

LETTERE GIC

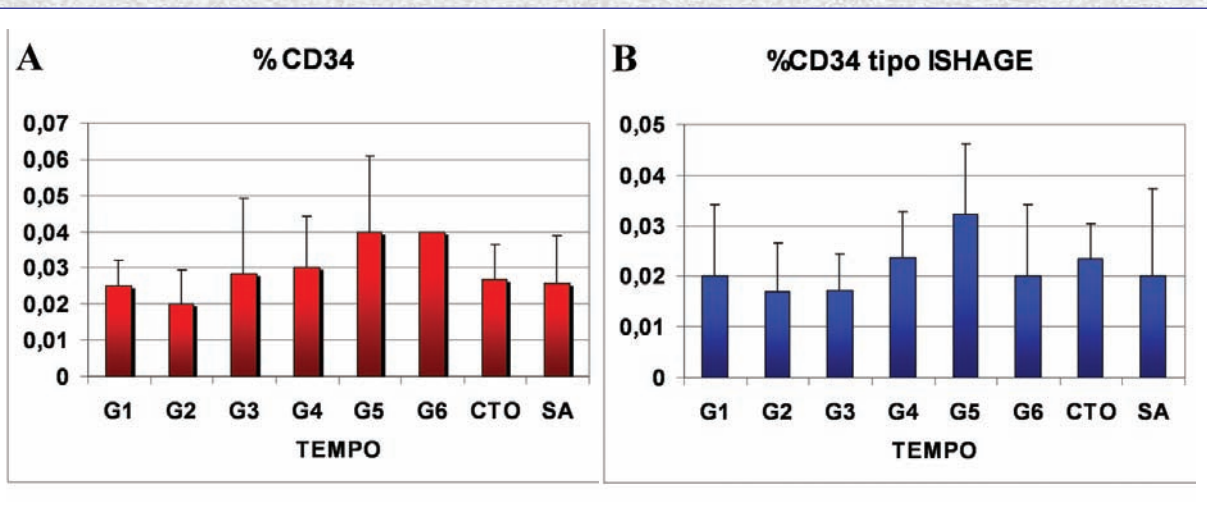
Periodico della Società Italiana di Citometria

Studio dei progenitori emopoietici circolanti in pazienti con infarto del miocardio

Progenitori endoteliali circolanti nelle patologie neoplastiche e cardiovascolari

La Citometria a flusso nell'analisi di immunociti di mitilo

Impiego del gene PIG-A come gene sentinella per la valutazione delle mutazioni indotte da raggi X su cellule congelate mediante Citometria a flusso



LETTERE GIC

Vol. 19, Num. 2

Agosto 2010

DIRETTORE RESPONSABILE

Raffaele De Vita

COMITATO EDITORIALE

Marco Danova

Dipartimento di Medicina Interna
Sezione di Medicina Interna
ed Oncologia Medica
Università e I.R.C.C.S. - Policlinico S. Matteo
Pavia

Raffaele De Vita

Unità Tossicologia e Scienze Biomediche
ENEA - Centro Ricerche Casaccia
Roma

Eugenio Erba

Istituto Ricerche Farmacologiche "Mario Negri"
Milano

Giuseppe Starace

Istituto Medicina Sperimentale CNR
Roma

Volume 19, numero 2, Agosto 2010

Lettere GIC

Periodico della Società Italiana di Citometria
Autorizz. del trib. di Roma n° 512/92 del 17/9/92
Edizione quadrimestrale
Spedizione in abbonamento postale

Grafica: Renato Cafieri

Stampa e Pubblicità:



Redazione:



c/o Unità Tossicologia e Scienze Biomediche
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
☎ 06/30484671 Fax 06/30484891
e-mail: devita@enea.it
http://biotec.casaccia.enea.it/GIC/

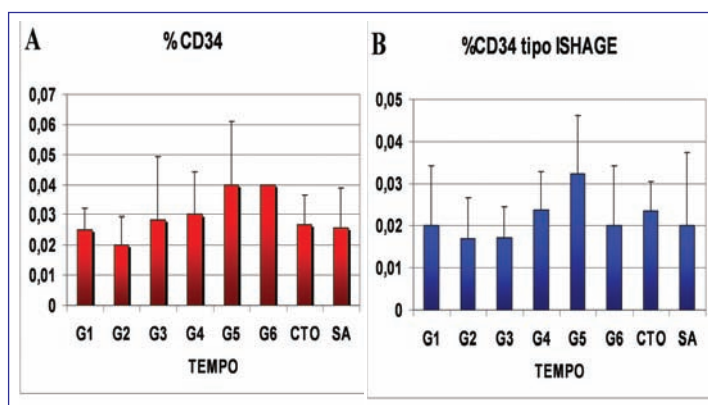


Associato alla
Unione Stampa
Periodica Italiana

In copertina: dal lavoro "Studio dei progenitori emopoietici circolanti in pazienti con infarto del miocardio" di Campioni D, Lodolini V, Gambetti S, Cangiano E, Ferrari L, Monti M, Cavazza C, Ceconi C, Ferrari R, Cuneo A., Lanza F; nelle immagini sono rappresentati in A i valori percentuali medi e in B quelli in microlitro delle CD34+ circolanti rispetto alla giornata dell'infarto (G1-G6). Si noti il picco in quinta giornata.

SOMMARIO

| | |
|---|----|
| Studio dei progenitori emopoietici circolanti in pazienti con infarto del miocardio Campioni D., Lodolini V., Gambetti S., Cangiano E., Ferrari L., Monti M., Cavazza C., Ceconi C., Ferrari R., Cuneo A., Lanza F. | 7 |
| Progenitori endoteliali circolanti nelle patologie neoplastiche e cardiovascolari A. Tenore, E. Consensi, C. Picone, L. Vanelli, R. Campanelli, E. Bonetti, M. Massa, V. Rosti, M. G Della Porta | 13 |
| La Citometria a flusso nell'analisi di immunociti di mitilo M. Arcangeletti, B. Canonico, C. Ciacci, M. Betti, F. Luchetti, G. Pojana, L. Canesi and S. Papa | 19 |
| Impiego del gene PIG-A come gene sentinella per la valutazione delle mutazioni indotte da raggi X su cellule congelate mediante Citometria a flusso G. Cugia, A. Lucarini, F. Centis, G. Del Zotto, E. Argazzi, M. Bono, G. Zini, M. Valentini, F. Picardi, W. Cesarini, S. Stramigioli, E. Fusco, L. Zamai | 25 |
| Invito alla lettura a cura di "Ale" | 29 |
| News in bibliografia a cura di "Marty DV." | 35 |
| In libreria a cura del "Lettore" | 38 |



Studio dei progenitori emopoietici circolanti in pazienti con infarto del miocardio

¹Campioni D, ¹Lodolini V, ²Gambetti S, ²Cangiano E, ¹Ferrari L, ²Monti M, ²Cavazza C, ²Ceconi C, ²Ferrari R, ¹Cuneo A., ³Lanza F.

¹U.O Ematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Ferrara- Ferrara - Ferrara

²U.O. Cardiologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Ferrara- Ferrara

³Sezione Ematologia - Istituti Ospitalieri di Cremona- Cremona

e-mail: cmpdni@unife.it

Introduzione

Lo scompenso cardiaco conseguente alla disfunzione ventricolare è la principale causa di morbilità e mortalità nei paesi occidentali. Negli ultimi anni lo studio delle cellule staminali ha incontrato l'interesse dei cardiologi poiché dapprima su modelli animali e poi sull'uomo si sono accumulate evidenze per le quali l'utilizzo di cellule staminali avrebbe un effetto benefico nella cura delle patologie del miocardico (Hill et al.2003; Steurer et al., 2008). In particolare è stato evidenziato che le cellule staminali, che sono cellule con alto potere plastico e differenziativo, potrebbero essere utilizzate per rigenerare il tessuto miocardico stesso. Diversi studi hanno dimostrato che le cellule staminali possono essere isolate e reinfuse nel luogo specifico del danno o possono essere mobilizzate in modo autologo e circolare nel sangue periferico favorendo la riparazione del tessuto cardiaco sia in senso miogenico che vascolare (Dimmeler et al. 2006). In particolare è stato evidenziata la mobilizzazione di cellule CD34+ con un andamento bifasico in fase precoce ed avanzata in pazienti con scompenso cardiaco (Valgimigli et al., 2004). Questi studi hanno anche dimostrato che la mobilizzazione di cellule staminali in questi pazienti risulta inversamente proporzionale alla classe funzionale secondo la classificazione del New York Heart Association (NYHA). Inoltre in alcuni studi le CD34+ circolanti risultano significativamente maggiori negli infarti rispetto al gruppo di controllo rappresentato da soggetti sani e rispetto alle angine stabili (Massa et al., 2005; Paczkowska et al., 2005) mentre in altri studi le CD34+ circolanti non risultano significativamente maggiori negli infarti e nelle angine rispetto ai soggetti sani (Grundmann et al. 2007). Riguardo invece alle sottopopolazioni (subsets) note di cellule staminali circolanti circolanti moltissimi lavori, sebbene non senza contraddizioni, riguardano la mobilizzazione di progenitori endoteliali (EPC/CEP) non-emopoietici definiti come

cellule CD34+VEGFR-2+CD45- e CD133+/- che rappresenterebbero una risposta funzionale del midollo al danno endoteliale indotto .

E' stata dimostrata inoltre la circolazione di cellule staminali emopoietiche coesprimenti oltre al CD133+ e al VEGFR-2, (Aghila Rani et al., 2008, Grundmann et al., 2007), altri antigeni considerati staminali come il CXCR4+, CD117+ (c-kit)+, c-met+ considerati dagli autori antigeni endoteliali, muscolari e cardiaci (Wojakowski et al., 2008). La somministrazione inoltre del fattore di crescita granulocitario (G-CSF) in pazienti con infarto miocardico, ha inoltre indotto l'aumento in circolo di CD34+ coesprimenti anche antigeni endoteliali come l'AC133 e il VEGFR-2 ma non è stato possibile vedere alcun miglioramento in termini di angiografia coronica e di frazione di eiezione o dell'estensione del difetto di perfusione nel follow-up del paziente (Valgimigli et al., 2005). Nonostante le prime evidenti incoraggianti dimostrazioni sperimentali e cliniche con cellule staminali in campo cardiologico molte questioni rimangono ancora aperte e da chiarire soprattutto perché non c'è standardizzazione di analisi citometrica.

A tale scopo in questo studio, con un approccio a 4 colori, ci proponiamo di valutare sia il numero medio di CD34+ circolanti valutato con un doppio sistema di analisi soprattutto in relazione alla giornata dall'infarto nonché la coespressione su di esse di altri antigeni quali il CD31+, CD117 (c-kit) e del CD184 (CXCR-4) in un piu' ampio gruppo di pazienti con infarto miocardico rispetto alla letteratura. Questi dati verranno confrontati con quelli raccolti da pazienti con angina stabile, e in soggetti di controllo.

Materiali e metodi

Pazienti

Campioni di sangue periferico (PB, 5ml in EDTA) sono

stati prelevati giornalmente dalla prima alla sesta giornata dall'evento acuto (G1-G6), dopo consenso informato, da 85 pazienti con infarto miocardico (61 maschi, 24 femmine, età media 65 anni). Nello studio sono stati arruolati pazienti che avevano tutti i valori dell'emocromo nei range di normalità. Altri campioni di sangue periferico (5ml in EDTA per paziente) sono stati prelevati anche da 15 pazienti affetti da angina stabile (SA), 15 pazienti a controllo sottoposti ad angiografia, 10 soggetti normali, 5 pazienti in corso di staminaferesi indotta da G-CSF in follow-up di linfoma non Hodgkin, 5 soggetti assolutamente sani per confronto.

Analisi citofluorimetrica dei progenitori endoteliali circolanti

I campioni di PB sono stati analizzati a fresco, dopo poche ore dal prelievo, mediante FACSCalibur (Becton Dickinson,) con una strategia a 4 colori. Le cellule staminali emopoietiche sono state individuate nel tempo (G1-G6) in base alla coespressione del CD45 e del CD34, mentre i subsets delle CD34+ sono stati individuati grazie alla co-espressione sulle cellule CD34+ dei seguenti altri antigeni CD31, CD117, CD184.

Per questa analisi sono stati usati i seguenti anticorpi monoclonali: CD45 (2D1, APC), CD34 (8G12 PerCP), CD31 (WM-59 FITC), CD184 (12G5 PE), CD117 (104D2, PE), (Becton-Dickinson- PharMingen, US). Per un'analisi più appropriata sono stati analizzati almeno 250,000 eventi per ogni campione fresco di cellule. I dati citometrici sono stati espressi come percentuale di cellule positive sul gate della popolazione eseguito. La percentuale di CD34+ è stata analizzata con una doppia strategia citofluorimetrica a 4 colori:

1) analizzando semplicemente le cellule CD34+ presenti nel gate delle cellule CD45+ escludendo debris e altri eventi morfologicamente non collocabili con gate sui parametri fisici.

2) adattando il sistema di analisi tipo ISHAGE, usata a livello europeo nella standardizzazione ed il monitoraggio delle cellule staminali in pazienti ematologici in corso di leucoferesi. Questa strategia permette di deter-

minare la percentuale ed il numero delle cellule CD34+ in modo molto restrittivo passando attraverso gates di analisi sequenziali che individuano in modo sempre più esatto le cellule staminali sulla base dei loro parametri morfologici e di fluorescenza escludendo qualunque evento riconducibile a cellule morte e/o altro, sebbene nel nostro caso abbiamo usato il CD34 PerCp ed il CD45 APC a differenze del metodo ISHAGE originale in cui si usano il CD34FITC ed il CD45PE.

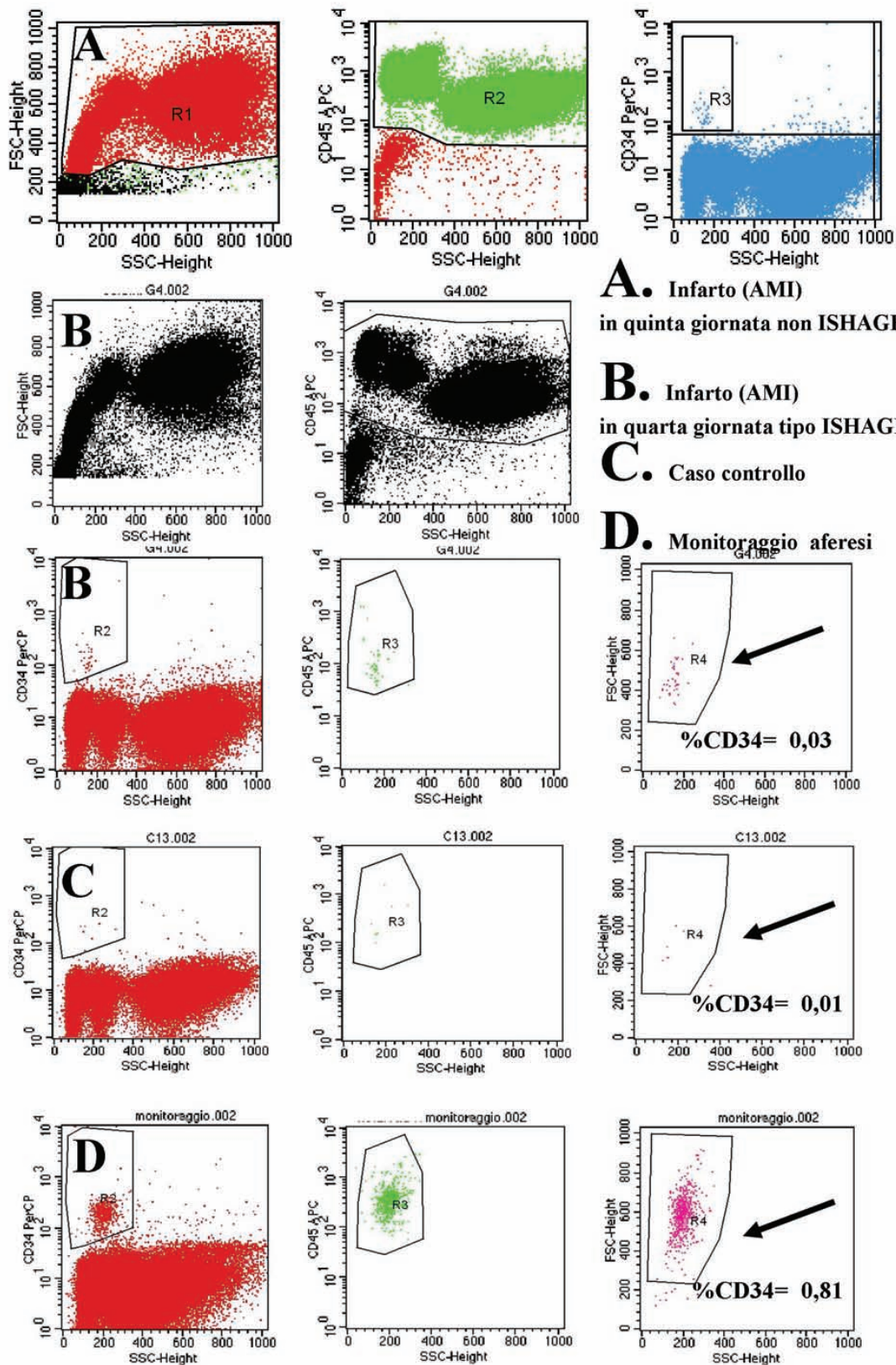
Risultati

Analisi citofluorimetrica dei campioni a fresco Valori medi totali cellule CD34+

Come mostrato nella Tabella 1, i risultati hanno evidenziato che la percentuale media totale di cellule CD34+ valutata nel gruppo di tutti gli infarti (IMA o AMI) risulta di 0,028+/-0,017% range 0,01-0,07; valore medio di 2,5 CD34+/UL ovvero di 0,021+/-0,011% range 0,01-0,04 analizzato con il metodo tipo ISHAGE. Questi valori non risultano significativamente più alti rispetto ai controlli in cui le CD34+ risultano 0,026+/-0,009% range 0,01-0,04; valore medio 2,4 CD34+/UL ovvero di 0,023+/-0,007 range 0,01-0,03 con il sistema tipo ISHAGE. Intermedio invece risulta il valore medio percentuale delle CD34+ nelle SA (0,036+/-0,015 range 0,02-0,05; valore medio 2/UL) ovvero 0,03+/-0,017% range 0,02-0,05 equivalenti a 2,1 CD34+ /ul. Come si può notare da questi dati la percentuale media delle CD34+ differisce poco se analizzata mediante i due diversi sistemi di analisi sebbene con il metodo tipo ISHAGE la percentuale risulta più bassa ovvero ristretta. Il risultato delle analisi ha mostrato anche che gli IMA mostrano una percentuale più bassa di CD34+ rispetto ai pazienti ematologici ancora in attesa del picco. Infatti in questi pazienti la % di CD34+ al 9° giorno risulta di 0,81% cellule CD34+ ovvero di 15 CD34+/ul. Concludendo dunque possiamo dire che considerando la media totale delle CD34+ in pazienti con IMA questa risulta essere più bassa che nelle SA e non significativamente diversa dai controlli (Figura 1). E' da sottolineare invece che tutti

Tabella 1. Nella tabella è rappresentato il valore medio percentuale delle cellule CD34+ analizzate con approccio semplice e tipo ISHAGE negli IMA, SA e controlli (CTO), nonché in un gruppetto di soggetti normali (NORM).

| | % CD34+ | %CD34+ tipo ISHAGE |
|-------------|----------------------|---------------------------|
| IMA | 0,028+/-0,017 | 0,021+/-0,011 |
| SA | 0,036+/-0,015 | 0,030+/-0,017 |
| CTO | 0,026+/-0,009 | 0,023+/-0,007 |
| NORM | 0,012+/-0,008 | 0,011+/-0,008 |



A. Infarto (AMI)
in quinta giornata non ISHAGE

B. Infarto (AMI)
in quarta giornata tipo ISHAGE

C. Caso controllo

D. Monitoraggio aferesi

Fig. 1 Nella figura sono rappresentati **A.** Approccio di analisi semplice con gate dapprima sui parametri morfologici (R1), poi sulle cellule CD45+ (R2) poi CD34+ (R3) in un paziente con infarto (IMA o AMI) in quinta giornata dall'infarto. **B.** Paziente con IMA in quarta giornata analizzato con metodo tipo ISHAGE in cui dapprima si attiva il gate sulle cellule CD45+ (R1), poi sulle cellule CD34+ (R2) poi ancora sulle CD45+ a basso SSC (R3) e poi ancora sulle CD34+ rispetto ai parametri morfologici piu' ristretti (R4). **C.** Soggetto di controllo analizzato con metodo tipo ISHAGE in cui non sono presenti cellule CD34+. **D.** Esempio di monitoraggio di paziente sottoposto a leucoafèresi con approccio di analisi tipo ISHAGE che evidenzia una nuvoletta di CD34+.

questi valori risultano comunque superiori a quelli mediamente valutati in soggetti sani in cui il valore delle CD34+ risulta di 0,012 \pm 0,007.

Cinetica di mobilitazione delle cellule CD34+

Poiché la percentuale media delle cellule CD34+ in totale nel gruppo di pazienti rispetto ai controlli non è risultata significativamente diversa abbiamo provato a stratificare i pazienti in base alla giornata dall'infarto per vedere se era anche possibile stabilire delle differenze ed individuare una cinetica di mobilitazione di queste cel-

lule con giornate di picco o flessso nella loro percentuale. Come mostrato dai grafici in figura 2 sia la percentuale media che il numero di cellule CD34+ circolanti risultano particolarmente alte in giornata 5-6 dall'infarto se analizzato con metodo non ISHAGE mentre il picco rimane solo relativo a G5 se analizzato con metodo tipo ISHAGE.

Se misurate su microlitro le cellule CD34+ risultano crescenti dalla seconda alla quinta giornata (G1: 2,8ul \pm 2,9; G2:1,8ul \pm 0,9; G3:2,4ul \pm 2,7; G4: 2,5ul \pm 1,1; G5: 3,5 ul \pm 2,3; G6: 3,2 \pm 2,8), escludendo la prima

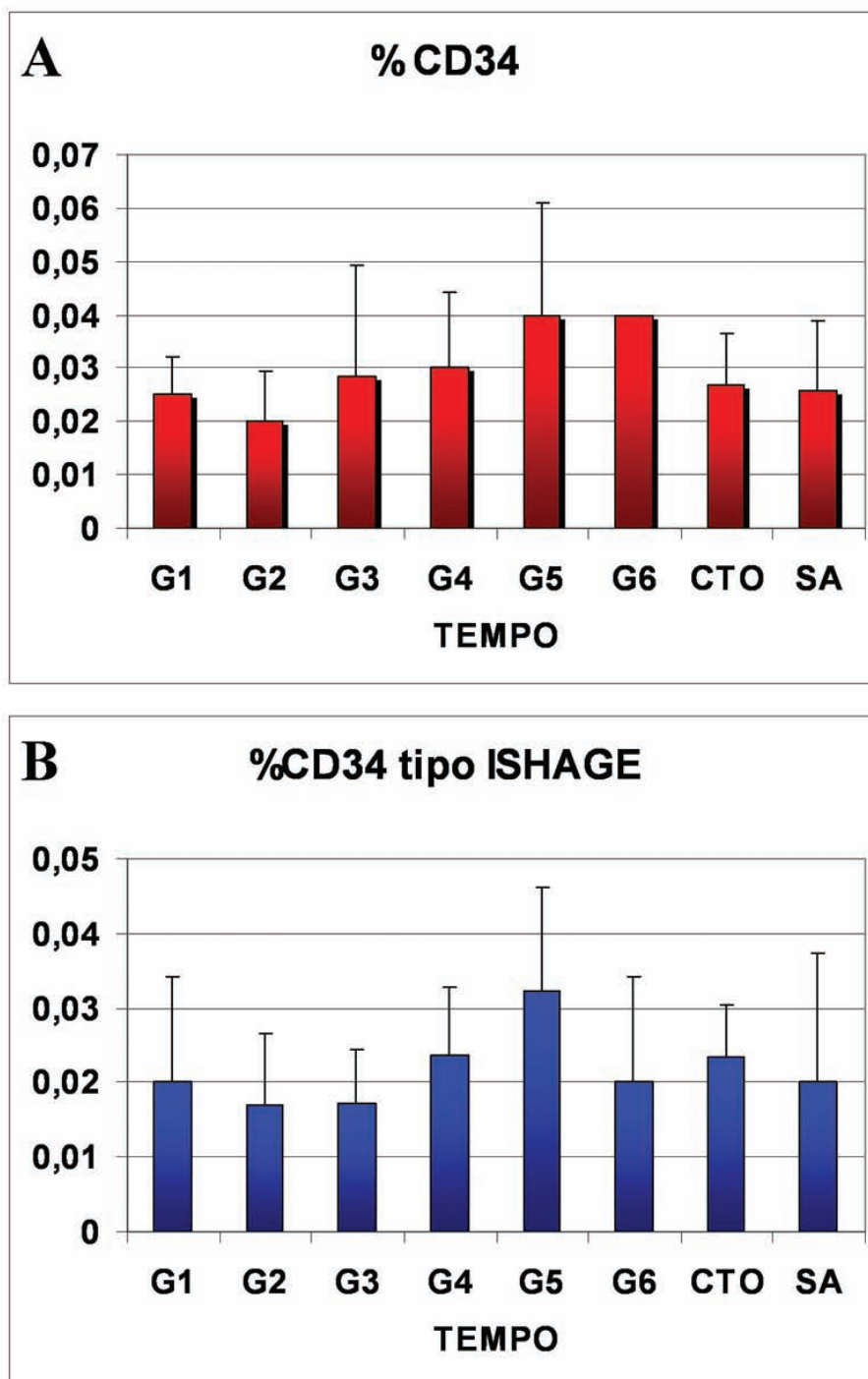


Fig. 2.

Nella figura sono rappresentati in **A** i valori percentuali medi e in **B** quelli in microlitro delle CD34+ circolanti rispetto alla giornata dell'infarto (G1-G6). Si noti il picco in quinta giornata.

giornata in cui il valore piu' alto è un effetto dovuto non tanto ad una maggiore percentuale di CD34+ totali circolanti quanto al numero più alto di globuli bianchi (> di 12000) presenti caratteristicamente in questa giornata. Inoltre i valori in g1 e G6 risultano relativi ad un numero piu' esiguo di pazienti osservati.

Sottopopolazioni fenotipiche di cellule CD34+ mobilizzate nei pazienti e controlli

Sebbene la percentuale ed il valore medio delle CD34+ non risulta essere molto elevato ci siamo preoccupati di vedere se queste cellule presentavano variazioni di espressione di altri marcatori antigenici di superficie, ovvero siamo andati a vedere quali sottopopolazioni (dette subsets) erano presenti e se differivano tra i controlli e gli IMA o le SA.

Ovvero abbiamo analizzato l'espressione di altri antigeni quali il CD31, il CD184, e il CD117+ presenti sulle cellule CD34+CD45+. Rispettivamente il CD31 (PECAM) è un antigene normalmente presente sulle cellule endoteliali, mentre il CD184 (CXCR4) o fusina è il ligando dell'SDF-1 (stromal derived factor 1) chemochina che guida l'homing delle CD34+ circolanti, il CD117 è un antigene di precoce staminalità. Come mostra la tabella 2 ci accorgiamo che il CD31 è espresso con elevati e simili livelli di percentuale media sia nei pazienti che nei controlli mentre l'espressione del CD117 e del CD184 sulle CD34+ risulta più bassa, sebbene non significativamente, nelle SA ma paragonabile negli IMA e nei controlli. Non si notano particolari differenze anche in relazione alla giornata dell'infarto (non mostrato), sebbene il valore medio di espressione del CD117 risulti più basso in G3, due giorni prima della mobilizzazione.

Discussione

Negli ultimi anni lo studio delle cellule staminali ha incontrato l'interesse dei cardiologi poiché è stato evidenziato che le cellule staminali, che sono cellule con alto potere plastico e differenziativo a livello tissutale, potrebbero essere utilizzate dopo isolamento e re-infu-

sione, per rigenerare miocardio. Nonostante le prime evidenti dimostrazioni sperimentali e cliniche sull'efficacia della terapia con cellule staminali in campo cardiologico molte questioni rimangono ancora aperte e da chiarire. Non sono ancora ben noti ad esempio i meccanismi e la cinetica alla base della mobilizzazione delle cellule staminali in pazienti cardiopatici e soprattutto le differenze nella cinetica di mobilizzazione tra pazienti con infarto miocardico o con angina stabile. Non sono noti inoltre tutti i subsets di cellule staminali mobilizzati e quali tra questi siano i migliori da utilizzare a scopo clinico. Per questo motivo in questo studio ci siamo proposti prima di tutto di verificare e quantificare la presenza di cellule staminali circolanti in un ampio gruppo di pazienti IMA rispetto a pazienti con SA e ai controlli. Infatti, per quanto siano presenti in letteratura molti lavori che descrivono la presenza di cellule CD34+ circolanti in pazienti con diversi tipi di malattie del miocardio come l'ischemia (Machalinski et al., 2006), lo scompenso (Valgimigli et al., 2004), ma anche l'infarto acuto (Massa et al., 2005, VÖÖ et al. 2008) non c'è uniformità di approccio e la quantificazione del tipo cellulare di interesse spesso è relativa a diverse giornate rispetto a quello dell'infarto in un numero variabile di pazienti. I nostri dati raccolti risultano in linea con la letteratura poiché abbiamo dimostrato che in generale la media totale delle CD34+ circolanti risulta molto bassa (dell'ordine dello 0,025% ovvero mediamente di 2,5CD34+/ul) ma ciò che noi abbiamo sottolineato è che questa media totale non risulta significativamente più alta dei controlli interi come soggetti sottoposti ad angiografia ma risulta superiore a quella di soggetti sani, mentre in letteratura questo dato è contraddittorio. Infatti spesso il gruppo di soggetti di controllo utilizzato è variabile come tipologia sicché varia la significatività del numero di CD34. Infatti ad esempio nel lavoro di Massa et al., 2005 o di Paczkowska et al., 2005 le CD34+ circolanti risultano significativamente maggiori negli IMA rispetto al gruppo di controllo rappresentato da soggetti sani (sebbene solo 10) e rispetto alle angine stabili mentre secondo

Tabella 2. Nella tabella sono riportati i valori percentuali medi di espressione dei vari antigeni coespressi dalle cellule CD34+ dei pazienti con IMA, SA rispetto ai controlli.

| | % 45+34+31+ | % 45+34+117+ | % 45+34+184+ |
|------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| IMA | 91,8+/-8,3 | 61,68 ± 19,02 | 43,05 ± 23,68 |
| SA | 89,8/-2,32 | 50,91± 26,72 | 35,2 ± 20,99 |
| CTO | 91,8+/-8,3 | 56,17 ± 15,14 | 42,09 ± 16,90 |

Grundmann et al. 2007 le CD34+ circolanti non risultano significativamente maggiori negli IMA e nelle SA rispetto ai soggetti "volontari". Nel nostro studio è da mettere in risalto che i risultati scaturiscono da un numero doppio e triplo di pazienti rispetto alla maggior parte degli studi citati precedentemente e dal fatto che abbiamo scelto di utilizzare un doppio approccio metodologico, semplice e tipo ISHAGE, diversamente dalla letteratura. Questo approccio ci ha permesso di evidenziare che non ci sono differenze significative tra i due metodi di approccio utilizzati sebbene l'analisi tipo ISHAGE risulti spesso con valori assoluti leggermente più bassi. Poiché inoltre in letteratura la cinetica di mobilizzazione delle CD34+ è assente o è riferita ad un periodo di poche ore o giorni dall'infarto (6-8-12h, 24 e 48h) oppure viene riportata in relazione alla 15°-20°-60° giornata di follow up i nostri risultati hanno dimostrato che la giornata di picco nella percentuale media di CD34+ risulta in quinta giornata, entro la prima settimana dall'infarto, abbastanza in linea con lo studio di Turan et al. 2007 che indica la settima giornata come quella di maggior mobilizzazione negli IMA e con Machalinski et al., 2006 che indica la prima settimana nei pazienti con ischemia cerebrale, mentre risultiamo meno in linea con lo studio di Grundmann che indica il picco di CD34+ tra la 3-4 giornata dall'infarto. Come già accennato queste diversità potrebbero essere dovute al numero di casi esaminati che rendono il dato più o meno significativo e che sono al massimo nel nostro studio oppure alle diversità procedurali o sperimentali utilizzate. Riguardo invece all'immunofenotipo dei subsets delle cellule staminali, sebbene in letteratura si sia dato ampio spazio soprattutto ai progenitori endoteliali CD34+CD133+ e/o VEGFR-2 o siano stati riportati lavori su cellule CD34+CXCR4+ (staminali in grado di fare homing), o CD34+CD117+(c-kit+) progenitori anche probabilmente miogenici Wojakowski et al., 2004; Aghila Rani et al., 2008, Grundmann et al., 2005), in questo studio, in accordo con Wojakowski et al., abbiamo confermato la presenza di questi ultimi progenitori circolanti considerati "cardiomiocitari" che sembrano aumentati nei primi sette giorni dall'infarto soprattutto in coincidenza con il picco di mobilizzazione delle CD34+, rispetto ai controlli e soprattutto alle SA, mentre, al contrario di quanto riportato in letteratura, sono meno evidenti differenze significative sull'espressione del CXCR4 sul totale delle cellule tra i pazienti e i controlli ma se si considerano invece le giornate dell'infarto si può osservare come l'espressione della fusina (CXCR-4) sia downregolata proprio in corrispondenza della 5° giornata dall'infarto quando le cellule iniziano a mobilizzarsi verso la periferia. L'espressione del CD31 è risultata invece meno informativa in quanto questo antigene, ritenuto specifico per le cellule endoteliali, risulta espresso ad alti livelli in tutti i gruppi. Questo studio, ci ha permesso dunque di confermare,

sebbene in percentuale molto basse, la presenza di cellule CD34+ circolanti coesprimenti soprattutto antigeni come il CD117 ed il CD31, sia in pazienti con infarto acuto che con angina stabile, e di proporre un approccio immunofenotipico almeno a 4 colori per approfondire lo studio dei subsets delle cellule CD34+ e capire quali siano i migliori da utilizzare a scopo clinico.

Bibliografia

1. Aghila Rani K.G, Jayakumar K, Srinivas G, Nair R.R, Kartha C.C. Isolation of c-kit-positive cardiosphere-forming cells from human atrial biopsy. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2008; 16(1): 50-6.
2. Dimmeler S. Viewpoint: Stem cells in Cardiology. *Circulation* 2006; 113:69-70
3. Grundmann F, Scheid C, Braun D, Zobel C, Reuter H, Schwiger R.H, Müller-Ehmsen J. Differential increase of CD34, KDR/CD34, CD133/CD34 and CD117/CD34 positive cells in peripheral blood of patients with acute myocardial infarction. *Clin Res Cardiol.* 2007; 96(9): 621-7. Epub 2007 Aug 13.
4. Hill JM, Zalos G, Halcox J.P.J, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, et al. Circulating progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Engl Med* 2003; 348:593-600.
5. Massa M, Rosti V, Ferrario M, Campanelli R, Ramajoli I, Rosso R, De Ferrari GM, Ferlini M, Goffredo L, Bertoletti A, Klersy C, Pecci A, Moratti R, Tavazzi L. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction. *Blood* 2005; 105: 1.
6. Paczkowska E, Larysz B, Rzeuski R, Karbicka A, Jatowski R, Kornacewicz-Jach Z, Ratajczak M.Z, Machalinski B. Human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34+ cells are mobilized into peripheral blood during stress related to ischemic stroke or acute myocardial infarction. *Eur J Haematol* 2005; 75:461-467.
7. Steurer M, Kern J, Zitt M, Amberger A, Bauer M, Gastl G, Untergasser G, Gunsilius E. Quantification of circulating endothelial and progenitor cells: comparison of quantitative PCR and four-channel flow cytometry. *BMC Research Notes* 2008; 1:71.
8. Valgimigli M, Rigolin G.M, Fucili A, Della Porta M, Soukhomskaja O, Malagutti P, Bugli A.M, Zenone Bragotti L, Francolini G, Mauro E, Castoldi G.L, Ferrari R. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004; 101: 1209-1212.
9. Valgimigli M, Rigolin G.M, Cittanti C, Malagutti P, Curello S, Percoco G.F, Bugli A. M, Porta M. D, Bragotti L. Z, Ansani L, Mauro E, Lanfranchi A, Giganti M, Feggi L, Castoldi G. L, Ferrari R. Use of granulocyte colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile. *Eur Heart J* 2005; 26 (18): 1838-45.
10. Wojakowski W, Kucia M, Kazmierski M, Ratajczak MZ, Tendera M. Circulating progenitor cells in stable coronary heart disease and acute coronary syndromes: relevant reparatory mechanism? *Heart* 2008; 94: 27-33.