



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**Ιατρική Σχολή**

**Τομέας Παθολογίας**

**Γ' Καρδιολογική Κλινική**

Καθηγητής Ε. Βαβουρανάκης

*<<Χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων για τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου>>*

**ΤΙΤΙΚΑ Κ.ΣΦΑΚΙΑΝΑΚΗ**

**Καρδιολόγος**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2020**

**Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 13/11/2012**

**Ημερομηνία δήλωσης θέματος: 19/12/2018**

**Αρχική Τριμελής Επιτροπή**

Καθηγήτρια Μαρία Αναστασίου Νανά - Επιβλέπων μέλος

Επίκουρος Καθηγητής Ιωάννης Τερροβίτης

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιωάννης Παρίσης

**Τριμελής Επιτροπή Ιούλιος 2014**

Καθηγήτρια Μαρία Αναστασίου Νανά - Επιβλέπων μέλος

Καθηγητής Ιωάννης Νανάς

Αναπληρωτής καθηγητής Ιωάννης Παρίσης

**Τριμελής Επιτροπή Μάιος 2017**

Καθηγήτρια Μαρία Αναστασίου Νανά - Επιβλέπων μέλος

Καθηγητής Αντώνης Μανώλης

Αναπληρωτής Καθηγητής Ιωάννης Παρίσης

**Τριμελής Επιτροπή Ιούλιος 2018**

Καθηγητής Σεραφείμ Νανάς - Επιβλέπων μέλος

Καθηγητής Αντώνης Μανώλης

Καθηγητής Ιωάννης Παρίσης

**Ημερομηνία Κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 4/11/2020**

*Η έγκριση διδακτορικής διατριβής από το τμήμα Ιατρικής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει ότι αποδέχεται τις γνώμες του συγγραφέα. (ΝΟΜΟΣ 5343/1932, Άρθρο 202, παράγραφος 2)*

## Ὅρκος Ἱπποκράτη

Ὅμνυμι Ἀπόλλωνα ἰητρόν καί Ἀσκληπιόν καί Ὑγείαν καὶ Πανάκειαν καὶ Θεούς πάντας τε καὶ πάσας, ἴστορας ποιούμενος, ἐπιτελέα ποιήσῃς κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν ὄρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε.

Ἠγήσεσθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γενέτησιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινώσεσθαι, καὶ χρεῶν χρήζοντι μετάδοσιν ποιήσεσθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτοῦ ἀδελφεοῖς ἴσον ἐπικρινέειν ἄρρεσι, καὶ διδάξῃς τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρήζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγελίης τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι καὶ τοῖσι τοῦ ἐμέ διδάξαντος καίμαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἰητρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί

Διαιτήμασί τε χρήσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμήν, ἐπί δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίῃ εἴρξειν.

Οὐ δώσω δὲ οὐδέ φάρμακον οὐδενί αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδέ ὑφηγήσομαι ξυμβουλίην τοιήνδε· ὁμοίως δὲ οὐδέ γυναικί πεσσόν φθόριον δώσω.

Ἀγνώω δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμόν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν.

Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲν μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσιν πρήξιος τῆσδε

Ἐς οἰκίας δὲ ὀκόσας ἂν ἐσίω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτός ἐών πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθορίας τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαίων καὶ ἀνδρείων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων.

Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἰδῶ ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἅ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἠγεύμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα.

Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποιέοντι καὶ μὴ ξυγχέοντι εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης, δοξαζομένῳ παρὰ πᾶσιν ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰεὶ χρόνον· παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιορκέοντι, τάναντία τουτέων.

*Στη μνήμη του αγαπημένου μου πατέρα,*

## Curriculum Vitae

Σύντομο Βιογραφικό Σημείωμα: Τίτικα Σφακιανάκη

### Προσωπικά Στοιχεία:

Όνομα, Επίθετο: Τίτικα Σφακιανάκη

Όνομα Πατρός: Κωνσταντίνος

Όνομα Μητρός: Αικατερίνη

Ημ. γέννησης: 28/01/1985

Email: titikasfakianaki@hotmail.com

### Εργασιακή Εμπειρία:

**Απρίλιος 2020- έως και σήμερα:** Επικουρική Επιμελήτρια Καρδιολογίας. Καρδιολογική Κλινική ΓΝΝΘΑ << Η ΣΩΤΗΡΙΑ >>

**Ιανουάριος 2016- Απρίλιος 2020:** Ειδικευόμενη Καρδιολογίας

Νοσοκομείο ΓΝΑ Γ.Γεννηματάς - Καρδιολογική κλινική

**Δεκέμβριος 2013 - Ιούνιος 2015:** Έναρξη ειδικότητας- Άσκηση στην κλινική Παθολογία - Προσπατιούμενο κομμάτι για την συνέχιση στην ειδικότητα της Καρδιολογίας.

Νοσοκομείο ΓΝΑ Γ. Γεννηματάς - Γ΄ Παθολογική κλινική.

**Νοέμβριος 2011 - Νοέμβριο 2013:** Επιστημονικός συνεργάτης της κλινικής και πειραματικής ομάδας Καρδιακής Ανεπάρκειας του Καθηγητή Καρδιολογίας κ. Ι. Νανά. Παρακολούθηση ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και συμμετοχή στις πειραματικές δραστηριότητες της ομάδας πάνω στη στεφανιαία νόσο και την καρδιακή ανεπάρκεια.

**Μάρτιος 2010 - Μάρτιο 2011:** Αγροτικός Ιατρός.

**Εκπαίδευση Δεξιότητες:**

**Μάρτιος 2020:** Απόκτηση τίτλου ειδικότητας Καρδιολογίας.

**Ιανουάριος 2016- Ιανουάριο 2020:** Άσκηση στην ειδικότητα της Καρδιολογίας.

**Δεκέμβριος 2013- Ιούλιο 2015:** Άσκηση στην παθολογία γενικό μέρος για την απόκτηση της ειδικότητας της καρδιολογίας.

**Οκτώβριος 2009- Δεκέμβριος 2009:** Τρίμηνο Εκπαιδευτικό πρόγραμμα στα πλαίσια μετεκπαιδευτικού προγράμματος του νοσοκομείου Υγεία για απόφοιτους Ιατρικής Σχολής.

**Νοέμβριος 2009:** Ολοκλήρωση με επιτυχία του σεμιναρίου ALS provider course Πανεπιστήμιο Κρήτης - Ιατρική Σχολή

**Μάρτιος 2009:** Πτυχίο Ιατρικής - Ιατρική Σχολή Αθηνών  
Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Συμμετοχή - Συνεργασία:**

Συμμετοχή στη διεθνή πολυκεντρική μελέτη Atmosphere, Efficacy and safety of aliskiren and aliskiren/enalapril combination on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure (NYHA Class II-IV).

Συμμετοχή στη διεθνή πολυκεντρική μελέτη Cantos, A randomized, double-blind, placebo-controlled, event-driven trial of quarterly subcutaneous canakinumab in the prevention of recurrent cardiovascular events among stable post-myocardial infarction patients with persistently elevated hsCRP.

Συμμετοχή στη διεθνή πολυκεντρική μελέτη Compas 2, Effects of the combination of bosantan and sildenafil versus sildenafil monotherapy on pulmonary arterial hypertension.

## Δημοσιεύσεις

1. Pharmacologic inhibition of the mitochondrial  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger protects against ventricular arrhythmias in a porcine model of ischemia-reperfusion. Sventzouri S, Nanas I, Vakrou S, Kapelios C, Sousonis V, Sfakianaki T, Papalois A, Manolis AS, Nanas JN, Malliaras K. *Hellenic J Cardiol*. 2018 Jul - Aug;59(4):217-222. doi: 10.1016/j.hjc.2017.12.009. Epub 2017 Dec 30.
2. High furosemide dose has detrimental effects on survival of patients with stable heart failure. Kapelios CJ, Kaldara E, Ntalianis A, Sousonis V, Repasos E, Sfakianaki T, Vakrou S, Pantsios C, Nanas JN, Terrovitis JV. *Hellenic J Cardiol*. 2015 Mar-Apr;56(2):154-9.
3. Intracoronary Administration of Allogeneic Cardiosphere-Derived Cells Immediately Prior to Reperfusion in Pigs With Acute Myocardial Infarction Reduces Infarct Size and Attenuates Adverse Cardiac Remodeling. Vasileios Sousonis, TitikaSfakianaki, Argirios Ntalianis, Ioannis Nanas, DVM, Christos Kontogiannis, Dionysios Aravantinos, ChrisKapelios, LamprosKatsaros, MD, Maria Nana, Dimitrios Sampaziotis, Despina Sanoudou, Apostolos Papalois, Konstantinos Malliaras, First Published July 17 2020
4. COVID-19 Pandemic and Angina Pectoris: What If the Pain Pathway Is Pharmaceutical Modulated? Eftychios Siniorakis, Spyridon Arvanitakis, Titika Sfakianaki, Antonis Katsianis, Georgia Konstantopoulou, Veneta Papagiannopoulou *Pain Med*. 2020 Sep 7; pnaa300. doi: 10.1093/pm/pnaa300.

## Συμμετοχή σε Συνέδρια

- Αναρτημένη ανακοίνωση στο 13<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, της εταιρείας μελέτης και έρευνας της καρδιακής ανεπάρκειας, τον Φεβρουάριο του 2012, με τίτλο, « Η υψηλή δόση φουροσεμίδης ως προγνωστικός παράγοντας σε χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια» Χ.Καπέλιος, Ι.Τερροβίτης, Ε.Καλδάρια, Β.Σουσιώνης, Ν.Μιχελινάκης, Π.Σίσκος, Σ.Σβεντζούρη, Σ.Βάκρου, Ζ.Μάργαρη, Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Ι.Νανάς.
- Αναρτημένη Ανακοίνωση στο 33<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, το Νοέμβριο του 2012, με τίτλο « Η ενδοαορτική αντλία αντιωθήσεως βελτιώνει τη λειτουργικότητα της δεξιάς κοιλίας σε ασθενείς με σοβαρή καρδιακή



ανεπάρκεια» Χ. Καπέλιος, Ι.Τερροβίτης, Μ. Μπόνιος, Β.Σουσώνης, Ζ.Μάργαρη, Ε.Καλδάρα, Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Λ.Κατσαρός, Δ.Αναγνώστου, Π.Σίσκας, Σ.Τουμανίδης, Ι.Νανάς.

- Αναρτημένη Ανακοίνωση στο 33<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, το Νοέμβριο του 2012, με τίτλο « Σε ασθενείς με σταθερή χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια η ελάττωση της δόσης της φουροσεμίδης δεν οδηγεί σε επιδείνωση των συμπτωμάτων και αύξηση του σωματικού βάρους» Χ.Καπέλιος, Ι.Τερροβίτης, Ε.Καλδάρα, Α.Νταλιάνης, Β.Σουσώνης, Τ.Σφακιανάκη, Δ.Αναγνώστου, Ζ.Μάργαρη, Γ.Σαΐνης, Ι.Νανάς.
- Αναρτημένη Ανακοίνωση στο 33<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, το Νοέμβριο του 2012, με τίτλο « Η επίδραση μιας ενδοστεφανιαίας δόσης δεξαμεθαζόνης κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης στην αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου, σε χρόνιο χοίρειο μοντέλο ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης» Α.Νταλιάνης, Ν.Μιχελινάκης, Β.Σουσώνης, Σ.Σβεντζούρη, Μ.Μπόνιος, Μ.Τσαματσούλης, Τ.Σφακιανάκη, Α.Παπαλόης, Ι.Νανάς, Ι.Τερροβίτης.
- Αναρτημένη Ανακοίνωση στο Αναρτημένη Ανακοίνωση στο 33<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, το Νοέμβριο του 2012, με τίτλο « Ο ρόλος της αναστολής της μιτοχονδριακής αντλίας  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  στον περιορισμό της βλάβης από επαναιμάτωση στο οξύ εμφραγμα του μυοκαρδίου, σε χοίρειο μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης» Σ.Σβεντζούρη, Λ.Κατσαρός, Β.Σουσώνης, Μ.Τσαματσούλης, Χ.Καπέλιος, Ν.Μιχελινάκης, Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Α.Παπαλόης, Ι.Νανάς, Ι.Τερροβίτης.
- Καλύτερες Ανακοινώσεις, στο 33<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, το Νοέμβριο του 2012, η εργασία με τίτλο « Η ενδοστεφανιαία χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων στην οξεία φάση του εμφράγματος οδηγεί σε υψηλό ποσοστό εμφύτευσης τους χωρίς επιδείνωση της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας» Σ.Βάκρου, Χ.Καπέλιος, Μ.Μπόνιος, Β.Σουσώνης, Γ.Νανάς, Μ.Νανά, Σ.Σβεντζούρη, Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Ι.Νανάς, Ι.Τερροβίτης.
- Προφορική Ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, της εταιρείας μελέτης και έρευνας της καρδιακής ανεπάρκειας, το Φεβρουάριο του 2013, η εργασία με τίτλο « Μέθοδος Αγγειακής Προσπέλασης και επιβίωση ασθενών με καρδιονεφρικό σύνδρομο» Ε.Ρεπάσος, Ε.Καλδάρα, Α.Νταλιάνης,

Μ.Μαρούγκας, Ε.Νανά, Χ. Καπέλιος, Β.Σουσώνης, Τ.Σφακιανάκη, Ι.Μπόλετης, Ι.Τερροβίτης, Ι.Νανάς

- Προφορική Ανακοίνωση στο 140 Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, της εταιρείας μελέτης και έρευνας της καρδιακής ανεπάρκειας, το Φεβρουάριο του 2013, η εργασία με τίτλο « Ασφαλής ενδοστεφανιαία χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων στο οξύ εμφραγμα» Β.Σουσώνης, Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Μ.Αθ.Νανά, Λ.Κατσαρός, Μ.Τσαματσούλης, Σ.Βάκρου, Α. Παπαλόης, Μ. Αναστασίου-Νανά, Ι.Νανάς, Ι.Τερροβίτης.
- Αναρτημένη Ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, της εταιρείας μελέτης και έρευνας της καρδιακής ανεπάρκειας, το Φεβρουάριο του 2013, με τίτλο « Αμιωδαρόνη σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και πολλαπλές κοιλιακές έκτακτες συστολές, μια προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη» Β.Σουσώνης, Ε.Ρεπάσος, Χ.Πάντσιος, Ε.Καλδάρα, Ζ.Μάργαρα, Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Χ.Καπέλιος, Α.Αντωνίου, Ι.Τερροβίτης, Ι.Νανάς
- Αναρτημένη Ανακοίνωση στο 14<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, της εταιρείας μελέτης και έρευνας της καρδιακής ανεπάρκειας, το Φεβρουάριο του 2013, με τίτλο «Η ελάττωση πίεσης ενσφήνωσης δεν βελτιώνει την πρόγνωση στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια» Χ.Καπέλιος, Ε.Καλδάρα, Α.Νταλιάνης, Β.Σουσώνης, Τ.Σφακιανάκη, Χ.Πάντσιος, Ε.Ρεπάσος, Ζ.Μάργαρα, Ι.Τερροβίτης.Ι.Νανάς.
- Βραβείο Καλύτερης Αναρτημένης Εργασίας, στο σεμινάριο ομάδων εργασίας της Ελληνικής Καρδιολογική Εταιρείας Φεβρουάριος 2013, η εργασία με τίτλο « Η επίδραση μιας ενδοστεφανιαίας δόσης δεξαμεθαζόνης κατά την έναρξη της επαναιμάτωσης στην αναδιαμόρφωση του μυοκαρδίου, σε χρόνια χοίρειο μοντέλο ισχαιμίας/ επαναιμάτωσης» Α.Νταλιάνης, Ν.Μιχελινάκης, Β.Σουσώνης, Σ.Σβεντζούρη, Μ.Μπόνιος, Μ.Τσαματσούλης, Τ.Σφακιανάκη, Α.Παπαλόης, Ι.Νανάς, Ι.Τερροβίτης.
- Ελεύθερες Ανακοινώσεις, 34<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Οκτώβριος 2013, η εργασία με τίτλο « Υπολογισμός πίεσης ενσφήνωσης βάσει της πίεσης του δεξιού κόλπου και παλαιότερων πιέσεων πλήρωσης της αριστερής κοιλίας»

Χ.Καπέλιος, Ε.Καλδάρα, Α.Γκουζιούτα, Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Ε.Νανά, J.Stehlik, Σ.Αδαμόπουλος, Σ. Δράκος, Ι.Νανάς, Ι.Τερροβίτης

- Καλύτερες ανακοινώσεις, 34<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Οκτώβριος 2013 η εργασία με τίτλο « Χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων με σκοπό τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου» Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Β.Σουσώνης, Ε.Ρεπάσος, Μ.Νανά, Χ.Κοντογιάννης, Λ.Κατσαρός, Α.Παπαλόης, Ι.Νανάς, Ι.Τερροβίτης.
- Ελεύθερες Ανακοινώσεις, 34<sup>ο</sup> Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Οκτώβριος 2013, η εργασία με τίτλο « Η χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων σε συνδυασμό με τη χειρουργική επαναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας επιδρούν θετικά στη μετεμφραγματική αναδιαμόρφωση : πειραματική μελέτη» Μ.Μπόνιος, Μ.Νανά, Ε.Νανά, Τ.Σφακιανάκη, Β.Σουσώνης, Χ.Καπέλιος, Α.Νταλιάνης, Ε.Καλδάρα, Ι.Τερροβίτης.
- Αναρτημένη ανακοίνωση American Heart Association Scientific Sessions 2013, 5155 «Intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere derived cells during acute myocardial infraction limits infraction size and delays but does not completely prevent remodelling of the left ventricle» Α. Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, Β. Σουσώνης, Ε. Ρεπάσος, Μ. Νανά, Χ. Κοντογιάννης, Λ.Κατσαρός, Α.Παπαλόης, Ι. Νανάς, Ι. Τερροβίτης.
- Συμμετοχή στο 30<sup>ο</sup> συνέδριο εξελίξεις στην καρδιολογία 2 και 3 Νοεμβρίου 2017. Ομιλία στο βήμα των ειδικευομένων στην θεματική ενότητα: Οξεία Στεφανιαία Σύνδρομο, Καρδιακή Ανεπάρκεια, Υπέρταση, Μυοκαρδιοπάθεια, Βαλβιδοπάθεια. Θέμα ομιλίας καρδιομυοπάθεια ΤΑΚΟΤSUBO παρουσίαση περιστατικού.

### Ξένες Γλώσσες:

Αγγλικά: Επίπεδο C2, Γαλλικά: Επίπεδο B2

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να αφιερώσω αυτά τα λίγα λόγια για να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλους εκείνους η συνδρομή των οποίων υπήρξε καθοριστική στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Ξεκινώντας Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Νανά, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου την παρούσα πειραματική μελέτη και για όλα αυτά που έμαθα δίπλα του στο ιατρείο Καρδιακής Ανεπάρκειας.

Θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τον αείμνηστο Ιωάννη Τερροβίτη καθώς υπήρξε για μένα πρότυπο ως επιστήμονας, ως γιατρός αλλά και ως άνθρωπος. Τον ευχαριστώ θερμά για όλα αυτά που πρόλαβε να με διδάξει.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμότατα τον Καθηγητή Σεραφείμ Νανά που από το 2018 ανέλαβε την επίβλεψη της παρούσας διατριβής και με τις εποικοδομητικές επισημάνσεις του με βοήθησε στη συγγραφή αυτής. Επίσης Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια κ. Μαρία Αναστασίου Νανά για τις πολύτιμες συμβουλές της και την υποστήριξή της καθώς υπήρξε επιβλέπουσα της παρούσας διατριβής. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, τον καθηγητή Αντώνη Μανώλη όπως και τον καθηγητή Ιωάννη Παρίση για τις υποδείξεις και τις παρατηρήσεις τους.

Επιπλέον Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κωνσταντίνο Μαλλιάρη ο οποίος με τις πολύτιμες γνώσεις του και με την εμπειρία του στην κυτταρική Θεραπεία συνέβαλε στην διεξαγωγή της παρούσας μελέτης. Η συμβολή του ήταν καθοριστικής σημασίας.

Ακόμη Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επεμβατικό καρδιολόγο κ. Αργύριο Νταλιάνη, για την πολύτιμη αρωγή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων. Επίσης Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και όλους όσους συνεργαστήκαμε για την επιτυχή εκτέλεση των πειραμάτων, τον κ. Βασίλη Σουσώνη, τον κ. Διονύση Αραβαντινό, τον κ. Χρήστο Κοντογιάννη, την κ. Μαρία Νανά και τον κ. Αλέξανδρο Σγουρίδη.

Επίσης Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Απόστολο Παπαλόη καθώς και όλο το προσωπικό του Ερευνητικού και Πειραματικού Κέντρου της ΕΛΤΕΝ για τη βοήθεια τους στην οργάνωση και την διεξαγωγή των πειραμάτων.

Κλείνοντας, Θα ήθελα να ευχαριστήσω κυρίως τον Κώστα αλλά και τη μητέρα μου και τον αδελφό μου που ήταν πάντα δίπλα μου σε όλη την προσπάθεια μου.

## Πρόλογος

Η στεφανιαία νόσος, παρά τις εξελίξεις που έχουν συμβεί και την καθιέρωση της πρωτογενούς αγγειοπλαστικής για την αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, παραμένει η κύρια αιτία θανάτου στον Δυτικό Κόσμο. Διαρκώς ερευνώνται νέοι επιπρόσθετοι τρόποι που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στον περιορισμό των επιπλοκών που έπονται του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Η κυτταρική θεραπεία έχει αποτελέσει στόχο έρευνας εδώ και πολλά χρόνια, τόσο για τη μυοκαρδιακή βλάβη οφειλόμενη σε ισχαιμία του μυοκαρδίου όσο και για άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Στην παρούσα πειραματική μελέτη εξετάστηκε η χορήγηση αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων συγκριτικά με τη χορήγηση εικονικού διαλύματος, νωρίς κατά τη φάση της οξείας ισχαιμίας, σε χοίρειο χρόνιο μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, με στόχο τη μελέτη της απώτερης αποτελεσματικότητας αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης, ως προς τον περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος και τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή αποτελείται από γενικό και ειδικό μέρος. Στο γενικό μέρος αναφέρονται επιδημιολογικά δεδομένα, δίδονται πληροφορίες για τη στεφανιαία νόσο όπως και για τα οξέα στεφανιαία σύνδρομα, αναλύεται η βλάβη από την ισχαιμία και την επαναιμάτωση καθώς και το φαινόμενο της μη επαναρροής. Επίσης αναλύεται η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στη συνέχεια ακολουθεί αναφορά στη μυοκαρδιακή αναγέννηση και την κυτταρική θεραπεία. Τέλος παρατίθενται στοιχεία από τη βιβλιογραφία και τις μελέτες που έχουν γίνει ως τώρα και αφορούν τη χορήγηση προγονικών καρδιακών κυττάρων με στόχο τον περιορισμό της μυοκαρδιακής βλάβης. Το ειδικό μέρος περιλαμβάνει την περιγραφή των μεθόδων που ακολουθήθηκαν, τα αποτελέσματα των πειραμάτων καθώς και τη στατιστική ανάλυση και κλείνοντας γίνεται η συζήτηση των ευρημάτων και αναφέρονται τα συμπεράσματα. Τέλος παρατίθεται η περίληψη της εργασίας στα ελληνικά και στα αγγλικά καθώς και η βιβλιογραφία

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε τη χρονική περίοδο 2013-2019 υπό την αιγίδα της Γ΄ Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής. Τα πειράματα διενεργήθηκαν στο « ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ» της ΕΛΠΕΝ.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....	3
1. Στεφανιαία νόσος, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και οι συνέπειες τους .....	4
1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία .....	4
1.2 Στεφανιαία νόσος.....	5
1.3 Οξεία στεφανιαία σύνδρομα .....	6
1.4 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου .....	8
1.4.1 Ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα υπέρ οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου* .....	11
1.5 Παθολογοανατομικά.....	12
1.5.1 Η βλάβη από την ισχαιμία και την επαναιμάτωση .....	12
1.5.2 Το φαινόμενο της μη επαναροής - the No Reflow Phenomenon.....	14
1.6 Καρδιακή ανεπάρκεια .....	18
1.7 Αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας .....	19
1.8 Αριστερός Καρδιακός Καθετηριασμός - Στεφανιογραφία.....	25
2. Μυοκαρδιακή αναγέννηση .....	27
2.1 Αναγεννητική ικανότητα μυοκαρδιακών κυττάρων .....	27
2.3 Κυτταρική Θεραπεία .....	28
2.3.1 Σκελετικοί μυοβλάστες.....	29
2.3.2 Κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών .....	30
2.3.3 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα .....	30
2.4 Προγονικά καρδιακά κύτταρα .....	31
2.5 Μηχανισμοί δράσης προγονικών κυττάρων.....	32
3. Βιβλιογραφικά δεδομένα.....	34
3.1 Προκλινικές μελέτες χορήγησης προγονικών καρδιακών κυττάρων .....	34
3.2 Κλινικές μελέτες χορήγησης καρδιακών προγονικών κυττάρων .....	37
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	40
1.Υπόθεση.....	41

2. Σκοπός.....	43
3. Πειραματική Διαδικασία.....	44
4. Πειραματικό Πρωτόκολλο.....	45
4.1 Υλικό .....	45
4.2 Μεθοδολογία .....	45
4.2.1 Απομόνωση και καλλιέργεια προγονικών καρδιακών κυττάρων (CDCs).....	45
4.2.3 Ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών CDCs - χρόνιο μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης.....	49
4.3 Φωτογραφικό υλικό από διαδικασίες του πειράματος .....	55
5. Αποτελέσματα.....	59
5.1 Θνησιμότητα και ανεπιθύμητα γεγονότα .....	59
5.2 Υπερηχογραφικά δεδομένα .....	60
5.2.1 Διαστάσεις και όγκοι αριστερής κοιλίας .....	61
5.2.2 Λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας .....	67
5.2.4 Εικόνες από τις υπερηχογραφικές μελέτες. ....	73
5.3 Εκτίμηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας - Κοιλιογραφία.....	75
5.4 Παθολογοανατομικά ευρήματα.....	79
5.4.1 Εκτίμηση της έκτασης του εμφράγματος- Μακροσκοπικά.....	79
5.4.2 Μικροσκοπική ανάλυση .....	82
6. Συζήτηση .....	87
6.1 Καινοτομία μελέτης.....	95
6.2. Κλινική σημασία.....	96
6.3 Περιορισμοί .....	97
6.4. Συμπεράσματα - Μελλοντικές προοπτικές.....	98
Περίληψη στην Ελληνική Γλώσσα .....	99
Περίληψη στην Αγγλική Γλώσσα -Summary .....	100
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	101

## ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ



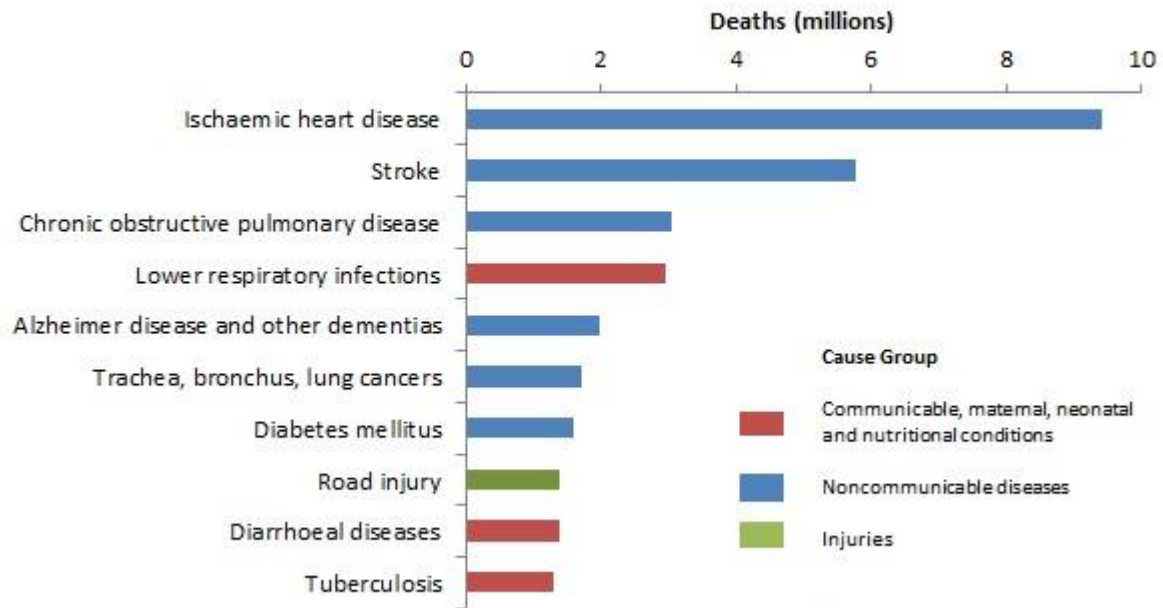
# 1. Στεφανιαία νόσος, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και οι συνέπειες τους

## 1.1 Επιδημιολογικά στοιχεία

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα παραμένουν η πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Η στεφανιαία νόσος έρχεται πρώτη ενώ δεύτερη σε σειρά αίτια είναι τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια. Υπολογίζεται ότι ο αριθμός των θανάτων από τα καρδιαγγειακά νοσήματα και κυρίως τη στεφανιαία νόσο και τα εγκεφαλικά επεισόδια θα αυξηθεί και θα φτάσει κατά το έτος 2030 πάνω από 22,2 εκατομμύρια ανά έτος σύμφωνα με μελέτη του 2014.<sup>1</sup>

Κάθε χρόνο περίπου 605,000 αμερικανοί πολίτες θα υποστούν νέο έμφραγμα του μυοκαρδίου ενώ περίπου 200,000 θα υποστούν οξύ στεφανιαίο επεισόδιο ξανά.<sup>1</sup> Παρά την εξέλιξη στην αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος, επεμβατικά με τη διενέργεια επείγουσας στεφανιογραφίας και την πρωτογενή αγγειοπλαστική τόσο οι επιπλοκές όσο και η θνησιμότητα παραμένουν σε υψηλά επίπεδα. Εκτιμάται πως ένα 30% των ασθενών μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, θα αναπτύξουν καρδιακή ανεπάρκεια μέσα στα επόμενα 5 χρόνια.<sup>2,3,4</sup>

## Top 10 global causes of deaths, 2016



Source: Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016. Geneva, World Health Organization; 2018.

Εικόνα 1, Παγκόσμια αίτια θανάτου, πηγή World Health Organization

### 1.2 Στεφανιαία νόσος

Στεφανιαία νόσος είναι η παθολογική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από την παρουσία αθηρωματικών πλακών αποφρακτικών ή και μη στα στεφανιαία αγγεία. Η νόσος μπορεί να χαρακτηρίζεται από μεγάλες περιόδους που να είναι σταθερή ή να γίνεται ασταθής σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή μετά από ρήξη ή διάβρωση της αθηρωματικής πλάκας<sup>4,5,6</sup>. Είναι μια χρόνια νόσος, προοδευτικά εξελισσόμενη, με σοβαρή κατάληξη ακόμα και σε φαινομενικά σταθερούς ασθενείς. Η στεφανιαία νόσος έχει ως αποτέλεσμα την ισχαιμία του μυοκαρδίου που οφείλεται στις αθηρωματικές αλλοιώσεις των επικαρδιακών αγγείων. Μπορεί να εκδηλωθεί ως οξύ στεφανιαίο επεισόδιο ή να εμφανίζεται ως χρόνια σταθερή στεφανιαία νόσος. Η χαρακτηριστική κλινική εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου είναι η στηθάγχη. Στηθάγχη είναι ο πόνος που οφείλεται στην ισχαιμία του μυοκαρδίου μικρής συνήθως διάρκειας κάτω από είκοσι λεπτά που εντοπίζεται συνήθως οπισθοστερνικά αλλά μπορεί να εντοπιστεί και οπουδήποτε από

το επιγάστριο έως την κάτω γνάθο και τα δόντια, είτε ανάμεσα στις ωμοπλάτες είτε και στο αριστερό άνω άκρο όπως και στον καρπό ή και στα δάχτυλα. Ο στηθαγχικός πόνος μπορεί να είναι συσφικτικού ή και καυστικού τύπου ή και πιεστικού τύπου ή απλά να εκλαμβάνεται από τον ασθενή ως δυσφορία. Διακρίνονται 3 μορφές προκάρδιου άλγους. Πρώτη μορφή, είναι η τυπική στηθάγχη, πόνος μικρής διάρκειας κάτω από 10 λεπτά με 3 χαρακτηριστικά: 1) συσφικτικού τύπου δυσφορία με εντόπιση οπισθοστερνικά ή και στο λαιμό ή και στη κάτω γνάθο ή και στον ώμο ή και στο αριστερό χέρι 2) ο πόνος εκλύεται από τη σωματική προσπάθεια 3) ο πόνος ανακουφίζεται από τη χρήση νιτρικών ή με τη διακοπή της προσπάθειας. Δεύτερη μορφή, είναι η άτυπη στηθάγχη όπου ισχύουν τα 2 από τα 3 χαρακτηριστικά. Τέλος η τρίτη μορφή, είναι ο μη στηθαγχικού τύπου πόνος όπου ισχύει μόνο το 1 χαρακτηριστικό.<sup>6</sup>

### **1.3 Οξεία στεφανιαία σύνδρομα**

Το κυρίαρχο σύμπτωμα που καθοδηγεί τη διάγνωση σε ένα οξύ στεφανιαίο επεισόδιο είναι η αιφνίδια έναρξη θωρακικής δυσφορίας που περιγράφεται με χαρακτηριστικό τρόπο από τον ασθενή ως πόνος ή πίεση ή σφύξιμο ή κάψιμο αλλά και τα ισοδύναμα στηθαγχικού πόνου όπως είναι η δύσπνοια, η επιγαστραλγία καθώς και ο πόνος στο αριστερό άνω άκρο.<sup>6</sup> Η κλινική εικόνα των ασθενών ποικίλει. Κάποιοι ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου εμφανίζονται αιμοδυναμικά σταθεροί. Άλλοι ασθενείς προσέρχονται αιμοδυναμικά ή και ηλεκτρικά ασταθείς. Ενώ κάποιοι άλλοι ασθενείς προσέρχονται σε καρδιογενή καταπληξία είτε λόγω παρατεταμένης συνεχιζόμενης ισχαιμίας είτε λόγω μηχανικών επιπλοκών, όπως η σοβαρή οξεία ανεπάρκεια της μιτροειδούς βαλβίδας. Τέλος για κάποιους ασθενείς η πρώτη εκδήλωση της στεφανιαίας νόσου μπορεί να είναι ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος

Με βάση τα ηλεκτροκαρδιογραφικά κριτήρια τα οξεία στεφανιαία επεισόδια χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες : 1) στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάρση του ST συνοδευόμενο από αιφνίδιας έναρξης στηθαγχικού τύπου άλγος διάρκειας πάνω από 20 λεπτά 2) στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίς ανάρση του ST.<sup>7</sup>

Ειδική κατηγορία είναι οι ασθενείς που παρουσιάζουν ασταθή στηθάγχη δηλαδή εμφάνιση μυοκαρδιακής ισχαιμίας στην ηρεμία ή στην ελάχιστη σωματική προσπάθεια απουσία οξείας μυοκαρδιακής βλάβης ή νέκρωσης.<sup>7</sup>

Ενώ το σύμπτωμα καθοδηγεί τη διάγνωση, η αύξηση των βιοδεικτών και κυρίως της τροπονίνης (υψηλής ευαισθησίας τροπονίνη Ι) μαρτυρούν την μυοκαρδιακή βλάβη και τη νέκρωση.<sup>5</sup>

Ο κλινικός ορισμός του εμφράγματος του μυοκαρδίου (ΕΜ) υποδηλώνει την παρουσία οξείας μυοκαρδιακής βλάβης, που διαπιστώνεται λόγω αυξημένων μυοκαρδιακών βιοδεικτών ως απόδειξη μυοκαρδιακής ισχαιμίας. Το ιστορικό μαζί με τους παράγοντες κινδύνου αλλά και τα συμπτώματα του ασθενή οδηγούν στη διάγνωση σε συνδυασμό με το ηλεκτροκαρδιογράφημα. Ο ασθενής μπορεί να εμφανίζει στηθάγχη συνοδευόμενη από δύσπνοια ή και κόπωση ή και αίσθημα παλμών ή και εφίδρωση, ενώ στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ) διαπιστώνονται ισχαιμικές αλλοιώσεις. Τέλος, μπορεί η πρώτη εκδήλωση να είναι η καρδιακή ανακοπή αλλά ακόμα και ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος. Μυοκαρδιακή βλάβη ορίζεται η αύξηση της τροπονίνης πάνω από την 99ή εκατοστιαία θέση του ανώτερου ορίου αναφοράς. Η βλάβη θεωρείται ως οξεία όταν υπάρχει άνοδος ή και πτώση των τιμών της τροπονίνης.<sup>5</sup>

Η αύξηση της τροπονίνης υποδηλώνει μυοκαρδιακή βλάβη η οποία μπορεί να οφείλεται είτε σε οξεία μυοκαρδιακή ισχαιμία συσχετιζόμενη με αθηρωματική νόσο (απόφραξη επικαρδιακού αγγείου), είτε σε μυοκαρδιακή ισχαιμία λόγω διαταραχής μεταξύ των απαιτήσεων προσφοράς κατανάλωσης οξυγόνου και τέλος να οφείλεται σε ποικίλα άλλα αίτια καρδιακά και μη. Στα καρδιακά αίτια περιλαμβάνονται, η καρδιακή ανεπάρκεια, η μυοκαρδίτιδα, η μυοκαρδιοπάθεια, το σύνδρομο Takotsubo, οι παρεμβάσεις επαναιμάτωσης των στεφανιαίων αγγείων ή άλλες παρεμβάσεις π/χ κατάλυση με καθετήρα και άλλα αίτια. Στα μη καρδιακά αίτια περιλαμβάνονται η σήψη, αλλά και η χρόνια νεφρική νόσος, καθώς και η πνευμονική εμβολή, όπως και διηθητικά νοσήματα του μυοκαρδίου, αλλά και πολλά άλλα αίτια.

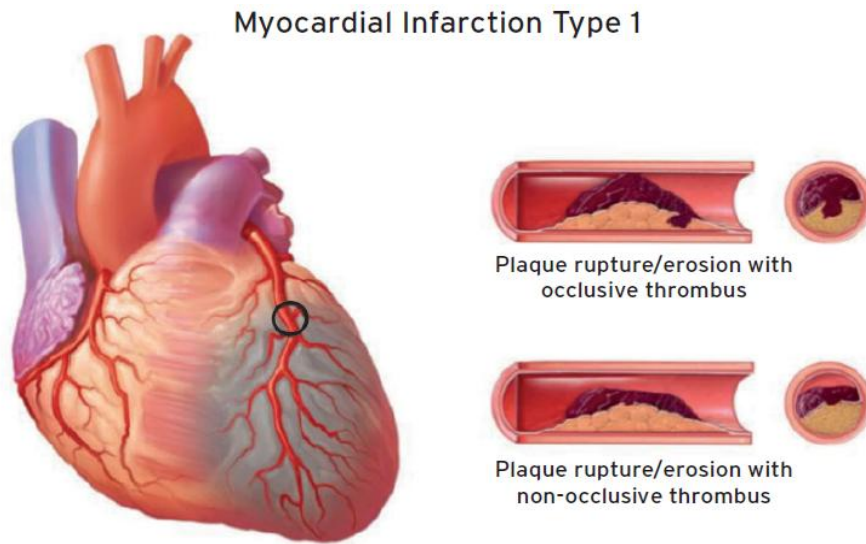
## 1.4 Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι η οξεία μυοκαρδιακή βλάβη συνοδευόμενη από άνοδο ή πτώση της τροπονίνης με αίτιο την μυοκαρδιακή ισχαιμία.

Ταξινομείται κλινικά σε 5 τύπους.

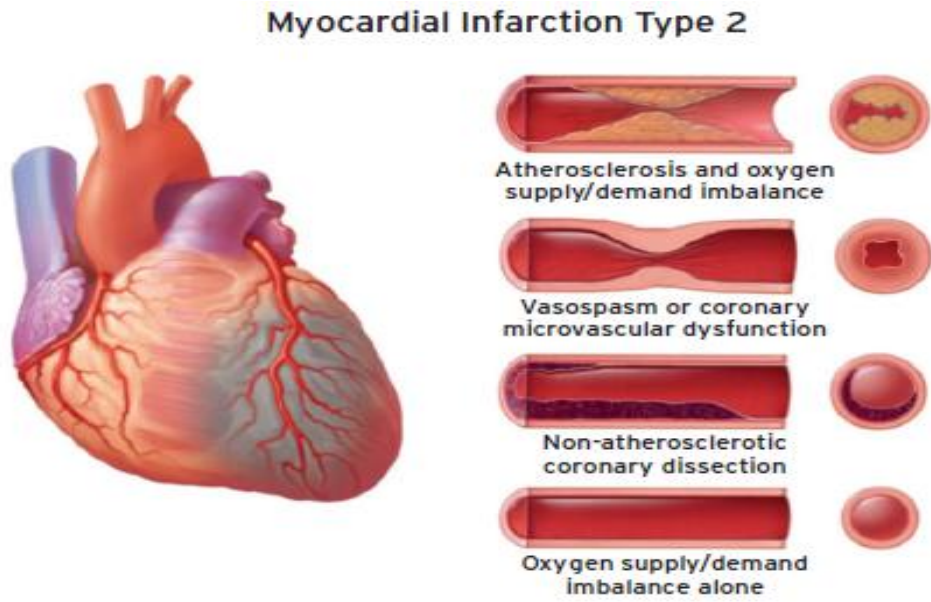
**Τύπου 1**, είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου που οφείλεται στην αθηρωμάτωση των στεφανιαίων αγγείων. Προηγείται ρήξη της αθηρωματικής πλάκας που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενδοαυλικού θρόμβου, με αποτέλεσμα τη μειωμένη ροή αίματος ή την πλήρη διακοπή της ροής από το σημείο της απόφραξης και περιφερικότερα, ενώ παράλληλα αθηροθρομβωτικά γεγονότα συμβαίνουν στην περιφέρεια και όλα μαζί οδηγούν στην μυοκαρδιακή νέκρωση.<sup>5</sup>

Ανευρίσκεται άνοδος ή και πτώση των τιμών της τροπονίνης με τουλάχιστον μια τιμή πάνω από την 99ή εκατοστιαία θέση του ανώτερου ορίου αναφοράς σε συνδυασμό με τουλάχιστον ένα από τα εξής: α) συμπτώματα οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας, β) νέες ισχαιμικές αλλοιώσεις στο ΗΚΓ, γ) ανάπτυξη παθολογικών κυμάτων q, δ) απεικονιστικά απώλεια μυοκαρδιακού ιστού με εμφάνιση νέων τμηματικών διαταραχών κινητικότητας που οφείλονται σε ισχαιμία, καθώς και η ανεύρεση θρόμβου στη στεφανιογραφία ή την νεκροψία.<sup>5</sup> (Εικόνα 2)



Εικόνα 2, Από τον 4ό Παγκόσμιο Ορισμό του Εμφράγματος του μυοκαρδίου 2018.<sup>5</sup>

**Τύπου 2**, είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου που οφείλεται στη διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ προσφοράς και κατανάλωσης οξυγόνου από τα μυοκαρδιακά κύτταρα. Παραδείγματα αυτού του τύπου είναι, η αγγειοσπαστική στηθάγχη, καθώς και η μικροαγγειακή νόσος, όπως επίσης είναι και ο διαχωρισμός των στεφανιαίων αγγείων, καθώς και οι ταχυαρρυθμίες ή οι σοβαρές βραδυαρρυθμίες καθώς και άλλες καταστάσεις.<sup>5</sup> (Εικόνα 3)



Εικόνα 3, Από τον 4<sup>ο</sup> Παγκόσμιο Ορισμό του Εμφράγματος του μυοκαρδίου 2018<sup>5</sup>

**Τύπου 3**, αφορά τα θύματα αιφνίδιου καρδιακού θανάτου που ανέφεραν ύποπτα συμπτώματα μυοκαρδιακής ισχαιμίας και συνοδεύτηκαν από ηλεκτροκαρδιογραφικές αλλοιώσεις ή κοιλιακή μαρμαρυγή αλλά κατέληξαν πριν τη λήψη αίματος ή πριν προλάβουν να ανέβουν στο αίμα οι βιοδείκτες (τροπονίνη). Στον τύπο αυτό ανήκει και το έμφραγμα που διαπιστώνεται στη νεκροψία.<sup>5</sup>

**Τύπου 4**, χωρίζεται σε δύο κατηγορίες (i) το έμφραγμα του μυοκαρδίου που συσχετίζεται με πρόσφατη διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση και συμβαίνει μέσα σε λιγότερο από 48 ώρες από την παρέμβαση (ii) το έμφραγμα οφειλόμενο σε θρόμβωση στεφανιαίας ενδοπρόθεσης που τεκμηριώνεται είτε κατά τη διάρκεια στεφανιογραφίας είτε στη νεκροψία. Ανάλογα με τη χρονική στιγμή η θρόμβωση χωρίζεται σε 4 κατηγορίες:

- οξεία όταν συμβαίνει μέσα στο πρώτο 24ώρο (0-24) ώρες μετά την εμφύτευση της ενδοπρόθεσης,
- υποξεία όταν συμβαίνει αφού έχουν παρέλθει 24 ώρες από την παρέμβαση και μέσα σε διάστημα 30 ημερών
- καθυστερημένη όταν συμβαίνει αφού έχουν παρέλθει 30 ημέρες από τη στιγμή της εμφύτευσης και μέχρι και ένα έτος μετά από την εμφύτευση

- πολύ όψιμη όταν συμβαίνει μετά από διάστημα ενός έτους.<sup>5</sup>

**Τύπου 5**, αφορά εμφράγματα που συσχετίζονται με τη διενέργεια αορτοστεφανιαίας παράκαμψης.

#### 1.4.1 Ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα υπέρ οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου\*

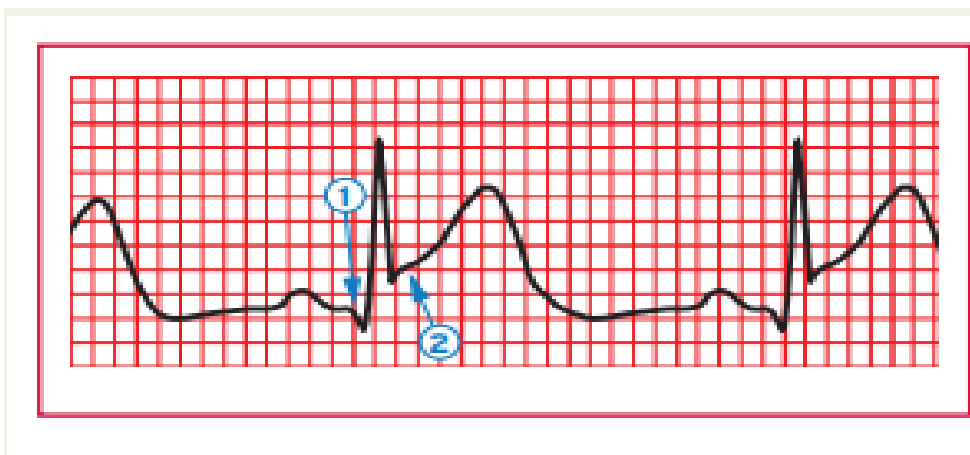
\*επί απουσίας υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας και σκελικού αποκλεισμού.

##### **Ανάσπαση του ST**

Νεοεμφανιζόμενη ανάσπαση του ST στο σημείο J σε δύο τουλάχιστον συσχετιζόμενες μεταξύ τους απαγωγές με το όριο της ανάσπασης να είναι  $\geq 1\text{mm}$  σε όλες τις απαγωγές πλην των απαγωγών V2-V3 όπου εκεί για άντρες κάτω των 40 ετών τα όρια για την ανάσπαση είναι  $\geq 2.5\text{mm}$ , ενώ για άντρες άνω των 40 ετών τα όρια είναι  $\geq 2\text{mm}$  και τέλος για τις γυναίκες ανεξάρτητα από την ηλικία τα όρια είναι  $\geq 1.5\text{mm}$ . (Εικόνα 4)<sup>5</sup>

Για τις απαγωγές V7-V9, όριο είναι η ανάσπαση του ST  $>0.5\text{mm}$  (στους άντρες κάτω των 40 ετών όριο  $>1\text{mm}$ ).

Για τις απαγωγές V3R-V4R όριο είναι η ανάσπαση του ST  $\geq 0.5\text{mm}$  (στους άντρες κάτω των 30 ετών το όριο είναι  $>1\text{mm}$ ). Σε αυτές τις απαγωγές η ανάσπαση μπορεί να είναι παροδική και η μη εύρεση ανάσπασης όταν υπάρχει η υποψία για έμφραγμα της δεξιάς κοιλίας δεν το αποκλείει.<sup>5</sup>





Εικόνα 4, Ηλεκτροκαρδιογραφικό παράδειγμα ανάσπασης του ST. Η αρχή του κύματος Q υποδεικνύεται από το βέλος 1. Το βέλος 2 δείχνει την αρχή της ανάσπασης του ST στο σημείο J. Η υψομετρική διαφορά των δύο σημείων ισοδυναμεί με το μέγεθος της ανάσπασης του ST. Η εικόνα είναι (figure 8) από τον 4ό Παγκόσμιο Ορισμό του Εμφράγματος του μυοκαρδίου 2018.<sup>6</sup>

### **Κατάσπαση του ST - αλλαγές στο κύμα T**

Νέα με οριζόντια ή κατιούσα φορά πτώση του ST πάνω από 0.5mm σε δύο συσχετιζόμενες απαγωγές ή/και αναστροφή του κύματος T  $\geq 1\text{mm}$  σε δύο συσχετιζόμενες απαγωγές με επικρατές κύμα R ή  $R/S > 1$ .

## **1.5 Παθολογοανατομικά**

Παθολογοανατομικά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι ο θάνατος των μυοκαρδιακών κυττάρων λόγω παρατεταμένης ισχαιμίας. Η ισχαιμία και η επαναιμάτωση έχουν ως αποτέλεσμα μια σειρά από αλλαγές στο μυοκαρδιακό ιστό με δραματικές συνέπειες.<sup>5</sup>

### **1.5.1 Η βλάβη από την ισχαιμία και την επαναιμάτωση**

Η ισχαιμία πάνω από 10-15 λεπτά έχει ως αποτέλεσμα μια σειρά από γεγονότα και αλλαγές που οδηγούν στο θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων εφόσον αυτή παρατείνεται. Τα γεγονότα αυτά είναι, η μείωση του κυτταρικού γλυκογόνου, όπως και η χάλαση των μυϊκών ινιδίων, καθώς και οι διαταραχές στο σαρκείλλημα αλλά και οι διαταραχές στα μιτοχόνδρια. Έτσι ισχαιμία λόγω διακοπής της επικαρδιακής ροής πάνω από 20 λεπτά έχει ως αποτέλεσμα μη αναστρέψιμη βλάβη στο μυοκαρδιακό ιστό.<sup>5</sup> Μετά από 60 λεπτά ισχαιμίας οι αλλαγές σε κυτταρικό επίπεδο είναι πολλές, τα μυοκαρδιακά κύτταρα γίνονται οιδηματώδη, τα μιτοχόνδρια διαταράσσονται ακόμη στα κύτταρα εμφανίζεται άμορφη συσσωμάτωση με κροκυδώσεις αλλά και αποτύπωση πυρηνικής χρωματίνης, και παράλληλα επέρχεται χάλαση των μυϊκών ινών.

Τελικό αποτέλεσμα όλων είναι η νέκρωση του μυοκαρδιακού ιστού. Η νέκρωση εξελίσσεται από το υπενδοκάρδιο στο επικάρδιο μέσα σε ώρες. Διακρίνονται τέσσερεις τύποι της μυοκαρδιακής νέκρωσης.<sup>8</sup> Α) Η πηκτική νέκρωση μετά από παρατεταμένη ισχαιμία, πιο εμφανής στην κεντρική περιοχή των εμφραγμάτων, που θέτει τα μυϊκά κύτταρα σε μια χαλαρή κατάσταση και ταυτόχρονα προκαλείται μια παθητική κίνηση των ισχαιμικών μυϊκών κυττάρων. Β) Η Νέκρωση με ζώνες σύσπασης, είναι το αποτέλεσμα σοβαρής ισχαιμίας ακολουθούμενης από επαναιμάτωση. Η αυξημένη εισροή ασβεστίου στα νεκρά μυοκαρδιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα τα μυοκαρδιακά κύτταρα να παραμένουν σε σύσπαση. Η νέκρωση αυτού του τύπου συναντάται στην περιφέρεια των μεγάλων εμφραγμάτων και σε μεγαλύτερη έκταση στα διατοιχωματικά παρά στα μη διατοιχωματικά εμφράγματα. Γ) Νέκρωση με μυοκυττόλυση, η σοβαρή παρατεταμένη ισχαιμία προκαλεί κενοτοπιώδη εκφύλιση των μυοκαρδιακών κυττάρων που ονομάζεται μυοκυττόλυση. Δ) Η νέκρωση οφειλόμενη σε απόπτωση ή στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο, σε αντίθεση με την πηκτική νέκρωση στα μυοκαρδιακά κύτταρα που υπόκεινται σε απόπτωση κυριαρχεί η συρρίκνωση του μεγέθους τους καθώς και η κατακερμάτιση του DNA τους, όπως και η φαγοκυττάρωση αλλά χωρίς εικόνα κυτταρικής διήθησης συμβατή με φλεγμονή. Ξεκινά νωρίς μετά την ισχαιμία και εξελίσσεται, με το αποτέλεσμα της να εμφανίζεται ως καθυστερημένος μυοκαρδιακός θάνατος συμβάλλοντας στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Ο χρόνος μέσα στον οποίο εξελίσσεται η νέκρωση όπως και η έκταση της σε σχέση με την υπό κίνδυνο περιοχή εξαρτώνται από την ύπαρξη παράπλευρης ροής, καθώς και από τις ανάγκες του μυοκαρδίου σε οξυγόνο τη δεδομένη στιγμή, αλλά και την προηγηθείσα διαλείπουσα ισχαιμία/επαναιμάτωση που δρουν ως προ-ισχαιμική εκγύμναση του μυοκαρδίου (preconditioning).<sup>8</sup>

Όταν η επαναιμάτωση συμβαίνει από την έναρξη της ισχαιμίας δηλαδή μέσα σε 15 - 20 λεπτά μπορεί να αποτρέψει τη νέκρωση. Όταν όμως ο χρόνος αυτός παρέρχεται τότε η ίδια η επαναιμάτωση επιφέρει μια σειρά από μεταβολές που επιδεινώνουν περαιτέρω τη βλάβη από ισχαιμία.<sup>9,10</sup>

Ο όρος βλάβη από επαναιμάτωση περιγράφει την επιδείνωση ή και την επέκταση της ισχαιμικής βλάβης συμπεριλαμβάνοντας αλλαγές στην απόδοση της αριστερής κοιλίας

(απόπληκτο μυοκάρδιο), αλλά και την εμφάνιση αρρυθμιών, ακόμη και τη μετατροπή μιας μη μόνιμης βλάβης σε μόνιμη βλάβη, καθώς και την περαιτέρω απόφραξη αλλά και τη δυσλειτουργία της μικροκυκλοφορίας με συνοδό αιμορραγία. Μία αλυσίδα από γεγονότα η τοπική φλεγόμενη, το οξειδωτικό στρες, η ενδοκυττάρια υπερφόρτωση με ασβέστιο, οι αλλαγές στο pH, το άνοιγμα των πόρων των μιτοχονδρίων, οδηγούν σε μη αναστρέψιμο κυτταρικό θάνατο μέσω της απόπτωσης και σε νέκρωση. Η βλάβη από επαναιμάτωση στο επίπεδο της μικροκυκλοφορίας καθορίζει την έκταση του φαινομένου της μη επαναροής με αποτέλεσμα περαιτέρω έκταση της ισχαιμικής βλάβης.<sup>11,12,13,14</sup>

### **1.5.2 Το φαινόμενο της μη επαναροής - the No Reflow Phenomenon**

Το φαινόμενο της μη επαναροής, no reflow phenomenon, αρχικά είχε περιγραφεί πειραματικά μετά από εγκεφαλική ισχαιμία σε κουνέλια. Μετά από σύντομη ισχαιμία ( 2 ώρες και 30 λεπτά), οι εγκέφαλοι των κουνελιών παρουσίαζαν φυσιολογική εγκεφαλική αιματική ροή μετά την αποκατάσταση της κυκλοφορίας, ενώ μετά από παρατεταμένη ισχαιμία μεγαλύτερης διάρκειας και αφού είχε αποκατασταθεί η ροή στο αγγείο η εγκεφαλική αιματική ροή δεν έφτανε στο φυσιολογικό. Στη συνέχεια η παρατήρηση αυτή επιβεβαιώθηκε και στον εγκέφαλο άλλων ζώων αλλά και σε άλλα όργανα. Ο Kloner με πειράματα σε σκύλους το 1974<sup>15</sup> περιγράφει τη σχέση του φαινομένου της μη επαναροής στην καρδιά με την απόφραξη της μικροκυκλοφορίας. Όπως αρχικά ορίστηκε από τον Kloner<sup>16</sup> και τους συνεργάτες του, το φαινόμενο της μη επαναροής είναι η απουσία ικανοποιητικής αιμάτωσης του μυοκαρδίου μετά από προσωρινό αποκλεισμό της επικαρδιακής ροής στεφανιαίου αγγείου χωρίς να υπάρχουν σημεία εμμένουσας μηχανικής απόφραξης της ροής του αγγείου, που έχει ως αποτέλεσμα τη συνέχιση της ισχαιμίας. Ακόμα και σήμερα παραμένει υπό διερεύνηση. Αρχίζει αμέσως μετά την αποκατάσταση της ροής στο επικαρδιακό αγγείο και επιδεινώνεται με το χρόνο. Οι παράγοντες που συμβάλουν στο φαινόμενο είναι η ίδια η βλάβη της ισχαιμίας, αλλά και τα απομακρυσμένα θρομβοεμβολικά γεγονότα, καθώς και η βλάβη από επαναιμάτωση, όπως και ο σπασμός των απόμακρων αρτηριδίων και επιπλέον και η ίδια η φλεγμονώδης απάντηση. Σε κυτταρικό επίπεδο η έντονη διείδυση των λευκοκυττάρων, αλλά και η ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων, επιπλέον η συρροή κυτταροκινών, όπως και η απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου αλλά και η

ενεργοποίηση του συμπληρώματος, συμβάλλουν στο φαινόμενο της μη επαναρροής. Είναι μια διαδικασία που εξελίσσεται με το χρόνο και όχι ένα μεμονωμένο συμβάν που συμβαίνει μόνο τη στιγμή της επαναιμάτωσης και έχει ως αποτέλεσμα την επέκταση της μυοκαρδιακής βλάβης.<sup>17,18,19,20</sup>

#### Σε προ κλινικό επίπεδο

Σε πειραματική μελέτη σε ζώα, μετά από πρόκληση ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, με προσωρινό αποκλεισμό της επικαρδιακής ροής ενός στεφανιαίου αγγείου που ακολουθείται από αποκατάσταση της ροής, το τμήμα του μυοκαρδίου που τέθηκε υπό κίνδυνο βιάστηκε με κατάλληλη χρώση για την ανάδειξη του no reflow. Με τη χρήση θειοφλαβίνης S (thioflavin S) μίας φθορίζουσας χρωστικής ουσίας για το ζωντανό ενδοθήλιο, οι περιοχές που δεν βιάστηκαν από αυτήν αντιστοιχούν στο ανατομικό no reflow. Με το μικροσκόπιο οι περιοχές του no reflow εμφανίζονται με οίδημα των μυοκαρδιακών κυττάρων και με διαταραχές των μικρών αγγείων, με βλάβες του ενδοθηλίου το οποίο εμφανίζεται να είναι έντονα οίδηματώδες με προεξοχές που εισέρχονται μέσα στον αυλό.<sup>16,17</sup>

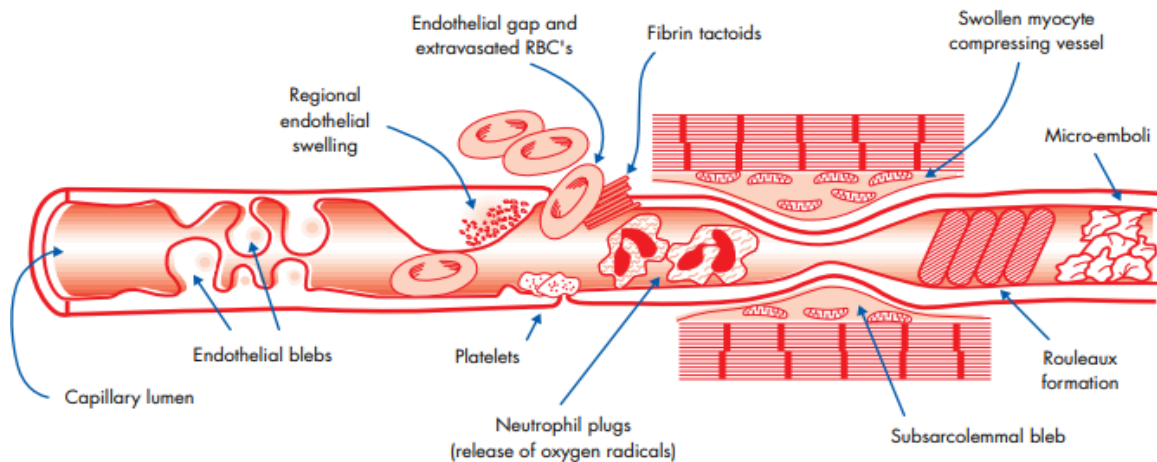
#### Σε κλινικό επίπεδο

Η στεφανιογραφία με τη χρήση σκιαγραφικού μέσου επιτρέπει μια ημιποσοτικοποίηση της επικαρδιακής ροής με βάση τον TIMI βαθμό ροής, έναν αγγειογραφικό δείκτη μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. TIMI 0, ισοδυναμεί με πλήρη έλλειψη ορθόδρομης ροής από το σημείο της απόφραξης και περιφερικότερα. TIMI 1, ισοδυναμεί με ελάχιστη ορθόδρομη ροή πέρα της απόφραξης και με ατελή πλήρωση του απόμακρου στεφανιαίου δικτύου του αγγείου. TIMI 2, ισοδυναμεί με καθυστερημένη ή αργή ορθόδρομη ροή, με αργή πλήρωση του απόμακρου δικτύου. TIMI3, ισοδυναμεί με φυσιολογική ορθόδρομη ροή που γεμίζει το δίκτυο μέχρι και την περιφέρεια του. Μετά από θρομβόλυση ή αγγειοπλαστική σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, η ροή TIMI 0-2 συνοδεύεται από περισσότερες επιπλοκές σε σχέση με τη ροή TIMI 3. Το αγγειογραφικό no reflow περιγράφεται ως ροή TIMI μικρότερη από 3 χωρίς σημεία απόφραξης του εγγύς τμήματος του αγγείου. Άλλες ενδείξεις αγγειογραφικού no reflow είναι, η ταχύτητα με την οποία θα φτάσει το σκιαγραφικό μέσο σε συγκεκριμένο τμήμα του αγγείου σε σχέση με τα αγγειογραφικά frame καθώς και η ύπαρξη μυοκαρδιακού "blush", δηλαδή το γέμισμα και των μικρών κλάδων της περιφέρειας των αγγείων. Διάφορες μελέτες έχουν

δείξει ότι το αγγειογραφικό no reflow είναι ένας ισχυρός προγνωστικός δείκτης σοβαρών καρδιακών επιπλοκών, όπως είναι η εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκειας, καθώς και η εμφάνιση κακοήθων αρρυθμιών. Τέλος το αγγειογραφικό no reflow είναι ισχυρός προγνωστικός δείκτης αυξημένου κινδύνου για καρδιακό θάνατο. Το ηλεκτροκαρδιογράφημα επιφανείας 12 απαγωγών μία γρήγορη και ανέξοδη μη επεμβατική μέθοδος, μπορεί να προσδιορίσει τους ασθενείς εκείνους που παρουσιάζουν το φαινόμενο μη επαναρροής, καθώς η εμμονή των ανασπάσεων μετά από τη διενέργεια πρωτογενούς αγγειοπλαστικής και τη διάνοιξη του υπεύθυνου αγγείου και την πλήρη αποκατάσταση της επικαρδιακής ροής σχετίζεται σε μεγαλύτερο βαθμό με το φαινόμενο του no reflow. Κλινικά επίσης μπορεί να αναδειχθεί με τη χρήση σκιαγραφικής ουσίας κατά τη διάρκεια υπερηχογραφικής μελέτης, όπως και μέσω της μαγνητικής τομογραφίας αλλά και με άλλες τεχνικές.<sup>17</sup>

Οι λόγοι που οδηγούν στο φαινόμενο της μη επαναρροής δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητοί. Οι μηχανισμοί αυτοί μπορεί να διαφέρουν ανάλογα τη χρονική στιγμή, δηλαδή άλλοι είναι οι λόγοι αμέσως μόλις λύεται η απόφραξη και άλλοι είναι οι λόγοι αργότερα κατά την επαναιμάτωση. Μερικοί από αυτούς τους μηχανισμούς που οδηγούν στο φαινόμενο της μη επαναρροής είναι, η βλάβη στο ενδοθήλιο και η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας, όπως και η τοπική φλεγμονώδης απάντηση με την διήθηση και την έντονη παρουσία ουδετερόφιλων, καθώς και η ενεργοποίηση των κυτταροκινών όπως και η παρουσία ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Ακόμη στα αγγεία συμβαίνουν διάφορες λειτουργικές διαταραχές. Από μελέτες σε πειραματόζωα έχει διαπιστωθεί στα αγγεία μετά την ισχαιμία, μειωμένη ικανότητα αγγειοδιαστολής που εμμένει για μέρες. Σε προκλινικό επίπεδο, με μελέτες στα ζώα, φαίνεται πως η προ- ισχαιμική εκγύμναση του μυοκαρδίου, preconditioning, μπορεί να προλάβει αυτές τις αλλαγές. Άλλος μηχανισμός είναι η μηχανική συμπίεση από το ίδιο το οίδημα που δημιουργείται, το οποίο και συμπιέζει τα μικρά αγγεία. Μέρος των μηχανισμών που οδηγούν στο φαινόμενο της μη επαναρροής σε προκλινικό επίπεδο, με την πρόκληση ισχαιμίας και επαναιμάτωσης σε πειραματόζωα, διαφέρει από τους μηχανισμούς που προκαλούν το φαινόμενο στον άνθρωπο. Στον άνθρωπο μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου ο μικροεμβολισμός με αθηρωματικά υλικά παίζει καθοριστικό ρόλο κάτι που δεν συμβαίνει στα πειραματόζωα<sup>17-21</sup>. Το φαινόμενο παραμένει υπό διερεύνηση. (Εικόνα 5).

Ως τώρα έχουν γίνει πολλές μελέτες που αναζητούν τη θεραπεία στο φαινόμενο της μη επαναρροής τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο όπου εκτός από φαρμακευτικές ουσίες έχουν δοκιμαστεί και τεχνικές κατά τη διάρκεια της αγγειοπλαστικής. Η καλύτερη στρατηγική για το φαινόμενο της μη επαναρροής δεν έχει ακόμα ταυτοποιηθεί.<sup>16,21</sup>



Εικόνα 5, Σχηματική φιγούρα των διαφορετικών μηχανισμών που συμβάλλουν στο φαινόμενο της μη επαναρροής μαζί με τις αγγειακές μεταβολές που συμβαίνουν στο αγγειακό δίκτυο. Η εικόνα αυτή είναι από το άρθρο των T.Reffelmann, R.A.Kloner με τίτλο the "NO-REFLOW" PHENOMENON: BASIC SCIENCE AND CLINICAL CORRELATES. Περιοδικό The Heart 2002;87:162-168<sup>16</sup>.

## 1.6 Καρδιακή ανεπάρκεια

Το έμφραγμα του μυοκαρδίου έχει ως επακόλουθο το θάνατο μυοκαρδιακών κυττάρων, την ίνωση και τη δημιουργία ουλής στην ισχαιμούσα περιοχή. Αποτέλεσμα όλων είναι η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας που έχει ως αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας καθώς και την εμφάνιση ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας και καρδιακής ανεπάρκειας. Ένα από τα κύρια αίτια της καρδιακής ανεπάρκειας με επηρεασμένη συστολική απόδοση της αριστερής κοιλίας, είναι η ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια.

Η καρδιακή ανεπάρκεια αποτελεί σύνδρομο κατά το οποίο η καρδιά σαν αντλία αδυνατεί να ικανοποιήσει τις ανάγκες της περιφέρειας.<sup>22</sup> Με αποτέλεσμα την αύξηση της θνησιμότητας, αλλά και την ανάγκη για συχνές νοσηλείες. Επιπρόσθετα για τους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια όχι μόνο μειώνεται το προσδόκιμο επιβίωσης αλλά ταυτόχρονα υποβαθμίζεται σε σημαντικό βαθμό και η ποιότητα της καθημερινότητας τους.

Η ενδεδειγμένη και σωστή αντιμετώπιση με την έγκαιρη επαναιμάτωση την άμεση διενέργεια στεφανιογραφίας και πρωτογενούς αγγειοπλαστικής εξασφαλίζουν τη μείωση της θνησιμότητας και των επιπλοκών σε ένα σημαντικό βαθμό. Παρόλα αυτά όμως οι επιπλοκές και η θνησιμότητα παραμένουν ακόμα σε υψηλά επίπεδα. Γεγονός που γεννά την ανάγκη για διερεύνηση επιπρόσθετων επικουρικών τρόπων που θα μπορούσαν να περιορίσουν τη βλάβη από ισχαιμία και επαναιμάτωση, αλλά και τη βλάβη από το φαινόμενο της μη επαναρροής και τελικά να περιορίσουν την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας.

## 1.7 Αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας

Ο όρος καρδιακή αναδιαμόρφωση χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1982 από τους Hockman και Bulkley<sup>23</sup> σε πειράματα σε επίμυες προκαλώντας ισχαιμία ώστε να προσδιορίσουν το χρονικό πλαίσιο της έκπτυξης του εμφράγματος και τη σχέση του με το μέγεθος της ισχαιμίας και τα παθολογοανατομικά του χαρακτηριστικά. Ήδη ήταν γνωστό ότι μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου εμφανίζεται έκπτυξη της ζώνης του εμφράγματος, με λέπτυνση της ζώνης του εμφράγματος και διάταση της περιεμφραγματικής περιοχής, χωρίς να υπάρχει περαιτέρω νέκρωση. Η έκπτυξη αυτή από τότε ήταν γνωστό ότι συνδυάζεται πιο συχνά με τα διατοιχωματικά εμφράγματα και ότι έχει ως αποτέλεσμα δυσμενέστερη πρόγνωση.

Η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας είναι η διαδικασία με την οποία η αρχιτεκτονική της αριστερής κοιλίας διαταράσσεται. Το μέγεθος της αριστερής κοιλίας, το σχήμα της και εν τέλει η λειτουργικότητά της, μέσω μηχανικών, νευροορμονικών και γενετικών παραγόντων υπόκεινται σε αλλαγές με αποτέλεσμα τη δυσλειτουργία της<sup>24</sup>. Η παθολογική αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μπορεί να είναι απότοκος εμφράγματος του μυοκαρδίου, όπως και μυοκαρδιοπάθειας, αλλά και υπέρτασης ή ακόμη να οφείλεται σε δυσλειτουργία καρδιακής βαλβίδας.

Εδώ και πολλά χρόνια είναι γνωστό ότι τα μεγάλα διατοιχωματικά εμφράγματα έχουν ως αποτέλεσμα μια σειρά πολύπλοκων μεταβολών στην αρχιτεκτονική της αριστερής κοιλίας που επηρεάζουν τόσο τη ζώνη του εμφράγματος όσο και τις απομακρυσμένες περιοχές που δεν έχουν ισχαιμήσει. Όλες αυτές οι μεταβολές μαζί, είναι η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας, που έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας και τη δυσμενέστερη κλινική έκβαση για τους ασθενείς. Τις πρώτες ώρες που ακολουθούν μετά από την ισχαιμία και το θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων, παρατηρείται νέκρωση, οίδημα, καθώς και φλεγμονή τοπικά στην ζώνη του εμφράγματος. Αυτή η φάση ακολουθείται από μια μακρόχρονη περίοδο με πολλαπλασιασμό ινοβλαστών και εναπόθεση κολλαγόνου μέχρι τη δημιουργία ουλής. Η όλη διαδικασία διαρκεί από μέρες έως και μήνες. Πριν την εκτεταμένη εναπόθεση κολλαγόνου και την αύξηση της ισχύς της ουλής, η εμφραχθείσα περιοχή μπορεί να λεπταίνει και να επιμηκύνεται. Η έκπτυξη του εμφράγματος συμβαίνει κυρίως μετά από μεγάλα διατοιχωματικά εμφράγματα. Οι ασθενείς αυτοί κινδυνεύουν περισσότερο από



καρδιακή ανεπάρκεια, όπως και από τη δημιουργία ανευρύσματος αλλά και τη ρήξη του τοιχώματος της κοιλίας. Ακόμη παρατηρείται συχνότερα σε ασθενείς με μεγάλα διατοιχωματικά εμφράγματα, όταν η εντόπιση του εμφράγματος είναι στο πρόσθιο κορυφαίο τοίχωμα ή και στην κορυφή της αριστερής κοιλίας παρά στα υπόλοιπα τμήματα. Καθώς το πρόσθιο κορυφαίο τοίχωμα και η κορυφή είναι τα πιο ευάλωτα διότι είναι λεπτότερα και έχουν μεγαλύτερη καμπυλότητα.<sup>24-26</sup>

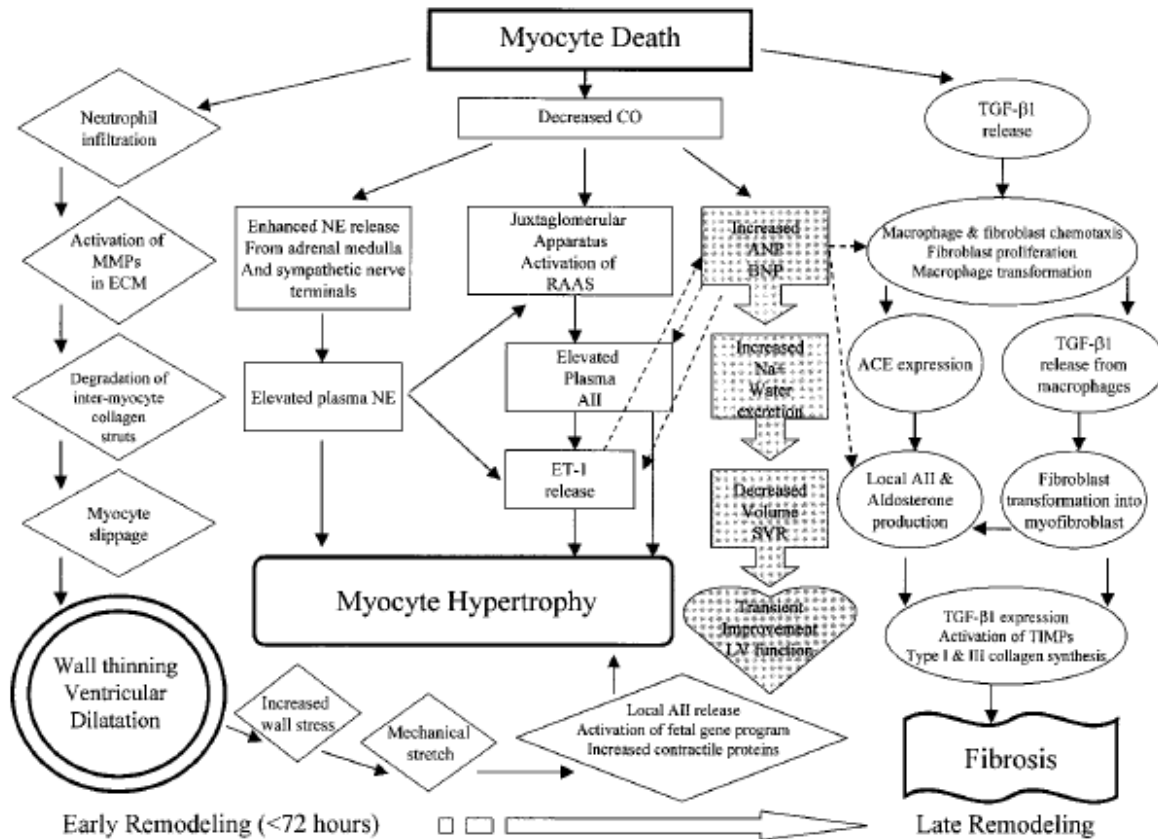
Το έμφραγμα του μυοκαρδίου έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαταραχών της κινητικότητας στην περιοχή της ισχαιμίας και σε δεύτερο χρόνο στην απομακρυσμένη περιοχή. Η απώλεια των μυοκαρδιακών κυττάρων ενεργοποιεί μια σειρά αλλαγών. Αρχικά η αριστερή κοιλία διατείνεται στην συνέχεια τα μυοκαρδιακά κύτταρα υπερτρέφονται και τελικά στην περιοχή του εμφράγματος σχηματίζεται μια διακριτή ουλή/ίνωση. Σε μοριακό επίπεδο οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι πολλοί. Τη μυοκαρδιακή βλάβη ακολουθεί τοπικά φλεγμονώδης απάντηση μέσω απελευθέρωσης κυτοκίνων που οδηγούν στον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών αλλά και στην ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών. Η αναδιαμόρφωση μπορεί να διαρκεί βδομάδες ή και μήνες μέχρι το σχηματισμό ισχυρής ίνωσης/ουλής. Η αναδιαμόρφωση μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου χωρίζεται σε δύο φάσεις. Σε μία πρώιμη φάση μέσα στις πρώτες 72 ώρες και σε μία όψιμη φάση που αρχίζει μετά τις 72 ώρες και διαρκεί για μέρες, εβδομάδες ή και μήνες. Η πρώιμη φάση χαρακτηρίζεται από την έκπτυξη της ζώνης του εμφράγματος και τη λέπτυνση του τοιχώματος που μπορεί να οδηγήσουν σε ρήξη του κοιλιακού μυοκαρδίου ή και στο σχηματισμό ανευρύσματος. Η όψιμη φάση αφορά τις αλλαγές στο σύνολο της αριστερής κοιλίας, σχετίζεται με τη χρόνο εξαρτώμενη διάταση, τις αλλαγές στο σχήμα της και από την υπερτροφία.<sup>24</sup>

Η έκπτυξη της ζώνης του εμφράγματος στην πρώιμη φάση της αναδιαμόρφωσης καθοδηγείται από τη φλεγμονή. Τα μυοκαρδιακά κύτταρα που υπέστησαν βλάβη εκκρίνουν κυτοκίνες. Η κυτοκίνη TGF-β1 αυξάνει νωρίς στη ζώνη του εμφράγματος ενεργοποιώντας τα μακροφάγα και τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, ενώ παράλληλα γίνεται διήθηση από ουδετερόφιλα που ενεργοποιούν τις μεταλλοπρωτεϊνάσες που εκκρίνονται από αυτά. Αποτέλεσμα όλων, είναι η διάταση της κοιλίας, καθώς και η λέπτυνση του τοιχώματος και τελικά η αύξηση της τοιχωματικής τάσης τόσο στη συστολή όσο και στη διαστολή. Η διάταση της αριστερής κοιλίας έρχεται

ως απάντηση στη δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και στην προσπάθεια της για διατήρηση του όγκου παλμού και της καρδιακής παροχής. Μέσω του μηχανισμού Frank-Starling, το υγιές μυοκάρδιο προσπαθεί να εξισορροπήσει την απόδοση της κοιλίας. Ενώ παράλληλα η αύξηση της χρονότροπης και της ινότροπης απόκρισης μέσω της διέγερσης του συμπαθητικού συμβάλλουν στη διατήρηση του καρδιακής παροχής. Όταν όμως το ποσοστό του μυοκαρδίου που έχει νεκρωθεί και που συνεπώς δεν συστέλλεται, είναι πάνω από 20% τότε οι μηχανισμοί αυτοί δεν επαρκούν ούτε προσωρινά για τη διατήρηση του όγκου παλμού. Η διάταση της αριστερής κοιλίας, είναι ένας αρχικός αντιρροπιστικός μηχανισμός για την διατήρηση του όγκου παλμού. Η διάταση όμως επιφέρει αύξηση της συστολικής και της διαστολικής τάσης που δέχεται η κοιλία και με το νόμο του Laplace επιβαρύνεται περαιτέρω δημιουργώντας έναν φαύλο κύκλο. Έτσι η αυξημένη τάση μέσω τασεοϋποδοχέων ενεργοποιεί τον άξονα ρενίνης -αγγειοτενσίνης -αλδοστερόνης (άξονας). Η ενεργοποίηση του συμπαθητικού ενεργοποιεί περαιτέρω τον άξονα ρενίνης -αγγειοτενσίνης- αλδοστερόνης με αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης νατριουρητικών πεπτιδίων (ANP-BNP). Η διέγερση του συμπαθητικού οδηγώντας σε αύξηση της καρδιακής συχνότητας έχει ως αποτέλεσμα τα υγιή τμήματα να γίνονται υπερσυσπαστικά συμβάλλοντας προσωρινά στη διατήρηση της καρδιακής παροχής. Τα νατριουρητικά πεπτιδία αρχικά καταφέρνουν να μειώνουν τον αυξημένο ενδαγγειακό όγκο και τις συστηματικές αντιστάσεις, διορθώνοντας τις πιέσεις πλήρωσης της κοιλίας και βελτιώνοντας την απόδοση της αριστερής κοιλίας. Η αυξημένη τοιχωματική τάση τόσο στη συστολή όσο και τη διαστολή γίνεται το ερέθισμα για την υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων μέσω διέγερσης τασεοϋποδοχέων.

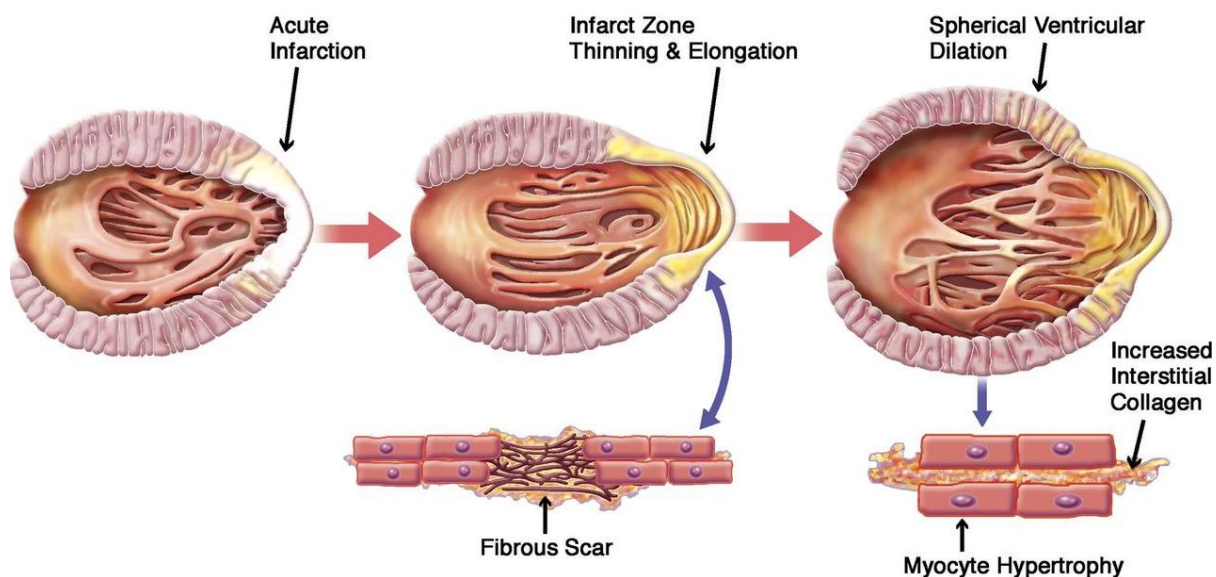
Στην όψιμη φάση, κυριαρχούν η υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων, αλλά και οι αλλαγές στην αρχιτεκτονική δομή της κοιλίας ώστε να ανταπεξέλθει η κοιλία στην αυξημένη τοιχωματική τάση ενώ παράλληλα σχηματίζεται μια ισχυρή ουλή από κολλαγόνο που θα εξισορροπήσει τις αντικρουόμενες δυνάμεις ώστε να διακοπούν οι περαιτέρω αλλαγές. Η υπερτροφία αρχικά είναι ένας αντιρροπιστικός μηχανισμός για να ισοσταθμίσει την διάταση και να σταθεροποιήσει την συστολική λειτουργικότητα. Υποκινείται από τον άξονα αλλά και παρακρινικούς παράγοντες. Η επιδιόρθωση του μυοκαρδιακού ιστού πυροδοτείται από τις κυτοκίνες που εκκρίνονται από τα μυοκαρδιακά κύτταρα που υπέστησαν βλάβη. Η σύνθεση του κολλαγόνου σχετίζεται με πολύπλοκο τρόπο με την αλδοστερόνη, καθώς και με τα νατριουρητικά πεπτιδία (ANP), όπως και με την ενδοθηλίνη αλλά και με την βραδυκινίνη και με τον TGF-β1. Στη ζώνη

του εμφράγματος παρατηρείται εναπόθεση κολλαγόνου τύπου III και I. Το κολλαγόνο είναι ορατό με το μικροσκόπιο από την 7ή ημέρα και αυξάνεται δραματικά ώστε περίπου την 28ή ημέρα τα νεκρά μυοκαρδιακά κύτταρα να έχουν αντικατασταθεί από ινώδη ιστό. Μετά τη δημιουργία της ουλής ο σχηματισμός κολλαγόνου μειώνεται πολύ και οι μυοϊνοβλάστες οδηγούνται σε απόπτωση.<sup>24-29</sup> (Εικόνες 9 και 10)



Εικόνα 6, Σχηματική απεικόνιση των αλλαγών που οδηγούν στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας κατά τις δύο φάσεις την πρώιμη και την όψιμη. MMPs: μεταλλοπρωτεϊνάσες, ECM: εξωκυττάριος χώρος, RAAS: ο άξονας ρενίνης αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης, CO: καρδιακή παροχή, SVR: συστηματικές αγγειακές αντιστάσεις, LV: αριστερή κοιλία, AII: αγγειοτενσίνη II. Η εικόνα αυτή είναι από τη δημοσίευση των M.G.St.J Sutton με τίτλο, Left Ventricular remodeling after myocardial infarction. Pathophysiology and therapy.<sup>24</sup>

## POST-MI REMODELING



Εικόνα 7, Η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μακροσκοπικά και μικροσκοπικά. Η πρώτη φάση χαρακτηρίζεται από τη διάταση, την επιμήκυνση και τη λέπτυνση της ζώνης του εμφράγματος. Η όψιμη φάση, είναι η φάση όπου η κοιλία λόγω της διάτασης χάνει το ελλειπτικό σχήμα της και γίνεται σφαιρική. Μικροσκοπικά κυριαρχεί η υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων και η εναπόθεση κολλαγόνου. Η εικόνα είναι από τη δημοσίευση των M.Konstam με τίτλο Left Ventricular Remodeling in Heart Failure.<sup>30</sup>

Η διαδικασία της αναδιαμόρφωσης έχει περιγραφεί και καθοριστεί σε μεγάλο βαθμό τόσο στα πειραματικά μοντέλα όσο και από τις μελέτες σε ασθενείς. Στην κλινική πράξη υπάρχουν διάφορες τεχνικές αξιολόγησης της αναδιαμόρφωσης.

Στις τεχνικές που έχουν ως τώρα χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας συμπεριλαμβάνονται, η κοιλιογραφία, επίσης η ραδιοισοτοπική κοιλιογραφία, όπως και η μαγνητική τομογραφία καρδιάς αλλά και η διαθωρακική υπερηχοκαρδιογραφία 2d και 3d. Κάθε τεχνική έχει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.<sup>30</sup>

Στην καθημερινή κλινική πράξη, η μελέτη με υπερήχους μπορεί να γίνει σχεδόν σε όλους τους ασθενείς ακόμη και σε αυτούς που είναι σε βαριά κλινική κατάσταση, επίσης μπορεί να επαναληφθεί όσες φορές χρειαστεί και δεν συνοδεύεται από έκθεση σε ακτινοβολία. Ταυτόχρονα παρέχει πολύτιμες πληροφορίες που αφορούν τη

λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας αλλά και τη δομή της. Με την υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη μπορεί να αξιολογηθεί γρήγορα και εύκολα η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας. Υπολογίζεται το κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας (LVEF), επίσης προσδιορίζονται οι διαστάσεις της κοιλίας, όπως και οι όγκοι της αλλά και άλλοι δείκτες, όπως ο δείκτης μάζας της αριστερής κοιλίας (LVMI) και το σχετικό πάχος των τοιχωμάτων (RWT). Το κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος δείκτης απόδοσης της αριστερής κοιλίας και είναι αυτός ο οποίος επηρεάζεται σχεδόν περισσότερο από οποιονδήποτε άλλο δείκτη από την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας.<sup>30</sup>

Η κοιλιογραφία της αριστερής κοιλίας στο αιμοδυναμικό εργαστήριο έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό του κλάσματος εξωθήσεως, αλλά και των όγκων της αριστερής κοιλίας. Οι μεταβολές στους όγκους της αριστερής κοιλίας έχουν χρησιμοποιηθεί και σε κλινικές μελέτες ως δείκτες πρόγνωσης μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου όπως αυτοί έχουν υπολογιστεί με κοιλιογραφία. Σε κλινική μελέτη που δημοσιεύτηκε το 1987, σε ασθενείς μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (4- 8 εβδομάδες μετά), φάνηκε πως ο τελοσυστολικός όγκος δείκτης της αριστερής κοιλίας (ESVi) και ειδικά σε ασθενείς με κλάσμα εξωθήσεως χαμηλότερο του 50% αποτελεί ισχυρότερο προγνωστικό δείκτη επιβίωσης σε σχέση με το κλάσμα εξωθήσεως. Αργότερα το 1997, μετά από την διεθνή πολυκεντρική μελέτη (GUSTO-I), όπου ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της θρομβόλυσης στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, 1300 ασθενείς της μελέτης στα 90 ή στα 180 λεπτά μετά την θρομβόλυση υποβλήθηκαν σε κοιλιογραφία και υπολογίστηκε και ο ESVi. Από τα αποτελέσματα φάνηκε πως ο ESVi είναι ανεξάρτητος παράγοντας επιβίωσης. ESVi μεγαλύτερος ή ίσος από 40ml/m<sup>2</sup>, αποτελούσε ανεξάρτητο παράγοντα αυξημένης θνητότητας τόσο στις 30 ημέρες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου όσο και στο χρόνο.<sup>31,32</sup>

Η θεραπευτική προσέγγιση στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου επιπρόσθετα από την έγκαιρη επαναιμάτωση πρέπει να στοχεύει στον περιορισμό της έκτασης της ουλής και στον περιορισμό της διάτασης της αριστερής κοιλίας, δηλαδή στον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης.

## 1.8 Αριστερός Καρδιακός Καθετηριασμός - Στεφανιογραφία

Επεμβατική μέθοδος όπου υπό ακτινοσκόπηση και ταυτόχρονη χορήγηση σκιαγραφικής ουσίας, ελέγχεται το στεφανιαίο δίκτυο με τη βοήθεια καθετήρων που προωθούνται από περιφερική αρτηρία στους κόλπους του Valsalva. Μπορεί να είναι διαγνωστική ή και θεραπευτική.<sup>8</sup>

Η ιστορία του καθετηριασμού ξεκινά σε πειραματικό επίπεδο από το Γάλλο Claude Bernande ο οποίος το 1844 περιέγραψε και δημοσίευσε αριστερό και δεξιό καθετηριασμό σε άλογο. Η σημαντικότερη συμβολή του ήταν εισαγωγή του καθετήρα ως μέσο μελέτης του καρδιαγγειακού συστήματος.

Η τεχνική της αγγειογραφίας αναπτύχθηκε από τον Πορτογάλο Egas Moniz.

Το 1929 ο Γερμανός χειρουργός Werner Forssman ο οποίος πραγματοποιεί τον πρώτο καρδιακό καθετηριασμό σε ζωντανό άνθρωπο, στον εαυτό του, εισάγοντας από περιφερική φλέβα ουροκαθετήρα ως το δεξιό κόλπο. Κατέγραψε το γεγονός σε ακτινογραφικό φιλμ και το δημοσίευσε 5 Νοεμβρίου του 1929.

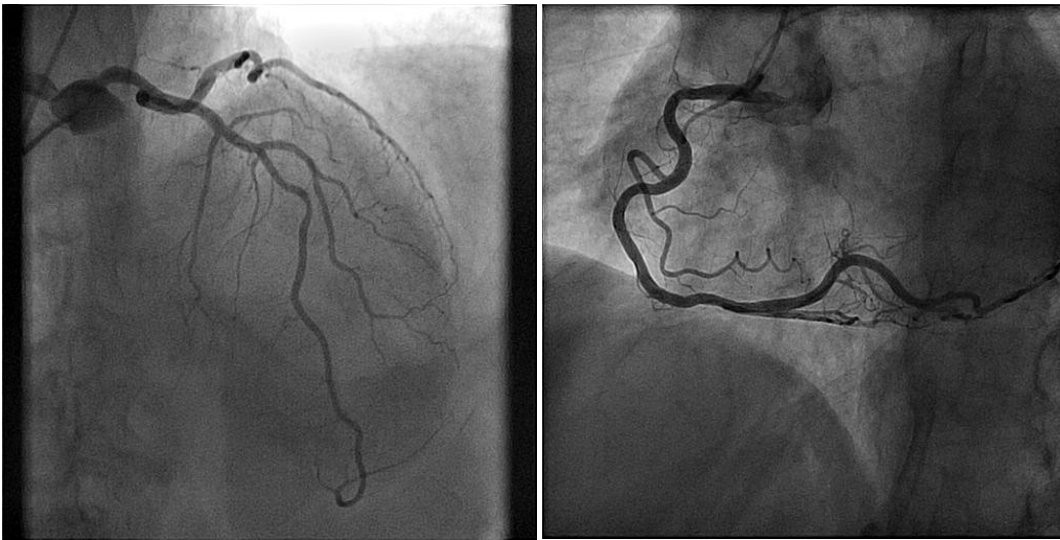
Στη συνέχεια οι Andre Cournand και Dickinson Richards τελειοποίησαν το δεξιό καθετηριασμό. Το 1956 οι 3 τους τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ για την προσφορά τους στην ιατρική.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1940 ο Henry Zimmerman πραγματοποίησε τον πρώτο δεξιό και αριστερό καθετηριασμό σε άνθρωπο. Η πρώτη εκλεκτική στεφανιογραφία έγινε τυχαία το 1958 από τον Mason Sones ο οποίος νομίζοντας ότι είναι στην αορτή πραγματοποίησε έγχυση 40κυβ.εκ στο στόμιο της δεξιάς στεφανιαίας αρτηρίας ο ασθενής έκανε ανακοπή που ανατάχτηκε.

Στις 16 Σεπτεμβρίου του 1977 ο Andreas Gruentzing πραγματοποιεί την πρώτη επιτυχή αγγειοπλαστική σε ξύπνιο ασθενή και ο δρόμος της επεμβατικής καρδιολογίας ανοίγει.<sup>33</sup>

Από τη στιγμή που η έγκαιρη επαναιμάτωση με την πρωτογενή αγγειοπλαστική άρχισε να γίνεται η ρουτίνα για την αντιμετώπιση των ασθενών με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου μειώθηκε η θνητότητα και οι επιπλοκές του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Εν τούτοις, η ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας και οι επιπλοκές που έπονται αυτής παραμένουν σε υψηλά επίπεδα . Συνεχώς διερευνούνται τόσο σε κλινικό όσο και σε προκλινικό επίπεδο επιπρόσθετοι τρόποι αντιμετώπισης της ισχαιμικής

βλάβης. Έτσι κατά καιρούς έχει δοκιμαστεί η χορήγηση φαρμάκων, η χορήγηση κυττάρων αλλά και παραγόντων με σκοπό το περιορισμό της μυοκαρδιακής βλάβης και της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας. Ήδη από τη δεκαετία του 1970 ξεκινούν μελέτες που έχουν σκοπό την εύρεση τρόπων περιορισμού της μυοκαρδιακής βλάβης και οι μελέτες συνεχίζονται αδιάκοπα μέχρι και σήμερα. Έχει διερευνηθεί η χορήγηση γλυκοκορτικοειδών, μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων, ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων και αντισωμάτων αλλά και η κυτταρική θεραπεία ως αναγεννητική θεραπεία.<sup>34</sup>



Εικόνα 8, Αριστερός καρδιακός καθετηριασμός. Στην αριστερή φωτογραφία απεικονίζεται η αριστερή στεφανιαία αρτηρία, το στέλεχος, η πρόσθια κατιούσα αρτηρία και η περισπωμένη αρτηρία. Στην δεξιά φωτογραφία απεικονίζεται η δεξιά στεφανιαία αρτηρία. Οι εικόνες προέρχονται από το αιμοδυναμικό εργαστήριο της καρδιολογικής κλινικής ΓΝΑ Γ.ΓΕΝΝΗΜΑΤΑΣ.

## 2. Μυοκαρδιακή αναγέννηση

Αναγέννηση των μυοκαρδιακών κύτταρων είναι η ικανότητα της καρδιάς να αντικαθιστά τα χαμένα μυοκαρδιακά κυττάρων με νέα.<sup>35</sup> Αρχικά η ικανότητα αυτή των μυοκαρδιακών κυττάρων διαπιστώθηκε στο ψάρι ζέβρα και στη συνέχεια σε μικρά θηλαστικά όπως στους επίμυες<sup>36,37</sup>

Η ανακάλυψη πως τα μυοκαρδιακά κύτταρα έστω και σε μικρό βαθμό έχουν τη δυνατότητα αναγέννησης, γέννησε ελπίδα και έθεσε νέους στόχους για την αντιμετώπιση των νοσημάτων του μυοκαρδίου.<sup>38</sup>

Το 2009 με τη μελέτη των Bergmann Olaf<sup>39</sup> και συνεργατών έγινε γνωστό ότι τα μυοκαρδιακά κύτταρα της ενήλικης ανθρώπινης καρδιάς έχουν την ικανότητα αναγέννησης σε ετήσιο ρυθμό από περίπου 1% αρχικά, σταδιακά μειούμενο από την ηλικία των 20, ώστε να φτάνει μέχρι και κάτω από 0,3% ανά έτος μετά την ηλικία των 75 ετών. Σε μια υγιή ενήλικη καρδιά ο αριθμός των μυοκαρδιακών κυττάρων παραμένει σταθερός και παράλληλα ανατροφοδοτείται με νέα κύτταρα ανά έτος έστω και σε αυτά τα μικρά ποσοστά. Ο ρυθμός ανανέωσης επιτυγχάνεται με την επανείσοδο των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό προϋπαρχόντων μυοκαρδιακών κυττάρων. Μετά από μυοκαρδιακή βλάβη φαίνεται πως ο ρυθμός αυτός αυξάνεται χωρίς όμως να μπορεί να καθοριστεί με ακρίβεια σε τι βαθμό. Η αύξηση αυτή όμως δεν είναι ικανή να επιδιορθώσει τη μυοκαρδιακή βλάβη.

### **2.1 Αναγεννητική ικανότητα μυοκαρδιακών κυττάρων**

Η άποψη ότι η καρδιά είναι ένα τελικά διαφοροποιημένο όργανο χωρίς ικανότητα ανανέωσης επικρατούσε μέχρι και σχεδόν πριν 20 έτη όταν και άρχισαν μελέτες να αποδεικνύουν την ύπαρξη ενός υποπληθυσμού αναπαραγωγής των μυοκαρδιακών κυττάρων τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Το 2003 ο Beltrami<sup>38</sup> και οι συνεργάτες του ανέφεραν την παρουσία Lin<sup>-</sup> c-kit<sup>pos</sup> κυττάρων, με χαρακτηριστικά προγονικών καρδιακών κυττάρων.

Γίνεται πλέον γνωστό ότι στην καρδιά των ενήλικων θηλαστικών υπάρχουν φυσιολογικά καρδιακά προγονικά κύτταρα (cardiac stem cells, CSCs), τα οποία εκφράζουν αντιγόνα επιφάνειας στελεχιαίων προγονικών κυττάρων, όπως αυτό του υποδοχέα c-Kit



(CD117). Τα κύτταρα αυτά είναι πολυδύναμα κύτταρα, με ικανότητα αυτοανανέωσης, δημιουργίας κυτταρικών κλώνων και διαφοροποίησης σε μυοκαρδιακά, λεία μυϊκά καθώς και σε ενδοθηλιακά κύτταρα. Η παρουσία κυττάρων που εκφράζουν τον υποδοχέα c-Kit, διαπιστώνεται αρχικά σε κύτταρα από επίμυες, που τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* εκφράζουν όλες τις προδιαγραφές προγονικών κυττάρων. Όταν τα κύτταρα αυτά χορηγούνται στην ισχαιμική καρδιά συμβάλλουν στην αναγέννηση του μυοκαρδιακού τοιχώματος.

Η ανθρώπινη ενήλικη καρδιά ενώ κυρίως αποτελείται από τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα δεν είναι ένα τελικά διαφοροποιημένο όργανο καθώς περιέχει έστω και σε μικρό βαθμό προγονικά καρδιακά κύτταρα που υποστηρίζουν την ικανότητα της αναγέννησης. Ο αριθμός ωστόσο των προγονικών αυτών κυττάρων είναι ιδιαίτερα μικρός, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να προσφέρουν επαρκή αναγέννηση σε περίπτωση εκτεταμένης μυοκαρδιακής βλάβης.<sup>39-41</sup>

## 2.3 Κυτταρική Θεραπεία

Από τις αρχές της χιλιετίας άρχισαν να γίνονται οι πρώτες μελέτες αποτελεσματικότητας της κυτταρικής θεραπείας στις καρδιακές παθήσεις χορηγώντας μη καρδιακά κύτταρα. Η ανακάλυψη πως τα μυοκαρδιακά κύτταρα έχουν την ικανότητα αναγέννησης καθώς και η απομόνωση και η καλλιέργεια των καρδιακών προγονικών κυττάρων, έδωσαν το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της κυτταρικής θεραπείας ως αναγεννητική θεραπεία στις καρδιακές παθήσεις. Έτσι από τότε μέχρι και σήμερα έχουν μελετηθεί διαφορετικοί πληθυσμοί προγονικών κυττάρων στην καρδιά. Έως τώρα δεν έχει βρεθεί ο ιδανικότερος κυτταρικός πληθυσμός, όμως για να μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι διάφοροι κυτταρικοί πληθυσμοί σαν θεραπευτικό μέσο στις καρδιακές παθήσεις θα πρέπει να έχουν κάποια βασικά κοινά χαρακτηριστικά.<sup>42</sup> Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι:

- Η χορήγηση τους να είναι ασφαλής δηλαδή να μην προκαλούν αρρυθμίες όταν χορηγούνται ούτε να συσχετίζονται με την ανάπτυξη όγκων.
- Να συμβάλλουν στη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας.

- Να είναι εύκολη η χορήγηση τους μέσω των συμβατικών μεθόδων (π.χ ενδοστεφανίαια).
- Να μπορούν να είναι διαθέσιμα όταν θα χρειαστούν.
- Να μην προκαλούν ανοσολογικές αντιδράσεις στον δέκτη.
- Η χορήγηση τους να μην εγείρει ζητήματα βιοηθικής.

Κυτταρικοί πληθυσμοί που έχουν ως τώρα ερευνηθεί στις καρδιακές παθήσεις είναι οι σκελετικοί μυοβλάστες, τα κύτταρα που προέρχονται από το μυελό των οστών, τα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα, τα εμβρυικά βλαστοκύτταρα, τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα και τέλος τα καρδιακά προγονικά κύτταρα.

### 2.3.1 Σκελετικοί μυοβλάστες

Ο πρώτος πληθυσμός που μελετήθηκε ήταν οι σκελετικοί μυοβλάστες. Οι σκελετικοί μυοβλάστες είναι υπεύθυνοι για το σχηματισμό και την επιδιόρθωση των σκελετικών μυών, παρουσιάζουν την ικανότητα πολλαπλασιασμού *in vitro*, είναι ανθεκτικοί σε συνθήκες ισχαιμίας, έχουν την ικανότητα συστολής και η συλλογή τους από περιφερικό μυ είναι σχετικά εύκολη. Έτσι αποτέλεσαν τον πρώτο κυτταρικό πληθυσμό που εξετάστηκε στην καρδιά. Η πρώτη κλινική εφαρμογή έγινε σε έναν άντρα 72 ετών με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια κατά τη διάρκεια αορτοστεφανιαίας παράκαμψης.<sup>43</sup> Στη συνέχεια η ίδια ομάδα ερευνητών με τους Menasche και συνεργάτες δημοσίευσαν το 2003 κλινική μελέτη φάσης I, που εξέτασε την ενδομυοκαρδιακή χορήγηση αυτόλογων σκελετικών μυοβλαστών σε 10 άντρες με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια.<sup>44</sup> Τα αποτελέσματα ήταν ενθαρρυντικά όσο αφορά την επίδραση τους στη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας. Μόνη ανεπιθύμητη παρενέργεια ήταν η εμφάνιση κοιλιακών αρρυθμιών. Ακολούθησε κλινική μελέτη φάσης I/II, η Magic trial το 2008.<sup>45</sup> Η μελέτη αυτή ήταν μία διπλά τυφλή μελέτη, με εικονικό φάρμακο ή παρέμβαση, σε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια οι οποίοι θα αντιμετώπιζόντουσαν με αορτοστεφανιαία παράκαμψη για επαναιμάτωση. Στη μελέτη, αυτόλογοι σκελετικοί μυοβλάστες μετά την τοποθέτηση των μοσχευμάτων χορηγήθηκαν με ενέσεις γύρω από τα σημεία που παρουσίαζαν τις διαταραχές της κινητικότητας, όπως αυτά είχαν προσδιοριστεί προ εγχειρητικά. Η μελέτη δεν κατάφερε να δείξει όφελος και παράλληλα παρατηρήθηκε αύξηση αρρυθμιών μετεγχειρητικά που αποδόθηκαν στους σκελετικούς

μυοβλάστες. Ακολούθησαν και άλλες μελέτες χωρίς όμως να αποδεικνύεται ξεκάθαρα το όφελος από τη χορήγηση τους και έτσι μειώθηκε το ενδιαφέρον για τη χρήση τους στη καρδιά.

### **2.3.2 Κύτταρα προερχόμενα από τον μυελό των οστών**

Η συλλογή των κυττάρων από το μυελό των οστών είναι μια σχετικά εύκολη διαδικασία και τα κύτταρα που συλλέγονται δεν χρειάζονται ιδιαίτερη επεξεργασία ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Έτσι γρήγορα τα κύτταρα αυτά έγιναν στόχος ερευνών. Ως τώρα έχουν γίνει πολλές μελέτες τόσο σε ασθενείς μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου όσο και σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Στο μυελό των οστών υπάρχουν διαφορετικοί πληθυσμοί κυττάρων που επιτελούν διαφορετικές λειτουργίες και έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά. Έχουν γίνει μελέτες με κύτταρα του μυελού των οστών με προγονικά στρωματικά κύτταρα σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης χωρίς να έχει φανεί σαφές όφελος από την χορήγηση τους μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Ακόμη, έχουν γίνει μελέτες με απομονωμένα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα του μυελού των οστών. Η συλλογή αυτών των κυττάρων γινόταν αφού πρώτα είχε προηγηθεί διέγερση του μυελού των οστών με αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυττάρων ώστε να συλλεχθούν αιμοποιητικά και προγονικά κύτταρα που να εκφράζουν CD34 ή και CD133 δείκτες επιφανείας. Αν και αρχικά υπήρξαν μελέτες με ενθαρρυντικά αποτελέσματα αυτά δεν επαναλήφθηκαν σε άλλες μελέτες από άλλες ερευνητικές ομάδες.<sup>46-49</sup>

### **2.3.3 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα**

Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα είναι πολυδύναμα μη αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα με δυνατότητα να διαφοροποιούνται σε οστεοκύτταρα, χοδροκύτταρα, λιποκύτταρα in vitro. Απομονώνονται εύκολα από το μυελό των οστών, το λιπώδη ιστό και τον ομφάλιο λώρο ενώ ανευρίσκονται και σε άλλους ιστούς. Τα τελευταία χρόνια αποτελούν πηγή για την διερεύνηση της κυτταρικής θεραπείας σε πλήθος νοσημάτων. Μπορούν εύκολα να πολλαπλασιάζονται in vitro και εκφράζουν δείκτες επιφανείας όπως είναι οι:

CD73,CD90 και CD105. Έχουν χρησιμοποιηθεί σε πλήθος καρδιακών παθήσεων και φαίνεται πως η καρδιοπροστατευτική τους δράση είναι πολυπαραγοντική. Τρεις βασικοί μηχανισμοί με τον οποίο επιδρούν αναγνωρίζονται: 1) η μείωση της ίνωσης, 2) η ενεργοποίηση της αγγειογένεσης, και 3) η ενεργοποίηση του πολλαπλασιασμού των ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων. Αποτέλεσμα όλων αυτών, η εξυγίανση των τμημάτων του μυοκαρδίου που πάσχουν και η βελτίωση της λειτουργικότητας του μυοκαρδίου. Έτσι ως τώρα έχουν γίνει πολλές κλινικές μελέτες με χρήση είτε αλλογενών είτε αυτόλογων μεσεγχυματικών κυττάρων, στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, όπως και στην χρόνια ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια αλλά και στη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια μη ισχαιμικής αιτιολογίας με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Συνεχίζεται η διερεύνηση και με άλλες μελέτες<sup>50-54</sup>

## 2.4 Προγονικά καρδιακά κύτταρα

Το 2003 δημοσιεύτηκε από την Messina<sup>55</sup> και τους συνεργάτες της η επιτυχής απομόνωση καρδιακών προγονικών κυττάρων. Αφού απομονωθούν και καλλιεργηθούν τα καρδιακά προγονικά κύτταρα, σε ειδικές συνθήκες καλλιέργειας σχηματίζουν πολυκύτταρους σφαιρικούς σχηματισμούς, τις καρδιόσφαιρες (cardiospheres, CSps). Οι καρδιόσφαιρες αποτελούνται από ένα πυρήνα πλούσιο σε κύτταρα τα οποία εκφράζουν αντιγόνα επιφανείας στελεχιαίων προγονικών κυττάρων (c-kit, CD34, sca-1), αλλά και ενδοθηλιακών κυττάρων (CD31) και ο οποίος περιβάλλεται από μία στοιβάδα από μεσεγχυματικά κύτταρα (CD105). Περαιτέρω καλλιέργεια των CSps σε κυτταροκαλλιέργειες μονής στοιβάδας οδηγεί σε απομόνωση ενός διαφορετικού πληθυσμού κυττάρων προερχόμενου από τις καρδιόσφαιρες (cardiosphere derived cells - CDCs). Τα CDCs είναι ένας ετερογενής πληθυσμός κυττάρων μη αιματολογικής προέλευσης, ο οποίος περιέχει αρχέγονα καρδιακά κύτταρα (c-kit +), μεσεγχυματικά (CD90+, CD105+), και επιπλέον εκφράζει την πρωτεΐνη κονεξίνη 43, υποδηλώνοντας την ικανότητα τους για ηλεκτρική σύζευξη, τόσο μεταξύ τους όσο και με τα ενδογενή καρδιακά κύτταρα. Αυτά τα χαρακτηριστικά των CDCs τα καθιστούν ως ένα πληθυσμό κυττάρων που μπορεί να χρησιμοποιηθεί μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου με σκοπό την αναγέννηση του μυοκαρδιακού ιστού. Η απομόνωση και η καλλιέργεια καρδιακών προγονικών κυττάρων άνοιξε ένα νέο ορίζοντα σκέψης πάνω στην αντιμετώπιση τόσο των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων όσο και άλλων παθολογικών καταστάσεων.

Τα κύτταρα φαίνεται πως επιδρούν μέσω παρακρινικών και άλλων μηχανισμών με αποτέλεσμα την προστασία του μυοκαρδιακού ιστού. Πολλαπλοί έμμεσοι μηχανισμοί που ακόμα διερευνούνται (μείωση του ρυθμού απόπτωσης των γηγενών κυττάρων, αύξηση της αγγειογένεσης, συμβολή στη μείωση της φλεγμονώδους απόκρισης, και άλλοι πολλοί μηχανισμοί), καθιστούν τα προγονικά καρδιακά κύτταρα έναν πολύτιμο πληθυσμό για διερεύνηση.<sup>56</sup> Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες μέθοδοι για την απομόνωση και καλλιέργεια των CSCs in vitro. Αυτό έθεσε τις βάσεις ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτός ο κυτταρικός πληθυσμός στην θεραπευτική προσέγγιση της ισχαιμίας του μυοκαρδίου, με στόχο την αναγέννηση και ανανέωση του μυοκαρδιακού ιστού.

## 2.5 Μηχανισμοί δράσης προγονικών κυττάρων

Τα εξωγενή κύτταρα που χορηγούνται δεν παραμένουν στο μυοκαρδιακό ιστό για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το όφελος από τη χορήγηση των κυττάρων φαίνεται να προκύπτει από την παρακρινική δράση τους με αποτέλεσμα την προστασία των ενδογενών μυοκαρδιακών κυττάρων. Η παρουσία των κυττάρων φαίνεται να καταστέλλει την κυτταρική απόπτωση των γηγενών μυοκαρδιακών κυττάρων, επίσης να βοηθά την επανείσοδο τους στον κυτταρικό κύκλο, ακόμη να συμβάλλει στην κινητοποίηση των ενδογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων και να προάγει την αύξηση των προφλεγμονώδων παραγόντων στο σημείο της βλάβης. Επιπλέον η παρουσία των κυττάρων βοηθά με έμμεσο τρόπο την αγγειογένεση, ακόμη συμβάλλει και στην τροποποίηση της φλεγμονώδους διεργασίας και τέλος επηρεάζει τον μεταβολισμό των αυτοχθόνων κυττάρων.

Το 2010, η Chimenti<sup>56</sup> και οι συνεργάτες της, μελέτησαν την επίδραση των ανθρώπινων προγονικών κυττάρων σε επίμυες μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Φάνηκε ότι από τα κύτταρα που χορηγούνται εκκρίνονται κυτοκίνες αλλά και αυξητικοί παράγοντες που συμβάλλουν στην ανάρρωση του ισχαιμικού ιστού. Πιο συγκεκριμένα τόσο τα CDCs όσο και οι CPCs εκκρίνουν τον αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (VEGF), τον αυξητικό παράγοντα των ηπατοκυττάρων (HGF), και τον ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα (IGF1), μέσω των οποίων επάγουν την αγγειογένεση και

καταστέλλουν την απόπτωση των γηγενών κυττάρων και ταυτόχρονα πυροδοτούν τους παρακρινικούς μηχανισμούς που συμβάλλουν στην επιδιόρθωση της ισχαιμικής βλάβης

Από πειραματική μελέτη σε επίμυες<sup>57</sup> το 2012, όπου χορηγήθηκαν CDCs μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου, 1-3 εβδομάδες μετά την χορήγηση των κυττάρων, τα κύτταρα βρίσκονταν στην περιοχή της ουλής και στην περιοχή στο όριο της ουλής συμβάλλοντας στην αγγειογένεση. Ακόμη στη μελέτη αυτή υπολογίστηκαν οι αυξητικοί παράγοντες που βρίσκονταν στην περιοχή του εμφράγματος (τις πρώτες 7 μέρες μετά τη χορήγηση των κυττάρων) και βρέθηκαν σε αυξημένα επίπεδα οι: VEGF, HGF και ο IGF1, συγκριτικά με την ομάδα που δεν είχε λάβει καθόλου κύτταρα. Και με αυτή τη μελέτη φαίνεται πως τα καρδιακά προγονικά κύτταρα ενεργοποιώντας τους ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης και αναγέννησης συμβάλλουν στον περιορισμό της μυοκαρδιακής βλάβης.

Στη συνέχεια, διαπιστώθηκε πως τα προερχόμενα από τις καρδίοςφαιρες προγονικά καρδιακά κύτταρα εκκρίνουν εξωσώματα (exosomes),<sup>58</sup> τα οποία μεταφέρουν micro RNAs και κυρίως τα miR-146 από τα ίδια τα εξωγενή CDCs στον πέριξ μυοκαρδιακό ιστό, τα οποία και συμβάλλουν στην καταστολή της κυτταρικής απόπτωσης, ενώ επιπλέον βοηθούν στην αγγειογένεση αλλά και στον πολλαπλασιασμό των ενδογενών κυττάρων.

Το 2015, σε άλλη πειραματική μελέτη σε επίμυες<sup>59</sup> σε μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης διαπιστώθηκε πως τα χορηγούμενα CDCs όταν χορηγούνται μετά από την βλάβη της ισχαιμίας - επαναιμάτωσης, σαν μηχανισμός μετά ισχαιμικής εκγύμνασης (postconditioning), βοηθούν στην μείωση της έκτασης του εμφράγματος ενώ ταυτόχρονα συμβάλλουν στη βελτίωση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας. Και πως αυτή η θετική επίδραση των κυττάρων επιτελείται μέσω αλλαγών στην πολικότητα των μακροφάγων που συρρέουν στην περιοχή που έχει ισχαιμήσει καταστέλλοντας έτσι την φλεγμονώδη αντίδραση. Πιθανά και αυτή η επίδραση των CDCs να συντελείται μέσω των εξωσωμάτων (exosomes) που αυτά εκκρίνουν.

Ως τώρα έχουν γίνει πολυάριθμες μελέτες για την επίδραση των κυττάρων. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η χορήγηση εξωγενών καρδιακών κυττάρων μπορεί να είναι είτε καρδιοπροστατευτική όταν δηλαδή τα εξωγενή κύτταρα χορηγούνται κατά τη διάρκεια οξείας ισχαιμίας ή σύντομα αμέσως μετά ή να είναι αναγεννητική όταν τα κύτταρα

χορηγούνται μετά τη δημιουργία ουλής.<sup>60</sup> Τα κύτταρα που έχουν την ικανότητα να δρουν καρδιοπροστατευτικά είναι τα προερχόμενα από τις καρδιόσφαιρες προγονικά καρδιακά κύτταρα (CDCs). Τα χορηγούμενα CDCs δρουν σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Δηλαδή παρουσιάζουν άμεση δράση, αμέσως μετά τη χορήγηση τους αλλά και μακροπρόθεσμη δράση. Στην οξεία φάση της βλάβης από επαναιμάτωση τα CDCs συμβάλλουν στη βιωσιμότητα των γηγενών μυοκαρδιακών κυττάρων και βοηθούν στη μείωση της έκτασης του εμφράγματος μέσω της ευεργετικής τους επίδρασης στα μακροφάγα τροποποιώντας τα ώστε να παίξουν έναν καρδιοπροστατευτικό ρόλο και καταστέλλοντας τη φλεγμονή. Στην καθυστερημένη φάση της βλάβης από ισχαιμία και επαναιμάτωση συμβάλλουν στο περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος με αλλαγές που προκαλούν στην πολικότητα των διηθημένων μακροφάγων περιορίζοντας την καθυστερημένη φλεγμονώδη απόκριση του μυοκαρδιακού ιστού.<sup>60-64</sup>

### **3. Βιβλιογραφικά δεδομένα**

#### **3.1 Προκλινικές μελέτες χορήγησης προγονικών καρδιακών κυττάρων**

Η απομόνωση και η καλλιέργεια των προγονικών καρδιακών κυττάρων έδωσε το έναυσμα σε πολυάριθμες προκλινικές πειραματικές μελέτες, να εξετάσουν τόσο την ασφάλεια, όσο και την αποτελεσματικότητα και ταυτοχρόνως και τον τρόπο δράσης των χορηγούμενων κυττάρων στις καρδιακές παθήσεις.<sup>65</sup>

Αυτόλογοι πληθυσμοί καρδιόσφαιρων (CPCs) αλλά και καρδιακών προγονικών κυττάρων προερχόμενα από τις καρδιόσφαιρες (CDCs), έχουν χορηγηθεί, ενδομυοκαρδιακά όπως και ενδοκαρδιακά αλλά και ενδοστεφανιαία, σε μοντέλα ισχαιμίας - επαναιμάτωσης σε μύες, επίμυες και χοίρους, χωρίς να παρατηρείται αύξηση ανεπιθύμητων συμβαμάτων, όπως είναι οι αρρυθμίες, η ογκογένεση αλλά και η αυξημένη θνητότητα. Αντίθετα από τις περισσότερες μελέτες φαίνεται πως τα πειραματόζωα που είχαν λάβει τα κύτταρα διατήρησαν τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας και παρουσίασαν μείωση της έκτασης της ουλής.

Πιο αναλυτικά, σε πειραματικά μοντέλα, πρόκλησης ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, έχει φανεί πως η χορήγηση καρδιόσφαιρων (CSps) μετά την ισχαιμία<sup>66</sup>, βοηθά στη διατήρηση

της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας και συμβάλει στη μείωση της έκτασης της ουλής. Επιπλέον από πειραματική μελέτη σε επίμυες όπου εξετάστηκε η χορήγηση των καρδιοσφαιρών στην ισχαιμική καρδιά, φάνηκε πως η χορήγηση προάγει την αγγειογένεση και πως παράλληλα μειώνει την υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων και πως τελικά περιορίζει την ίνωση. Καθώς όμως οι καρδιόσφαιρες είναι μεγάλοι σε μέγεθος σχηματισμοί, δεν είναι δυνατή η ενδοστεφανιαία χορήγησή τους, παρά μονάχα η απευθείας ενδομυοκαρδιακή. Σε πειραματική μελέτη όπου εξετάστηκε η χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων (CDCs), μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, με μαγνητική τομογραφία καρδιάς, φάνηκε πως η χορήγηση των κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας και μάλιστα το αποτέλεσμα αυτό διατηρείτο μέχρι και 16 εβδομάδες μετά τη χορήγηση.<sup>67,68</sup>

Σε πειραματική μελέτη σε επίμυες<sup>57</sup> εξετάστηκε η χορήγηση μη αλλογενών και αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων ώστε να διαπιστωθούν η αποτελεσματικότητα της χορήγησης των κυττάρων μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου και τυχόν ανοσολογικές αντιδράσεις. Ταυτόχρονα σε άλλη ομάδα από επίμυες χρησιμοποιήθηκαν και ανθρώπινα CDCs για παράλληλη σύγκριση των ανοσολογικών αντιδράσεων αλλά και της αποτελεσματικότητας. Τα καρδιακά προγονικά κύτταρα είναι ένας ετερογενής πληθυσμός μη αιματολογικής προέλευσης με κάποια χαρακτηριστικά που αποτρέπουν την ανοσολογική απόρριψη. Τα CDCs δεν εκφράζουν το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II (MHC τάξης II) και επίσης στερούνται συνδιεγερτικών μορίων CD80/CD86. Εκφράζουν όμως το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας I (MHC τάξης I). Η έκφραση των MHC τάξης I τα προστατεύει από τα κύτταρα φυσικούς φονείς και το γεγονός ότι δεν εκφράζουν αντιγόνα MHC τάξης II τα κάνει μη αναγνωρίσιμα από τα CD4<sup>+</sup> T βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Έτσι από τα αποτελέσματα όσο αφορά την ασφάλεια της χορήγησης των αλλογενών κυττάρων, φάνηκε πως η χορήγηση τους δεν συνοδεύεται από ανοσολογική απόρριψη για τρεις λόγους. Πρώτον, η χορήγηση των αλλογενών προγονικών κυττάρων δεν συνοδεύεται από ανοσολογική διέγερση ιστολογικά (χρώση αιματοξυλίνη ηωσίνη), ενώ η χορήγηση ανθρώπινων CDCs είχε ως αποτέλεσμα την ανοσολογική απόρριψη. Δεύτερον, ανοσολογική απόρριψη δεν φάνηκε ούτε με ανοσοιστοχημικό έλεγχο για τα αλλογενή προγονικά κύτταρα. Τρίτον, 3 εβδομάδες μετά μετρήθηκαν οι κυτοκίνες στο αίμα και ενώ για τα πειραματόζωα που είχαν λάβει είτε αλλογενή είτε μη αλλογενή κύτταρα, οι προφλεγμονώδεις κυτοκίνες (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1b, KG/GPO) καθώς και οι



αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες (IL-5,IL-13,IL-4) ήταν στα ίδια επίπεδα, για την ομάδα που έλαβε τα ανθρώπινα CDCs η αύξηση των κυτοκινών (IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ,IL-13,IL-4), ήταν αξιοσημείωτη, γεγονός που σημαίνει ανοσολογική διέγερση. Όσο αφορά την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας αλλά και τη λειτουργικότητα της, τόσο η ομάδα που είχε λάβει αλλογενή όσο και η ομάδα που είχε λάβει μη αλλογενή προγονικά κύτταρα, εμφάνιζαν μείωση της έκτασης της ουλής και παράλληλα διατηρούσαν τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας. Η ομάδα που δεν είχε λάβει καθόλου κύτταρα καθώς και η ομάδα που έλαβε τα ανθρώπινα, εμφάνιζαν διάταση της αριστερής κοιλίας με λέπτυνση του τοιχώματος και επηρεασμένη συσπαστικότητα. Έτσι φάνηκε πως η χορήγηση αλλογενών προγονικών κυττάρων, σε πειραματικό μοντέλο σε επίμυες, μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, είναι ασφαλής και αποτελεσματική.

Στη συνέχεια ακολούθησαν και άλλες πειραματικές μελέτες με παρόμοια αποτελέσματα, που εξέτασαν και τη χορήγηση αλλογενών καρδιοσφαιρών και τη χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων, μετά από ισχαιμία. Τέτοιες μελέτες έγιναν και σε μικρά αλλά και σε μεγαλύτερα πειραματόζωα (π.χ χοίρους).<sup>69-77</sup>

Το 2015 ο Kanazawa<sup>78</sup> και οι συνεργάτες του δημοσίευσαν πειραματική μελέτη σε χοίρους όπου εξετάστηκε η ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων σε μοντέλο οξείας ισχαιμίας επαναιμάτωσης. Η χορήγηση των κυττάρων αποδείχτηκε ασφαλής και εφικτή, συνοδεύτηκε από μείωση της ουλής, και παράλληλα συνέβαλε στον περιορισμό της απόφραξης της μικροκυκλοφορίας και στον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας. Η θετική επίδραση των κυττάρων ερμηνεύτηκε ως κυτταρικό post-conditioning, δηλαδή κυτταρική μετά - ισχαιμική εκγύμναση. Η μελέτη είχε δύο σκέλη, πειράματα για την τιτλοποίηση της δόσης των χορηγούμενων αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων και πειράματα για την εκτίμηση της αποτελεσματικότητας της χορήγησης. Για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας, μετά από μηχανική απόφραξη με μπαλόνι στον πρόσθιο κατιόντα και πρόκληση ισχαιμίας για 90 λεπτά ακλουθούσε λύση της απόφραξης και αποκατάσταση της ροής, στη συνέχεια στα 30 λεπτά της επαναιμάτωσης χορηγήθηκαν ενδοστεφανιαία στο ίδιο σημείο στον πρόσθιο κατιόντα  $7.5 \times 10^6$  αλλογενή κύτταρα. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν 48 ώρες μετά με κοιλιογραφία της αριστερής κοιλίας και με ιστοπαθολογική εκτίμηση. Το 2016<sup>79</sup> ακολούθησε άλλη δημοσίευση της ίδιας ομάδας όπου με αντίστοιχο τρόπο σε χρόνιο μοντέλο ισχαιμίας - επαναιμάτωσης εξετάστηκε (η

εκτίμηση έγινε με κοιλιογραφία, μαγνητική τομογραφία και ιστοπαθολογική ανάλυση) η μακροπρόθεσμη αποτελεσματικότητα των χορηγούμενων κυττάρων.

### **3.2 Κλινικές μελέτες χορήγησης καρδιακών προγονικών κυττάρων**

Τις προκλινικές μελέτες, με τα πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα ακολούθησαν μελέτες σε κλινικό επίπεδο (κλινικές μελέτες φάσης I/II) που επίσης εξέτασαν την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των κυττάρων.

Η πρώτη τυχαίοποιημένη κλινική μελέτη φάσης I, ήταν η μελέτη SCIPPIO το Φεβρουάριο του 2009. Στη μελέτη ελέγχθηκε η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα χορήγησης αυτόλογων καρδιακών προγονικών κυττάρων (CSCs) που εξέφραζαν τον υποδοχέα c-kit<sup>+</sup>. Η μελέτη συμπεριέλαβε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια και καρδιακή ανεπάρκεια και κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας μικρότερο από 40%, με ιστορικό παλαιού εμφράγματος που θα αντιμετωπιζόντουσαν με αορτοστεφανιαία παράκαμψη. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν 33 ασθενείς. Οι 20 από αυτούς έλαβαν την κυτταρική θεραπεία και οι υπόλοιποι 13 ήταν η ομάδα ελέγχου. Κατά τη διάρκεια του χειρουργείου ελήφθη βιοψία από τον δεξιό κόλπο, το δείγμα επεξεργάστηκε με κατάλληλο τρόπο και καλλιεργήθηκαν καρδιακά προγονικά κύτταρα. Στη συνέχεια τα αυτόλογα κύτταρα χορηγήθηκαν ενδοστεφανιαία στους 4 μήνες  $\pm$ 1 μήνα. Η μελέτη είχε θετική έκβαση. Στους ασθενείς που έλαβαν την κυτταρική θεραπεία με μαγνητική τομογραφία καρδιάς στους 12 μήνες διαπιστώθηκε ότι η συνολική συσπαστικότητα καθώς και η τμηματική συσπαστικότητα είχαν βελτιωθεί, επίσης διαπιστώθηκε ότι μειώθηκε η έκταση εμφράγματος και παράλληλα ότι αυξήθηκε το βιώσιμο μυοκάρδιο.<sup>80,81</sup> Ακολούθησαν και άλλες μελέτες.

Η μελέτη CADUCEUS υπήρξε η πρώτη κλινική μελέτη φάσης I κατά την οποία χορηγήθηκαν προγονικά καρδιακά κύτταρα προερχόμενα από τις καρδιόσφαιρες (CDCs), ενδοστεφανιαία σε ασθενείς που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου. Συμπεριλήφθηκαν ασθενείς 2-4 εβδομάδες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και αφού είχαν αντιμετωπιστεί με επιτυχή διαδερμική επαναιμάτωση και με κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας 25-45%. Οι ασθενείς που τυχαίοποιήθηκαν να λάβουν την κυτταρική θεραπεία υποβλήθηκαν σε βιοψία για τη λήψη των κυττάρων και

στη συνέχεια μέσα σε διάστημα, από 1,5 μήνα μετά έως και 3 μήνες, έλαβαν ενδοστεφανιαία στο υπεύθυνο αγγείο που προκάλεσε το έμφραγμα του μυοκαρδίου τα αυτόλογα καρδιακά προγονικά κύτταρα. Από αυτή τη μελέτη φάνηκε η ασφάλεια αλλά και η αποτελεσματικότητα από τη χορήγηση των κυττάρων. Στους ασθενείς που είχαν λάβει την κυτταρική θεραπεία παρατηρήθηκε μείωση της έκτασης της ουλής, αύξηση του βιώσιμου μυοκαρδίου και βελτίωση της τμηματικής συστολικής συσπαστικότητας της εμφραχθείσας περιοχής σε μαγνητική τομογραφία καρδιάς, στους 6 μήνες αλλά και ένα χρόνο μετά την χορήγηση των CDCs.<sup>82,83</sup>

Η κλινική μελέτη ALLSTAR<sup>84,85</sup> ήταν μία πολυκεντρική κλινική μελέτη φάσης I/II που εξέτασε την χορήγηση ενδοστεφανιαία αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων προερχόμενων από καρδιόσφαιρες (CDCs) σε ασθενείς μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που είχαν αντιμετωπιστεί με διαδερμική αγγειοπλαστική και εμφύτευση ενδοστεφανιαίας πρόθεσης στο ένοχο αγγείο με αποκατάσταση ροής TIMI 3. Τα βασικά κριτήρια ένταξης στη μελέτη ήταν: ιστορικό προηγούμενου οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου 4 έως 12 μήνες πριν, κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας χαμηλότερο από 45%, έκταση εμφράγματος όπως απεικονίζεται στη μαγνητική τομογραφία καρδιάς μεγαλύτερη από 15%, και οι ασθενείς να μην έχριζαν περαιτέρω επαναιμάτωσης. Η μελέτη είχε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση αφορούσε την τιτλοποίηση και την ασφάλεια της χορηγούμενης δόσης κυττάρων. Στη πρώτη φάση συμπεριλήφθηκαν 14 ασθενείς. Η δεύτερη φάση ήταν η διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη μελέτη για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των κυττάρων. Στη φάση αυτή συμπεριλήφθησαν 120 ασθενείς. Και για τις δύο φάσεις της μελέτης πρωτεύοντα καταληκτικά σημεία για την ασφάλεια ήταν, η πρόκληση μυοκαρδίτιδας επαγόμενη από την κυτταρική θεραπεία, επίσης η εμφάνιση κοιλιακών αρρυθμιών (κοιλιακή μαρμαρυγή/ κοιλιακή ταχυκαρδία), επιπρόσθετα η εμφάνιση ανεπιθύμητων καρδιακών συμβαμάτων και τέλος ο αιφνίδιος καρδιακός θάνατος, τον πρώτο μήνα μετά την έγχυση των κυττάρων. Δεν υπήρξε διαφορά στην εμφάνιση μείζονων ανεπιθύμητων συμβαμάτων ανάμεσα στις δύο ομάδες. Η μελέτη σταμάτησε νωρίς χωρίς ενθαρρυντικά αποτελέσματα από την χορήγηση των κυττάρων όσο αφορά τη μείωση της έκτασης του εμφράγματος. Παρόλα αυτά στους 6 μήνες οι ασθενείς που είχαν λάβει την κυτταρική θεραπεία σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν λάβει την εικονική θεραπεία, παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μείωση στον τελοδιαστολικό και στον τελοσυστολικό

όγκο της αριστερής κοιλίας αλλά και στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα του νατριουρητικού πεπτιδίου NT-pro BNP ( $P=.02$  για όλα τα ανωτέρω).

Η κλινική μελέτη CAREMI είναι μία πρόσφατη κλινική μελέτη φάσης I/II πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή μελέτη, με χορήγηση είτε εικονικού φαρμάκου είτε αλλογενών CSCs, που εξέτασε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων σε ασθενείς μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με ανάρταση του ST και δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας. Οι ασθενείς που συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη επιπλέον παρουσίαζαν κλάσμα εξωθήσεως μικρότερο του 45% και έκταση εμφράγματος πάνω από το 25% της μάζας της αριστερής κοιλίας όπως αυτό ελέγχθηκε με μαγνητική τομογραφία. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 49 ασθενείς 5 έως 7 ημέρες μετά το έμφραγμα και την επιτυχή επαναιμάτωση. Από τους ασθενείς της μελέτης, οι 33 έλαβαν την κυτταρική θεραπεία και οι 16 ανήκαν στην ομάδα ελέγχου. Οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν τα κύτταρα, έλαβαν ενδοστεφανιαία  $35 \times 10^6$  κύτταρα. Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν στους 6 και 12 μήνες μετά την παρέμβαση. Ένας ασθενής παρουσίασε μετά τη χορήγηση κυττάρων αλλεργική αντίδραση (δερματίτιδα). Δεν παρατηρήθηκαν όμως σημαντικές ανοσολογικές αντιδράσεις ή σοβαρά ανεπιθύμητα γεγονότα. Παρόλα αυτά η μελέτη δεν κατάφερε να δείξει αποτελεσματικότητα όσο αφορά τη μείωση της έκτασης του εμφράγματος και τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας.<sup>86,87</sup>

## ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. Υπόθεση

Πλέον είναι γνωστό ότι τα χορηγούμενα ενδογενή/αλλογενή καρδιακά προγονικά κύτταρα επιβιώνουν για μικρό χρονικό διάστημα, ανεξάρτητα από την οδό και τον τρόπο χορήγησης τους. Επίσης είναι γνωστό ότι σπάνια έως ποτέ τα χορηγούμενα κύτταρα διαφοροποιούνται σε ώριμα μυοκαρδιακά κύτταρα. Το όφελος από τη χορήγηση αυτών των κυττάρων φαίνεται να προκύπτει από την παρακρινική δράση τους, με αποτέλεσμα την προστασία των ενδογενών μυοκαρδιακών κυττάρων, την επανείσοδο τους στον κυτταρικό κύκλο, την ενεργοποίηση των ενδογενών προγονικών κυττάρων, την αγγειογένεση και την τροποποίηση της φλεγμονώδους διεργασίας και του μεταβολισμού των αυτόχθονων κυττάρων.<sup>56,60,89-90</sup>

Το πλεονέκτημα των αλλογενών CDCs, συγκριτικά με τα ενδογενή είναι ότι μπορούν εφόσον έχουν απομονωθεί και καλλιεργηθεί να είναι άμεσα διαθέσιμα για χορήγηση μέσα σε ένα αιμοδυναμικό εργαστήριο. Εφόσον λοιπόν τεκμηριωθεί πραγματικό όφελος από τη χορήγηση τους, θα μπορούσαν να χορηγούνται στον ασθενή με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου κατά τη διάρκεια της διαδερμικής επαναιμάτωσης. Αντίθετα τα ενδογενή καρδιακά προγονικά κύτταρα δεν θα μπορούσαν να είναι διαθέσιμα οποιαδήποτε στιγμή, καθώς θα χρειαζόταν χρόνος για την συλλογή και την καλλιέργεια τους.

Από τις ως τώρα μελέτες, προκλινικές αλλά και κλινικές, φαίνεται ότι η χρήση των αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων είναι ασφαλής και δεν συνοδεύεται από σημαντικές ανοσολογικές αντιδράσεις, καθώς τα ίδια τα CDCs παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που βοηθούν ώστε να μην προκαλείται έντονη ανοσολογική αντίδραση στο δέκτη. Επίσης προκλινικές πειραματικές μελέτες έχουν δείξει πως έχουν την ίδια αποτελεσματικότητα συγκριτικά με τη χορήγηση ενδογενών CDCs, όταν χορηγούνται μετά από ισχαιμική βλάβη.<sup>57</sup> Τα αλλογενή CDCs περιορίζουν την έκταση της ουλής και την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και έτσι συμβάλλουν στην διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας.

Ως τώρα δεν έχουν γίνει μελέτες που να εστιάζουν στην ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων κατά την οξεία φάση του εμφράγματος

πριν την επαναιμάτωση ώστε να μελετηθούν τα αποτελέσματα μίας τέτοιας χορήγησης στη μυοκαρδιακή αναδιαμόρφωση.

Το φαινόμενο της μη επαναρροής ξεκινά αμέσως μετά την επαναιμάτωση και συνεχίζεται για ώρες, όμως μέσα στα 5 πρώτα λεπτά από την επαναιμάτωση συμβαίνουν οι πιο καθοριστικές αλλαγές. Η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας και το φαινόμενο της μη επαναρροής δεν βοηθούν στην ομοιόμορφη κατανομή των χορηγούμενων κυττάρων στο μυοκαρδιακό ιστό που ισχαιμήσε. Συνεπώς το όφελος από τη χορήγηση των κυττάρων στην επαναιμάτωση περιορίζεται.

Τις πρώτες ώρες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου πεθαίνουν και τα περισσότερα μυοκαρδιακά κύτταρα. Η συνεισφορά των χορηγούμενων κυττάρων έγκειται με πολλαπλούς μηχανισμούς. Ένας σημαντικός μηχανισμός είναι η αντιαποπτωτική επίδραση των χορηγούμενων κυττάρων στα γηγενή.<sup>58</sup> Μετά τη χορήγηση των κυττάρων η απόπτωση των ενδογενών κυττάρων μειώνεται σε σημαντικό βαθμό. Επιπλέον σημαντικό ρόλο παίζει και η δράση των εξωγενών κυττάρων ως προς την καταστολή της φλεγμονώδους απόκρισης στο μυοκαρδιακό ιστό που ισχαιμεί. και επαναιμάτωση και της επιπρόσθετης βλάβης του φαινομένου της μη επαναρροής. Αυτοί οι μηχανισμοί αλλά και οι υπόλοιποι τρόποι με τους οποίους επιδρούν τα εξωγενή κύτταρα, θα μπορούσαν να επηρεάσουν όλο τον καταρράκτη της βλάβης από ισχαιμία<sup>60,92</sup>

Προηγούμενη πειραματική μελέτη της ομάδας, όπου χορηγήθηκαν αλλογενή προγονικά καρδιακά κύτταρα ενδοστεφανιαία σε προκλινικό μοντέλο οξείας ισχαιμίας - επαναιμάτωσης σε χοίρους, 5 λεπτά πριν την επαναιμάτωση και 5 λεπτά μετά την επαναιμάτωση, είχε σκοπό τον έλεγχο της ασφάλειας της χορήγησης, του προσδιορισμού της δόσης των κυττάρων και την εύρεση της ιδανικότερης χρονικής στιγμής για την χορήγηση αυτών. Καταληκτικά σημεία ήταν ο αριθμός της δόσης των χορηγούμενων κυττάρων, η στιγμή της χορήγησης τους αλλά και ο τρόπος χορήγησης τους, ώστε να επιτυγχάνεται η μεγαλύτερη κατακράτηση των χορηγούμενων κυττάρων χωρίς να επιδεινώνεται περαιτέρω η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας. Διαπιστώθηκε πως η ενδοστεφανιαία χορήγηση  $5 \times 10^6$  και  $10 \times 10^6$  κυττάρων είναι ασφαλής και δεν επιδεινώνει περαιτέρω τη μικροκυκλοφορία.

Έγινε η υπόθεση πως αν στην οξεία φάση, νωρίς πριν ακόμα και την επαναιμάτωση, χορηγηθούν ενδοστεφανιαία προγονικά καρδιακά κύτταρα όπως προσδιορίστηκε από

την προηγούμενη μελέτη, θα μπορούσαν τα χορηγούμενα κύτταρα να συμβάλουν στον περιορισμό του no-reflow και στη μείωση της μυοκαρδιακής βλάβης.

Η τοπική υποξία, η φλεγμονή και τυχόν μηχανισμοί οξείας ανοσολογικής απόρριψης θα μπορούσαν να αναστείλουν την ευεργετική δράση των CDCs . Όμως η χορήγηση τους πριν την επαναιμάτωση και πριν την έναρξη του no-reflow θα συντελούσε ώστε τα κύτταρα να κατανομηθούν ομοιόμορφα στο μυοκαρδιακό ιστό. Η παρουσία τους στην ζώνη της ισχαιμίας θα μπορούσε να συμβάλει σε αύξηση της καρδιοπροστασίας που επάγεται από αυτά.

## 2. Σκοπός

Από τη βιβλιογραφία με τις ενθαρρυντικές προκλινικές μελέτες και τις κλινικές μελέτες που αν και δεν κατάφεραν να αναδείξουν τη σαφή αποτελεσματικότητα της χορήγησης των κυττάρων αλλά δείχνουν όμως την ασφάλεια της χορήγησης των αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων πολλά ερωτήματα γεννούνται. Μπορούν τελικά τα αλλογενή προγονικά καρδιακά κύτταρα να βοηθήσουν στον περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος και στη διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας; Ποια μπορεί να είναι η κατάλληλη στιγμή για τη χορήγηση των κυττάρων;

Το ενδεχόμενο μιας πιο έγκαιρης χορήγησης κοντά στην φάση της οξείας ισχαιμίας πρέπει να διερευνηθεί. Δεν υπάρχουν αρκετά δεδομένα από τη χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων σε προκλινικό μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε μεγάλα ζώα κατά την οξεία φάση της ισχαιμίας.

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν η χορήγηση  $5 \times 10^6$  αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων ή εικονικού διαλύματος, νωρίς κατά τη φάση της οξείας ισχαιμίας, σε χοίρειο χρόνιο μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, με στόχο τη μελέτη της απώτερης αποτελεσματικότητας αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης, ως προς τον περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος και τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας.



### **3. Πειραματική Διαδικασία**

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες έγιναν σύμφωνα με τις διατάξεις της « Ευρωπαϊκής σύμβασης για την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για πειραματικούς ή επιστημονικούς σκοπούς » και τις άλλες κείμενες διατάξεις περί «Προστασίας των ζώων» (Ν. Ι 197/8 Ι αρθρ. 4, Ν.201/5/92 Π.Δ. 160/91). Τα πειράματα διενεργήθηκαν στο « ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΚΕΝΤΡΟ» της ΕΛΠΕΝ. Για την εκπόνηση της πειραματικής μελέτης πάρθηκε ειδική έγκριση από τη Γενική Διεύθυνση Κτηνιατρικής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων Περιφέρειας Αττικής με Αριθμ. Πρωτ.: 1253/15-03-2013. Η πειραματική μελέτη είχε λάβει χορήγηση από τον Ειδικό Λογαριασμό Κονδυλίων Έρευνας με Αριθμ. Πρωτ.: 033359/2013. Κατά τη διενέργεια των πειραμάτων όλα τα ζώα παρέμειναν φιλοξενούμενα σε ειδικό χώρο του εργαστηρίου της ΕΛΠΕΝ κάτω από σταθερές συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας, αερισμού και υγιεινής, έχοντας πρόσβαση σε νερό και τροφή ενώ παρέμεναν υπό παρακολούθηση.

## **4. Πειραματικό Πρωτόκολλο**

### **4.1 Υλικό**

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 18 θηλυκοί και αρσενικοί χοίροι βάρους 30-35 κιλά για τη διενέργεια του πειραματικού πρωτοκόλλου οξείας ισχαιμίας και επαναιμάτωσης. Επιπλέον, 10 αρσενικοί χοίροι είχαν χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση μυοκαρδιακών κυττάρων.

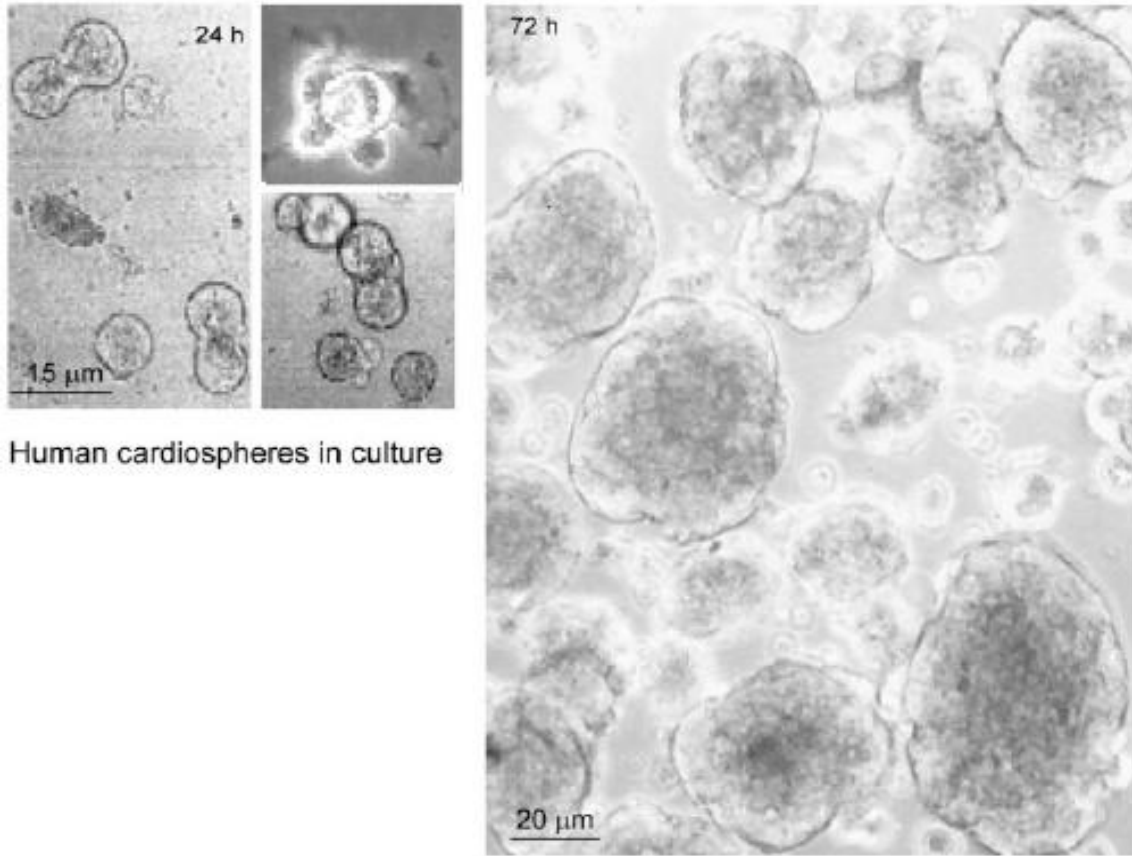
### **4.2 Μεθοδολογία**

#### **4.2.1 Απομόνωση και καλλιέργεια προγονικών καρδιακών κυττάρων (CDCs)**

Για την απομόνωση των προγονικών καρδιακών κυττάρων είχαν χρησιμοποιηθεί 10 υγιείς, αρσενικοί χοίροι, βάρους 30-35 kg. Ελήφθησαν δείγματα μυοκαρδίου από την αριστερή κοιλία με βελόνη βιοψίας υπό άσηπτες συνθήκες. Στα δείγματα έγινε επεξεργασία σύμφωνα με τις τυποποιημένες μεθόδους που έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία ώστε να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν καρδιακά προγονικά κύτταρα σε επαρκείς αριθμούς.

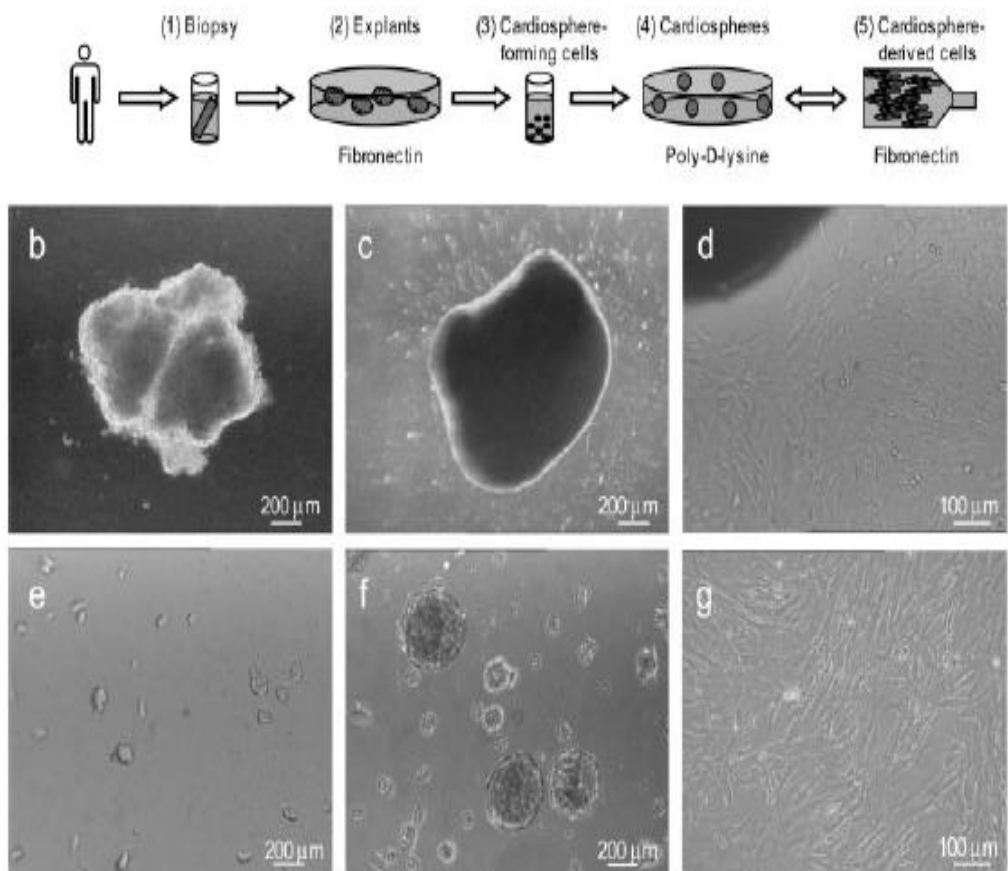
Πιο αναλυτικά, όλα τα ζώα, αφού είχαν λάβει αναισθησία και αναλγησία όπως περιγράφεται στη συνέχεια, υποβαλλόντουσαν σε διασωλήνωση και παρέμεναν υπό μηχανικό αερισμό ενώ ελάμβαναν αναισθησία και αναλγησία. Ακλουθούσε μέση στερνοτομή, διατομή του περικαρδίου αποκάλυψη της καρδιάς και πάντα υπό άσηπτες συνθήκες λαμβανόντουσαν δείγματα από την αριστερή κοιλία με βελόνη βιοψίας μαλακών μορίων 14G. Στη συνέχεια τα ζώα χρησιμοποιούνταν για τη διενέργεια άλλων μη καρδιολογικών πειραματικών πρωτοκόλλων. Τα δείγματα που είχαν ληφθεί ξεπλένονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered solution, PBS, GIBCO) και επεξεργάζονταν ενζυμικά με θρυψίνη (0,25% Trypsin-EDTA, GIBCO) για 3 λεπτά, τα δείγματα του μυοκαρδιακού ιστού τεμαχίζονταν σε ιστοτεμαχίδια πάχους 1-2 mm και τοποθετούνταν σε πλαστικά αποστειρωμένα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, τα οποία προηγουμένως είχαν επωασθεί με φιμπρονεκτίνη (20 mg/mL, Sigma-Aldrich)

για 24 ώρες. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε κλίβανο επώασης στους 37 βαθμούς κελσίου και καλλιεργούνταν με ορό ο οποίος περιείχε θρεπτικό υλικό (Isconve's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO) σε συνδυασμό με 10% ορό εμβρύου βοός (HyClone), 2 mmol/L-γλουταμίνης (GIBCO), 100 U/mL πενικιλίνης G (GIBCO) και 100 U/mL στρεπτομυκίνης (GIBCO). Μετά από 10- 14 μέρες καλλιέργειας ένα στρώμα από μικρά διαυγή ατρακτοειδή κύτταρα εμφανίζονταν γύρω από τα ιστοτεμαχίδια. Όταν τα κύτταρα αυτά έφταναν σε μεγάλο αριθμό και επικάλυπταν πλήρως το τρυβλίο της καλλιέργειας, συλλέγονταν. Αφαιρούνταν το καλλιεργητικό υλικό μετά από ήπια ενζυμική πέψη με θρυψίνη για 3-5 λεπτά. Το διάλυμα που προέκυπτε έμπαινε σε κωνικά σωληνάρια των 50ml και ακολουθούσε φυγοκέντρηση για 3 λεπτά (3000rcf στροφές). Στη συνέχεια αφού αφαιρούνταν το υπερκείμενο διάλυμα το ίζημα αποτελούσε τα προγονικά κύτταρα. Τα κύτταρα τοποθετούνταν σε πλάκες 24 κυψελίδων (24-well plates) επικαλυμμένες με poly-D-lysine, σε αριθμούς 3 - 5 x 10<sup>4</sup> κύτταρα/κυψελίδα. Οι πλάκες επωάζονταν σε κλίβανο στους 37 βαθμούς κελσίου για το σχηματισμό καρδιοσφαιρών. Περίπου μια εβδομάδα μετά, στο δισκίο εμφανίζονταν μεγάλα συσώματα κυττάρων, οι καρδιόσφαιρες. Οι καρδιόσφαιρες συλλέγονταν και τοποθετούνταν σε φλάσκες με προσθήκη καλλιεργητικού υγρού ώστε να καλλιεργηθούν σε μονή στιβάδα. Στις κυτταροκαλλιέργειες αυτές πολλαπλασιάζονταν τα καρδιακά προγονικά κύτταρα τα προερχόμενα από τις καρδιόσφαιρες. Τα καρδιακά προγονικά κύτταρα προερχόμενα από τις καρδιόσφαιρες (CDCs) συλλέγονταν έπειτα από ήπια ενζυμική πέψη με θρυψίνη για 3-5 λεπτά και χρησιμοποιούνταν στις περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες μετά από ανασύσταση σε διάλυμα PBS. Κύτταρα που δεν θα χρησιμοποιούνταν άμεσα στις πειραματικές διαδικασίες φυλάσσονταν σε θερμοκρασία - 80 βαθμούς κελσίου. Μία εβδομάδα νωρίτερα πριν τη χρήση τους γινόταν απόψυξη σε υδατόλουτρο στους 37 βαθμούς κελσίου, ανασύσταση τους σε θρεπτικό υλικό και καλλιεργούνταν σε φλάσκες στον επωαστικό κλίβανο στους 37 βαθμούς κελσίου. (Εικόνες 9,10)



Human cardiospheres in culture

Εικόνα 9, Καλλιέργεια ανθρώπινων καρδιοσφαιρών δείγμα βιοψίας από μυοκάρδιο κόλπου. Η εικόνα αποτελεί μέρος της δημοσίευσης της Messina E με τίτλο: Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart, *Circ Res.* 2004<sup>55</sup>



Εικόνα 10, Απεικονίζονται τα βήματα για την καλλιέργεια των καρδιοσφαιρών και των προερχόμενων από τις καρδιοσφαίρες προγονικών καρδιακών κυττάρων. Η πρώτη φάση, η λήψη μυοκαρδιακού ιστού με βιοψία, (b) η ενδομυοκαρδιακή βιοψία την πρώτη μέρα, (c) τρεις μέρες μετά τη στρώση, (d) δεκατρείς ημέρες μετά, στο τέλος αυτής της φάσης, (e) σχηματισμός καρδιοσφαιρών από την καλλιέργεια μετά από τις δεκατρείς ημέρες αφού είχαν απομονωθεί και στρωθεί σε polyD-lysine για 2 μέρες, (f) πλήρως σχηματισμένες καρδιοσφαίρες την 25ή ημέρα και δώδεκα ημέρες μετά από τη συλλογή των πρώιμων καρδιοσφαιρών, (g) CDCs στη δεύτερη φάση στρωμένα πάνω σε φιμπρονεκτίνη για επέκταση. Η εικόνα αποτελεί μέρος της δημοσίευσης της Smith R, με τίτλο *Regenerative potential of Cardiosphere-Derived Cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens* Circulation 2007<sup>61</sup>

#### **4.2.3 Ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών CDCs - χρόνιο μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης**

Στην παρούσα πειραματική μελέτη σε χοίρους, εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης,  $5 \times 10^6$  αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων συγκριτικά με τη χορήγηση εικονικού διαλύματος, ως προς τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας αλλά και της μείωση της έκτασης του εμφράγματος καθώς και της διατήρησης της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας, μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Προκλήθηκε ισχαιμία με μηχανική απόφραξη του προσθίου κατιόντα. Τα κύτταρα χορηγήθηκαν κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, στα 60 λεπτά και η επαναιμάτωση επιτράπηκε με λύση της απόφραξης 5 λεπτά μετά την έγχυση των κυττάρων ή του εικονικού διαλύματος. Στη συνέχεια τα πειραματόζωα έμειναν υπό παρακολούθηση για 30 ημέρες.

Η ομάδα που έλαβε το εικονικό φάρμακο θα αποκαλείται ομάδα ελέγχου, ενώ η ομάδα που έλαβε τα κύτταρα θα αποκαλείται ομάδα κυττάρων. Το χρονοδιάγραμμα του πειράματος παρουσιάζεται στην εικόνα 11.

#### **A. Οξεία Φάση**

Πρόκληση ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και χορήγηση διαλύματος CDCs ή χορήγηση εικονικού διαλύματος.

Θηλυκοί και αρσενικοί χοίροι βάρους 30 - 35 kg υποβλήθηκαν σε εισαγωγή στην αναισθησία με ενδομυϊκή χορήγηση 15 mg/kg σωματικού βάρους κεταμίνης, 0,5 mg/kg σωματικού βάρους μιδαζολάμης και 1 mg ατροπίνης, τοποθετήθηκαν στο τραπέζι του αιμοδυναμικού εργαστηρίου και διασωληνώθηκαν. Διατήρηση της αναισθησίας κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας επιτυγχανόταν με χρήση πτητικού αναισθητικού (σεβοφλουράνιο 1,5 - 2%), ενώ παράλληλα τα πειραματόζωα ελάμβαναν στάγδην ενδοφλεβίως διάλυμα φεντανύλης για αναλγησία και διάλυμα σισατρακούριου για μυοχάλαση. Η θερμοκρασία των ζώων παρέμενε στους  $37 \pm 0.5$  βαθμούς κελσίου με

χρήση θερμαινόμενης κουβέρτας. Σε όλα τα πειραματόζωα πραγματοποιήθηκε υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη με διαθωρακικό υπέρηχο (Vivid i Cardiovascular ultrasound system, GE Healthcare). Κατά τη διάρκεια της υπερηχογραφικής μελέτης λαμβανόντουσαν τομές κατά το βραχύ άξονα στο επίπεδο της μιτροειδούς βαλβίδας, στο ύψος των θηλοειδών μυών και στην κορυφή. Κατόπιν στα πειραματόζωα γινόταν παρασκευή της αριστερής τραχηλικής χώρας, υπό άσηπτες συνθήκες, με σκοπό την αποκάλυψη της αριστερής έσω σφαγίτιδας για τοποθέτηση καθετήρα για μέτρηση κεντρικής φλεβικής πίεσης, αλλά και της αριστερής έξω καρωτίδας, στην οποία τοποθετούνταν θηκάρι 6F, δια μέσου του οποίου λαμβάνονταν αιμοδυναμικές παράμετροι. Κατά τη διάρκεια του πειράματος όλα τα πειραματόζωα βρισκόντουσαν υπό συνεχή ηλεκτροκαρδιογραφική παρακολούθηση, και ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν καταγραφή των αιμοδυναμικών παραμέτρων. Τα αιμοδυναμικά χαρακτηριστικά λαμβάνονταν για την εξασφάλιση της σταθερής κατάστασης των πειραματόζωων. Κατά τη διάρκεια του πειράματος τα πειραματόζωα λάμβαναν και ενδοφλέβια αμιωδαρόνη για περιορισμό των αρρυθμιολογικών συμβαμάτων.

Υπό τη βοήθεια της ακτινοσκόπησης και μέσω του θηκαριού της αρ. καρωτίδας γινόταν εισαγωγή σύρματος και στη συνέχεια Pigtail καθετήρας 6F στην αριστερή κοιλία, για διενέργεια κοιλιογραφίας. Με το πέρας της κοιλιογραφίας τοποθετούνταν Judkins καθετήρας 6F για τη σκιαγράφιση της δεξιάς και της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας. Σε όλα τα ζώα χορηγούνταν 1 ml ηπαρίνης, ενδοφλεβίως, για την ελαχιστοποίηση των θρομβώσεων. Εν συνεχεία γινόταν προώθηση σύρματος αγγειοπλαστικής στον πρόσθιο κατιών κλάδο της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας και μέσω αυτού προωθούνταν αεροθάλαμος αγγειοπλαστικής (over the wire balloon) κατάλληλου μεγέθους (2,5x12, 2,75x12, 3,00x12). Ο αεροθάλαμος φούσκωνε, αφού είχε προωθηθεί στην επιθυμητή θέση (μεταξύ της έκφυσης του πρώτου και δευτέρου διαγώνιου κλάδου), προκαλώντας με τον τρόπο αυτό απόφραξη του προσθίου κατιόντα και ισχαιμία διάρκειας 60 λεπτών. Στα 30 λεπτά ισχαιμίας πραγματοποιούταν σε κάθε πείραμα διαθωρακικό υπερηχογράφημα καρδιάς για μια αδρή εκτίμηση της έκτασης του εμφράγματος και της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας προκειμένου να τεκμηριώνεται η ισχαιμία της αριστερής κοιλίας και απεικονιστικά και να εξασφαλίζονται ίδιες συνθήκες για όλα τα πειραματόζωα. Στα 60 λεπτά ισχαιμίας γινόταν η ενδοστεφανιαία έγχυση, διαμέσου του αυλού του αεροθαλάμου, διαλύματος CDCs 5X10<sup>6</sup> ή εικονικού διαλύματος. Τα διαλύματα ήταν τελικού όγκου 5ml και περιείχαν επιπλέον 100 U/mL ηπαρίνης και 50 mg/mL

νιτρογλυκερίνης με σκοπό τον περιορισμό του σχηματισμού κυτταρικών συσσωματωμάτων και την απόφραξη της μικροκυκλοφορίας. Η έγχυση γινόταν γρήγορα μέσα σε 30 δευτερόλεπτα και ακολουθούσε ξέπλυμα του καθετήρα με χορήγηση διαλύματος PBS (phosphate buffered solution). Πέντε λεπτά μετά την έγχυση, ξεφούσκωνε ο αεροθάλαμος αποκαθιστώντας έτσι την επικαρδιακή ροή και γινόταν απόσυρση του.

Μόλις τα πειραματόζωα ήταν αιμοδυναμικά σταθερά και αφού είχαν περάσει τουλάχιστον 30 λεπτά, αφαιρούνταν το θηκάρι από την αριστερή καρωτίδα και την αριστερή έσω σφαγίτιδα και ακολουθούσε απολίνωση των αγγείων. Στη συνέχεια γινόταν σύγκλειση του τραύματος της αριστερής τραχηλικής χώρας. Τα πειραματόζωα αποδεσμεύονταν από τη μηχανική αναπνοή και ανένηπταν υπό παρακολούθηση.

## **B. Χρόνια Φάση**

Τα πειραματόζωα που επέζησαν της ισχαιμίας παρακολουθούνταν για ένα μήνα, ενώ ελάμβαναν παράλληλα από το στόμα αγωγή με 200mg αμιωδαρόνη ημερησίως, για την πρόληψη αρρυθμιών.

## **Γ. Ενδιάμεση αξιολόγηση**

Δεκαπέντε ημέρες μετά την πρόκληση του εμφράγματος και τη χορήγηση των κυττάρων ή του εικονικού διαλύματος όλα τα πειραματόζωα λάμβαναν αναισθησία εκ νέου με την ίδια διαδικασία της οξείας φάσης και υποβάλλονταν σε διαθωρακική υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη με διαθωρακικό υπέρηχο (Vivid i Cardiovascular ultrasound system, GE Healthcare). Λαμβάνοντας ακριβώς τις ίδιες τομές όπως και πριν την πρόκληση του εμφράγματος, δηλαδή τομές κατά το βραχύ άξονα στο επίπεδο της μιτροειδούς βαλβίδας, στο ύψος των θηλοειδών μυών και στο επίπεδο της κορυφής.

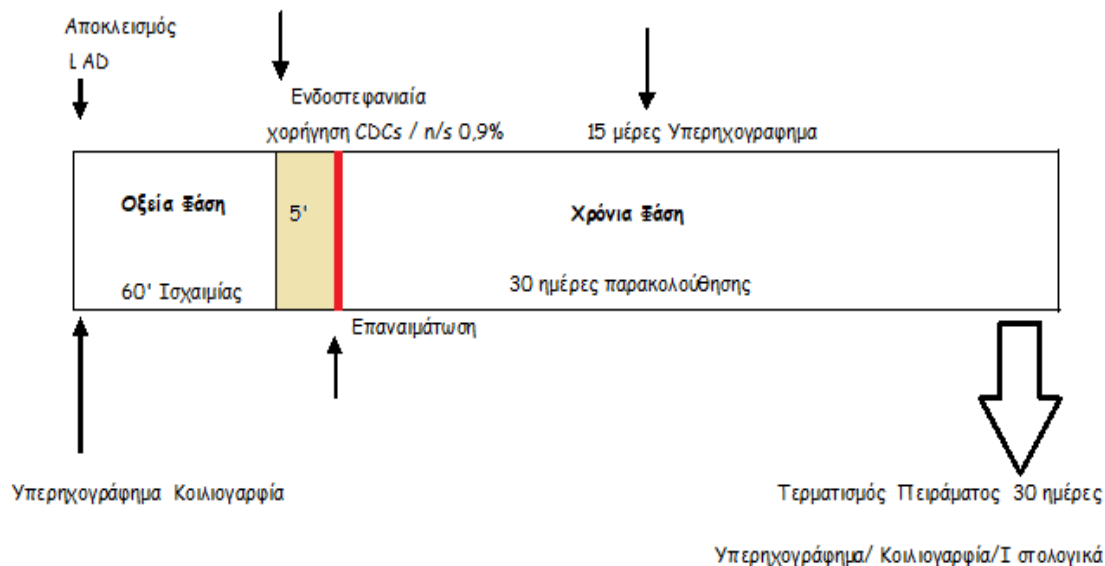


#### Δ. Τελική Αξιολόγηση

Ο τερματισμός του πειράματος γινόταν 30 ημέρες μετά την οξεία ισχαιμία. Όλα τα πειραματόζωα λάμβαναν για μια ακόμη φορά αναισθησία, με την ίδια ακριβώς διαδικασία όπως και στην οξεία φάση. Εισαγωγή και διατήρηση στην αναισθησία, (ενδομυϊκή χορήγηση 15 mg/kg σωματικού βάρους κεταμίνης, 0,5 mg/kg σωματικού βάρους μιδαζολάμης ακόμη 1 mg ατροπίνης, και για τη διατήρηση της αναισθησίας σεβοφλουράνιο 1,5-2 %), ενώ αναλγησία και μυοχάλαση επιτυγχανόταν με στάγδην ενδοφλέβια έγχυση, φεντανύλης και σισατρακούριου. Τα ζώα τοποθετούνταν ξανά στο τραπέζι του αιμοδυναμικού εργαστηρίου όπου και διασωληνώνονταν. Η θερμοκρασία των ζώων παρέμενε σταθερή κατά τη διάρκεια του πειράματος στους  $37 \pm 0.5$  βαθμούς Κελσίου με χρήση θερμαινόμενης κουβέρτας. Σε όλα τα ζώα γινόταν η τελική υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη με τον διαθωρακικό υπέρηχο, για την αξιολόγηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας. Στη συνέχεια γινόταν παρασκευή της δεξιάς τραχηλικής χώρας, για να αποκαλυφθούν η δεξιά έσω σφαγίτιδα και η δεξιά καρωτίδα. Στην δεξιά έσω σφαγίτιδα γινόταν τοποθέτηση καθετήρα κεντρικής φλεβικής γραμμής, και στη δεξιά καρωτίδα γινόταν τοποθέτηση θηκαριού 6F, για τη καταγραφή αιμοδυναμικών παραμέτρων. Κατόπιν τα ζώα υποβάλλονταν σε μέση στερνοτομή και γινόταν διατομή του περικαρδίου και αποκάλυψη της καρδιάς. Δια μέσω του θηκαριού της δεξιάς καρωτίδας, γινόταν προώθηση σύρματος καθώς και Pigtail καθετήρα 6F στην αριστερή κοιλία για τη διεξαγωγή κοιλιογραφίας. Υπό τη βοήθεια ακτινοσκόπησης, ακολουθούσε απολίνωση του προσθίου κατιόντα στο σημείο όπου είχε γίνει η απόφραξη με τον αεροθάλαμο κατά τη φάση της οξείας ισχαιμίας. Κατόπιν ενδοκοιλοτικά στην αριστερή κοιλία γινόταν έγχυση ιώδους της γεντιανής 0,3 mL/kg σωματικού βάρους 1% (Sigma-Aldrich) για τον καθορισμό της υπό κίνδυνο περιοχής και ακολουθούσε ευθανασία του ζώου με την πρόκληση κοιλιακής μαρμαρυγής με χρήση συνεχούς ρεύματος. Γινόταν απομόνωση της καρδιάς και εν συνεχεία της αριστερής κοιλίας από την υπόλοιπη καρδιά, η οποία και τεμαχιζόταν σε τομές πάχους 1 εκατοστού. Ζυγίζονταν το βάρος κάθε τομής. Οι τομές βυθίζονταν για τουλάχιστον 20 λεπτά σε διάλυμα χλωριούχου τετραζολίου 1% TTC (Sigma-Aldrich) σε σκοτεινό περιβάλλον προκειμένου να καθοριστεί η έκταση της ουλής. Με τη χρήση αυτής της χρώσης το

υγιές βιώσιμο μυοκάρδιο λαμβάνει ένα έντονο κόκκινο χρώμα ενώ η περιοχή της ουλής δεν προσλαμβάνει την χρώση και εμφανίζεται υπόλευκη<sup>8</sup>. Οι περιοχές αυτές φωτογραφίζονταν, πλανημετρούνταν και γινόταν επεξεργασία στο image J από ερευνητή που δεν γνώριζε την ομάδα στην οποία ανήκε το κάθε πειραματόζωο. Η έκταση του εμφράγματος εκφραζόταν σαν ποσοστό της υπό κίνδυνο περιοχής. Η παράμετρος αυτή συγκρίθηκε μεταξύ των ομάδων των πειραματοζώων. Τέλος, από κάθε τομή, λαμβάνονταν 3 βιοψίες για ιστολογική εκτίμηση. Μία βιοψία από την ουλή, άλλη μια βιοψία από τα όρια της εμφραχθείσας περιοχής και τέλος μια βιοψία της από την υγιή περιοχή. Τα δείγματα απ' τις βιοψίες άλλα και όλες οι υπόλοιπες τομές διατηρούνταν σε διάλυμα φορμόλης 10%. Με την ιστολογική εξέταση εξετάστηκαν : α) η φλεγμονώδης διήθηση β) η υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων (χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης) και γ) η εμφάνιση ίνωσης (τρίχρωμη χρώση Masson). Δείγματα για ιστολογική εξέταση ελήφθησαν από την περιοχή της ουλής, από την περιοχή στα όρια της ουλής και από την απομακρυσμένη περιοχή.

## Πειραματική διαδικασία



Εικόνα 11, Η πειραματική διαδικασία

Σε όλα τα πειράματα ακολουθήθηκαν ακριβώς οι ίδιες διαδικασίες όπως περιγράφονται αναλυτικά ωρύτερα. Όλα τα ζώα ζυγίζονταν πριν την έναρξη του πειράματος. Πριν την πρόκληση του εμφράγματος και στη συνέχεια κάθε δεκαπέντε λεπτά, τόσο κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας όσο και κατά τη διάρκεια της επαναιμάτωσης, γινόταν καταγραφή αιματηρής αρτηριακής πίεσης όπως και καταγραφή της κεντρικής φλεβικής πίεσης.

Σε πίνακες τα στοιχεία της ομάδας ελέγχου πριν την πρόκληση εμφράγματος και στις 30 ημέρες. ΒΣ= σωματικό βάρος, ΑΡ= αρτηριακή πίεση, CVP= κεντρική φλεβική πίεση

ΟΜΑΔΑ	ΒΣ 0D	ΑΡ 0	CVP 0
Ελέγχου 1	33.100kg	105/55	3
Ελέγχου 2	36.5 kg	123/93	7
Ελέγχου 3	32.3kg	107/62	9
Ελέγχου 4	30.7kg	85/65	9
Ελέγχου 5	31.5kg	95/66	9
Ελέγχου 6	24.8kg	116/65	6

ΟΜΑΔΑ	ΒΣ 30D	ΑΡ30D	CVP 30D
Ελέγχου 1	47.5kg	124/89	9
Ελέγχου 2	51kg	110/55	10
Ελέγχου 3	41.5kg	112/83	4
Ελέγχου 4	54kg	115.75	10
Ελέγχου 5	54.5kg	140/108	5
Ελέγχου 6	38kg	110/80	4

Σε πίνακες τα στοιχεία της ομάδας Κυττάρων πριν την πρόκληση εμφράγματος και στις 30 ημέρες. ΒΣ= σωματικό βάρος, ΑΡ= αρτηριακή πίεση, CVP= κεντρική φλεβική πίεση

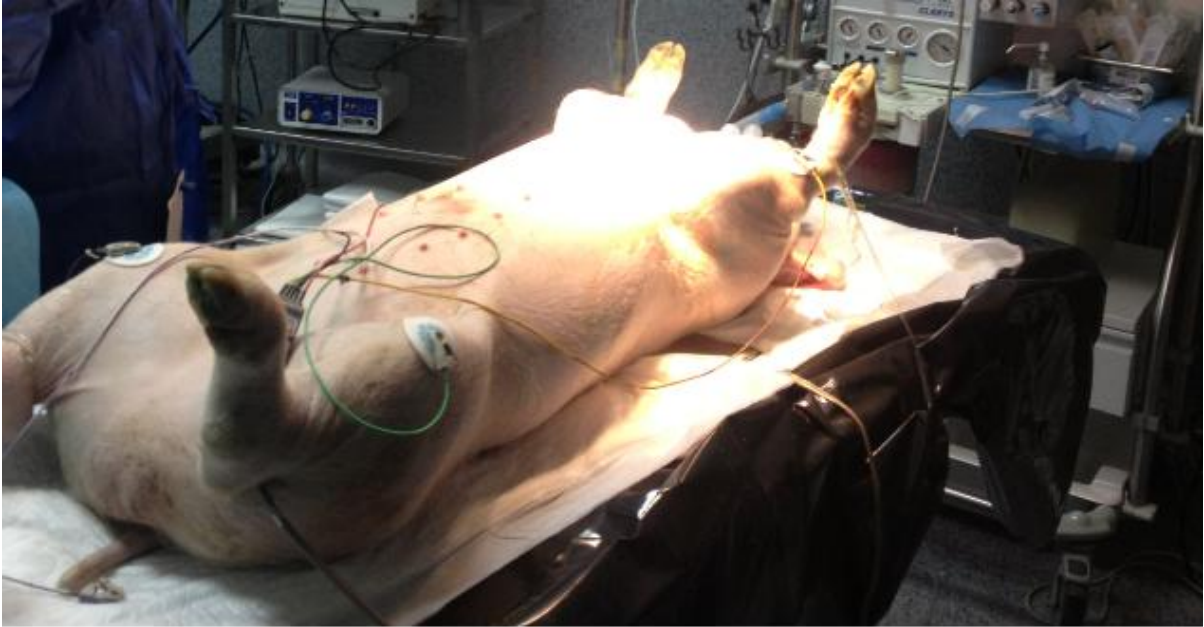
ΟΜΑΔΑ	ΒΣ Β	ΑΡ Β	CVP Β
Κυττάρων 1	31	87/57	6
Κυττάρων 2	40kg	91/57	10
Κυττάρων 3	36kg	108/82	7
Κυττάρων 4	36.4kg	96/76	9
Κυττάρων 5	33kg	93/59	10
Κυττάρων 6	31kg	101/67	7

ΟΜΑΔΑ	ΒΣ 30	ΑΡ 30	CVP 30
Κυττάρων 1	45kg	106/91	4
Κυττάρων 2	56kg	100/61	13
Κυττάρων 3	49kg	95/85	6
Κυττάρων 4	51kg	97/55	6
Κυττάρων 5	48kg	93/68	3
Κυττάρων 6	54.7kg	105/65	4

### 4.3 Φωτογραφικό υλικό από διαδικασίες του πειράματος



Εικόνα 12, Η οθόνη καταγραφής των αιμοδυναμικών παραμέτρων

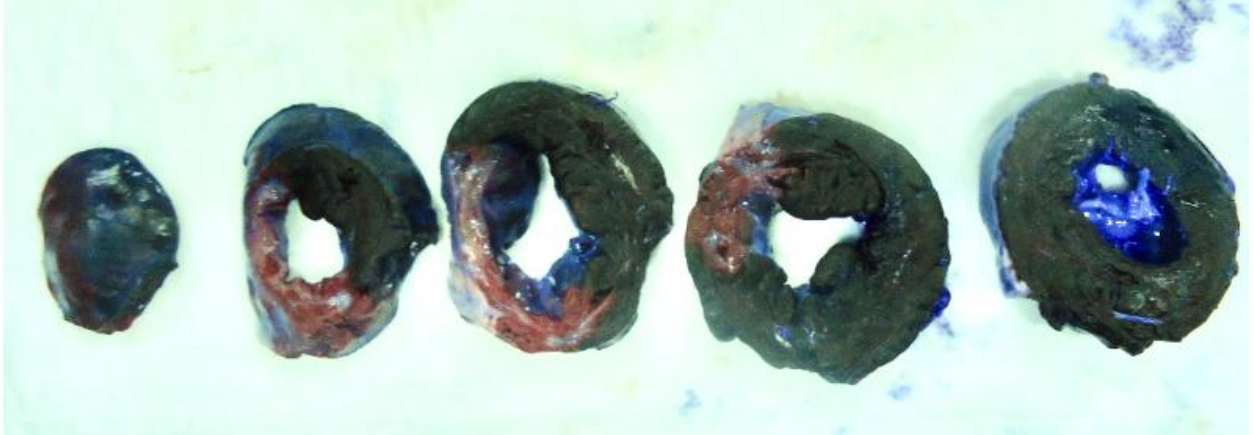


Εικόνα 13, Η αρχική προετοιμασία του ζώου και η εισαγωγή στην αναισθησία προκειμένου να αρχίσουν οι υπόλοιπες πειραματικές διαδικασίες.

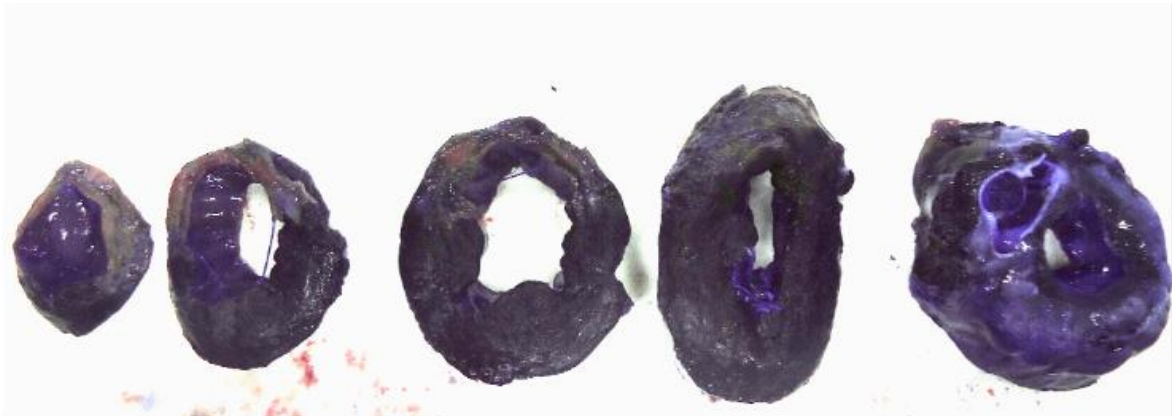


Εικόνα 14, Ο χώρος του αιμοδυναμικού εργαστηρίου όπου υπό άσηπτες συνθήκες πραγματοποιούνταν οι πειραματικές διαδικασίες. Απεικονίζονται, το ακτινοσκοπικό μηχάνημα οι οθόνες του ακτινοσκοπικού μηχανήματος, η οθόνη καταγραφής και το πειραματόζωο διασωληνωμένο υπό γενική αναισθησία κατά τη διάρκεια πειράματος.





Εικόνα 15, Την ημέρα τελικής αξιολόγησης μετά την ευθανασία και αφού είχε απομονωθεί η αριστερή κοιλία και είχε κοπεί σε τομές. Με τη χρήση της χρώσης ιώδους της γεντιάνης για τον προσδιορισμό της υποκίνδυνο περιοχής. Οι τομές είχαν βυθιστεί για τουλάχιστον 20 λεπτά σε διάλυμα χλωριούχου τετραζολίου. Το κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στο βιώσιμο μυοκάρδιο. Στη συνέχεια γινόταν πλανημέτρηση και καθοριζόταν η έκταση του εμφράγματος. Η εικόνα ανήκει στην ομάδα που έλαβε κύτταρα



Εικόνα 16, Αντίστοιχη εικόνα με την εικόνα 15 για την ομάδα ελέγχου.

## **5. Αποτελέσματα**

Η στατιστική ανάλυση έγινε με Mann-Whitney U test για τη σύγκριση μεταξύ δύο ανεξάρτητων ομάδων και με Wilcoxon signed-rank test για τη σύγκριση αλλαγών μέσα στην ίδια ομάδα. Όλες οι μετρήσεις εκφράστηκαν σαν μέση τιμή  $\pm$  σταθερή απόκλιση. Στατιστικά σημαντικές θεωρούνται οι διαφορές με P value < 0.05.

Όλες οι αναλύσεις έγιναν από ανεξάρτητο ερευνητή που δεν γνώριζε την ομάδα τυχαιοποίησης των πειραματοζώων.

### **5.1 Θνησιμότητα και ανεπιθύμητα γεγονότα**

Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν για την ολοκλήρωση του πρωτοκόλλου 18 πειραματόζωα (αρσενικοί και θηλυκοί χοίροι).

Από τα 18 αυτά πειραματόζωα: ένα από τα ζώα της ομάδας ελέγχου κατέληξε την ημέρα αξιολόγησης κατά τη διάρκεια υπερήχου μετά από κοιλιακή μαρμαρυγή ενώ ένα ζώο κατέληξε κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας πριν γίνει η τυχαιοποίηση. Τέσσερα ζώα κατέληξαν κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης (CDC n=1 και ομάδα ελέγχου n=3). Έτσι συνολικά από τα δεκαοκτώ πειραματόζωα αξιολογήσιμα κρίθηκαν δώδεκα, έξι από κάθε ομάδα.

Παρόλο που η χορήγηση των κυττάρων συνέβη κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας δεν παρατηρήθηκαν διαφορές σε αρρυθμιολογικά γεγονότα μεταξύ των δύο ομάδων. Κατά τη διάρκεια της παρακολούθησης των 30 ημερών, δεν υπήρξαν διαφορές σε μείζονα γεγονότα μεταξύ των δύο ομάδων. Η χορήγηση των κυττάρων δεν συνδυάστηκε με περισσότερες επιπλοκές.



## 5.2 Υπερηχογραφικά δεδομένα

Όλα τα ζώα υποβλήθηκαν σε διαθωρακική υπερηχογραφική μελέτη καρδιάς πριν την πρόκληση εμφράγματος, όπως και 15 ημέρες μετά, αλλά και κατά την τελική αξιολόγηση στις 30 ημέρες μετά την οξεία ισχαιμία. Οι τομές που λαμβάνονταν ήταν κατά το βραχύ άξονα της αριστερής κοιλίας, στο επίπεδο της μιτροειδούς βαλβίδας, στο επίπεδο των θηλοειδών μυών και στο επίπεδο της κορυφής. Οι μετρήσεις έγιναν από ερευνητή που δεν γνώριζε την ομάδα στην οποία ανήκε το κάθε πειραματόζωο.

Εκτιμήθηκε η συστολική λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας αλλά και η τμηματική συσπαστικότητα καθώς και η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας (ομάδα ελέγχου n=6 και ομάδα CDC n=6). Υπολογίστηκαν για τους λόγους αυτούς το κλάσμα εξωθήσεως (LVEF), όπως και η συστολική πάχυνση του προσθίου διαφραγματικού τοιχώματος, αλλά και οι διαστάσεις και οι όγκοι της αριστερής κοιλίας στην τελουστολή και την τελοδιαστολή. (Εικόνες 17-19)

### 5.2.1 Διαστάσεις και όγκοι αριστερής κοιλίας

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον πίνακα 1.

ΟΜΑΔΑ	LVEDD BL	LVEDV BL	LVESD BL	LVESV BL
Ελέγχου 1	31	36	20	13
Ελέγχου 2	31	39	23	21
Ελέγχου 3	34	46	23	18
Ελέγχου 4	40	70	25	24
Ελέγχου 5	32	42	23	18
Ελέγχου 6	29	32	20	13
Κυττάρων 1	42	80	24	20
Κυττάρων 2	38	63	25	21
Κυττάρων 3	38	61	23	21
Κυττάρων 4	35	52	20	12
Κυττάρων 5	33	43	21	15
Κυττάρων 6	31	38	21	15

Πίνακας 1, Υπερηχογραφικά δεδομένα πριν την πρόκληση εμφράγματος. LVEDD είναι η τελοδιαστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας, LVEDV είναι ο τελοδιαστολικός όγκος της αριστερής κοιλίας, LVESD είναι η τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας, LVESV είναι ο τελοσυστολικός όγκος της αριστερής κοιλίας. Οι διαστάσεις είναι μετρημένες σε mm και οι όγκοι σε ml.

<b>ΟΜΑΔΑ</b>	<b>LVEDD 15D</b>	<b>LVEDV 15D</b>	<b>LVESD 15D</b>	<b>LVESV 15D</b>
<b>Ελέγχου 1</b>	38	65	25	26
<b>Ελέγχου 2</b>	37	57	31	37
<b>Ελέγχου 3</b>	37	58	27	27
<b>Ελέγχου 4</b>				
<b>Ελέγχου 5</b>	39	66	30	36
<b>Ελέγχου 6</b>				
<b>Κυτάρων 1</b>	42	80	29	32
<b>Κυτάρων 2</b>	43	82	30	35
<b>Κυτάρων 3</b>	42	77	28	29
<b>Κυτάρων 4</b>	46	97	42	77
<b>Κυτάρων 5</b>	46	98	32	40
<b>Κυτάρων 6</b>	33	44	24	20

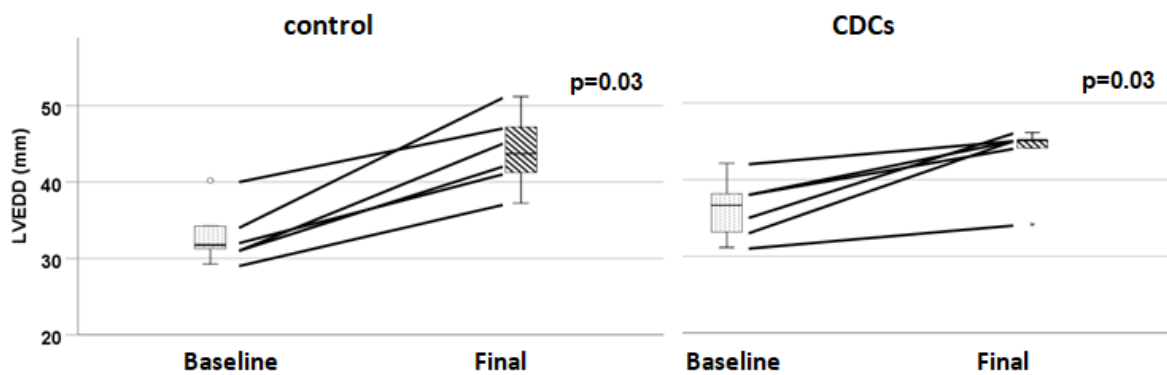
Πίνακας 2, Υπερηχογραφικά δεδομένα ενδιάμεσης αξιολόγησης 15 ημερών.

ΟΜΑΔΑ	LVEDD 30D	LVEDV 30D	LVESD 30D	LVESV 30D
Ελέγχου 1	42	78	32	40
Ελέγχου 2	45	94	34	48
Ελέγχου 3	51	122	35	49
Ελέγχου 4	47	104	37	60
Ελέγχου 5	41	75	32	40
Ελέγχου 6	37	74	26	23
Κυττάρων 1	45	94	24	19
Κυττάρων 2	45	94	33	43
Κυττάρων 3	44	89	28	29
Κυττάρων 4	46	95	36	57
Κυττάρων 5	45	92	37	59
Κυττάρων 6	34	47	21	14

Πίνακας 3, Υπερηχογραφικά δεδομένα τελικής αξιολόγησης 30 ημερών

Για την ομάδα που έλαβε τα κύτταρα, η τελοδιαστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας (LVEDD) παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση τόσο στις 15 όσο και στις 30 ημέρες. Η LVEDD αρχικά πριν την πρόκληση του εμφράγματος ήταν LVEDD:  $36.17 \pm 4 \text{mm}$ , έπειτα στις 15 μέρες ήταν  $42.8 \pm 4.8 \text{mm}$  και τελικά στις 30 ημέρες ήταν  $43.17 \pm 4.5 \text{mm}$   $P=0.04$  και  $P=0.03$  αντίστοιχα. (Γράφημα 1)

Για την ομάδα ελέγχου, η τελοδιαστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας δεν αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά στις 15 μέρες αλλά στις 30. Η LVEDD αρχικά πριν την πρόκληση του εμφράγματος ήταν  $32.8 \pm 3.9 \text{ mm}$ , έπειτα στις 15 μέρες  $37.8 \pm 1 \text{ mm}$  και τελικά στις 30 ημέρες  $43.8 \pm 4.5 \text{ mm}$   $P=0.07$  και  $P=0.03$  αντίστοιχα. (Γράφημα 1)

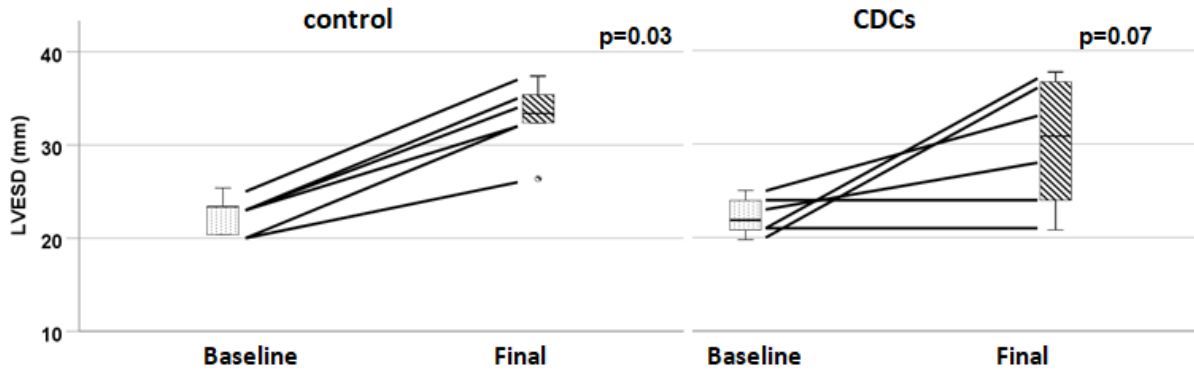


Γράφημα 1, Η μεταβολή της LVEDD της αριστερής κοιλίας την τελική ημέρα αξιολόγησης, ήταν στατιστικά σημαντική και για τις δύο ομάδες. Αριστερά είναι η ομάδα ελέγχου (control) και δεξιά η ομάδα κυττάρων (CDCs). Baseline: πριν την πρόκληση εμφράγματος και Final: τελική αξιολόγηση.

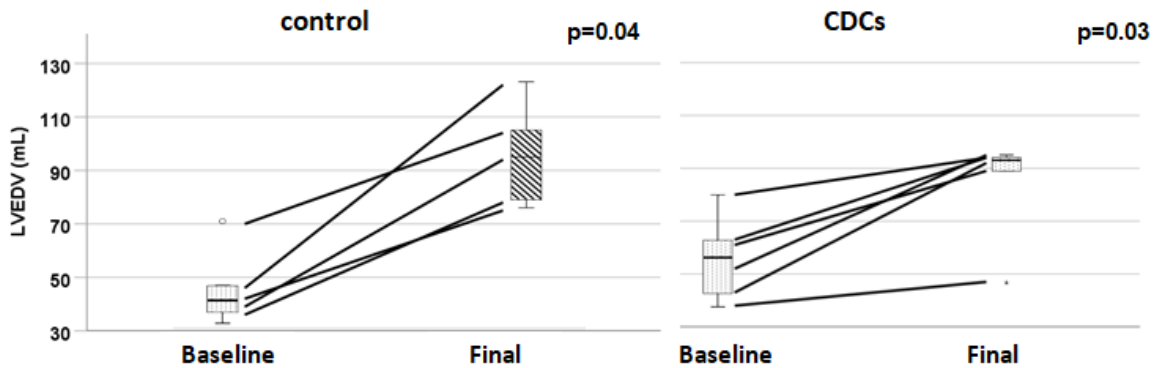
Η ομάδα ελέγχου, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση στην τελοσυστολική διάμετρο της αριστερής κοιλίας (LVESD) και στον τελοδιαστολικό όγκο της αριστερής κοιλίας (LVEDV) στις 30 ημέρες. Η LVESD αρχικά ήταν  $22.3 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$  και ο LVEDV αρχικά ήταν  $44.17 \text{ ml} \pm 13.5 \text{ ml}$ . Στις 30 ημέρες η LVESD έφτασε  $32.7 \pm 3.8 \text{ mm}$  με  $P=0.03$  και ο LVEDV έφτασε  $94.6 \pm 19.3 \text{ ml}$  με  $P=0.043$ . (Γραφήματα 2 και 3).

Η ομάδα κυττάρων, παρουσίασε επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση στον τελοδιαστολικό όγκο της αριστερής κοιλίας. Η αύξηση όμως για την τελοσυστολική διάμετρο της αριστερής κοιλίας δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Ο LVEDV από  $56.17 \pm$

15.2 ml έφτασε στις 30 ημέρες στα  $85.17 \pm 19.3$  ml με  $P=0.04$ . Η LVEDD ήταν  $22.3\text{mm} \pm 2\text{mm}$  και έφτασε στις 30 ημέρες  $29.8 \pm 6.6\text{mm}$  με  $P=0.07$  (Γραφήματα 2 και 3).



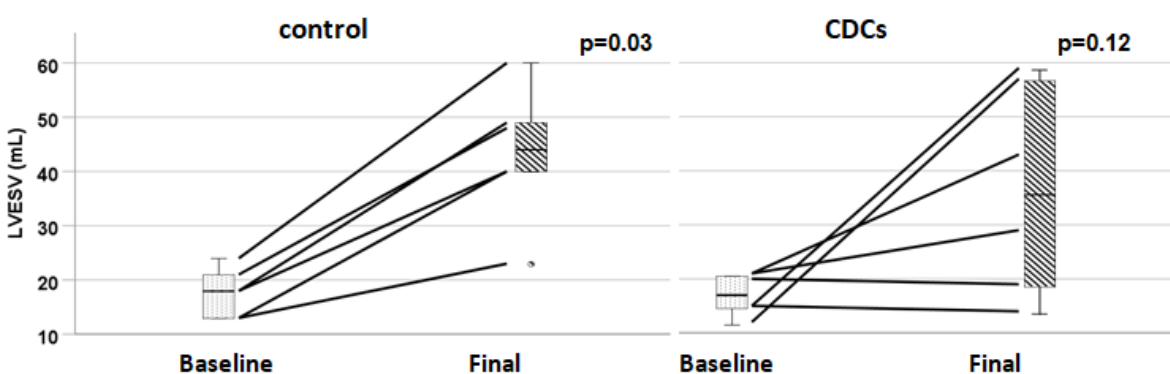
Γράφημα 2, Η μεταβολή της τελοσυστολικής διαμέτρου της αριστερής κοιλίας την τελική ημέρα αξιολόγησης ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για την ομάδα ελέγχου. Αριστερά είναι η ομάδα ελέγχου (control) και δεξιά η ομάδα κυττάρων (CDCs). Baseline: πριν την πρόκληση εμφράγματος και Final: τελική αξιολόγηση.



Γράφημα 3, Η μεταβολή του τελοδιαστολικού όγκου της αριστερής κοιλίας την τελική ημέρα αξιολόγησης ήταν στατιστικά σημαντική και για τις δύο ομάδες. Αριστερά είναι η ομάδα ελέγχου (control) και δεξιά η ομάδα κυττάρων (CDCs). Baseline: πριν την πρόκληση εμφράγματος και Final: τελική αξιολόγηση.

Για την ομάδα ελέγχου η μεταβολή του τελοσυστολικού όγκου της αριστερής κοιλίας (LVESV) ήταν στατιστικά σημαντική στις 30 ημέρες. Αρχικά ο LVESV ήταν  $17.8 \pm 4.3$  ml και στις 30 ημέρες ήταν  $43.3 \pm 12.4$  ml με  $P= 0.03$ .

Για την ομάδα κυττάρων, η μεταβολή του LVESV στις 30 ημέρες δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Αρχικά ο LVESV ήταν  $17.3 \pm 3.8$  ml και στις 30 ημέρες έφτασε  $36.8 \text{ ml} \pm 19.2 \text{ ml}$  με  $P=0.12$ . (Γράφημα 4)



Γράφημα 4, Η μεταβολή του LVESV της αριστερής κοιλίας την τελική ημέρα αξιολόγησης ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για την ομάδα ελέγχου. Αριστερά είναι η ομάδα ελέγχου (control) και δεξιά η ομάδα κυττάρων (CDCs). Baseline: πριν την πρόκληση εμφράγματος και Final: τελική αξιολόγηση.

## 5.2.2 Λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας

### A. Κλάσμα εξωθήσεως αριστερής κοιλίας

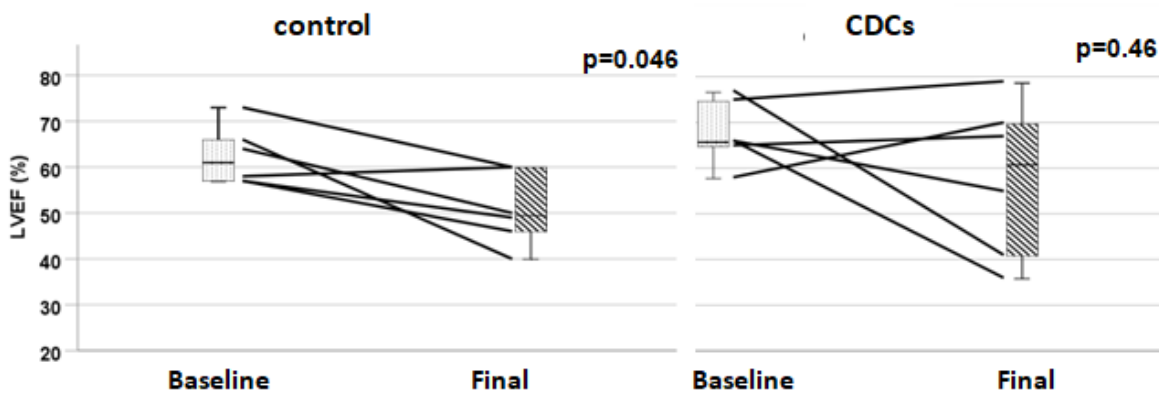
ΟΜΑΔΑ	EF BL	FS BL	EF 15D	FS 15D	EF 30D	FS 30D
Ελέγχου 1	64	34	60	32	50	24
Ελέγχου 2	57	23	36	17	49	25
Ελέγχου 3	73	35	61	27	60	32
Ελέγχου 4	66	36			40	20
Ελέγχου 5	57	29	46	23	46	22
Ελέγχου 6	58	29			60	
Κυτάρων 1	75	44	60	32	79	48
Κυτάρων 2	66	36	57	30	55	28
Κυτάρων 3	65	35	63	34	67	37
Κυτάρων 4	77	45	21	10	41	20
Κυτάρων 5	66	35	58	31	36	17
Κυτάρων 6	58	29	54	27	70	38

Πίνακας 6, Υπερηχογραφικά δεδομένα πριν την πρόκληση εμφράγματος, στις 15 ημέρες και στις 30 ημέρες. EF το κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας και FS η συστολική βράχυνση της αριστερής κοιλίας. Το κλάσμα εξωθήσεως και η βράχυνση είναι εκφρασμένα σε ποσοστά επί τις εκατό.



Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε στατιστικά σημαντική έκπτωση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας (LVEF) στις 30 ημέρες ενώ η μείωση δεν ήταν στατιστικά σημαντική στις 15 μέρες (LVEF:  $50.8 \pm 8\%$  στις 30 ημέρες,  $50.7 \pm 12\%$  στις 15 μέρες από  $62.5 \pm 6.4\%$  που ήταν αρχικά με  $p=0.068$  και  $p=0.046$  αντίστοιχα).

Αντίθετα η ομάδα των κυττάρων ενώ παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση του κλάσματος εξωθήσεως στις 15 μέρες, στις 30 ημέρες η ομάδα των κυττάρων πλέον διατηρούσε το κλάσμα εξωθήσεως (LVEF:  $58 \pm 17\%$  στις 30 ημέρες,  $52.1 \pm 15\%$  στις 15 μέρες από  $67.9 \pm 7\%$  που ήταν αρχικά με  $p=0.028$  και  $p=0.12$  αντίστοιχα). (Γράφημα 5).



Γράφημα 5, Η μείωση του LVEF στις 30 ημέρες. Ενώ για την ομάδα ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντική δεν ήταν στατιστικά σημαντική για την ομάδα κυττάρων. Αριστερά είναι η ομάδα ελέγχου (control) και δεξιά η ομάδα κυττάρων (CDCs). Baseline: πριν την πρόκληση εμφράγματος και Final: τελική αξιολόγηση.

Η σύγκριση μεταξύ των ομάδων για τις διαμέτρους, τους όγκους αλλά και το κλάσμα εξωθήσεως δεν ανέδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές. Παρόλα αυτά στις 30 ημέρες η τελοσυστολική διάμετρος της αριστερής κοιλίας και ο τελοσυστολικός όγκος της

αριστερής κοιλίας ήταν χαμηλότερες ως απόλυτες τιμές για την ομάδα των κυττάρων. Επίσης στις 30 ημέρες το κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας ήταν αριθμητικά υψηλότερο στην ομάδα των κυττάρων.

## B. Τμηματική συστολική λειτουργικότητα

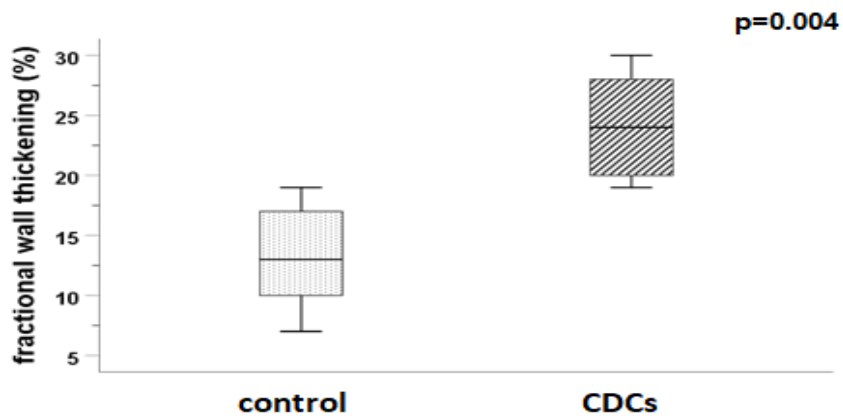
Όσο αφορά την τμηματική συσπαστικότητα της αριστερής κοιλίας, στις 30 ημέρες η ομάδα των κυττάρων παρουσίασε αύξηση της τοιχωματικής πάχυνσης του πρόσθιοδιαφραγματικού τοιχώματος ( $24.2 \pm 4.3\%$ ) συγκριτικά με την ομάδα που δεν έλαβε κύτταρα ( $13.2 \pm 4.6\%$   $p=0,04$ ).

ΟΜΑΔΑ	IVS D BL mm	IVS S BL mm	IVS FR BLmm	ANTIVS D BL mm	ANTIVS S BLmm	ANTIVS FR BL mm	ANT D BL mm	ANT S BL mm	ANT FR BL
Ελέγχου 1	88	149	0.69	76	122	0.61	106	162	0.53
Ελέγχου 2	71	121	0.7	67	100	0.49	98	149	0.52
Ελέγχου 3	96	152	0.58	86	129	0.5	106	166	0.57
Ελέγχου 4	57	98	0.72	59	92	0.56	72	117	0.63
Ελέγχου 5	65	106	0.63	58	93	0.6	90	141	0.57
Ελέγχου 6	78	134	0.72	69	106	0.54	88	142	0.61
Κυττάρων 1	71	112	0.58	55	85	0.55	115	180	0.57
Κυττάρων 2	79	131	0.66	74	114	0.54	113	185	0.64
Κυττάρων 3	68	109	0.6	65	105	0.62	102	164	0.61
Κυττάρων 4	65	102	0.57	59	99	0.68	66	104	0.58
Κυττάρων 5	87	149	0.71	72	115	0.6	92	143	0.55
Κυττάρων 6	57	93	0.63	47	75	0.6	84	128	0.52

Πίνακας 4, Υπερηχογραφικά δεδομένα αρχικής αξιολόγησης πριν την πρόκληση εμφράγματος. S: συστολή, D: διαστολή, FR: κλάσμα πάχυνσης. IVS: μεσοκοιλιακό τοίχωμα, ANTIVS: πρόσθιο μεσοκοιλιακό τοίχωμα, ANT: πρόσθιο τοίχωμα

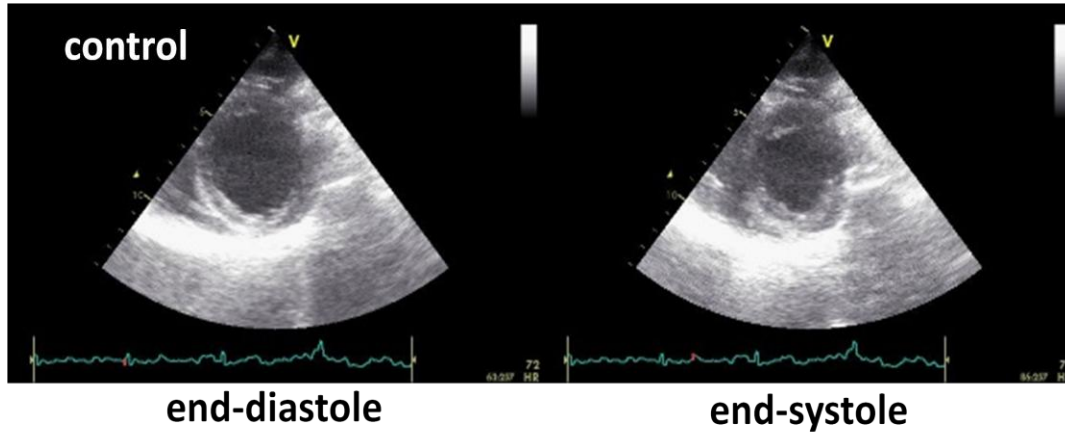
ΟΜΑΔΑ	IVS D 30D mm	IVS S 30D mm	IVS FR 30D mm	ANTIVS D 30D mm	ANTIVS S 30D mm	ANTIVS FR 30D	ANT D 30D mm	ANT S 30Dmm	ANT FR 30D
<b>Ελέγχου 1</b>	76	84	11	64	74	0.16	102	137	0.34
<b>Ελέγχου 2</b>	64	75	17	49	55	0.12	93	128	0.38
<b>Ελέγχου 3</b>	64	76	19	63	73	0.16	90	123	0.37
<b>Ελέγχου 4</b>	93	102	10	85	97	0.14	86	121	0.41
<b>Ελέγχου 5</b>	78	90	15	78	90	0.15	127	164	0.29
<b>Ελέγχου 6</b>	67	72	7	50	58	0.16	79	114	0.44
<b>Κυτάρων 1</b>	64	82	28	49	59	0.2	106	150	0.42
<b>Κυτάρων 2</b>	100	119	19	83	102	0.23	93	128	0.38
<b>Κυτάρων 3</b>	101	121	20	92	101	0.1	82	108	0.32
<b>Κυτάρων 4</b>	73	90	23	86	103	0.2	112	150	0.34
<b>Κυτάρων 5</b>	64	80	25	90	105	0.17	98	127	0.3
<b>Κυτάρων 6</b>	64	83	30	97	130	0.34	144	182	0.26

Πίνακας 5, Υπερηχογραφικά δεδομένα τελικής αξιολόγησης 30 ημερών.

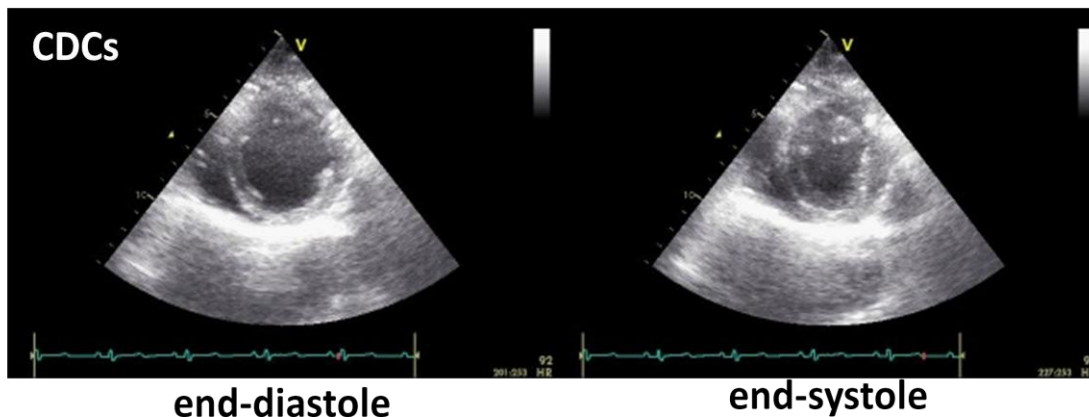


Γράφημα 6, Η τμηματική συσπαστικότητα, κλασματική πάχυνση προσθίου τοιχώματος, η ομάδα των κυττάρων παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση της τοιχωματικής πάχυνσης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αριστερά είναι η ομάδα ελέγχου (control) και δεξιά η ομάδα κυττάρων (CDCs). Baseline: πριν την πρόκληση εμφράγματος και Final: τελική αξιολόγηση.

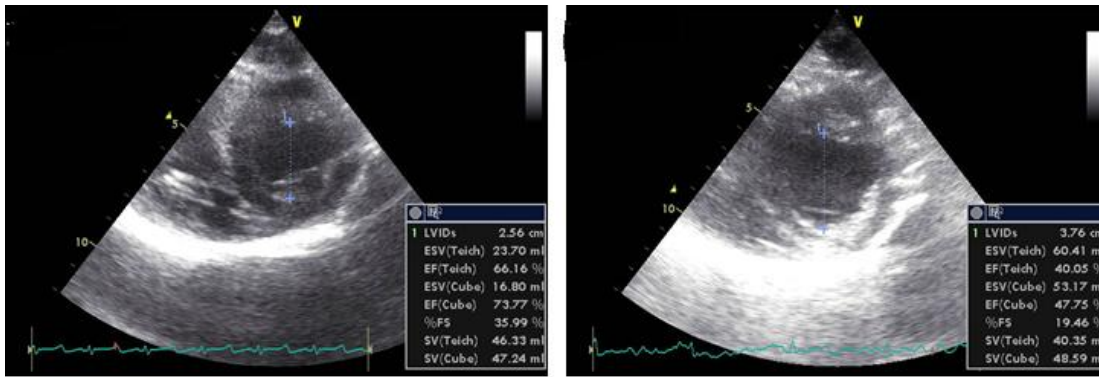
#### 5.2.4 Εικόνες από τις υπερηχογραφικές μελέτες.



Εικόνα 17, Η εικόνα αυτή ανήκει σε πειραματόζωο της ομάδας ελέγχου, από την υπερηχογραφική μελέτη κατά την τελική αξιολόγηση στις 30 ημέρες. Εικόνα κατά το βραχύ άξονα της αριστερής κοιλίας, στη μεσότητα στο επίπεδο των θηλοειδών μυών. Απεικονίζεται η αριστερή κοιλία κατά την τελοδιαστολική και την τελοσυστολική φάση αριστερά και δεξιά αντίστοιχα.

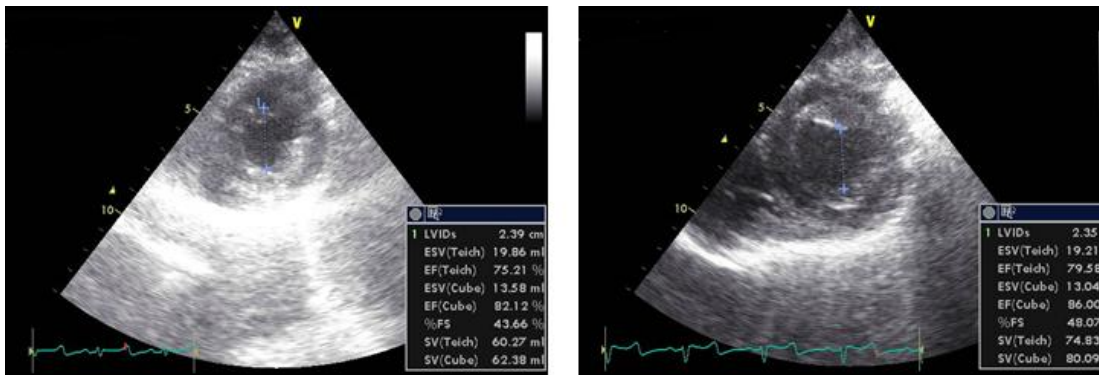


Εικόνα 18, Η εικόνα αυτή ανήκει σε πειραματόζωο της ομάδας κυττάρων από την υπερηχογραφική μελέτη κατά την τελική αξιολόγηση στις 30 ημέρες. Εικόνα κατά το βραχύ άξονα της αριστερής κοιλίας, στη μεσότητα στο επίπεδο των θηλοειδών μυών. Απεικονίζεται η αριστερή κοιλία κατά την τελοδιαστολική και την τελοσυστολική φάση αριστερά και δεξιά αντίστοιχα.



**Control Baseline**

**Control 30 Days Post AMI**



**CDCs Baseline**

**CDCs 30 Days Post AMI**

Εικόνα 19, Στις δύο επάνω εικόνες απεικονίζονται οι μετρήσεις κατά τη συστολική και τη διαστολική φάση σε πειραματόζωο της ομάδας ελέγχου, αριστερά πριν την πρόκληση εμφράγματος και δεξιά 30 ημέρες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στις δύο κάτω εικόνες απεικονίζονται οι μετρήσεις κατά τη συστολική και τη διαστολική φάση σε πειραματόζωο της ομάδας των κυττάρων, αριστερά πριν την πρόκληση εμφράγματος και δεξιά 30 ημέρες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

### 5.3 Εκτίμηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας - Κοιλιογραφία

Τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε κοιλιογραφία της αριστερής κοιλίας πριν την πρόκληση του εμφράγματος και στις 30 ημέρες μετά την ισχαιμία στο τέλος της παρακολούθησης. Η εκτίμηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας έγινε υπολογίζοντας το κλάσμα εξώθησης με βάση τη μέθοδο της επιφάνειας και χρησιμοποιώντας το Image J. (Εικόνες 20 -23)<sup>93</sup>

Όλες οι μετρήσεις βρίσκονται στον πίνακα 7.

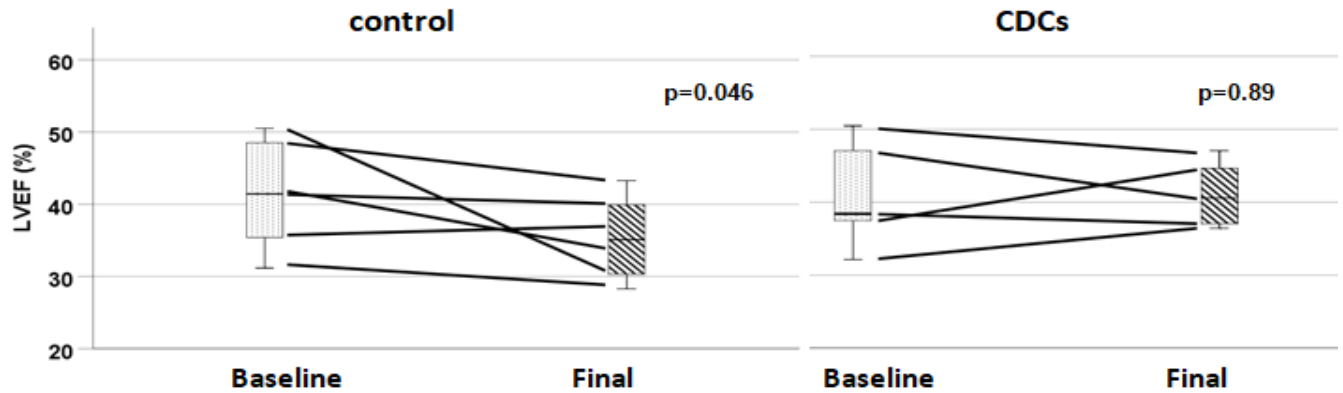
ΟΜΑΔΑ	EF LVG BL	EF LVG 30
Ελέγχου 1	48.44	43.35
Ελέγχου 2	31.64	28.84
Ελέγχου 3	35.74	36.93
Ελέγχου 4	41.79	33.9
Ελέγχου 5	41.33	40.1
Ελέγχου 6	50.35	30.8
Κυττάρων 1	32.25	36.43
Κυττάρων 2	46.76	40.47
Κυττάρων 3	37.46	44.44
Κυττάρων 4	53.27	
Κυττάρων 5	50.07	46.76
Κυττάρων 6	38.36	37.06

Πίνακας 7, Κλάσμα εξωθήσεως (EF) από την κοιλιογραφία

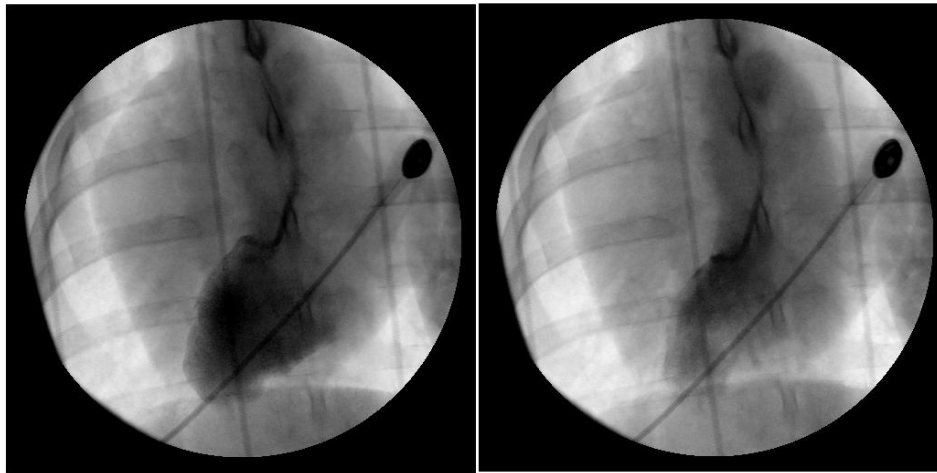
Δεν υπήρχε διαφορά στο υπολογιζόμενο κλάσμα εξώθησεως (EF) ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου (n=6) αλλά ούτε και στην ομάδα που έλαβε τα κύτταρα (n=5) τόσο πριν την ισχαιμία όσο και στις 30 ημέρες. Η ομάδα ελέγχου παρουσίασε σημαντική πτώση στο κλάσμα εξωθήσεως στις 30 ημέρες. Πριν την πρόκληση του εμφράγματος το κλάσμα



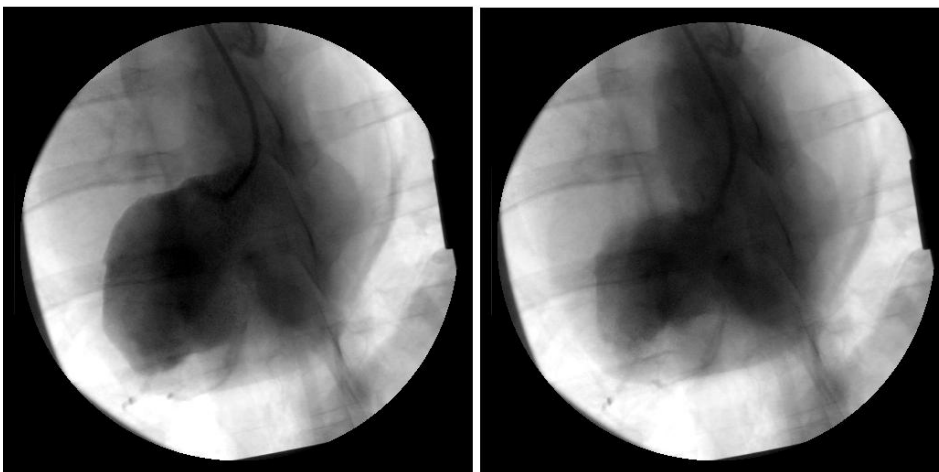
εξωθήσεως EF ήταν  $41.5 \pm 7.2\%$ , και στις 30 ημέρες το κλάσμα εξωθήσεως ήταν EF:  $35.7 \pm 5.5\%$  με  $P=0,046$ . Αντίθετα τα πειραματόζωα που έλαβαν κύτταρα διατήρησαν το κλάσμα εξωθήσεως. Πριν την πρόκληση εμφράγματος το EF ήταν  $43 \pm 8.2\%$  και 30 ημέρες μετά το EF ήταν  $41 \pm 4.5 \%$  με  $P=0.89$ . (Γράφημα 7)



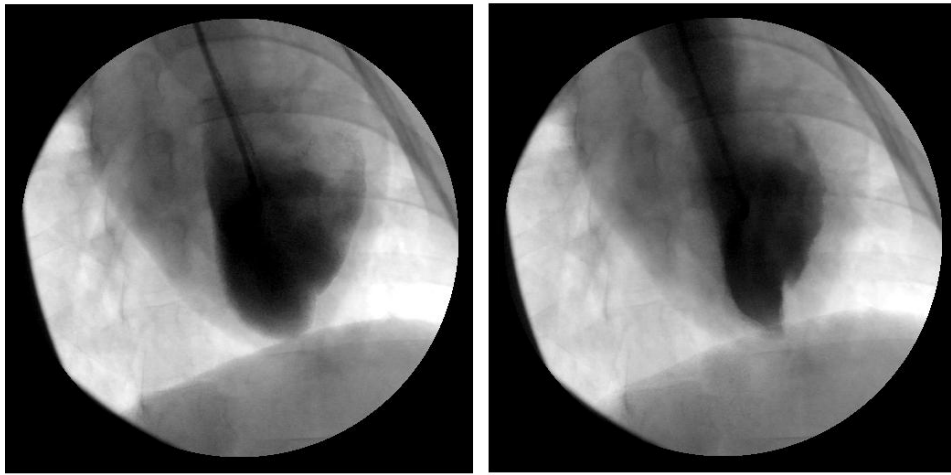
Γράφημα 7, Οι μεταβολές για την κάθε ομάδα μεταξύ της αρχικής αξιολόγησης πριν την πρόκληση του εμφράγματος και της τελικής αξιολόγησης πριν τον τερματισμό του πειράματος. Αριστερά είναι η ομάδα ελέγχου (control) και δεξιά η ομάδα κυττάρων (CDCs). Baseline: πριν την πρόκληση εμφράγματος και Final: τελική αξιολόγηση.



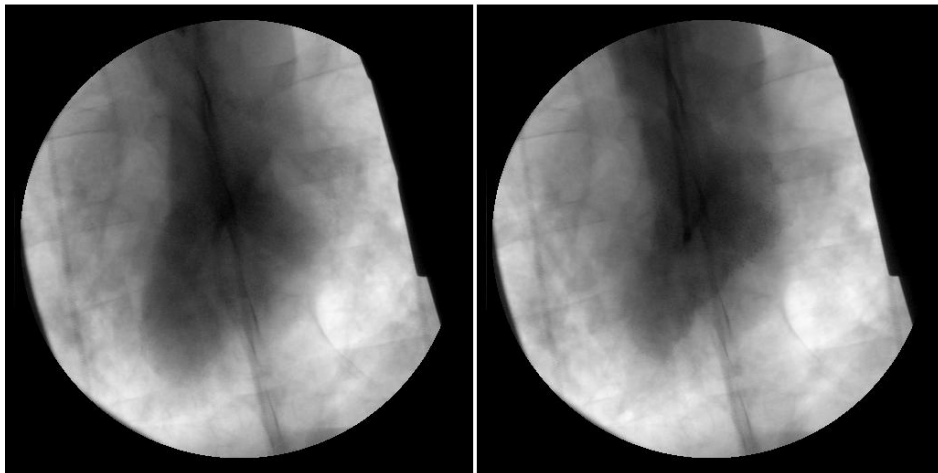
Εικόνα 20, Η κοιλιογραφία για την ομάδα ελέγχου πριν την πρόκληση του εμφράγματος. Αριστερά η τελοδιαστολική φάση και δεξιά η τελοσυστολική φάση.



Εικόνα 21, Η κοιλιογραφία για την ομάδα ελέγχου 30 ημέρες μετά την πρόκληση του εμφράγματος. Αριστερά η τελοδιαστολική φάση και δεξιά η τελοσυστολική φάση.



Εικόνα 22, Η κοιλιογραφία για την ομάδα κυττάρων πριν την πρόκληση του εμφράγματος. Αριστερά η τελοδιαστολική φάση και δεξιά η τελοσυστολική φάση.



Εικόνα 23, Η κοιλιογραφία για την ομάδα κυττάρων 30 ημέρες μετά την πρόκληση εμφράγματος. Αριστερά η τελοδιαστολική φάση και δεξιά η τελοσυστολική φάση.

## 5.4 Παθολογοανατομικά ευρήματα

Κατά τον τερματισμό κάθε πειράματος για τον καθορισμό της υπό κίνδυνο περιοχής γινόταν έγχυση με το ιώδες της γεντιάνης (όπως αναφέρεται στην ανάλυση της πειραματικής διαδικασίας), στη συνέχεια ακολουθούσε ευθανασία του πειραματόζωου και απομόνωση της αριστερής κοιλίας. Η αριστερή κοιλία ζυγιζόταν και γινόταν διατομή της κατά το βραχύ άξονα σε τμήματα πάχους 1 εκατοστού και στη συνέχεια ακολουθούσαν μακροσκοπική ανάλυση και μικροσκοπική. Η υπό κίνδυνος περιοχή εκφράστηκε ως ποσοστό της συνολικής μάζας της αριστερής κοιλίας και η περιοχή που ισχαιμίστηκε σαν ποσοστό της υπό κινδύνου περιοχής. Η υπό κίνδυνος περιοχή ήταν όμοια ανάμεσα στις δύο ομάδες (19,5% και 19,72% αντίστοιχα). Οι αναλύσεις έγιναν με πλανημέτρηση και χρήση του Image J.

### 5.4.1 Εκτίμηση της έκτασης του εμφράγματος- Μακροσκοπικά

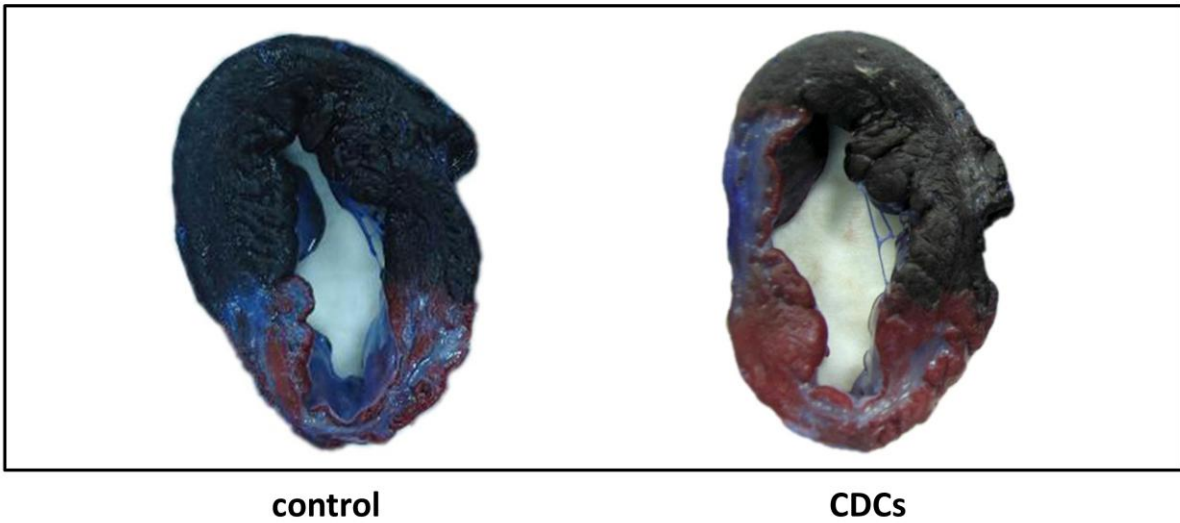
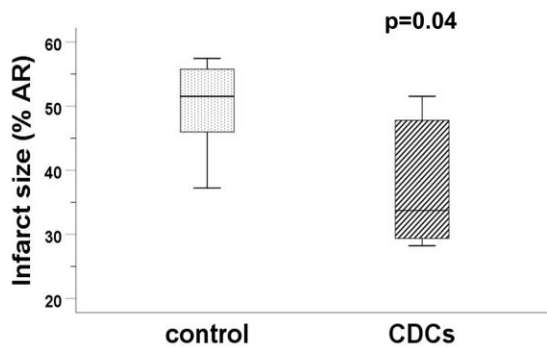
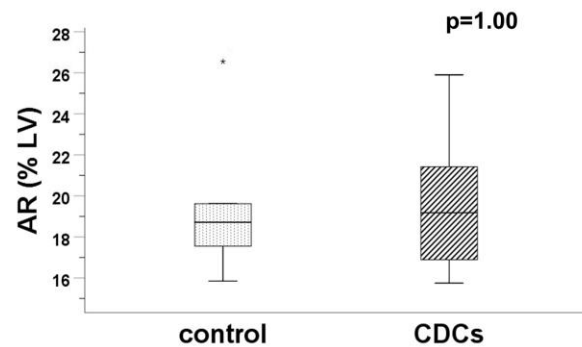
Τα τμήματα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 1% χλωριούχου τετραζολίου (TTC) χρώση που αναδεικνύει το μεταβολικά ενεργό ιστό, αρχικά είναι ένα άχρωμο διάλυμα, το οποίο παρουσία αφυδρογονασών στα ζωντανά μυοκαρδιακά κύτταρα, μετατρέπεται σε αδιάλυτο ίζημα ζυθρού ερυθρού χρώματος. Η αντίδραση αυτή εξαρτάται από το συνένζυμο NADH. Τα κύτταρα που έχουν υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη χάνουν σε διάστημα λίγων ωρών τα συγκεκριμένα ένζυμα και δεν χρωματίζονται, έτσι βάφεται με ζυθρό κόκκινο χρώμα μόνο το βιώσιμο μυοκάρδιο.<sup>8,51</sup> (Εικόνα 22)

Όλες οι μετρήσεις βρίσκονται στον πίνακα 8.

<b>ΟΜΑΔΑ</b>	<b>AR</b>	<b>ΜΙ</b>
Ελέγχου 1	26.55	51.94
Ελέγχου 2	17.55	57.44
Ελέγχου 3	15.85	51.1
Ελέγχου 4	19.62	45.96
Ελέγχου 5	19.25	37.23
Ελέγχου 6	18.18	55.76
Κυττάρων 1	18.05	47.79
Κυττάρων 2	16.89	51.54
Κυττάρων 3	20.31	32.15
Κυττάρων 4	21.42	29.37
Κυττάρων 5	25.9	35.29
Κυττάρων 6	15.75	28.24

Πίνακας 8, Έκταση της υπό κίνδυνο περιοχής(AR) και έκταση εμφράγματος (MI)

Τα πειραματόζωα που έλαβαν κύτταρα παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά μικρότερη έκταση ουλής ( $37.4 \pm 9.9\%$  της υπό κίνδυνο περιοχής  $n=6$  με  $P= 0,04$  συγκριτικά με εκείνα της ομάδας ελέγχου ( $49.9 \pm 7.4\%$ ,  $n= 6$  με  $P=0.04$ ). (Γράφημα 8)

**A****B****C**

Εικόνα 22 και Γράφημα 8, (A) Φωτογραφίες από την αριστερή κοιλία, αριστερά η ομάδα ελέγχου δεξιά η ομάδα των κυττάρων. Με τη βοήθεια του ιώδους της γεντιάνης βάφτηκε η υποκίνδυνος περιοχή και στη συνέχεια οι τομές εμβαπτίστηκαν σε TTC για την ανάδειξη του βιώσιμου μυοκαρδίου (έντονο κόκκινο χρώμα). (B) σύγκριση της έκτασης του εμφράγματος ανάμεσα στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα κυττάρων. (C) σύγκριση της υπό κίνδυνο περιοχής μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των κυττάρων.

#### 5.4.2 Μικροσκοπική ανάλυση

Ελήφθησαν βιοψίες α) από την ουλή, β) από τα όρια της ουλής με την υγιή περιοχή (όριο) και γ) από σημεία της υγιούς/απομακρυσμένης περιοχής. Τα δείγματα εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα φορμόλης 10% και στη συνέχεια ακολούθησε επεξεργασία για ιστολογική εκτίμηση. Τα δείγματα βάφτηκαν με τη χρώση της αιματοξυλίνης ηωσίνης ώστε να γίνει εκτίμηση του μεγέθους των μυοκαρδιακών κυττάρων καθώς και της ανοσολογικής απόρριψης και με τη χρώση Masson Trichrome για την ανάδειξη της ίνωσης σε παθολογοανατομικό εργαστήριο.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων βρίσκονται στο πίνακα 9.

ΟΜΑΔΑ	MASSON REMOTE	CELL MEAN BORDER	CELL MEAN REMOTE
Ελέγχου 1	4.03	30.022	25.255
Ελέγχου 2	6.13	24.945	29.472
Ελέγχου 3	3.34	20.726	17.52
Ελέγχου 4	2.43	30.543	25.631
Ελέγχου 5	2.31	24.057	24.461
Ελέγχου 6	2.07	18.037	17.318
Κυττάρων 1	1.73	25.454	24.051
Κυττάρων 2	1.81	24.238	26.394
Κυττάρων 3	1.05	19.821	17.978
Κυττάρων 4	1.89	28.191	24.081
Κυττάρων 5	0.81	20.996	21.853
Κυττάρων 6	1.25	30.537	28.254

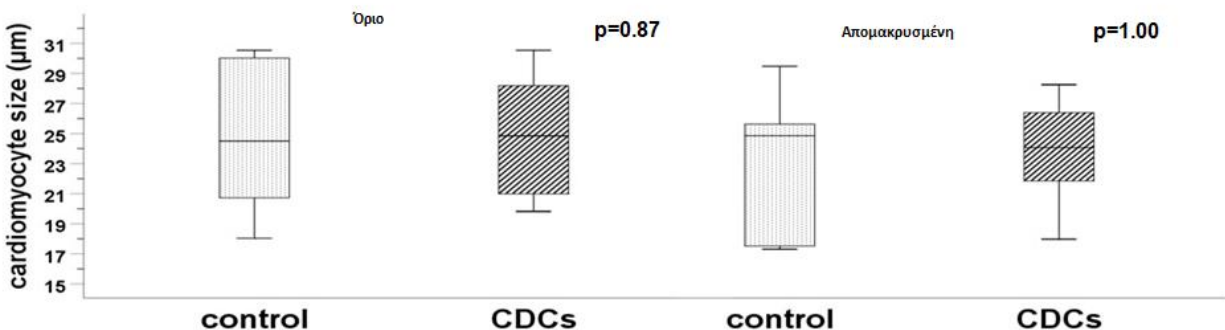
Πίνακας 9, συνολικά ιστολογικά ευρήματα. Το ποσοστό της ίνωσης στην απομακρυσμένη περιοχή με τη χρώση Masson, οι μέσες τιμές του μεγέθους των μυοκαρδιακών κυττάρων για κάθε ένα ζώο, στην περιοχή στο όριο και στην απομακρυσμένη περιοχή ( cell mean border και cell mean remote αντίστοιχα)

## A. Αιματοξυλίνη Ηωσίνη

Με τη χρώση της αιματοξυλίνης ηωσίνης δεν διαπιστώθηκε ανοσολογική απόρριψη καθώς στα δείγματα από την ομάδα που έλαβε κύτταρα, δεν παρατηρήθηκε οίδημα, αιμορραγία ή και νέκρωση. Επίσης δεν παρατηρήθηκε λεμφοκυτταρική διήθηση, σημείο ανοσολογικής απόρριψης.<sup>57,71,78</sup> Μετρήθηκε η διάμετρος των καρδιομυοκυττάρων στο όριο της ουλής και στην απομακρυσμένη περιοχή. (Εικόνα 23).

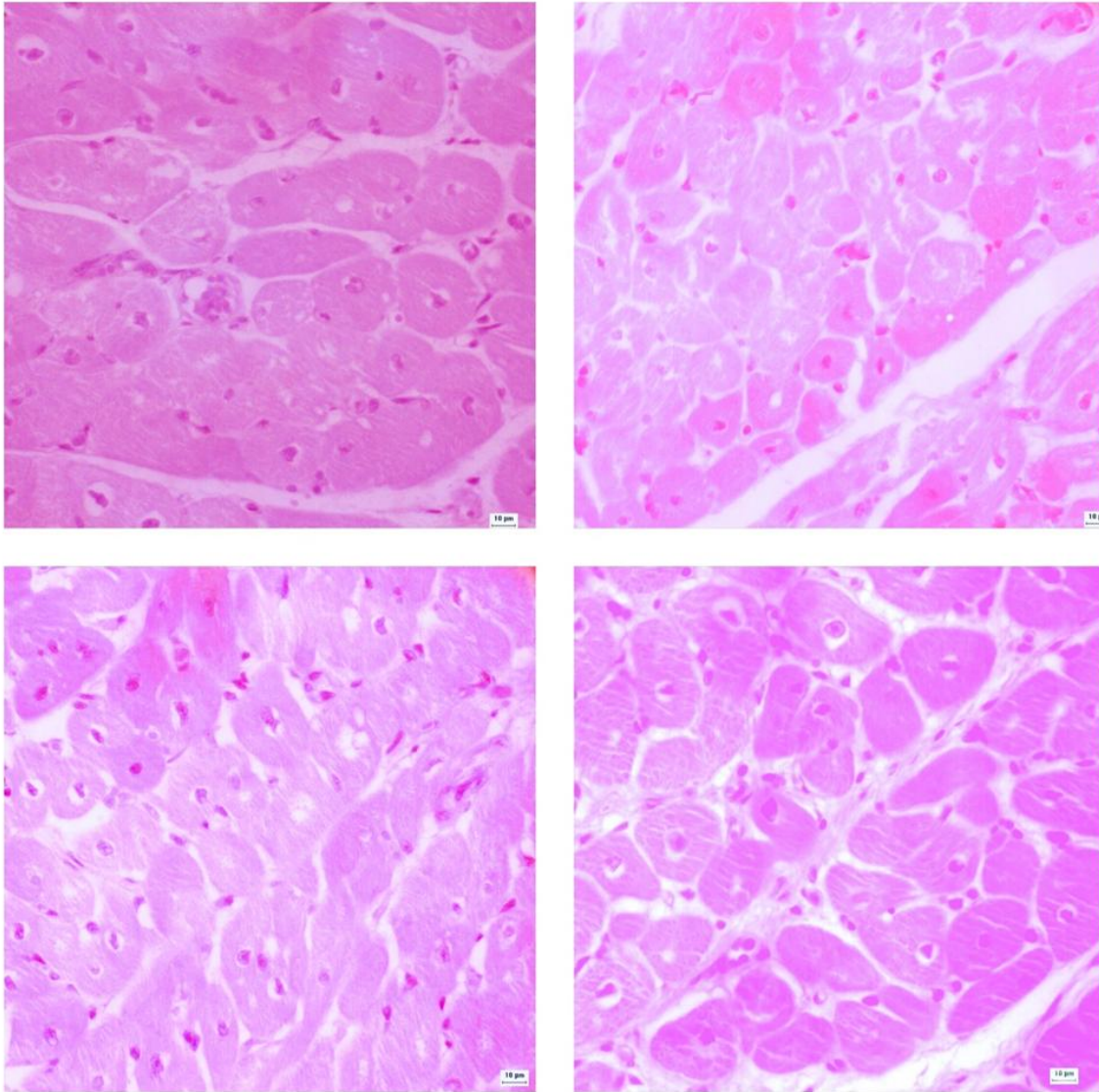
Δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο μέγεθος των καρδιομυοκυττάρων ανάμεσα στις δύο ομάδες ούτε στην περιοχή στο όριο ούτε όμως στην υγιή (απομακρυσμένη) περιοχή.

Για την ομάδα ελέγχου, το μέγεθος των καρδιομυοκυττάρων στο όριο ήταν  $24.7 \pm 5 \mu\text{m}$  και στην απομακρυσμένη περιοχή ήταν  $23.2 \pm 4.9 \mu\text{m}$ . Για την ομάδα των κυττάρων, το μέγεθος των καρδιομυοκυττάρων στο όριο ήταν  $24.9 \pm 4.1 \mu\text{m}$  και στην απομακρυσμένη περιοχή ήταν  $23.7 \pm 3.6 \mu\text{m}$ . Χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά  $P = 0.87$  και  $P = 1$  για το όριο και την απομακρυσμένη περιοχή αντίστοιχα. (Γράφημα 9).



Γράφημα 9, Το μέγεθος των κάρδιομυοκυτταρων για κάθε ομάδα στην περιοχή στο όριο της ζώνης του εμφράγματος ( αριστερά) και στην απομακρυσμένη περιοχή (δεξιά) control = ομάδα ελέγχου, CDCs = ομάδα κυττάρων.





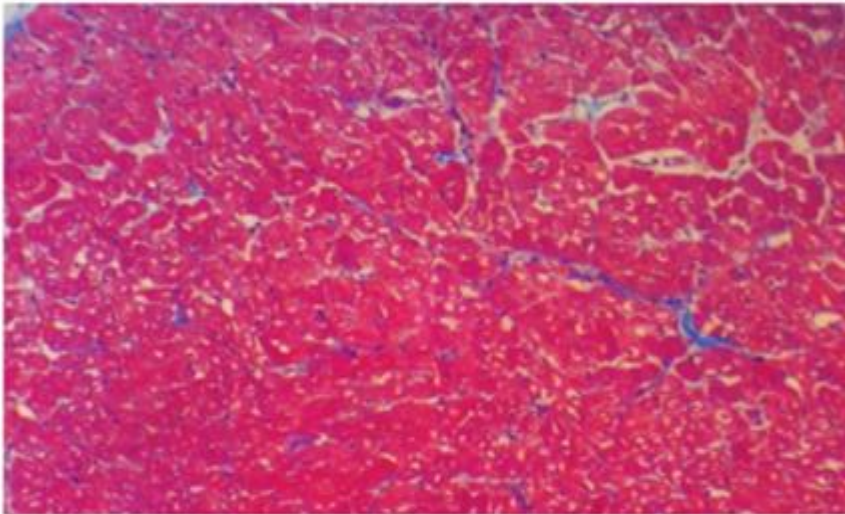
Εικόνα 23, Στις φωτογραφίες της πρώτης σειράς απεικονίζεται η ομάδα ελέγχου στο όριο και στην απομακρυσμένη περιοχή αντίστοιχα.

Στις φωτογραφίες της δεύτερης σειράς απεικονίζεται η ομάδα των κυττάρων στο όριο και την απομακρυσμένη περιοχή αντίστοιχα.

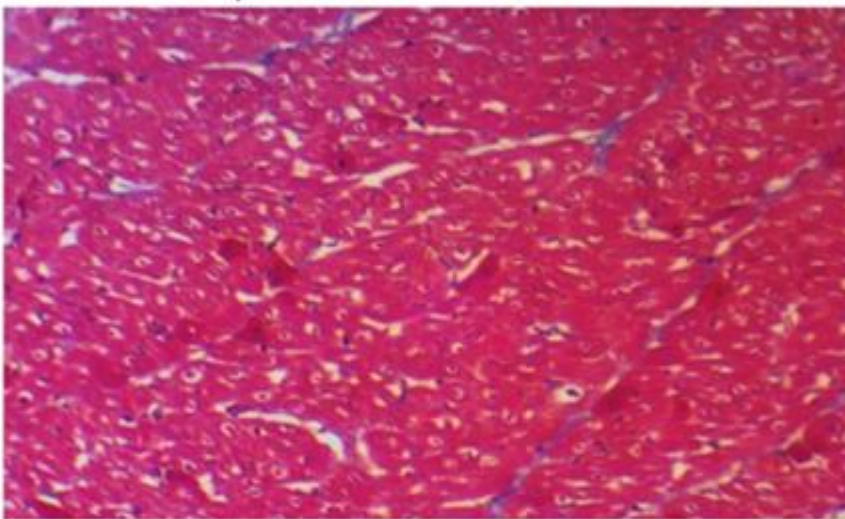
## B. Masson Trichrome - Ίνωση

Με τη χρώση Masson Trichrome, φάνηκε ότι η ομάδα που έλαβε κύτταρα παρουσιάζει στατιστικά σημαντικά λιγότερη ίνωση στην απομακρυσμένη περιοχή  $1.4 \pm 0.4\%$  συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου  $3.4 \pm 1.5\%$  με  $P= 0.004$ . Γεγονός που δείχνει την συμβολή των κυττάρων στον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας<sup>29</sup>. (Εικόνα 24)

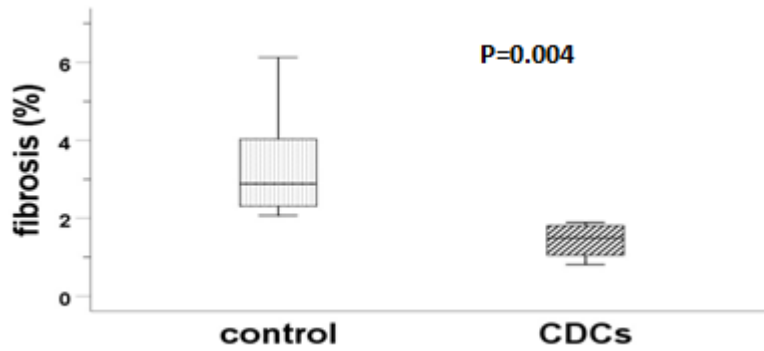
Ομάδα Ελέγχου



Ομάδα Κυττάρων



Εικόνα 24 , Με τη χρώση Masson Trichrome με το μωβ χρώμα απεικονίζεται η ίνωση. Πάνω η ομάδα ελέγχου και κάτω η ομάδα των κυττάρων.



Γράφημα 10, Η ίνωση στην απομακρυσμένη περιοχή. Η ομάδα που έλαβε τα κύτταρα είχε στατιστικά σημαντικά λιγότερη ίνωση σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

## 6. Συζήτηση

Η στεφανιαία νόσος, παρά τις εξελίξεις που έχουν συμβεί και την καθιέρωση της πρωτογενούς αγγειοπλαστικής για την αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, παραμένει η κύρια αιτία θανάτου στον Δυτικό Κόσμο. Διαρκώς ερευνώνται νέοι επιπρόσθετοι τρόποι που θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη μείωση της θνησιμότητας και στον περιορισμό των επιπλοκών που έπονται του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.<sup>1</sup>

Η ανακάλυψη ότι τα μυοκαρδιακά κύτταρα έστω και σε μικρό βαθμό αναγεννώνται<sup>38</sup>, γέννησε την ελπίδα εύρεσης τρόπων που θα μπορούσαν να ενισχύσουν την αναγεννητική ικανότητα της καρδιάς. Η κυτταρική θεραπεία έχει αποτελέσει στόχο έρευνας εδώ και πολλά χρόνια, τόσο για τη μυοκαρδιακή βλάβη οφειλόμενη σε ισχαιμία του μυοκαρδίου όσο και για άλλες παθολογικές καταστάσεις. Η απομόνωση και η καλλιέργεια των καρδιακών προγονικών κυττάρων έδωσε το έναυσμα για περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασής τους στο μυοκαρδιακό ιστό. Τα χορηγούμενα προγονικά κύτταρα δεν ενσωματώνονται στο μυοκαρδιακό ιστό<sup>88,89</sup> όμως ενεργοποιούν παρακρινικούς μηχανισμούς. Έτσι όταν χορηγούνται μετά από μυοκαρδιακή βλάβη συνεισφέρουν στο μυοκαρδιακό ιστό, ενεργοποιώντας είτε μηχανισμούς καρδιοπροστασίας είτε αναγεννητικούς μηχανισμούς. Λόγω της επίδρασής τους αλλά και των χαρακτηριστικών τους, έχουν γίνει αντικείμενο μελετών για την εύρεση επιπρόσθετων των συμβατικών μεθόδων, περιορισμού της μυοκαρδιακής βλάβης.<sup>56,57</sup>

Πολυάριθμες πειραματικές προκλινικές μελέτες έχουν γίνει ως τώρα εξετάζοντας τους μηχανισμούς δράσης των κυττάρων αλλά και το όφελος από τη χορήγηση των προγονικών καρδιακών κυττάρων (αλλογενών και ενδογενών). Οι μελέτες αυτές στην πλειονότητα τους έχουν δείξει ευεργετικά αποτελέσματα από τη χορήγηση των κυττάρων είτε μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, είτε σε άλλες παθολογικές καταστάσεις. Εντούτοις οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα δεν έχουν εξετάσει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των κυττάρων στη φάση της οξείας ισχαιμίας και πριν την επαναιμάτωση.<sup>97-109</sup>

Η ισχαιμία και η επαναιμάτωση προκαλούν μια σειρά από γεγονότα με αποτέλεσμα βλάβη στο μυοκαρδιακό ιστό συχνά μη αναστρέψιμη. Ξεκινώντας από τη βλάβη της ίδιας της ισχαιμίας που ακολουθείται από τη βλάβη της επαναιμάτωσης, τη βλάβη στο ενδοθήλιο, την απομακρυσμένη αθηροθρομβωτική εμβολή και τελικά και από το φαινόμενο της μη επαναροής (no-reflow). Όλα μαζί συμβάλλουν στην αύξηση της έκτασης του εμφράγματος, καθώς και στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και τελικά στην μείωση της λειτουργικότητας της.<sup>16,94-96</sup>

Στην φάση της οξείας ισχαιμίας στο μυοκαρδιακό ιστό επικρατεί η υποξία αλλά η μικροκυκλοφορία παραμένει ανοιχτή. Το no-reflow φαινόμενο δεν έχει ακόμα αρχίσει. Συνεπώς τη στιγμή αυτή η χορήγηση των κυττάρων, με ανοιχτή τη μικροκυκλοφορία, θα βοηθούσε στην ομοιόμορφη κατανομή των χορηγούμενων κυττάρων στο μυοκαρδιακό ιστό που ισχαιμεί. Το φαινόμενο της μη επαναροής ξεκινά με την αποκατάσταση της επικαρδιακής ροής και συνεχίζεται όσο περνά ο χρόνος, όμως τα πρώτα πέντε λεπτά της επαναιμάτωσης συμβαίνουν οι πιο καθοριστικές αλλαγές. Όταν τα αλλογενή κύτταρα χορηγούνται στην επαναιμάτωση, το no-reflow έχει ήδη αναπτυχθεί και συνεπώς τα χορηγούμενα κύτταρα δεν θα φτάσουν στις περιοχές του no-reflow. Τα περισσότερα μυοκαρδιακά κύτταρα πεθαίνουν τις πρώτες ώρες μετά την ισχαιμία.<sup>91</sup> Η χορήγηση των εξωγενών κυττάρων μειώνει σε σημαντικό βαθμό την απόπτωση των ενδογενών κυττάρων. Το γεγονός ότι η χορήγηση των αλλογενών CDCs συνοδεύεται από σημαντική μείωση της απόπτωσης των γηγενών κυττάρων και συνάμα το ότι βοηθούν την επανείσοδο τους στον κυτταρικό κύκλο, μαζί με το γεγονός ότι συμβάλλουν στην αγγειογένεση και παράλληλα τροποποιούν τη φλεγμονή, σημαίνει πως η παρουσία τους στο μυοκαρδιακό ιστό στη φάση της ισχαιμίας θα μπορούσε να περιορίσει τη βλάβη από ισχαιμία - επαναιμάτωση αλλά και από το φαινόμενο της μη επαναροής.

Τα αλλογενή προγονικά καρδιακά κύτταρα εκτός από τις θετικές επιδράσεις που έχουν στα γηγενή κύτταρα αλλά και στο μυοκαρδιακό ιστό, έχουν και κάποια άλλα χαρακτηριστικά που βοηθούν ώστε μετά τη χορήγηση τους να μη δημιουργούνται έντονες ανοσολογικές αντιδράσεις στο δέκτη.<sup>57</sup> Εκφράζουν αντιγόνα ιστοσυμβατότητας MHC τάξης I που τα προστατεύουν από τα κύτταρα φυσικούς φονείς και το γεγονός ότι

δεν εκφράζουν αντιγόνα ΜΗC τάξης ΙΙ τα κάνει μη αναγνωρίσιμα από τα CD4<sup>+</sup> Τ βοηθητικά λεμφοκύτταρα. Άλλο σημαντικό πλεονέκτημα των αλλογενών CDCs, συγκριτικά με τα ενδογενή είναι ότι μπορούν εφόσον έχουν απομονωθεί και καλλιεργηθεί να είναι διαθέσιμα για χορήγηση 24 ώρες το 24 ώρο μέσα σε ένα αιμοδυναμικό εργαστήριο. Εφόσον λοιπόν τεκμηριωθεί πραγματικό όφελος από τη χορήγηση τους, θα μπορούσαν να χορηγούνται σε ασθενή με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου κατά τη διάρκεια της διαδερμικής επαναιμάτωσης.

Τα χαρακτηριστικά αυτά τα καθιστούν έναν ιδανικό πληθυσμό κυττάρων που θα μπορούσε να χορηγηθεί επικουρικά στην ισχαιμία και πριν την επαναιμάτωση με σκοπό τον περιορισμό της μυοκαρδιακής βλάβης.

Η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας μετά από το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, είναι η διαταραχή της αρχιτεκτονικής της που συνοδεύεται από αυξημένους όγκους και διάταση της κοιλότητας.<sup>30</sup> Σε κυτταρικό επίπεδο χαρακτηρίζεται από την απόπτωση των μυοκαρδιακών κυττάρων αλλά και την υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων, τον πολλαπλασιασμό των μυοϊνοβλαστών και ταυτόχρονα την εναπόθεση κολλαγόνου. Είναι μια διαδικασία που εξελίσσεται μέσα σε μεγάλο χρονικό διάστημα και έχει ως αποτέλεσμα την έκπτωση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας. Η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας ολοκληρώνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη φάση, η πρώιμη φάση, ξεκινά από το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και διαρκεί έως 72 ώρες μετά. Στη φάση αυτή ο θάνατος των μυοκαρδιακών κυττάρων ακολουθείται από μια σειρά αλλαγών όπου κυρίαρχο ρόλο παίζει η φλεγμονή. Η φλεγμονή σχετίζεται με την έκπτυξη της ζώνης του εμφράγματος δηλαδή τη λέπτυνση του τοιχώματος και τη διάταση της εμφραχθείσας περιοχής. Η δεύτερη φάση της αναδιαμόρφωσης, η όψιμη φάση ξεκινά 72 ώρες μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και συνεχίζεται έως και εβδομάδες μετά. Οι αλλαγές που έχουν ήδη γίνει στην πρώιμη φάση έχουν κινητοποιήσει νευροορμονικές αλλαγές και άλλους μηχανισμούς. Στην όψιμη φάση, κυριαρχούν η υπερτροφία των μυοκαρδιακών κυττάρων, οι αλλαγές της αρχιτεκτονικής της κοιλίας και ο σχηματισμός της ουλής.<sup>24</sup> Η έγκαιρη χορήγηση των κυττάρων στην ισχαιμία μπορεί ενδεχομένως να συμβάλει και στον περιορισμό της πρώιμης αναδιαμόρφωσης. Τα καρδιακά προγονικά κύτταρα όταν χορηγούνται συμβάλλουν στον περιορισμό της φλεγμονής και μειώνουν την απόπτωση των γηγενών κυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η χορήγηση αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων, σε προκαθορισμένο αριθμό ( $5 \times 10^6$ ) ώστε να μην επιδεινώνεται περαιτέρω η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας, κατά τη φάση της οξείας ισχαιμίας και πριν την επαναιμάτωση, σε χοίρειο χρόνιο μοντέλο ισχαιμίας - επαναιμάτωσης. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιελάμβανε, μηχανικό αποκλεισμό της ροής στον πρόσθιο κατιόντα και ισχαιμία για 60 λεπτά, στη συνέχεια χορήγηση των κυττάρων ή εικονικού διαλύματος, κατόπιν λύση της απόφραξης μετά την πάροδο 5 λεπτών και αποκατάσταση της επικαρδιακής ροής, επαναιμάτωση και παρακολούθηση για 30 ημέρες. Η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας, εκτιμήθηκε παθολογοανατομικά, ιστολογικά και υπερηχογραφικά, ενώ η λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας ελέγχθηκε υπερηχογραφικά και μέσω διενέργειας κοιλιογραφίας.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης προέκυψε πως η ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων κατά την φάση της οξείας ισχαιμίας και πριν την επαναιμάτωση είναι εφικτή και ασφαλής. Πιο συγκεκριμένα δεν σημειώθηκαν απειλητικές για τη ζωή αρρυθμίες συσχετιζόμενες με τη χορήγηση των κυττάρων, ενώ δεν παρατηρήθηκαν ούτε άλλες επιπλοκές. Επιπρόσθετα από την ιστολογική ανάλυση δεν παρατηρήθηκαν στοιχεία ανοσολογικής απόρριψης, όπως οίδημα, αιμορραγία ή και νέκρωση καθώς ούτε και λεμφοκυτταρική διήθηση.<sup>71</sup>

Από τα παθολογοανατομικά και ιστολογικά ευρήματα, προέκυψε ότι η ομάδα που έλαβε τα κύτταρα (n=6) παρουσίασε στατιστικά σημαντική μικρότερη έκταση εμφράγματος αλλά και λιγότερη ίνωση στο απομακρυσμένο μυοκάρδιο σε σχέση με την ομάδα εκείνη που δεν έλαβε κύτταρα. Τα αποτελέσματα αυτά είναι ένδειξη περιορισμού της αναδιαμόρφωσης.

Με βάση τα υπερηχογραφικά δεδομένα, η ομάδα ελέγχου, παρουσίασε στατιστικά σημαντική έκπτωση του κλάσματος εξωθήσεως στις 30 ημέρες ( $P=0.046$ ), ενώ για την ομάδα των κυττάρων η μείωση του κλάσματος εξωθήσεως δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $P=0.12$ ). Και στις δύο ομάδες παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της τελοδιαστολικής διαμέτρου και του τελοδιαστολικού όγκου της αριστερής κοιλίας στις 30 ημέρες. Επιπλέον η ομάδα ελέγχου στις 30 ημέρες παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση του τελοσυστολικού όγκου, ενώ αντίστοιχα στην ομάδα των κυττάρων η αύξηση του τελοσυστολικού όγκου δεν ήταν στατιστικά σημαντική.



Από τον υπολογισμό του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας με την κοιλιογραφία, διαπιστώθηκε για την ομάδα ελέγχου στατιστικά σημαντική έκπτωση του κλάσματος εξωθήσεως ( $P=0.046$ ). Αντίθετα η ομάδα που έλαβε τα κύτταρα στις 30 ημέρες διατηρούσε το κλάσμα εξωθήσεως ( $P=0.89$ ).

Με την πειραματική μελέτη αυτή φάνηκε πως η ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων σε προκαθορισμένο αριθμό νωρίς κατά τη φάση της οξείας ισχαιμίας και πριν την επαναιμάτωση είναι ασφαλής και εφικτή. Η χορήγηση συμβάλει στον περιορισμό της έκτασης της ουλής και της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας καθώς και στη διατήρηση καλύτερης λειτουργικότητας.

Προηγηθείσα προκλινική μελέτη σε χοίρους<sup>79</sup> και με παρόμοιο πειραματικό σχεδιασμό είχε επίσης ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τη χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στη μελέτη αυτή, σε μοντέλο οξείας ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, (μηχανικό αποκλεισμό της ροής στον πρόσθιο κατιόντα για 90 λεπτά, λύση του αποκλεισμού και αποκατάσταση της κυκλοφορίας), χορηγήθηκε στα 30 λεπτά της επαναιμάτωσης μεγαλύτερος αριθμός κυττάρων συγκριτικά με την παρούσα μελέτη ( $7.5 \times 10^6$ ) αλλογενών CDCs. Αξιολογήθηκε η λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας με μαγνητική τομογραφία και κοιλιογραφία στη μία ώρα και στις 8 εβδομάδες. Στις 8 εβδομάδες έγινε η τελική αξιολόγηση και ακολούθησε ιστολογική εκτίμηση. Η μελέτη αυτή έδειξε την ασφάλεια της χορήγησης των αλλογενών κυττάρων ενδοστεφανιαία αλλά και την αποτελεσματικότητά τους. Τα πειραματόζωα που έλαβαν τα κύτταρα, παρουσίασαν μικρότερης έκτασης έμφραγμα, περιορισμό στην αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και καλύτερη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας. Η ίδια ομάδα νωρίτερα σε παρόμοιο πειραματικό μοντέλο, οξείας ισχαιμίας και επαναιμάτωσης, τιτλοποίησε τη δόση των χορηγούμενων κυττάρων και παράλληλα αξιολόγησε την αποτελεσματικότητά της χορήγησης στις 48 ώρες. Κατάφερε να αναδείξει με τα πειράματα αυτά την ικανότητα των κυττάρων να επιδρούν ως μηχανισμός μετά-ισχαιμικής εκγύμνασης (post-conditioning).

Η χορήγηση ενδοστεφανιαία αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων, σε μοντέλο οξείας ισχαιμίας επαναιμάτωσης, μετά από 60 λεπτά ισχαιμίας και 5 λεπτά πριν την



επαναιμάτωση, με τελική αξιολόγηση στις 4 εβδομάδες, έχει παρόμοια αποτελέσματα με την ανωτέρω μελέτη. Οι μελέτες αυτές δείχνουν την ασφάλεια της χορήγησης των κυττάρων αλλά και την αποτελεσματικότητά τους. Καθώς η χορήγηση των κυττάρων δεν συνοδεύεται από ανεπιθύμητα γεγονότα και παράλληλα συμβάλει στον περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος, στον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης και στη διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας.

Η ασφάλεια και η επίδραση της χορήγησης αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων μετά το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου έχει μελετηθεί και σε κλινικές μελέτες. Η ALLSTAR<sup>84,85</sup> ήταν κλινική μελέτη φάσης I/II που εξέτασε τη χορήγηση ενδοστεφανιαία αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων σε ασθενείς μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου που είχαν αντιμετωπιστεί με διαδερμική αγγειοπλαστική και εμφύτευση ενδοστεφανιαίας πρόθεσης στο ένοχο αγγείο με αποκατάσταση ροής TIMI 3. Τα βασικά κριτήρια ένταξης στη μελέτη ήταν: i) ιστορικό προηγούμενου οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου 4 έως 12 μήνες πριν, ii) κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας χαμηλότερο από 45%, iii) έκταση εμφράγματος μεγαλύτερη από 15% της αριστερής κοιλίας σε έλεγχο με μαγνητική τομογραφία καρδιάς και iv) ασθενείς που δεν έχρηζαν περαιτέρω επαναιμάτωσης. Η μελέτη σταμάτησε νωρίς μην έχοντας δείξει τη μείωση της ουλής στους 6 μήνες, όπως ελέγχθηκε με μαγνητική τομογραφία καρδιάς. Όμως στους 6 μήνες οι ασθενείς που είχαν λάβει την κυτταρική θεραπεία σε σύγκριση με τους ασθενείς που είχαν λάβει την εικονική θεραπεία, παρουσίαζαν στατιστικά σημαντική μείωση στον τελοδιαστολικό και στον τελοσυστολικό όγκο της αριστερής κοιλίας αλλά και στατιστικά σημαντική μείωση στα επίπεδα του νατριουρητικού πεπτιδίου NT-pro BNP ( $P=.02$  για όλα τα ανωτέρω).

Παλιότερα σε κλινικές μελέτες είχε φανεί πώς ο αυξημένος τελοσυστολικός όγκος (ESVi) όχι μόνο σχετίζεται ισχυρά με την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας αλλά ταυτόχρονα και ειδικά σε ασθενείς με επηρεασμένο κλάσμα εξωθήσεως είναι ανεξάρτητος δείκτης αυξημένης θνησιμότητας. Στην παρούσα πειραματική μελέτη η χορήγηση των αλλογενών CDCs , στην ισχαιμία και πριν την επαναιμάτωση, είχε ως αποτέλεσμα τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας και ταυτόχρονα είχε και ως αποτέλεσμα και τη διατήρηση του τελοσυστολικού όγκου για την ομάδα που έλαβε τα κύτταρα. Ενδεχομένως και η διατήρηση του τελοσυστολικού όγκου και στη μελέτη ALLSTAR, να αποτελεί ένα στοιχείο της θετικής επίδρασης των κυττάρων στη

μυοκαρδιακή βλάβη. Μένει να γίνουν και άλλες κλινικές μελέτες που θα εξετάσουν την αποτελεσματικότητα της χορήγησης των κυττάρων.

Η κλινική μελέτη CAREMI<sup>86,87</sup> φάσης I/II επίσης εξέτασε τη χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων. Η μελέτη αυτή ήταν μια πολυκεντρική τυχαίοποιημένη διπλά τυφλή μελέτη, που εξέτασε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης αλλογενών καρδιακών κυττάρων σε ασθενείς μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν ασθενείς άνω των 18 ετών που είχαν υποστεί οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και που είχαν αντιμετωπιστεί με επιτυχή διαδερμική αγγειοπλαστική μέσα σε 12 ώρες από την έναρξη των συμπτωμάτων, που είχαν κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας μικρότερο από 50% (υπερηχογραφική εκτίμηση), ή που είχαν κλάσμα εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας μικρότερο από 45% (μαγνητική τομογραφία) και που παρουσίαζαν έκταση εμφράγματος πάνω από το 25% της μάζας της αριστερής κοιλίας (μαγνητική τομογραφία). Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 49 ασθενείς, 5 έως 7 ημέρες μετά το έμφραγμα, 33 έλαβαν την κυτταρική θεραπεία και 16 ασθενείς ανήκαν στην ομάδα ελέγχου. Οι ασθενείς στους οποίους χορηγήθηκαν τα κύτταρα έλαβαν ενδοστεφανιαία  $35 \times 10^6$  κύτταρα. Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν στους 6 και 12 μήνες, χωρίς να παρατηρηθούν σημαντικές ανοσολογικές αντιδράσεις ή σοβαρά ανεπιθύμητα γεγονότα. Όμως η μελέτη δεν κατάφερε να δείξει αποτελεσματικότητα όσο αφορά τη μείωση της έκτασης του εμφράγματος και τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας.

Οι κλινικές μελέτες που εξέτασαν την χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων ενδοστεφανιαία μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (4 ημέρες έως 12 μήνες μετά) ενώ δείχνουν ότι η χορήγηση είναι εφικτή και ασφαλής δεν έχουν καταφέρει να δείξουν σαφές όφελος ως προς την αποτελεσματικότητα. Στις μελέτες αυτές η χορήγηση των κυττάρων έγινε σε δεύτερο χρόνο, μακριά από την οξεία ισχαιμία και αφού ο καταρράκτης των αλλαγών που έπονται του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου είχε αρχίσει. Η παρουσία των κυττάρων εκεί δεν μπόρεσε να δράσει ευεργετικά.

Από τα ως τώρα δεδομένα της παρούσας μελέτης αλλά και αρκετών άλλων πειραματικών μελετών φαίνεται πως η χορήγηση των αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων ενδοστεφανιαία, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας ή της

επαναιμάτωσης, είναι εφικτή αλλά και ασφαλής και ταυτόχρονα και αποτελεσματική. Τα χορηγούμενα κύτταρα συμβάλλουν στον περιορισμό της ουλής και της έκτασης του εμφράγματος αλλά και στον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας και τελικά στη διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας.

## 6.1 Καινοτομία μελέτης

Η καινοτομία της μελέτης έγκειται στη χρονική στιγμή που επιλέχτηκε για να γίνει η χορήγηση των κυττάρων. Ως τώρα δεν είχε γίνει κάποια μελέτη που να είχε εξετάσει τη χορήγηση των κυττάρων πριν την επαναιμάτωση, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας. Τα γεγονότα που έπονται της ισχαιμίας και της επαναιμάτωσης, η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας και το φαινόμενο της μη επαναρροής σε ένα βαθμό δρουν αποτρεπτικά ώστε τα χορηγούμενα κύτταρα να φτάσουν στο μυοκαρδιακό ιστό που ισχαιμεί. Γνωρίζοντας ότι τα κύτταρα που χορηγούνται δεν επιβιώνουν για πολύ αλλά ότι η προστατευτική δράση τους σχετίζεται με τον αριθμό που συγκεντρώνεται<sup>88,89</sup> αποφασίστηκε να χορηγηθούν πριν την επαναιμάτωση και πριν την έναρξη του no-reflow, στοχεύοντας σε όσο το δυνατόν καλύτερες συνθήκες ώστε να εξασφαλιζόντουσαν περισσότερα CDCs στο μυοκαρδιακό ιστό που ισχαιμεί. Τα κύτταρα χορηγήθηκαν στα 60 λεπτά της ισχαιμίας με μία γρήγορη έγχυση και η επαναιμάτωση ακολούθησε 5 λεπτά μετά. Ο λόγος που καθυστέρησε η επαναιμάτωση, πέντε λεπτά μετά τη χορήγηση των κυττάρων, ήταν ώστε τα χορηγούμενα κύτταρα να μπορέσουν να καταμεμηθούν στο μυοκαρδιακό ιστό αλλά και να προσκολληθούν και να μην απομακρυνθούν αμέσως από την ροή της κυκλοφορίας. Τα αποτελέσματα της μελέτης κατάφεραν να δείξουν την ασφάλεια της χορήγησης των κυττάρων αλλά και την αποτελεσματικότητα. Η χορήγηση των κυττάρων συνοδεύτηκε από περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος όπως και από περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας και ταυτόχρονα συνέβαλε στη διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας.

## 6.2. Κλινική σημασία

Εφόσον τα ενθαρρυντικά αυτά αποτελέσματα τεκμηριωθούν και με άλλες προκλινικές και κλινικές μελέτες ώστε να εξασφαλιστεί η ιδανική στιγμή αλλά και ο ιδανικός αριθμός κυττάρων, τα αλλογενή προγονικά καρδιακά κύτταρα θα μπορούσαν να είναι διαθέσιμα μέσα σε ένα αιμοδυναμικό εργαστήριο 24 ώρες το 24ώρο. Έτσι, θα μπορούσαν να δοθούν άμεσα στον ασθενή με έμφραγμα του μυοκαρδίου ως επιπρόσθετο μέτρο στην αντιμετώπιση του εμφράγματος ακριβώς πριν την επαναιμάτωση, στον ίδιο χρόνο που διενεργείται η πρωτογενής αγγειοπλαστική με μία μόνο μικρή καθυστέρηση

Ο χρόνος είναι μυοκάρδιο για κάθε ασθενή που έρχεται με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και κλειστό αγγείο. Η γρήγορη επαναιμάτωση είναι καθοριστικής σημασίας.<sup>4,110-111</sup> Η έγχυση των κυττάρων στην παρούσα προκλινική μελέτη έγινε με κλειστό αγγείο επιτρέποντας την επαναιμάτωση 5 λεπτά μετά. Για έναν σταθερό ασθενή τα πέντε λεπτά καθυστέρησης για την επαναιμάτωση εκτιμάται πως θα είχαν ως αποτέλεσμα περίπου 0,17<sup>112</sup> περισσότερους θανάτους ανά 100 ασθενείς που θα αντιμετωπιζόντουσαν με επαναιμάτωση και πρωτογενή διαδερμική αγγειοπλαστική. Ενδεχομένως τα 5 αυτά λεπτά να μην είναι τόσο πολλά εφόσον αποδειχθεί περαιτέρω το όφελος της χορήγησης των κυττάρων με κλινική μελέτη. Στη παρούσα μελέτη η μείωση κατά περίπου 25% της ουλής θα σήμαινε μείωση περίπου 1% της θνησιμότητας στους 6 μήνες.<sup>27,28</sup>

### 6.3 Περιορισμοί

Στη μελέτη αυτή δεν εξετάστηκαν καθόλου οι μηχανισμοί με τους οποίους τα κύτταρα επιδρούν. Ακόμη και να τεκμηριωθεί το όφελος από τη χορήγηση των αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων, στην οξεία φάση της ισχαιμίας και πριν την επαναιμάτωση και παρόλο που τα 5 λεπτά καθυστέρησης της επαναιμάτωσης δεν συνοδεύονται από σημαντική αύξηση στην θνησιμότητα, η κλινική εφαρμογή σε ορισμένες περιπτώσεις θα είναι δύσκολη. Οι αρρυθμίες, η αιμοδυναμική αστάθεια αλλά και διάφορες άλλες καταστάσεις θα δυσκόλευαν τη χορήγηση των κυττάρων.

Η παρούσα πειραματική μελέτη με την μηχανική απόφραξη της κυκλοφορίας διαφέρει από τις αληθινές συνθήκες που επικρατούν στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Εκεί το υπόστρωμα είναι η αθηρωματική νόσος με μηχανισμό την απόφραξη από θρόμβο μετά από ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Το φαινόμενο της μη επαναροής στον άνθρωπο συσχετίζεται πολύ περισσότερο με τον μικροεμβολισμό αθηρωματικού υλικού στην περιφέρεια ενός αγγείου, δηλαδή στη μικροκυκλοφορία, κάτι που δεν συμβαίνει στα προκλινικά πειραματικά μοντέλα όπου η απόφραξη δεν γίνεται σε έδαφος αθηρωματικής νόσου αλλά με μηχανικό τρόπο. Η θετική επίδραση των κυττάρων στο πειραματικό μοντέλο δεν σημαίνει ότι θα έχει τα αντίστοιχα θετικά αποτελέσματα μετά από κλινικό οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου σε έδαφος στεφανιαίας νόσου.

Η πειραματική αυτή μελέτη βασίστηκε σε προηγούμενη μελέτη που εξέτασε τον τρόπο χορήγησης, τη στιγμή χορήγησης και τον αριθμό των χορηγούμενων κυττάρων. Επιλέχθηκε να χορηγηθούν ενδοστεφανιαία στην παρούσα πειραματική μελέτη  $5 \times 10^6$  πριν την επαναιμάτωση. Η κατακράτηση των κυττάρων στο μυοκάρδιο ήταν μεγαλύτερη με αυτή τη μέθοδο αλλά όχι στατιστικά σημαντική, ο αριθμός αυτός των κυττάρων δεν επιδείνωνε περαιτέρω τη μικροκυκλοφορία και παράλληλα βρέθηκε ότι με αυτόν τον αριθμό υπήρχε μεγαλύτερη κατακράτηση των κυττάρων στο μυοκάρδιο πάλι όμως με μη στατιστικά σημαντική διαφορά.

#### **6.4. Συμπεράσματα - Μελλοντικές προοπτικές**

Η πειραματική αυτή μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση των αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων ενδοστεφανιαία κατά την φάση της οξείας ισχαιμίας και πριν την επαναιμάτωση είναι εφικτή, ασφαλής και αποτελεσματική. Τα κύτταρα μέσω έμμεσων μηχανισμών συμβάλλουν στη μείωση της έκτασης του εμφράγματος, στον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας και στη διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας.

Εφόσον η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της χορήγησης των αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου τεκμηριωθεί και σε κλινικές μελέτες θα μπορούσε μια νέα τέτοια θεραπευτική προσέγγιση να ενταχθεί στην κλινική πράξη, σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες στρατηγικές αντιμετώπισης των οξέων στεφανιαίων συνδρόμων ( πρωτογενής αγγειοπλαστική, φαρμακευτική αγωγή) ώστε να μειωθεί η θνησιμότητα και οι επιπλοκές που έπονται του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου.

## Περίληψη στην Ελληνική Γλώσσα

**Εισαγωγή:** Η κυτταρική θεραπεία αποτελεί στόχο έρευνας για τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Σε προκλινικές μελέτες, φάνηκε ότι η ενδοστεφανιαία χορήγηση προγονικών καρδιακών κυττάρων (CDCs) μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση με αποτέλεσμα την προστασία του μυοκαρδιακού ιστού. Ωστόσο η χορήγηση των CDCs πριν την επαναιμάτωση και την έναρξη του φαινομένου της μη επαναρροής δεν έχει εξεταστεί. Το φαινόμενο της μη επαναρροής εξελίσσεται γρήγορα μετά την επαναιμάτωση και ενδεχομένως μειώνει την αποτελεσματικότητα της κυτταρικής θεραπείας. Υποθέσαμε ότι η χορήγηση αλλογενών CDCs στην ισχαιμία και πριν την επαναιμάτωση θα συνέβαλε στον περιορισμό του φαινομένου της μη επαναρροής και της μυοκαρδιακής βλάβης.

**Μέθοδος και αποτελέσματα:** Στην παρούσα μελέτη συγκρίθηκε η ενδοστεφανιαία χορήγηση  $5 \times 10^6$  αλλογενών CDCs με εικονικό διάλυμα, σε χοίρειο χρόνιο προκλινικό μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Η χορήγηση των κυττάρων έγινε στην ισχαιμία και πριν την επαναιμάτωση. Η παρακολούθηση διήρκεσε 30 ημέρες. Συνολικά μελετήθηκαν 18 ζώα, εκ των οποίων 12 ολοκλήρωσαν την μελέτη. Τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε υπερηχογραφική μελέτη και σε κοιλιογραφία, ενώ ελήφθησαν και ιστοπαθολογικά δείγματα προκειμένου να εκτιμηθεί η λειτουργικότητα και η αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας. Στην ομάδα ελέγχου ( $n=6$ ) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση του κλάσματος εξωθήσεως τόσο υπερηχογραφικά όσο και με την κοιλιογραφία ( $p=0.046$  και με τις δυο μεθόδους). Αντίθετα για την ομάδα των κυττάρων ( $n=6$ ) η μείωση στο κλάσμα εξωθήσεως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στις 30 ημέρες και οι δύο ομάδες παρουσίασαν σημαντική αύξηση στην τελοδιαστολική διάμετρο και στον τελοδιαστολικό όγκο. Επιπρόσθετα η ομάδα ελέγχου παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση και στον τελοσυστολικό όγκο, ενώ η ομάδα κυττάρων παρουσίασε αύξηση αλλά όχι στατιστικά σημαντική. Παθολογοανατομικά στην ομάδα ελέγχου βρέθηκε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη έκταση εμφράγματος και περισσότερη ίνωση. Δεν παρατηρήθηκαν σημεία ανοσολογικής απόρριψης.

**Συμπεράσματα:** Η ενδοστεφανιαία χορήγηση  $5 \times 10^6$  αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων κατά την ισχαιμία και πριν την επαναιμάτωση σε χοίρειο μοντέλο οξείας ισχαιμίας επαναιμάτωσης, είναι ασφαλής και έχει ως αποτέλεσμα μείωση της έκτασης του εμφράγματος αλλά και περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας και παράλληλα συμβάλει στη διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας.



## Περίληψη στην Αγγλική Γλώσσα -Summary

**Background:** Allogeneic cardiosphere-derived cells (CDCs) exert cardioprotective effects when administered intracoronarily after reperfusion in animal models of acute myocardial infarction (AMI). The “no-reflow” phenomenon develops rapidly post-reperfusion and may undermine the efficacy of cell therapy, due to poor cell delivery in areas of microvascular obstruction (MVO). We hypothesized that CDC-induced cardioprotection would be enhanced by cell administration prior to reperfusion, when microvasculature is still relatively intact, to facilitate widespread cell delivery within the ischemic area.

**Methods and Results:** We studied 18 farm pigs; 12 completed the specified protocol. We performed a randomized, placebo-controlled study to assess the long-term efficacy of intracoronary infusion of 5 million allogeneic CDCs, delivered at 5 minutes prior to reperfusion, in a porcine model of acute myocardial infarction (AMI). The CDC therapy resulted in decreased scar size, improved regional systolic function, and attenuation of adverse cardiac remodeling (manifested as preserved global systolic function, preserved end-systolic volume, and decreased interstitial fibrosis) compared to placebo at 30 days post-MI.

**Conclusions:** Dose - optimized intracoronary infusion of allogeneic CDCs prior to reperfusion in a porcine model of AMI is feasible, safe and confers long term benefits.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

1. Salim S. Virani, MD, PhD, FAHA, Alvaro Alonso, MD, PhD, FAHA Emelia J. Benjamin, MD, ScM, FAH et al Heart Disease and Stroke Statistics— 2020 Update A Report From the American Heart Association Circulation <https://www.ahajournals.org/journal/circ>
2. Gerber Y, Weston SA, Enriquez-Sarano M, et al. Atherosclerotic burden and heart failure after myocardial infarction. JAMA Cardiol. 2016;1(2):156-162.
3. Alnasser SM, Huang W, Gore JM, et al. Late consequences of acute coronary syndromes: Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) Follow-up. Am J Med. 2015;128(7):766-775
4. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation.
5. Kristian Thygesen (Denmark), Joseph S. Alpert (USA), Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)
6. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC)
7. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation.
8. Braunwald's Heart Disease. A textbook of Cardiovascular Medicine. 10th Edition, Mann, Zipes, Libby, Bonow et al, editor Elsevier ; 2015
9. C E. Rochitte, Jo A.C. Lima. Magnitude and Time Course of Microvascular Obstruction and Tissue Injury After Acute Myocardial Infarction. Circulation. 1998;98:1006-1014.

10. A K. Singhal, J. D Symons. Role of Endothelial Cells in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *Vasc Dis Prev.* 2010 ; 7: 1-14.
11. G. Ambrosio and I. Tritto. Myocardial reperfusion injury. *European Heart Journal Supplements* (2002) 4 (Supplement B), B28-B30
12. Georg M. Frohlich, Pascal Meier et al, Myocardial reperfusion injury: looking beyond primary PCI. *European Heart Journal* (2013) 34, 1714-1724 doi:10.1093/eurheartj/eh090
13. M Neri, I Riezzo, N Pascale et al Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Hindawi Mediators of Inflammation* Volume 2017, Article ID 7018393, <https://doi.org/10.1155/2017/7018393>.
14. Ευρωπαϊκή Καρδιολογική Εταιρεία παρουσίαση του Pasquale Pagliaro, πανεπιστήμιο του Torino, με τίτλο Mechanisms of ischemia reperfusion injury (IRI). [https://www.escardio.org/staticfile/Escardio/Education/Courses/Basic%20science%20summer%20school/Revised\\_Pagliari.pdf](https://www.escardio.org/staticfile/Escardio/Education/Courses/Basic%20science%20summer%20school/Revised_Pagliari.pdf)
15. R Kloner, C. E. Ganote, and R. B. Jennings. The "No-Reflow" Phenomenon after Temporary Coronary Occlusion in the Dog. *The journal of Clinical Investigation* Volume 54. December 1974. 1496-1508.
16. Reffelmann T, Kloner RA. The "no reflow" phenomenon :basic science and clinical correlates. . *Heart.* 2002 Feb;87(2):162-8.
17. Rezkalla SH, Kloner RA. No-reflow phenomenon. *Circulation.* 2002;105(5):656-662.
18. T. Reffelmann, R A. Kloner Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1099-H1107, 2002. May 23, 2002; 10.1152/ajpheart.00270.2002.

19. Ambrosio G, Weisman HF, Manissi JA, Becker LC. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation*. 1989;80(6): 1846-1861.
20. Bouleti C, Mewton N, et al The no-reflow phenomenon: State of the art *Cardiovasc Dis*. 2015 Dec;108(12):661-74. doi: 10.1016/j.acvd.2015.09.006. Epub 2015 Nov 23.
21. E. Eeckhout, M. J. Kern The coronary no-reflow phenomenon: a review of mechanisms and therapies *European Heart Journal* (2001) 22, 729-739 doi:10.1053/euhj.2000.2172, available online at <http://www.idealibrary.com>
22. L.R.Goldberg, In the clinic. *Heart Failure. Annals of Internal Medicine*. vol 152, no11, p. ITC61-15, 2010 quiz ITC616.
23. J. S. HOCHMAN, B.H. BULKLEY. Expansion of Acute Myocardial Infarction: An Experimental Study *Circulation* 65, No. 7, 1982.
24. M. G. St. John Sutton, N. Sharpe, Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction *Pathophysiology and Therapy*. (*Circulation*. 2000;101:2981-2988.)
25. Pfeffer MA, Barunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. 1990;81:1161-1172.
26. Schirone L, Forte M, Palmerio S, et al. A review of the molecular mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:3920195.
27. Burns RJ, Gibbons RJ, Yi Q, et al. The relationships of left ventricular ejection fraction, end-systolic volume index and infarct size to six-month mortality after hospital discharge following myocardial

- infarction treated by thrombolysis. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39(1):30-36.
28. Gibbons RJ, Valeti US, Araoz PA, Jaffe AS. The quantification of infarct size. *J Am Col Cardiol.* 2004;44(8):1533-1542.
29. Biesbroek PS, Amier RP, Teunissen P, et al. Changes in remote myocardial tissue after acute myocardial infarction and its relation to cardiac remodeling: a CMR T1 mapping study. *PLoS One.* 2017;12(6):e0180115.
30. M Konstam, DG. Kramer, AR. Pate et al Left Ventricular Remodeling in Heart Failure Current Concept in Clinical Significance and Assessment *JACC: Cardiovascular Imaging* Volume 4, Issue 1, January 2011 DOI: 10.1016/j.jcmg.2010.10.008
31. H. White, R Norris, M. Brown et al Left ventricular end systolic volume as the mazor determinant of survival after recovery from myocardial infraction. *Circulation* 76, No.1, 44-51, 1987
32. RQ Migrino, JB Young, SG Elis et al. End End-systolic volume index at 90 to 180 minutes into reperfusion therapy for acute myocardial infarction is a strong predictor of early and late mortality. The *Global Utilization of Streptokinase and t-PA for Occluded Coronary Arteries (GUSTO)-I Angiographic Investigators.* *Circulation* 1997;96:116-121 doi: 10.1161/01.cir.96.1.116.
33. R Wake, M Yoshiyama et al. History of Coronary Angiography. doi: 10.5772/22578.
34. S Huang and N G Frangogiannis. Anti-inflammatory therapies in myocardial infarction: failures, hopes and challenges. *British Journal of Pharmacology* (2018) 175 1377-1400 1377.

35. T. Eschenhagen, R. Bolli et al. Cardiomyocyte Regeneration. *Circulation*. 2017;136:680-686. doi: 10.1161/circulationaha.117.029343
36. K D Poss , L.G Wilson, M.T Keating. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 2002 Dec 13;298(5601):2188-90. doi: 10.1126/science.1077857.
37. J Itou, H Kawakami. Life-long preservation of the regenerative capacity in the fin and heart in zebrafish. *Biology Open* 1, 739-746 doi: 10.1242/bio.20121057
38. Beltrami AP, Barlucchi L, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration *Cell*. 2003;114(6):763-76.
39. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, Zupicich J, Alkass K, Buchholz BA, Druid H, Jovinge S, Frisén J. Evidence of cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324(5923):98-102.
40. Davis DR, Kizana E, Terrovitis J, Barth AS, Zhang Y, Smith RR, Miake J, Marbán E. Isolation and expansion of functionally competent cardiac progenitor cells directly from heart biopsies. *J Mol Cell Cardiol*. 2010; 49(2):312-21.
41. A.P. Beltrami, K. Urbanek et al. Evidence That Human Cardiac Myocytes Divide after Myocardial Infarction, *N Engl J Med* 2001; 344:1750-1757
42. Malliaras K, Marbán E. Cardiac cell therapy: where we've been, where we are, and where we should be headed. *Br Med Bull*. 2011; 98:161-85.
43. P. Menasché, A. A. Haeghe, M. Scorsin et al. Myoblast transplantation for heart failure *THE LANCET* • Vol 357 • January 27, 2001

- 44.P Menasche, A. A. Hagege, et al. Autologous Skeletal Myoblast Transplantation for Severe Postinfarction Left Ventricular Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* Vol. 41, No. 7, 2003. Published by Elsevier Science Inc. doi:10.1016/S0735-1097(03)00092-5
- 45.P Menasché, MD, O Alfieri, MD, Sn Janssens, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) Trial First Randomized Placebo-Controlled Study of Myoblast Transplantation *Circulation*. 2008;117:1189-1200.
- 46.Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell*. 2011; 8:389-398.
- 47.M.B. Britten,N.D. Abolmaali, MD et al. Infarct Remodeling After Intracoronary Progenitor Cell Treatment in Patients With Acute Myocardial Infarction(TOPCARE-AMI)Mechanistic Insights From Serial Contrast-Enhanced Magnet Resonance Imaging. *Circulation*. 2003;108:2212-2218.)
- 48.J.H. Traverse, T. Henry et al. TIME Trial: Effect of Timing of Stem Cell Delivery Following ST - Elevation Myocardial Infarction on the Recovery of Global and Regional Left Ventricular Function. Final 2 year analysis. *Circ Res*. 2018 February 02; 122(3): 479-488. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311466
49. D.Orlic, J. Kazustra, S.Chimenti et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001. Apr 5;410(6829):701-5.doi 10.1038/35070587.
- 50.V.Karantalis , J.M.Hare. Use of Mesenchymal Stem Cells for therapy of Cardiac Diseases. *Circ Res*. 2015 April 10; 116(8): 1413-1430. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303614.

51. LC Amado, Saliaris AP, Schuleri KH, St John M, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Aug 9;102(32):11474-9. Epub 2005 Aug 1.
52. A. van Dijk, B.A. Naaijens. Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. 2011 Elsevier. doi:10.1016/j.scr.2011.06.003.
53. D. Baksh, L. Song, R. Tuan. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 8, No 3 2004 pp301-316.
54. J.L. Spees, R.H. Lee, C.A. Gregory. Mechanisms of mesenchymal stem stromal cell function. Spees et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2016) 7:125 DOI 10.1186/s13287-016-0363-7
55. 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(9):911-21.
56. Chimenti I, Smith RR, Li TS, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res*. 2010;106(5): 971-980
57. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation*. 2012;125(1): 100-112.
58. Ibrahim AG, Cheng K, Marban E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Reports*. 2014;2(5):606-619.



- 59.G de Couto, Liu W, Tseliou E, et al. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2015;125(8):3147-3162.
- 60.D.J. Lefer, E Marbán, Is Cardioprotection dead? *Circulation*. 2017 July 04; 136(1): 98-109. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.027039.
61. Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115(7):896-908.
62. Johnston PV, Sasano T, Mills K, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009; 120(12):1075-1083.
63. E Marban. Breakthroughs in Cell Therapy for Heart Disease: Focus on Cardiosphere-Derived Cells. *Mayo Clin Proc*. 2014 June;89(6): 850-858. doi:10.1016/j.mayocp.2014.02.014
64. Weil BR, Suzuki G, Leiker MM, et al. Comparative efficacy of intracoronary allogeneic mesenchymal stem cells and cardiosphere-derived cells in swine with hibernating myocardium. *Circ Res*. 2015;117(7):634-644.
65. Li TS, Cheng K, Malliaras K, et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(10):942-953
66. M. Rota, E Pandin Iruegas, et al. Local Activation or Implantation of Cardiac Progenitor Cells Rescues Scarred Infarcted Myocardium Improving Cardiac Function. *Circ Res*. 2008;103:107-116
67. Carolyn A. Carr, Daniel J. Stuckey, et al. Cardiosphere-Derived Cells Improve Function in the Infarcted Rat Heart for at Least 16 Weeks - an MRI Study, *PLoS One*. 2011; 6(10): e25669.

68. Tseliou E, de Couto G, Terrovitis J, et al. Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres. *PLoS One*. 2014;9(2):e88590
69. Lee ST, White AJ, Matsushita S, et al. Intramyocardial injection of autologous Cardiospheres or Cardiosphere-Derived Cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll. Cardiol*. 2011; 57:455-265.
70. Li TS, Cheng K, Lee ST, Matsushita S, Davis D, et al. Cardiospheres recapitulate a niche-like microenvironment rich in stemness and cell-function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll. Cardiol*. 2011; 57:455-265.
71. Tseliou E, Pollan S, et al. Allogeneic cardiospheres safely boost cardiac function and attenuate adverse remodeling after myocardial infarction in immunologically mismatched rat strains. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Mar 12;61(10):1108-19. doi: 10.1016/j.jacc.2012.10.052. Epub 2013 Jan 23
72. Crisostomo V, Baez-Diaz C, Maestre J, et al. Delayed administration of allogeneic cardiac stem cell therapy for acute myocardial infarction could ameliorate adverse remodeling: experimental study in swine. *J Transl Med*. 2015;13:156.
73. Crisostomo V, Baez C, Abad JL, et al. Dose-dependent improvement of cardiac function in a swine model of acute myocardial infarction after intracoronary administration of allogeneic heart derived cells. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):152.
74. Suzuki G, Weil BR, Leiker MM, et al. Global intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere-derived cells improves ventricular function and

stimulates endogenous myocyte regeneration throughout the heart in swine with hibernating myocardium. *PLoS One*. 2014;9(11):e113009.

75. Suzuki G, Weil BR, Young RF, et al. Nonocclusive multivessel intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere-derived cells early after reperfusion prevents remote zone myocyte loss and improves global left ventricular function in swine with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2019;317(2): H345-H356.
76. Malliaras K, Zhang Y, Sheinfeld J, et al. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med*. 2013;5(2):191-209
77. Malliaras K, Smith RR, Kanazawa H, et al. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. *Circulation*. 2013;128(25):2764-2775.
78. Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras K, et al. Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2015;8(2):322-332.  
10 *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* XX(X)
79. Kanazawa H, Tseliou E, Dawkins JF, et al. Durable benefits of cellular postconditioning: long-term effects of allogeneic cardiosphere-derived cells infused after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*. 2016;5(2): e002796
80. R Bolli, A.R Chugh, D D'Amario, J. H Loughran. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 2011; 378: 1847-57  
DOI:10.1016/S0140-6736(11)61590-0.

81. R. Chugh, G M. Beache Administration of Cardiac Stem Cells in Patients With Ischemic Cardiomyopathy: The SCIPIO Trial Surgical Aspects and Interim Analysis of Myocardial Function and Viability by Magnetic Resonance (Circulation. 2012;126[suppl 1]:S54 -S64.) DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.092627
82. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2012; 379(9819):895-904.
83. Malliaras K, Makkar RR, et al. Intracoronary cardiosphere derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CArdiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jan 21; 63(2):11022. doi:10.1016/j.jacc.2013.08.724. Epub 2013.
84. Chakravarty T, Makkar RR, et al. ALLogenic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial: Rationale and Design. *Cell Transplant*. 2017 Feb 16; 26(2):205-214. doi: 10.3727/096368916X692933. Epub 2016 Aug 18
85. R. R. Makkar, D. J. Kereiakes, Frank Aguirre, et al. Intracoronary ALLogenic heart STem cells to Achieve myocardial Regeneration (ALLSTAR): a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial. *European Heart Journal*, Volume 41, Issue 36, 21 September 2020, Pages 3451-3458, <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehaa541>
86. R. Sanz-Ruiz, A. C. Plasencia, L. R. Borlado et al. Rationale and Design of a Clinical Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction The

Randomized Multicenter Double-Blind Controlled CAREMI Trial. Cardiac Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circ Res*. 2017;121:71-80. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310651.

87. F. Aviles, Sanz-Ruiz R, Bogaert J, et al. Safety and efficacy of intracoronary infusion of allogeneic human cardiac stem cells in patients with ST-segment elevation myocardial infarction and left ventricular dysfunction. *Circ Res*. 2018; 123(5):579-589.
88. Terrovitis J, Lautamaki R, Bonios M, et al. Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(17):1619-1626.
89. John V. Terrovitis, Rachel Ruckdeschel Smith and Eduardo Marbán. Assessment and Optimization of Cell Engraftment After Transplantation Into the Heart. *Circ Res*. 2010;106:479-494. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.208991.
90. Marunouchi T, Yano E, Tanonaka K. Effects of cardiosphere derived cells transplantation on cardiac mitochondrial oxygen consumption after myocardial infarction in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 108 (2018) 883-892. Elsevier.
91. Taki J, Higuchi T, Kawashima A, et al. Detection of cardiomyocyte death in a rat model of ischemia and reperfusion using <sup>99m</sup>Tc-labeled annexin V. *J Nucl Med*. 2004;45(9):1536-1541
92. BNadal-Ginard, JKajstura, et al Myocyte death, Growth, and Regeneration in Cardiac Hypertrophy and Failure. *Circ Res* 2003;92:139-150

93. J A Wisneski, C N Pfeil, et al. Left ventricular ejection fraction calculated from volumes and areas: underestimation by area method. *Circulation*. 1981;63:149-151. doi: 10.1161/01.CIR.63.1.149.
94. A.L. Moensa, M.J. Claeysa, J.P. Timmermans. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process *International Journal of Cardiology* 100 (2005) 179 - 190 doi:10.1016/j.ijcard.2004.04.013
95. H K Saini MPharm<sup>1</sup>, Y-J Xu PhD MD<sup>1</sup>, M Zhang et al. Role of tumour necrosis factor-alpha and other cytokines in ischemia-reperfusion-induced injury in the heart. *Exp Clin Cardiol* Vol 10 No 4 2005.
96. A M. Lefer, D J. Lefer The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion *Cardiovascular Research* 32 (1996) 743-751
97. Hensley MT, Tang J et al. Intracoronary allogeneic cardiosphere-derived stem cells are safe for use in dogs with dilated cardiomyopathy *J Cell Mol Med*. 2017 Aug;21(8):1503-1512. doi: 10.1111/jcmm.13077. Epub 2017 Mar 15.
98. Cheng K, Li TS, Malliaras K, et al. Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction. *Circ Res*. 2010;106(10): 1570-1581.
99. Cheng K, Malliaras K, Li TS, et al. Magnetic enhancement of cell retention, engraftment, and functional benefit after intracoronary delivery of cardiac-derived stem cells in a rat model of ischemia/reperfusion. *Cell Transplant*. 2012;21(6):1121-1135.
100. J. A Palacios, M. D. Schneider Heart to heart: grafting cardiosphere-derived cells augments cardiac self-repair by both myocytes and stem cells. *EMBO Molecular Medicine* <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201201737>

101. Reich H, Tseliou E, de Couto G, Angert D, et al Repeated transplantation of allogeneic cardiosphere-derived cells boosts therapeutic benefits without immune sensitization in a rat model of myocardial infarction
102. Yee K, Malliaras K, Kanazawa H, Tseliou E, et al. Allogeneic cardiospheres delivered via percutaneous transendocardial injection increase viable myocardium, decrease scar size, and attenuate cardiac dilatation in porcine ischemic cardiomyopathy.
103. L Z, D Mastroeni, N Mutlu. Transplantation of cardiac progenitor cell sheet into infarcted heart promotes cardiogenesis and improves function. *Cardiovascular Research* (2010) 87, 40-49 doi:10.1093/cvr/cvq027
104. Ko Urbanek, Mar Rota, St Cascapera, Cl Bearzi. Regenerate the Infarcted Myocardium, Improving Ventricular Function and Long-Term Cardiac Stem Cells Possess Growth Factor-Receptor Systems That After Activation Regenerate the Infarcted Myocardium, Improving Ventricular Function and Long-Term Survival. *Circ Res.* 2005;97:663-673; doi: 10.1161/01.RES.0000183733.53101.11
105. Ko Urbanek†, D Cesselli, M Rota, et al. Stem cell niches in the adult mouse heart *Cardiovascular Research Institute, Department of Medicine, New York Medical College, Valhalla, NY 10595; and ‡Institute of Molecular Cardiology, Edited by Eugene Braunwald, Harvard Medical School, Boston, MA, and approved April 27, 2006*
106. Xian-Liang Tang, Gregg Rokosh, Santosh K. Sanganalmath. Intracoronary Administration of Cardiac Progenitor Cells Alleviates Left Ventricular. Dysfunction in Rats With a 30-Day-Old Infarction. *Circulation.* 2010;121:293-305; doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.871905
107. J M. Canty Jr, Br R. Weil, and Gen Suzuki. Widespread Intracoronary Cardiopoietic Cell Infusion -Treating at the Time of Myocardial Reperfusion to Prevent Rather than Reverse Established

Left Ventricular Dysfunction Moves Us Closer to Practical Clinical Translation *Circ Res.* 2016 April 1; 118(7): 1045-1048. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.308518.

108. D Shen, K Cheng , Eduardo Marban. Dose-dependent functional benefit of human cardiosphere transplantation in mice with acute myocardial infarction. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 16, No 9, 2012 pp. 2112-2116.

109. M T Hensley , J Tang, K Woodruff, Teresa Defrancesco et al. Intracoronary allogeneic cardiosphere-derived stem cells are safe for use in dogs with dilated cardiomyopathy. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 21, No 8, 2017 pp. 1503-1512

110. B R. Brodie, Ch Hansen et al. Door-to-Balloon Time With Primary Percutaneous Coronary Intervention for Acute Myocardial Infarction Impacts Late Cardiac Mortality in High-Risk Patients and Patients Presenting Early After the Onset of Symptoms. *Journal of the American College of Cardiology.* doi:10.1016/j.jacc.2005.08.065

111. E. Boersma and The Primary Coronary Angioplasty vs. Thrombolysis (PCAT)-2 Trialists Collaborative Group. Does time matter? A pooled analysis of randomized clinical trials comparing primary percutaneous coronary intervention and in-hospital fibrinolysis in acute myocardial infarction patients. *European Heart Journal* (2006) 27, 779-788 doi:10.1093/eurheartj/ehi810

112. Scholz KH, Maier SKG, Maier LS, et al. Impact of treatment delay on mortality in ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) patients presenting with and without haemodynamic instability: results from the German prospective, multicentre FITT-STEMI trial. *Eur Heart J.* 2018;39(13):1065-1074



