

Apoptotische Leukozyten und deren Sekretionsprodukt

Relevanz für die Herzinfarkttherapie beim Menschen

Der akute Myokardinfarkt gefolgt von einem linksventrikulären Remodellingprozess ist eine der Hauptursachen für die chronische Herzinsuffizienz in der westlichen Welt. Basierend auf der Hypothese, dass apoptotische Zellen einen protektiven Effekt im Szenario eines Herzinfarkts aufweisen könnten, testeten wir diesen Mechanismus experimentell im Klein- und im klinisch relevanteren Großtiermodell. Im Speziellen zeigten parakrine Faktoren, die während des Apoptoseprozesses von Leukozyten sezerniert wurden, ein großes therapeutisches Potential, das vielfältige Vorteile gegenüber der bisher bekannten Stammzelltherapie bieten könnte.

Durch Verbesserung der Therapiestrategien in der Kardiologie konnte das Überleben und die Prognose von Patienten, die einen akuten Herzinfarkt erlitten haben, in den vergangenen Jahren verbessert werden. Dennoch stellt die Herzinsuffizienz, die sich aufgrund des Verlusts von vitalem Herzmuskelgewebe entwickelt, weiterhin ein sehr dramatisches Krankheitsbild dar (1). Große Hoffnungen wurden in den vergangenen Jahren in die Entwicklung von stammzellbasierten Therapieformen gesetzt. Experimentelle Arbeiten an Mäusen ließen eine gute Effektivität erwarten (2), diese konnte in klinischen Studien beim Menschen jedoch nur zum Teil bestätigt werden (3, 4).

Die Hypothese der „sterbenden Stammzellen“

Im Jahre 2005 postulierten Forscher der Berliner Charité die Hypothese der „sterbenden Stammzellen“ bezugnehmend auf klinische Studien der zellbasierten Herzinfarkttherapie (5). Diese besagt, dass jene

positiven Effekte, die in klinischen Stammzellstudien zum Teil beobachtet wurden, sich nicht direkt auf das regenerative Potential der Zellen zurückführen lassen. Im Gegenteil, die Autoren spekulierten in dieser Hypothese, dass sich aufgrund der Stammzellaufbereitung und Prozessierung viele Zellen im Stadium der Apoptose befanden und hierdurch immunmodulatorische Prozesse ausgelöst wurden. Dies wiederum führte zur Herunterregulierung inflammatorischer Reaktionen nach ischämieinduzierter Inflammation. Experimentelle Hinweise für diesen Mechanismus lieferten Studien aus den USA, die zeigen konnten, dass apoptotische Zellen immun-suppressive Signale transduzieren können (6). Die Berliner Forscher schlussfolgerten, dass apoptotische Stammzellen eine Verringerung der Inflammationsreaktion nach Herzinfarkt verursacht haben könnten.

Nachweis der Hypothese

In experimentellen Studien unserer Arbeitsgruppe haben wir diese Hypothese aufgegriffen, anstatt der apoptotischen Stammzellen wurden allerdings Leukozyten in unseren Experimenten verwendet (7, 8). Dieses Vorgehen wurde gewählt, da in der Literatur kein Hinweis zu finden war, ob prozessierte Leukozyten vergleichbare Effekte wie Stammzellen im experimentellen Setting eines Herzinfarkts auslösen. Explizit ist hier erwähnt, dass dieses Kontrollexperiment in allen bisherig publizierten Stammzellenstudien nicht durchgeführt wurde.

Wir konnten zeigen, dass die Beigabe apoptotischer Zellen zu Zellkulturen LPS stimulierter humaner PBMC (peripheral blood mononuclear cells) und aufgereinigter Monozyten die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie



Abb. 1: Repräsentative Präparate von Rattenherzen, die sechs Wochen nach Herzinfarkt explantiert wurden. Große Infarkt Narben fanden sich in der Kontrollgruppe (Injektion von normalem Zellkulturmedium), wohingegen die Verabreichung von Suspensionen apoptotischer Zellen zu einer Verringerung des Narbenareals führte. Die Injektion nicht-apoptotischer Zellen als weitere Kontrolle zeigte nur geringfügig kleinere Infarkt Narben verglichen mit der Medium-Kontrollgruppe.

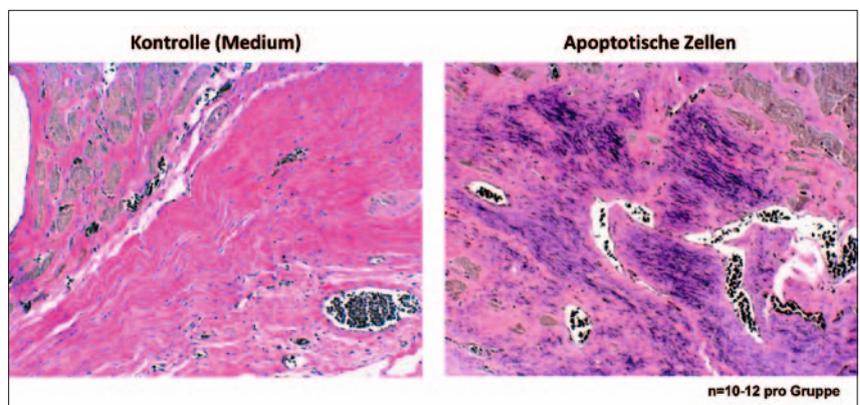


Abb. 2: Ausschnitte der Randzonen der Infarkt Narben. Herzen von Ratten, denen Suspensionen apoptotischer Zellen injiziert wurden, wiesen sechs Wochen nach Herzinfarkt in der Übergangszone von vitalem Myokard hin zur Narbe eine signifikante Anreicherung von elastischen Fasern auf. Narben von Tieren aus der Kontrollgruppe waren fast ausschließlich aus kollagenem Gewebe aufgebaut (Färbung Elastica van Gieson).

¹⁺²Dr. Michael Lichtenauer, PhD
Assoc. Prof. Univ. Doz. Dr. Hendrik Jan Ankersmit
Abteilung für Thoraxchirurgie, Medizinische
Universität Wien und Christian Doppler Labor für
Diagnose und Regeneration von Herz- und Tho-
raxerkrankungen, Wien

³ Michael Mildner, PhD
Abteilung für Dermatologie
Medizinische Universität Wien

⁴ Prof. Univ. Doz. Dr. Mariann Gyöngyösi
Universitätsklinik für Innere Medizin II, Abteilung
für Kardiologie, Medizinische Universität Wien

Interleukin-1beta und Interleukin-6, reduzierte. Ähnliche Ergebnisse lieferten auch Mixed-Lymphocyte Reactions. Weiters konnten wir zeigen, dass Apoptose-induktion zwar zu einer Reduktion von klassischen pro-inflammatorischen Faktoren führte, die Expression von pro-angiogenetischen Proteinen jedoch aktiv durch den Apoptoseprozess gesteigert wurde. Diese Erkenntnis, dass Leukozyten, die in die Apoptose getrieben werden, aktiv mRNA transkribieren und Proteine sezernieren, war in der Literatur nicht beschrieben und hat das Design der nachfolgenden Experimente entscheidend beeinflusst. Die wissenschaftliche Neudeutung einer apoptotischen Zelle als „Bioreaktor“ hat uns initial massiv erstaunt.

Um diese zellbiologische Erkenntnis zu erweitern, setzten wir ein Kleintiermodell des akuten Herzinfarkts ein. Hierfür wurden stammgleichen Ratten Leukozyten entnommen, und diese Zellen mit 60 Gray bestrahlt, um Apoptose zu induzieren. Im Folgenden wurden die Zellen für bis zu 24 Stunden in Zellkulturmedium inkubiert. Die Apoptoserate der Leukozyten lag nach diesem Prozess bei über 80 Prozent. Nach Induktion des Herzinfarkts wurden stammgleichen Tieren Suspensionen von bestrahlten, apoptotischen Leukozyten einerseits intravenös über die Femoralvene als auch mittels intramyokardialer Injektion in das Infarkttrandgebiet verabreicht. Als Kontrollen fungierten sowohl die Verabreichung von nicht-apoptotischen Zellen, von frischem Zellkulturmedium als auch eine Versuchsgruppe mit Sham-Operation. In histologischen Analysen des Infarktgebiets drei Tage nach LAD Ligatur zeigten sich in HE-Präparaten von Tieren, denen apoptotische Zellen verabreicht wurden, sehr viel dichtere zelluläre Infiltrate im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Beim Versuch dieses Zellinfiltrat mittels Immunhistologie genauer zu definieren, zeigte sich, dass die Herzen von Tieren, denen Suspensionen apoptotischer Zellen injiziert wurden, eine weit höhere Dichte von Makrophagen und Endothelproge-

nitorzellen (Stammzellen) aufwiesen. Dieses Zellbild könnte auf eine schnellere Abheilungsreaktion nach dem Infarktschaden hindeuten. In einer längerfristigen Auswertung, die sechs Wochen nach Infarkt durchgeführt wurde, zeigte sich, dass die Verabreichung von apoptotischen Zellen, sowohl intravenös als auch intramyokardial, die Infarktgröße signifikant reduzieren konnte (Abb. 1). Die Injektion nicht-apoptotischer Zellen zeigte gegenüber der Medikationskontrollgruppe nur eine sehr geringe Wirksamkeit. Bei genauerer Analyse des kardialen Narbengewebes zeigten sich weitere Auffälligkeiten. Während die Narben in der Kontrollgruppe ausschließlich aus Kollagen

aufgebaut waren, fand sich hingegen in der Therapiegruppe eine beeindruckende Akkumulation von elastischen Fasern (Abb. 2). Die höchste Expression von Elastin konnte im kardialen Narbengewebe jener Tiere nachgewiesen werden, denen die Suspensionen apoptotischer Zellen direkt in die Randbezirke des Infarktareals injiziert wurden. Ähnliche Effekte mit einer vergleichbaren Anreicherung von elastischen Fasern im kardialen Narbengewebe nach Herzinfarkt konnten bisher nur in experimentellen Studien, die Plasmidvektoren mit dem Elastin-gen eingesetzt hatten, nachgewiesen werden (9). Im Weiteren wurden auch Auswertungen mittels Echokardiographie durchgeführt, die zeigen konnten, dass Ratten, denen apoptotische Zellen verabreicht wurden, eine signifikante Verbesserung der kardialen Funktion zeigten, u.a. der Ejektionsfraktion.

Kardioprotektion durch parakrine Faktoren apoptotischer Zellen

Basierend auf unseren Vordaten, die zeigten dass im Zellkulturüberstand apoptotischer Zellen höhere Konzentrationen von pro-angiogenetischen Zytokinen und Chemokinen mittels ELISA nachgewiesen werden konnten, versuchten wir in unseren weiteren Experimenten den speziellen Einfluss von parakrinen Faktoren in diesem Kontext weiter zu definieren. Hierfür modifizierten wir unsere initiale Hypothese basierend auf der Fragestellung, ob die beobachteten protektiven Effekte in der vorangegangenen Tierstudie durch die apoptotischen Zellen selbst, oder durch lösliche, parakrine Faktoren, die die Zellen nach der Apoptoseinduktion während der Kultivierungsphase in den Zellkulturüberstand sezernierten, ausgelöst wurden. Daher trennten wir nach der Zellinkubation den Überstand mittels Zentrifugation von den apoptotischen Zellen. In der Folge wurde die so gewonnene flüssige Fraktion gefriergetrocknet, um eine pulverige Substanz zu gewinnen, die in dieser Form eine bessere Stabilität aufweist und nach Resus-

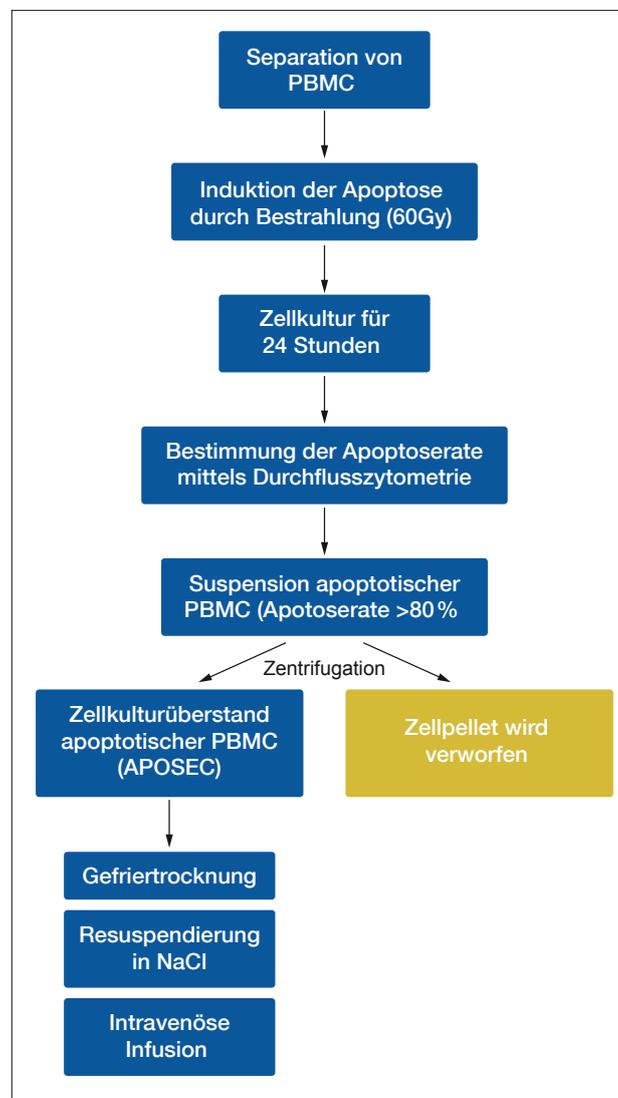


Abb. 3: Illustration des Herstellungsprozesses von APOSEC. Nach der Separation der mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurde die Apoptose mittels Bestrahlung induziert. Nach einer Zellinkubationsperiode von 24 Stunden und Messung der Apoptoserate im Durchflusszytometer wurde die Zellfraktion vom Überstand mittels Zentrifugation abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand gefriergetrocknet, kurz vor Verabreichung in den Tiermodellen konnte so die pulverige Substanz in NaCl resuspendiert und für die intravenöse Infusion vorbereitet werden.

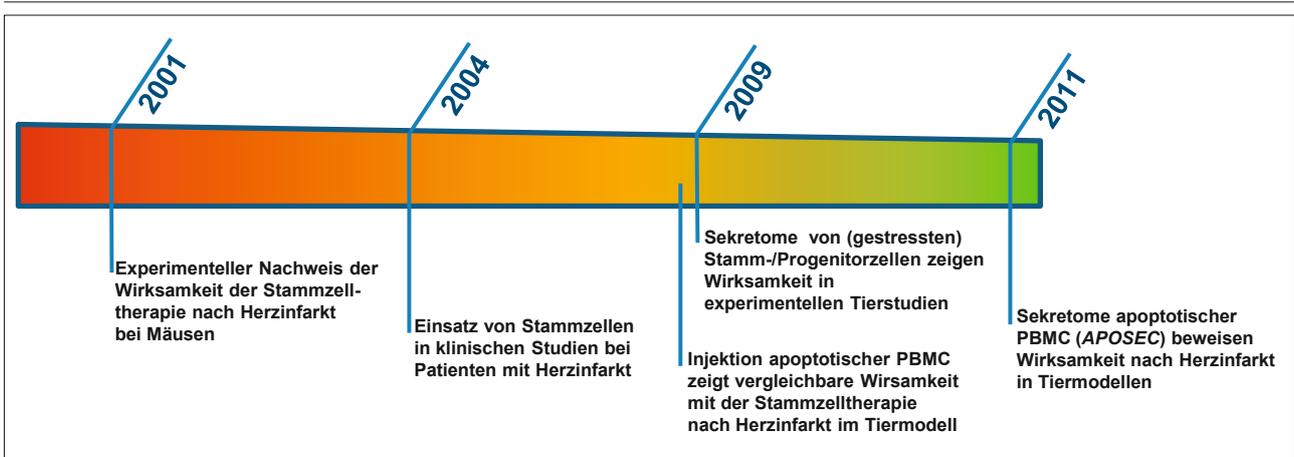


Abb. Autoren

Abb. 4: Entwicklung der Zelltherapie nach Herzinfarkt über die vergangenen zehn Jahre dar. Beginnend mit dem experimentellen Nachweis, dass Stammzellen die kardiale Funktion nach Herzinfarkt verbessern, über die Entdeckung des therapeutischen Potentials von Sekretomen bis hin zur Entwicklung von APOSEC.

pendierung leicht als intravenöse Therapie einsetzbar ist. Dieser Prozessvorgang macht es möglich, ein „off-the-shelf“-Präparat für einen akuten Herzinfarkt potentiell zur Verfügung zu haben. Aufgrund des Produktionsprozesses nannten wir die so hergestellte Substanz *APOSEC*, dieses Akronym steht für *apoptotic cell secretome* (Abb. 3) (10).

Ähnliche Hypothesen wurden bereits seit kurzer Zeit auch von anderen Forschungsgruppen mit Hinblick auf die Stammzelltherapie bei ischämischen Ereignissen verfolgt. So konnten die Autoren der BOOST Studie nachweisen, dass in der (stamm-)zellbasierten Herzinfarkttherapie parakrine Faktoren, wie Zytokine und Wachstumsfaktoren, eine bedeutende Rolle spielen. In *in vitro* Experimenten konnten sie nachweisen, dass durch die „konditionierten“ Zellkulturüberstände von Knochenmarkszellen pro-angiogenetische, zytoprotektive und auch proliferative Signale transduziert werden konnten (11). Ähnliche Effekte beschrieben kürzlich auch italienische, Schweizer und niederländische Ar-

beitsgruppen (12, 13, 14). Tenor all dieser aktuellen Publikationen: Die protektiven Effekte, die in klinischen Studien der Stammzelltherapie des Herzinfarkts gesehen wurden, wurden wahrscheinlicher nicht durch die Stammzellen selbst, sondern durch deren Sekretionsprodukt induziert. *Abbildung 4* illustriert die publikatorische Entwicklung der vergangenen zehn Jahre im Bereich der kardialen Zelltherapie, einen Bogen spannend von der Entdeckung, dass die Injektion von Stammzellen positive Einflüsse auf den Erhalt der Herzfunktion nach Infarkt zeigt, bis hin zur Entdeckung, dass Sekretome von Stammzellen, aber auch von Leukozyten/PBMC, kardioprotektive Effekte nach Infarkt aufweisen (Abb. 4).

Aufbauend auf diesen Publikationen und unseren experimentellen Vordaten versuchten wir anschließend, die von uns gewonnenen Zellkulturüberstände apoptotischer Zellen wieder in einem Tiermodell des akuten Herzinfarkts zu testen. In diesen Experimenten konnten wir ähnlich Effekte wie in unseren vorangegangenen Arbeiten

beobachten. Zum Zeitpunkt von drei Tagen nach Induktion des Herzinfarkts zeigten mit *APOSEC* therapierte Ratten ein kleineres Nekroseareal und mehr Makrophagen und Endothelprogenitorzellen im Infarktgebiet. Sechs Wochen nach Herzinfarkt wiesen Tiere aus der Therapiegruppe kleinere kardiale Narben auf. Weiters waren wieder echokardiographische Parameter, u.a. die Ejektionsfraktion, nach *APOSEC*-Gabe signifikant verbessert.

Da wir die positiven Effekte mit *APOSEC* in diesem Kleintiermodell nachweisen konnten, war es unser nächstes Ziel, die Verabreichung von *APOSEC* in einem Großtiermodell, das dem klinischen Szenario eines Menschen, der einen akuten Herzinfarkt erleidet, besser vergleichbar ist, auszutesten. Hierfür wählten wir ein Ischämie/Reperfusion- Herzinfarktmodell an Schweinen, das am geschlossenen Thorax mittels Ballonkatheter durchgeführt werden kann. Für diese Versuchsreihen produzierten wir zwei unterschiedliche Dosierungen von *APOSEC*-Präparaten aus Zellkulturüberständen apoptotischer Schweine-PBMC, gewonnen von jeweils $250 \cdot 10^6$ beziehungsweise von $1 \cdot 10^9$ Zellen. Im Versuchsaufbau der Großtierstudie wurde bei allen Tieren mittels Ballonkatheter, der in der LAD platziert wurde, für 90 Minuten eine Myokardischämie induziert. Vierzig Minuten nach Experimentstart wurde das pulverige *APOSEC*-Präparat in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert, als 250 Milliliter Kurzinfusion vorbereitet und im Anschluss den Tieren intravenös verabreicht. Als Kontrolle diente die Verabreichung von gefriergetrocknetem und anschließend in Kochsalzlösung resuspendiertem normalem Zellkulturmedium. Die Reperfusionphase wurde 90 Minuten nach Start der Experimente eingeleitet.

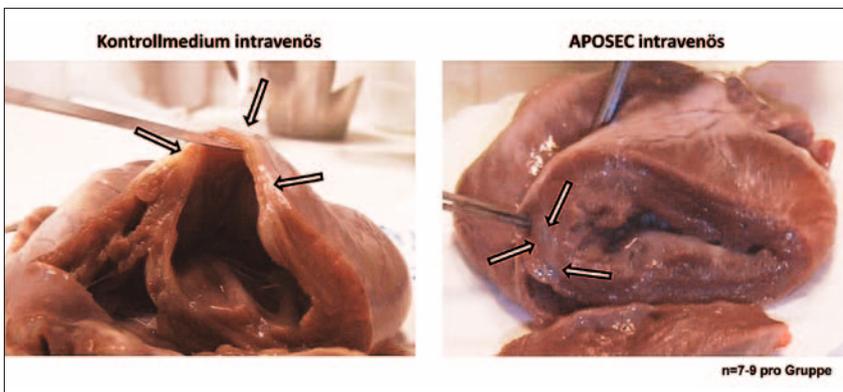


Abb. 5: Repräsentative Aufnahmen von Schweineherzen, die 30 Tage nach Herzinfarkt entnommen wurden. Herzen von Tieren aus der Kontrollgruppe zeigten große Infarkt Narben und Dilatation des linken Ventrikels, wohingegen im Myokard von APOSEC (Hochdosis) therapierten Schweinen nur kleine Narbenareale sichtbar waren und die Ventrikelgeometrie sehr gut erhalten blieb.

Diese Zeitpunkte wurden deshalb gewählt, da in einem Notfallszenario unter optimalen Bedingungen ein Gefäßverschluss nach 90 Minuten wiedereröffnet werden könnte, wohingegen eine erste intravenöse Therapie, beispielsweise durch den Notarzt, bereits 40 Minuten nach Symptombeginn gestartet werden kann. Um den Effekt der APOSEC-Therapie nachweisen zu können, wurde sowohl drei Tage als auch 30 Tage nach Herzinfarkt eine kardiale Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Diese Auswertungen zeigten zum Zeitpunkt von drei Tagen nach Experimentbeginn bereits eine signifikante Reduktion des Infarkt-schadens in der APOSEC-Hochdosisgruppe (Überstände von $1 \cdot 10^9$ apoptotischen Zellen). Eine signifikante Verbesserung auch von funktionalen Parametern zeigte die Auswertung der MRTs, die 30 Tage nach Infarkt durchgeführt wurden, unter anderem mit einer hochsignifikanten Steigerung des Herz-index und der Ejektionsfraktion. Ebenfalls 30 Tage nach Experimentstart wurden die Herzen der Tiere explantiert und makroskopisch analysiert. Herzen, die Kontrollieren entnommen wurden, zeigten große Infarkt-narben und eine Dilatation des linken Ventri-kels, wohingegen die ventrikuläre Geometrie in der (Hochdosis-)Therapiegruppe gut

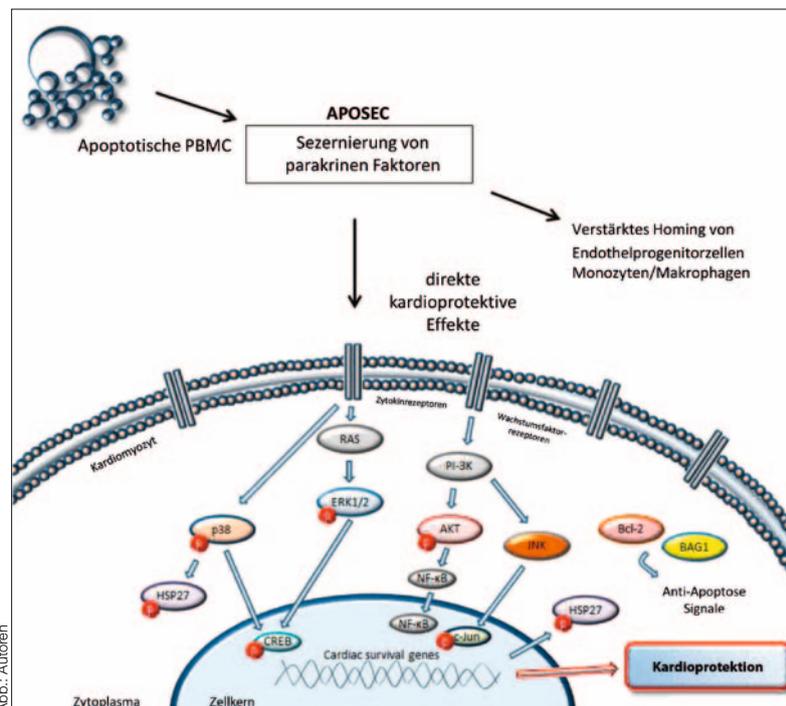


Abb.: Autoren

Abb. 6: Zusammenfassung des therapeutischen Prinzips von APOSEC. Zellen aus dem peripher venösen Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) sezernieren während des Apoptoseprozesses eine große Bandbreite von parakrinen Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren, etc.), die einerseits das Homing von Endothelprogenitorzellen und Monozyten/Makrophagen in das Infarktgebiet befördern, als auch direkte kardioprotektive Effekte auf das ischämische Myokard ausüben. Diese kardioprotektiven Signale wurden über verstärkte Phosphorylierung von Signalfaktoren übermittelt, die in früheren Studien mit Kardioprotektion assoziiert wurden (u.a. AKT, ERK1/2, CREB).

erhalten blieb. Sowohl bei makroskopischer Betrachtung als auch bei histologischer Analyse fanden sich nur geringe Anzeichen von kollagenem Narbengewebe (Abb. 5).

Diese Ergebnisse zeigten, dass der myokardiale Schaden durch die Verabreichung von APOSEC signifikant reduziert werden konnte. In weiteren *in vitro* Assays wollten wir versuchen, die protektiven Mechanismen dahinter genauer nachzuweisen. Hierfür inkubierten wir humane Kardiomyozyten mit APOSEC und konnten in Western Blots zeigen, dass die anti-apoptischen Proteine Bcl-2 und BAG1 durch APOSEC massiv hochreguliert wurden. Weiters zeigten sich erhöhte Raten der Phosphorylierung von Signalfaktoren, u.a. von Akt, Erk1/2 und CREB, die in vorangegangenen Studien mit Kardioprotektion und kardialen Conditioning nach Ischämie assoziiert wurden (15) (Abb. 6). Limitierend muss angemerkt werden, dass auch noch andere zelluläre Mechanismen, mögliche Interaktionen mit Granulozyten und Plättchenaktivierung möglich sind und derzeit in unserem Labor experimentell beforcht werden.

Zusammenfassung

Es lässt sich der Schluss ziehen, dass APOSEC im Szenario eines akuten Herzinfarkts eine potente Zytoprotektion vermitteln und so den Verlust von vitalem Herzmuskelgewebe reduzieren kann. Verglichen mit relativ aufwändigen Zellprozessierungsmaßnahmen bei der kardialen Stammzelltherapie würde APOSEC einerseits ein leichter herzustellen Präparat (das aus Kulturüberschüssen von Zellen aus dem peripher venösen Blut, ev. von vielen Spendern gepoolt produziert werden könnte) darstellen, als auch mittels intravenöser Infusion auch eine einfache Form der Verabreichbarkeit bieten. Vergleichbar wäre dies beispielsweise mit Gerinnungsfaktorpräparaten oder intravenösen Immunglobulinen (IVIG).

Ausblick

Um die Wirksamkeit dieser Therapiestrategie auch in zukünftigen klinischen Studien testen zu können, ist es nun in den weiteren Schritten von Nöten eine sichere und zuverlässige Produktion, den Richtlinien für

„Good Manufacturing Practice“ entsprechend, aufzustellen. Toxikologische dose-escalation Studien mit humanem APOSEC wurden bereits durchgeführt, diese haben ergeben, dass selbst die hundertfache Dosis (der angenommenen Humandosis entsprechend) keinen akut toxischen Effekt hatte (Prüfbericht Seibersdorf Laboratories Internal Study Code: MUW4, MUW5, 22.09.2010). Von wissenschaftlicher Seite sind wir überzeugt, dass klinische Studien die Konsequenz unserer prä-klinischen experimentellen Daten darstellen. Diese sind jedoch nach unserem momentanen Finanzrahmen unserer Arbeitsgruppe nicht im Bereich des Möglichen. Bereits die Durchführung der Grundlagenforschung und der präklinischen Großtierstudie erforderte einen finanziellen Aufwand von ca. 250.000 Euro. Vorsichtige Schätzungen für die nun weiter notwendige GMP-Produktion von APOSEC sind mit ca. einer Million Euro zu beziffern, weiterführende toxikologische Studien belaufen sich auf ca. 300.000 Euro, eine klinisch akademische Studie mit Monitoring würde einen Aufwand von ca. 2,5 Millionen Euro benötigen (Gesamtsumme 3,8 Millionen Euro). Diese abschließende Darstellung der weiteren Entwicklungskosten offenbart die Potentialitäten und Limitationen, die früher oder später einer erfolgreichen Produktweiterentwicklung entgegen stehen. ■

Danksagung: Allen PhD-Studenten und -Studentinnen, Diplomanden und Diplomandinnen, wissenschaftlichen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen, Mentoren und Mentorinnen sowie den Financiers gewidmet.

Korrespondenz:
 Assoc. Prof. Univ. Doz. Dr. Hendrik Jan Ankersmit
 Oberarzt der Abteilung für Thoraxchirurgie
 Medizinische Universität Wien
 Christian Doppler Labor für Diagnose und Regeneration von Herz- und Thoraxerkrankungen
 Währinger Gürtel 18–20
 1090 Wien, Tel.: 01-40400-6777, Fax: 01-40400-6777
 Email: hendrik.ankersmit@meduniwien.ac.at

Acknowledgements

Die initialen Studien wurden finanziert durch private Mittel des Studienleiters. Durch Kommunikation mit Business Angel Investors und deren Bereitschaft wurde die weitere Arbeit von 2005 bis 2008 finanziell subsidiert. Im Jahr 2008 wurde aufgrund der vorhandenen Patentapplikationen ein Start-up Unternehmen gegründet (APOSCEANCE AG). Nach peer-review hat die Christian Doppler Gesellschaft das Christian Doppler Labor für Diagnose und Regeneration von Herz- und Thoraxerkrankungen ins Leben gerufen.
 Ein Kooperationsvertrag zwischen der APOSCEANCE AG und der Medizinischen Universität Wien, Universitätsklinik für Chirurgie, garantiert eine nachhaltige Zusammenarbeit der Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnenn, klinisch tätigen Kardiologen und Kardiologinnen, Chirurgen und Chirurginnen sowie der Stakeholder. Die Produktion von APOSEC und deren klinische Indikationen wurden patentrechtlich abgesichert (EP2201954, WO2010070105-A1, eingereicht 18.12.2008).

LITERATUR

1 Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM et al. Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction. *Circulation*. 2008 Nov 11;118(20):2057–62

2 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Aug 28;98(18):10344–9

3 Meyer GP, Wollert KC, Lotz J et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *Eur Heart J*. 2009 Dec;30(24):2978–84

4 Lunde K, Solheim S, Aakhus S et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006 Sep 21;355(12):1199–209

5 Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA et al. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 15;46(10):1799–802

6 Hoffmann PR, Kench JA, Vondracek A et al. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J Immunol*. 2005 Feb 1;174(3):1393–404

7 Ankersmit HJ, Hoetzenecker K, Dietl W et al. Irradiated cultured apoptotic peripheral blood mononuclear cells regenerate infarcted myocardium. *Eur J Clin Invest*. 2009 Jun;39(6):445–56

8 Lichtenauer M, Mildner M, Baumgartner A et al. Intravenous and intramyocardial injection of apoptotic white blood cell suspensions prevents ventricular remodelling by increasing elastin expression in cardiac scar tissue after myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 2011 Jun;106(4):645–55

9 Mizuno T, Mickle DA, Kiani CG et al. Overexpression of elastin fragments in infarcted myocardium attenuates scar expansion and heart dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Jun;288(6):H2819–27

10 Lichtenauer M, Mildner M, Hoetzenecker K et al. Secretome of apoptotic peripheral blood cells (APOSEC) confers cytoprotection to cardiomyocytes and inhibits tissue remodelling after acute myocardial infarction: a preclinical study. *Basic Res Cardiol*. 2011 [ahead of print]. DOI: 10.1007/s00395-011-0224-6

11 Korf-Klingebiel M, Kempf T, Sauer T et al. Bone marrow cells are a rich source of growth factors and cytokines: implications for cell therapy trials after myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008 Dec;29(23):2851–8

12 Gnechchi M, Melo LG. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells: isolation, expansion, characterization, viral transduction, and production of conditioned medium. *Methods Mol Biol*. 2009;482:281–94

13 Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M et al. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One*. 2009 May 21;4(5):e5643

14 Timmers L, Lim SK, Hofer IE et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem Cell Res*. 2011 May;6(3):206–14

15 Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev*. 2007 Dec;12(3–4):217–34

