD patients. *J Surg Res* 2005;123:25-32.
156. Torre-Amione G, Stetson SJ, Youker KA, Durand JB, Radovancevic B, Delgado RM, Frazier OH, Entman ML, Noon GP. Decreased expression of tumor necrosis factor- α in failing human myocardium after mechanical circulatory support : A potential mechanism for cardiac recovery. *Circulation* 1999;100:1189-93.
157. Bruckner BA, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Youker KA, Radovancevic B, Connelly JH, Koerner MM, Entman ME, Frazier OH, Noon GP, Torre-Amione G. Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:457-64.
158. Fedak PW, Szmitko PE, Weisel RD, Altamentova SM, Nili N, Ohno N, Verma S, Fazel S, Strauss BH, Li RK. Cell transplantation preserves matrix homeostasis: a novel paracrine mechanism. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;130:1430-9.
159. Pagani FD, DerSimonian H, Zawadzka A, Wetzel K, Edge AS, Jacoby DB, Dinsmore JH, Wright S, Aretz TH, Eisen HJ, Aaronson KD. Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:879-88.

6. Terminologie und Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer
ATP	Adenosintriphosphat
β-Blocker	Beta-Rezeptorenblocker
BMP-2	<i>englisch:</i> Bone Morphogenetic Protein 2
Ca ²⁺	Kalzium
CO ₂	Kohlendioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure bzw. <i>englisch:</i> acid
EPC	endotheliale Progenitorzellen bzw. <i>englisch:</i> cells
ESC	embryonale Stammzellen bzw. <i>englisch:</i> cells
FS	<i>englisch:</i> Fraction of Shortening
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor bzw. <i>englisch:</i> Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HLHS	Hypoplastisches Linksherzsyndrom
HSC	Hämatopoetische Stammzellen bzw. <i>englisch:</i> cells
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme bzw. <i>englisch:</i> International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IVUS	intravaskulärer Ultraschall
iPS	<i>englisch:</i> induced Pluripotent Stem cells
LV	Linker Ventrikel bzw. linksventrikulär
LVAD	linksventrikuläres Assist Device
LVEF	linksventrikuläre Ejectionsfraktion
MACS	<i>englisch:</i> Magnetic Activated Cell Sorting
MNC	Mononukleäre Knochenmarkstammzellen bzw. <i>englisch:</i> cells
MRT	Magnetresonanz-Computertomographie
MSC	<i>englisch:</i> Marrow derived mesenchymal Stem Cells
NYHA	New York Heart Association
NADH	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthetase
NOS3	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthetase bzw. auch eNOS

NOS3 ^{-/-}	NOS3-knock-out-Mäuse
RIVA	Ramus interventrikularis anterior
RNA	Ribonukleinsäure bzw. <i>englisch</i> : acid
TEE	transösophagealen Echokardiographie
TGF- β	<i>englisch</i> : Transforming Growth Factor β
VAD	<i>englisch</i> : Ventricular Assist Device
VSD	Ventrikelseptumdefekt
WMS	Wandbewegungs-Score bzw. <i>englisch</i> : Wall Motion Score
WT	Wildtyp-Mäuse

7. Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei den Personen bedanken, die mir nicht nur sehr nahe stehen, sondern mein Leben ausmachen und geprägt haben.

Ich danke meiner **Frau Sabina**, die die Liebe meines Lebens ist. Seit vielen Jahren erträgt Sabina geduldig meine Launen mit Liebe und Feingefühl, sie motiviert mich in meinen Zielen und gibt mir den Freiraum, den ich als Chirurg und Wissenschaftler benötige. Doch das Wichtigste schenkte sie uns mit unseren beiden **Söhnen Max und Len**. Sie sind die Freude und das Glück unseres Lebens. Auch Max und Len möchte ich danken, denn sie erhalten das Kind in mir und geben mir Kraft und Ausdauer. Sabina, Max und Len, ich liebe Euch sehr. Danke.

Ich bin meiner **Mutter Heike Nasser-George** und meinem **Vater Professor Modjtaba Nasser** sehr dankbar, die mein Leben geprägt, immer an mich geglaubt und mir ein sorgenfreies Leben ermöglicht haben. **Meiner Mutter** möchte ich danken, denn sie war und ist in jeder Lebenslage für mich da und hat immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Nöte sowie die entsprechenden Ratschläge für mich parat. Sie ist eine tolle Großmutter, die uns im Alltag entlastet und immer bereit steht uns zu helfen.

Auch möchte ich ihrem **Ehemann Jan George** danken, der mich intellektuell und künstlerisch inspiriert und mit seinem enormen politischen und geschichtlichen Wissen eine stetige Bereicherung für mich ist.

Danken möchte ich **meinem Vater**, dessen außergewöhnliches Leben und Karriere ein immerwährendes Vorbild, aber auch Antriebsfeder für mich sind. Er hat mich gelehrt, dass man mit harter Arbeit und Ausdauer alles erreichen und trotzdem menschlich, großzügig und sensibel bleiben kann. Er hat mich gelehrt, dass Glück nicht nur zu suchen, sondern auch zu finden und zu genießen.

Meinem Bruder Timo Nasser danke ich, denn er befreit mich regelmäßig von den Scheuklappen, die mein Beruf mir allzu häufig aufsetzt und zeigt mir eine andere, spannende und fremde Welt.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Professor Roland Hetzer**, meinem Chef, der immer großzügig meine klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeiten unterstützte. Während unserer 17-jährigen Zusammenarbeit zeigte er mir nicht nur das chirurgische Handwerk, sondern beeindruckte immer wieder mit seinem unglaublichen Wissen, welches weit über die Grenzen des klinisch-medizinischen reicht, seinem souveränen Umgang mit Patienten und Kollegen und

seine schier unerschöpfliche Energie und Einsatz im Deutschen Herzzentrum Berlin. Professor Hetzer war ein stetes Vorbild für mich. Dafür gilt ihm mein besonderer Dank.

Auch möchte ich einem besonderen Menschen und Kollegen, Herrn **Professor Christof Stamm**, herzlichst danken. Er half mir bei der Umsetzung vieler wissenschaftlicher Projekte, insbesondere dann, wenn es an der Zeit war, diese zu Papier zu bringen. Sein zielstrebiges Charakter, seine gelassene Art und die fortwährende Hilfsbereitschaft sind nur einige Punkte, die ich an ihm als Mentor, Kollege und Freund schätzen gelernt habe und für die ich ihm danke.

Herr Professor Vladimir Alexi-Meskhishvili ist nicht nur eine unerschöpfliche Quelle der kardiovaskulären Historie, sondern beeindruckt mich durch sein enormes Wissen über chirurgische Techniken und sein enormes Engagement im Bereich der Chirurgie angeborener Herzfehler. Operativ war er besonders in meinen Anfängen ein geduldiger Lehrer, der immer an mich glaubte. Auch das wissenschaftliche Arbeiten inspirierte er stetig und schärfte meinen Blick für das Wesentliche. Vielen Dank.

Ich möchte auch Herrn **Professor Hermann Kuppe** danken. Sein Einsatz und väterlicher Rat waren und sind immer wichtig für mich. Auch dafür möchte ich mich an dieser Stelle sehr bedanken.

Meinen Dank möchte ich **auch Herrn Professor Miralem Pasic** aussprechen, der nicht nur durch sein chirurgisches Können und seine wissenschaftlichen Leistungen ein Vorbild ist, sondern auch an schlechten Tagen mir die schönen Seiten des Berufes vor Augen führte.

Ich danke Herrn **PD Dr. Christoph Knosalla**, der mich immer mit Rat und Tat unterstützt. Sein Engagement im Deutschen Herzzentrum Berlin und im Bereich der Hochschullehre ist für mich immer beispielhaft gewesen. Als Förderer meiner Person gilt ihm mein besonderer Dank.

Ich bedanke mich bei Herrn **Dr. Norbert Franz**, der maßgeblich half, mir meine erste Stelle 1997/98 am Deutschen Herzzentrum Berlin als zivildienstleistender Arzt im Praktikum zu vermitteln und auch in den Jahren danach immer ein offenes Ohr für mich hatte. Ich bedaure zutiefst, dass Herr Dr. Franz uns zu früh verlassen hat.

Ein besonderer Dank gebührt auch Frau **Astrid Benhennour**, die mich in meiner wissenschaftlichen Tätigkeit stetig unterstützte und als Lektorin meiner Habilitationsschrift keinen einfachen Job hatte. Danke dafür.

Ich möchte Frau **Anne Gale** für ihre Hilfe bei der Publikation in englischen Zeitschriften und der Vorbereitung englischer Vorträge danken.

Auch gilt mein Dank Frau **Sabine Hübler**, Leiterin der Studienzentrale, und den Damen aus der Studienzentrale Frau **Elke Wenzel** und Frau **Monika Teichmann**, die mir bei der Planung und Durchführung meiner klinischen Projekte eine enorme Hilfe waren. Vielen Dank auch an Frau **Karla Weber** und Herrn **Helge Haselbach** aus der Grafikabteilung, an Frau **Julia Stein**, Statistikerin am DHZB, sowie an Herrn **Stefan Vogel** und Herrn **Philipp Krüger** aus der EDV, auf deren Hilfe ich mich immer verlassen konnte.

Ich bedanke mich bei **meinen Kollegen** Drs. Evgenij Potapov, Robert Hammerschmidt, Volker Düsterhöft, Matthias Bauer, Marian Kukucka, Wolfram Ebell, Rolf Gebker, Tom Gromann und Guna Tetere, ohne die der Klinikalltag und das Forschen nur halb soviel Spaß machen würden.

Schließlich möchte ich die Gelegenheit nutzen, all den Wegbegleitern zu danken, die ob ihrer Vielzahl hier namentlich unerwähnt bleiben müssen. Auf meinem Weg vom Studenten bis zum Herzchirurgen bin ich vielen Menschen begegnet, bei denen ich mich noch bedanken möchte, seien es Kollegen, Pflegepersonal oder Vorgesetzte, sei es in Berlin, Lexington, Houston, San Diego oder Boston. Die Mehrzahl dieser Menschen haben mich bewusst oder unbewusst, meist durch positive Eindrücke und gelegentlich auch durch negative, zu dem gemacht, der ich heute bin.

8. Eidesstattliche Versicherung

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

Datum

.....

Unterschrift