



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Γ' ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
Καθηγητής Εμμανουήλ Βαβουρανάκης**

**Χορήγηση αυτόλογων προγονικών καρδιακών
κυττάρων σε επίμυες με πειραματική αυτοάνοση
μυοκαρδίτιδα**

ΕΜΜΕΛΕΙΑ Σ. ΝΑΝΑ

Ιατρός

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΘΗΝΑ 2019**

Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΗ

Ὁμνιμι Ἀπόλλωνα ἡτῖρον, καὶ Ἀσκληπιόν, καὶ Ὑγίαν, καὶ Πανάκειαν, καὶ θεοὺς πάντας τε καὶ πάσας, ἱστορας ποιέμενος, ἐπιτελέα ποιήσων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν ὅρκον τόνδε καὶ ξυγγραφὴν τήνδε, ἡγήσασθαι μὲν τὸν διδάξαντά με τὴν τέχνην ταύτην ἴσα γέγετῃσιν ἐμοῖσι, καὶ βίου κοινωνήσασθαι, καὶ χρεῶν χρηίζοντι μετάδοσιν ποιήσασθαι, καὶ γένος τὸ ἐξ αὐτέου ἀδελφοῖς ἴσον ἐπικρυῖεν ἄρρεσι, καὶ διδάξω τὴν τέχνην ταύτην, ἣν χρηίζωσι μανθάνειν, ἄνευ μισθοῦ καὶ ξυγγραφῆς, παραγγέλως τε καὶ ἀκροήσιος καὶ τῆς λοιπῆς ἀπάσης μαθήσιος μετάδοσιν ποιήσασθαι υἱοῖσι τε ἐμοῖσι, καὶ τοῖσι τοῦ ἐμὲ διδάξαντος, καὶ μαθηταῖσι συγγεγραμμένοις τε καὶ ὠρκισμένοις νόμῳ ἡτρικῷ, ἄλλω δὲ οὐδενί. Διαιτήμασί τε χρῆσθαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων κατὰ δύναμιν καὶ κρίσιν ἐμὴν, ἐπὶ δηλήσει δὲ καὶ ἀδικίᾳ εἶρξεν. Οὐ δώσω δὲ οὐδὲ φάρμακον οὐδενὶ αἰτηθεὶς θανάσιμον, οὐδὲ ὑφηρεῖσθαι ξυμβουλὴν τοιήδε, ὁμοίως δὲ οὐδὲ γυναικὶ πεσόντι φθόρον δώσω. Ἀγνώως δὲ καὶ ὁσίως διατηρήσω βίον τὸν ἐμὸν καὶ τέχνην τὴν ἐμήν. Οὐ τεμέω δὲ οὐδὲ μὴν λιθιῶντας, ἐκχωρήσω δὲ ἐργάτησιν ἀνδράσι πρήξις τῆσδε. Ἐς οὐκίας δὲ ὁκόσας ἂν εἰώω, ἐσελεύσομαι ἐπ' ὠφελείῃ καμνόντων, ἐκτὸς ἔων πάσης ἀδικίης ἐκουσίης καὶ φθοράς, τῆς τε ἄλλης καὶ ἀφροδισίων ἔργων ἐπὶ τε γυναικείων σωμαμάτων καὶ ἀνδράων, ἐλευθέρων τε καὶ δούλων. Ἄ δ' ἂν ἐν θεραπείῃ ἢ ἴδω, ἢ ἀκούσω, ἢ καὶ ἄνευ θεραπείης κατὰ βίον ἀνθρώπων, ἃ μὴ χρή ποτε ἐκλαλέεσθαι ἔξω, σιγήσομαι, ἄρρητα ἡγείμενος εἶναι τὰ τοιαῦτα. Ὅρκον μὲν οὖν μοι τόνδε ἐπιτελέα ποίεοντι, καὶ μὴ ξυγχείοντι, εἴη ἐπαύρασθαι καὶ βίου καὶ τέχνης δοξαζομένῃ παρὰ πᾶσι ἀνθρώποις ἐς τὸν αἰῶν χρόνον, παραβαίνοντι δὲ καὶ ἐπιωκοῦντι, τὰ ναντία τουτέων

Ημερομηνία αιτήσεως υποψηφίου: 21/09/2012

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής: 9/10/2012

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής-Αρχική:

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δ. Σανούδου - Επιβλέπον μέλος

Επίκουρος Καθηγητής Ι. Τερροβίτης

Καθηγητής Β. Γοργούλης

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής-Από 30-4-2014:

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δ. Σανούδου - Επιβλέπον μέλος

Καθηγητής Ε. Ηλιοδρομίτης

Καθηγητής Β. Γοργούλης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20/2/2015

Ημερομηνία καταθέσεως της διδακτορικής διατριβής: 4/7/2018

Πρόεδρος ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ: Καθηγητής Π. Σφηκάκης

Μέλη επταμελούς εξεταστικής επιτροπής:

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Δ. Σανούδου

Καθηγητής Ε. Ηλιοδρομίτης

Καθηγητής Β. Γοργούλης

Αναπληρωτής Καθηγητής Ι. Οικονομίδης

Αναπληρωτής Καθηγητής Θ. Παπαϊωάννου

Επίκουρη Καθηγήτρια Μ. Ρουμπελάκη

Ερευνητής Γ' Μ. Μαυροειδής

Βαθμός διδακτορικής διατριβής: Άριστα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I.ΠΡΟΛΟΓΟΣ	7
II. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	10
III.ΠΙΝΑΚΑΣ ΚΥΡΙΩΤΕΡΩΝ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ	27
IV. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	29
1. ΜΥΟΚΑΡΔΙΤΙΔΑ.....	30
1.1 Ορισμός.....	30
1.2 Αίτια.....	30
1.3 Επιδημιολογία.....	33
1.4 Παθοφυσιολογία	36
1.4.1 Οι 3 φάσεις της μυοκαρδίτιδας	36
1.4.2 Φλεγμονή του μυοκαρδίου.....	40
1.4.3 Αυτοανοσία στην μυοκαρδίτιδα.....	46
1.5 Κλινική εκδήλωση	50
1.6 Διάγνωση	51
1.6.1 Ενδομυοκαρδιακή βιοψία	54
1.7 Θεραπεία.....	56
1.7.1 Υποστηρικτική θεραπεία της μυοκαρδίτιδας.....	57
1.7.2 Ειδικές Θεραπείες	58
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΜΥΟΚΑΡΔΙΤΙΔΑ	63
3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	66
3.1 Βασικές αρχές καρδιακής αναγέννησης	66
3.2 Μηχανισμοί αναγέννησης.....	67
3.3 Κυτταρική θεραπεία.....	71
3.4 Μηχανισμοί δράσης της κυτταρικής θεραπείας	72
3.5 Κυτταρικές ομάδες υπό μελέτη για καρδιακές παθήσεις	72
3.5.1 Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs)	73
3.5.2 Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC).....	73
3.5.3 Σκελετικοί μυοβλάστες	74

3.5.4 Κύτταρα που προέρχονται από των μυελό των οστών.	75
3.5.5 Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs)	76
3.5.6 Καρδιακά προγονικά κύτταρα (CPCs).....	77
V.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	80
1. ΥΠΟΘΕΣΗ	81
2. ΣΚΟΠΟΣ	82
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ.....	83
3.1 Πειραματόζωα	83
3.2 Παρακολούθηση και ευζωία των πειραματόζων	83
3.3 Απομόνωση και καλλιέργεια προγονικών καρδιακών κυττάρων.....	84
3.4 Πρόκληση πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας	86
3.5 Έγχυση καρδιακών προγονικών κυττάρων	88
3.6 Ευθανασία πειραματόζων	89
3.7 Παράμετροι υπό μελέτη.....	90
3.7.1 Διαθωρακική υπερηχογραφική μελέτη	90
3.7.2 Ιστοπαθολογική ανάλυση.....	90
3.7.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη.....	91
3.7.4 Στατιστική ανάλυση	93
4. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΜΥΟΚΑΡΔΙΤΙΔΑΣ.....	94
5.ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ	98
5.1 Ανεπιθύμητα συμβάματα και θνησιμότητα	98
5.2 Περιγραφή πειραμάτων που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο	98
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	115
6.1 Διαθωρακική υπερηχογραφική μελέτη.....	115
6.2 Φλεγμονώδης διήθηση.....	123
6.3 Ίνωση του μυοκαρδίου	129
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	133
8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	142
VI.ΠΕΡΙΛΗΨΗ	143
VII.SUMMARY	145

VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	147
-------------------------	-----

Ι.ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε υπό την αιγίδα της Γ' Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας» της Ιατρικής σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Η τριμελής συμβουλευτική επιτροπή της διδακτορικής αυτής διατριβής αποτελείται από την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα Δέσποινα Σανούδου, τον Καθηγητή κ. Ευστάθιο Ηλιοδρομίτη και τον Καθηγητή κ. Βασίλειο Γοργούλη.

Για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν πολύτιμη και απαραίτητη η βοήθεια πολλών προσώπων, που από την πλευρά τους και με τον δικό τους τρόπο ο καθένας συνέβαλαν στην ολοκλήρωση της. Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς:

Τον Καθηγητή κ. Ιωάννη Νανά που από τα πρώτα μου βήματα στην Ιατρική, μου έδωσε την ευκαιρία να έρθω σε επαφή με την έρευνα μιας ομάδας υψηλών προδιαγραφών ανοίγοντας μπροστά μου ένα τεράστιο πεδίο. Μου έδωσε την ευκαιρία να έρθω πιο κοντά στην κλινική ιατρική ενώ ταυτόχρονα με μύησε στην πειραματική και κλινική έρευνα μέσα από μια δυνατή εμπειρία ζωής με πολύ δουλειά και πλούσιους καρπούς για την επαγγελματική αλλά και προσωπική μου πορεία. Με δίδαξε με πατρική αγάπη με τις συμβουλές του αλλά και με το παράδειγμα του την αγάπη για τον ασθενή, την ιατρική, την δουλειά και την έρευνα.

Την επιβλέπουσα Καθηγήτρια μου κα Δέσποινα Σανούδου που από την αρχή στάθηκε ακούραστα δίπλα μου, διαθέτοντας χρόνο και κόπο ενώ παράλληλα μου προσέφερε πολλές ευκαιρίες για να διευρύνω το ερευνητικό μου πεδίο. Το ενδιαφέρον και η συνεχής επαγρύπνησή της, αποτέλεσαν την κινητήρια δύναμη για την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Επίσης ευχαριστώ για τη στήριξη τους, ως μέλη της

συμβουλευτικής επιτροπής τους Καθηγητές κ. Ευστάθιο Ηλιοδρομίτη και κ. Βασίλειο Γοργούλη.

Τον αείμνηστο Επίκουρο Καθηγητή Ιωάννη Τερροβίτη ο οποίος ήταν ο εμπνευστής της παρούσας διδακτορικής διατριβής και έθεσε τα θεμέλια πάνω στα οποία κτίστηκε όλη αυτή η προσπάθεια. Τον ευγνωμονώ όχι μόνο γιατί μου εμπιστεύτηκε ένα τόσο σπουδαίο και όμορφο θέμα αλλά γιατί αποτέλεσε για εμένα πηγή έμπνευσης και πρότυπο ιατρού, επιστήμονα, ερευνητή και ανθρώπου.

Το Διδάκτορα της Ιατρικής και Επίκουρο Καθηγητή (UCLA) Κωσταντίνο Μαλλιάρρα που με τις πλούσιες γνώσεις και την εμπειρία του, έκανε τις αναγκαίες τροποποιήσεις του πρωτοκόλλου ενώ συνέβαλε και στην ολοκλήρωση των πειραμάτων αποτελώντας ακρογωνιαίο λίθο για την ολοκλήρωση του πειραματικού πρωτοκόλλου και της διδακτορικής διατριβής. Τέλος, τον ευχαριστώ θερμά που διέθεσε πολύ χρόνο και δουλειά για τη λεπτομερή ανασκόπηση της διατριβής.

Τους συνεργάτες μου σε όλη αυτή την πορεία, Μαρία Νανά, Αλέξανδρο Σγουρίδη, Βασίλειο Σουσώνη και Μιχάλη Μπόνιο για την πολύτιμη βοήθεια τους στην εκτέλεση των πειραμάτων.

Την Καθηγήτρια κα Δέσποινα Περρέα καθώς και όλο το προσωπικό και τους συνεργάτες του Εργαστηρίου Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας» της Ιατρικής σχολής ΕΚΠΑ για την συμβολή τους στην επιτυχή ολοκλήρωση των πειραμάτων στον χώρο του εργαστηρίου.

Την Διευθύντρια του Παθολογοανατομικού τμήματος του Γ.Ν.Α. «ο Ευαγγελισμός», κα Δήμητρα Ροντογιάννη και τους ιατρούς Γεώργιο Ανδρέου και Νικόλαο Πουλιανίτη για την πολύτιμη βοήθεια τους και την πολύ καλή συνεργασία για την διεκπεραίωση όλων των παθολογοανατομικών διεργασιών της παρούσας διδακτορική διατριβής.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τον σύζυγο και συμπαραστάτη μου Νίκο που από την αρχή στάθηκε δίπλα μου με υπομονή και επιμονή δίνοντάς μου δύναμη να συνεχίσω και να ξεπερνάω τις δυσκολίες.

Ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου Σεραφείμ και Μαρίνα που με στήριζαν στη προσπάθειά μου αυτή, όπως πάντα με αγάπη, κατανόηση και διάκριση. Το παράδειγμά τους ως ιατροί, επιστήμονες αλλά κυρίως γονείς και άνθρωποι αποτελεί για εμένα φωτεινό σηματοδότη στην μέχρι τώρα προσωπική και επαγγελματική μου ζωή. Ευχαριστώ επίσης μέσα από την κάρδιά μου και την «δεύτερη» μητέρα μου Αθηνά που χωρίς την πολύτιμη βοήθεια της στην ανατροφή των παιδιών μας δεν θα ήταν δυνατόν να ολοκληρώσω την διδακτορική διατριβή.

II. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Όνοματεπώνυμο: **Εμμέλεια Νανά-Λεβεντάκη**

Πατρώνυμο: Σεραφείμ Νανάς

Μητρώνυμο: Μαρίνα Μανδηλαρά

Οικογενειακή κατάσταση: Έγγαμη, μητέρα τριών παιδιών

Όνομα συζύγου: Νικόλαος Λεβεντάκης

Τόπος γέννησης: Αμαρούσιο Αττικής

Ημ. γέννησης: 13/1/1989

Τηλέφωνο: 6998680123

e-mail: emmeleianana@hotmail.com

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

1994-2000: 32^ο δημοτικό σχολείο Περιστερίου

2000-2003: Ιδιωτικό γυμνάσιο Ηρακλείου Αττικής «Ελληνική Παιδεία».

Βαθμός απολυτηρίου: δεκαεννέα και επτά δέκατα τρίτα (19 7/13)

2003-2006: Ιδιωτικό ενιαίο λύκειο Ηρακλείου Αττικής «Ελληνική Παιδεία».

Βαθμός Απολυτηρίου: δεκαεννέα και οκτώ δέκατα (19 8/10)

2006-2012: Πτυχίο Ιατρικής σχολής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Βαθμός πτυχίου: 8,31 Λίαν καλώς

2012-8/2014: Επιστημονικός συνεργάτης Γ' Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής, Λαϊκό Νοσοκομείο Αθηνών

2012-σημερα: Υποψήφια Διδάκτωρ ΕΚΠΑ

7/2016-5/2017: Ειδικευόμενη παιδιατρικής στην Πανεπιστημιακή Νεογνολογική Κλινική του Αρεταιείου Νοσοκομείου

8/2017-2/2018: Ειδικευόμενη παιδιατρικής στο Β παιδιατρικό Τμήμα του Νοσοκομείου Παίδων Παναγιώτου και Αγλαΐας Κυριακού.

7/2018-σήμερα: Ειδικευόμενη παθολογίας στο Νοσοκομείο Αγία Ελένη

ΓΛΩΣΣΕΣ

Ελληνικά: Μητρική γλώσσα

Αγγλικά: Άριστο επίπεδο.

Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Εμμέλεια Νανά

- Certificate of Proficiency in English, university of Michigan.
- Κρατικό πιστοποιητικό γλωσσομάθειας επίπεδο B2

Ελληνική Νοηματική Γλώσσα

- Διετές σεμινάριο εκμάθησης Ελληνικής Νοηματικής Γλώσσας (2009-2011)
- Επιτυχής ολοκλήρωση πρώτου έτους σπουδών για την εκμάθηση της Ελληνικής Νοηματικής Γλώσσας στην Σχολή Ελληνικής Νοηματικής Γλώσσας της Ομοσπονδίας Κωφών Ελλάδος.(2014-2015)

ΓΝΩΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΟΥ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΗ

Πολύ καλή γνώση χρήσης ηλεκτρονικού υπολογιστή

- Πιστοποιητικό ECDL core γνώσης ηλεκτρονικών υπολογιστών.
- Certification of Microsoft office specialist (word, excel)
- Καλή γνώση στατιστικού προγράμματος SPSS

ΕΠΙΜΟΡΦΩΣΗ

- Προαιρετική άσκηση «Εφαρμοσμένη Φυσιολογία-Γενική Ιατρική», 17 έως 21 Δεκεμβρίου 2007 στο Κέντρο Υγείας Βύρωνα
- 4th First Aid Trainer- FAT σεμινάριο της HelMSIC, 14 και 16 Μαΐου 2012
- Εκπαίδευση και πιστοποίηση για την «Υποστήριξη της ζωής του Νεογνού»(Newborn Life Support, NLS) από το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο Αναζωογόνησης (European Resuscitation Council, ERC) ,16 Απριλίου 2016
- Παρακολούθηση σειράς οκτώ μετεκπαιδευτικών μαθημάτων από την Νεογνολογική Κλινική του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών στο Αρεταίειο Νοσοκομείο, Ιανουάριο έως Μάιο 2017

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΟΛΥΚΕΝΤΡΙΚΑ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

1.Δράση της ιβαμπραδίνης σε ασθενείς με σταθερή στεφανιαία νόσο χωρίς κλινική εκδήλωση καρδιακής ανεπάρκειας. Μια τυχαιοποιημένη διπλή τυφλή ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο διεθνής πολυκεντρική μελέτη. Μελέτη αξιολόγησης των πλεονεκτημάτων όσον αφορά τη νοσηρότητα/θνητότητα του αναστολέα των διαύλων if ιβαμπραδίνη σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο. (SIGNIFY) Επιστημονικός υπεύθυνος: Ι.Νανάς

2.Τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο μελέτη βάσει συμβάντων του υποδόριου canakinumab χορηγούμενο ανά τρίμηνο για την πρόληψη των επανεμφανιζόμενων καρδιαγγειακών συμβαμάτων σ ασθενείς σε σταθερή

κατάσταση μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου με αυξημένη C αντιδρώσα πρωτεΐνη υψηλής ευαισθησίας (hsCRP).(CANTOS) Επιστημονικός υπεύθυνος: Ι. Νανάς

3.«Η διερεύνηση του γενετικού υποστρώματος της διατακτικού τύπου, της υπερτροφικής και της αρρυθμιογόνου μυοκαρδιοπάθειας της δεξιάς κοιλίας» (The Dilated, Obstructive – Hypertrophic and Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy Registry) (QCRC-IGC) Επιστημονικοί υπεύθυνοι: Ι.Τερροβίτης, Δ.Σανούδου

4. Μια τυχαίοποιημένη, διπλά τυφλή, με διπλό εικονικό φάρμακο, πολυκεντρική μελέτη για την εκτίμηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του BAY 94-8862 σε συμμετέχοντες που προσέρχονται επειγόντως στο Νοσοκομείο εξαιτίας επιδεινούμενης χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας με συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και είτε με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με ή χωρίς χρόνια νεφρική νόσο είτε μόνο με μέτρια χρόνια νεφρική νόσο έναντι της επλερενόνης (ARTS-HF) Επιστημονικός υπεύθυνος: Ι.Νανάς

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

9/2012 – 9/2015: Συμμετοχή σε οξέα και χρόνια πρωτόκολλα καρδιακής ανεπάρκειας σε αρρouraίων, χοίρων και βοών με ή χωρίς χορήγηση προγονικών καρδιακών κυττάρων ενδομυοκαρδιακώς ή ενδοστεφανιαίως.

9/2012 – 9/2015: Υπερηχογραφική μελέτη της καρδιακής λειτουργίας επίμυων.

10/2012- 9/2015: Καλλιέργεια προγονικών καρδιακών κυττάρων (CDCs) από επίμυες, χοίρους και βοοειδή.

12/2012- 8/2014: Συλλογή δειγμάτων αίματος, απομόνωση DNA από αίμα, ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση του DNA.

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ-ΕΠΙΔΟΤΗΣΕΙΣ

6/2013: Χρηματοδότηση Ελληνικής Καρδιολογικής εταιρίας για την εκπόνηση της πειραματικής μελέτης: «Χορήγηση αυτόλογων προγονικών καρδιακών κυττάρων σε επίμυες με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα»

2007-2012: Υποτροφία του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών του κληροδοτήματος Αντωνίου Παπαδάκη

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

1. Διάκριση στις 7 καλύτερες προφορικές ανακοινώσεις: Ε.Ρεπάσος, Ε.Καλδάρα, Α.Νταλιάνης, Μ.Μαρούγκας, **Ε.Νανά**, Χ.Καπέλιος, Β.Σουσώνης, Τ. Σφακιανάκη, Ι Μπολέτης, Ι.Τερροβίτης, Ι.Νανάς
Μέθοδος αγγειακής προσπέλασης και επιβίωση ασθενών με καρδιοεμφρυσματικό σύνδρομο
14^ο Πανελλήνιο συνέδριο καρδιακής ανεπάρκειας, Αθήνα 2013
2. Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης: Μ. Μπόνιος, Χ. Μελεξοπούλου, **Ε.Νανά**, Μ.Α.Νανά, Ι.Τερροβίτης, Δ.Περρέα, Ι.Νανάς
Χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων και χειρουργική αναδιαμόρφωση επιδρούν θετικά στην μεταεμφραγματική λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας
15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα Ιανουάριος 2014
3. Διάκριση στις 5 καλύτερες προφορικές ανακοινώσεις: Ε. Ρεπάσος, Ε. Καλδάρα, Χ. Σκαλιώτη, Σ. Βερναδάκης, **Ε. Λεβεντάκη**, Χ. Καπέλιος, Ι. Ταχλιαμπούρης, Ε. Βλάρας, Ζ. Μάργαρη, Κ. Μαλλιάρης, Ι. Μπολέτης, Ι. Νανάς.
Χρόνια διαλείπουσα εξωνεφρική κάθαρση σε τελικού σταδίου καρδιακή ανεπάρκεια: τυχαιοποιημένη μελέτη-αποτελέσματα έτους.
16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2015
4. Βραβείο 2^{ης} καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης: Σ.Βάκρου, Μ.Α.Νανά, **Ε.Λεβεντάκη**, Δ.Περρέα, Ι.Νανάς, Κ.Μαλλιάρης
Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης καρδιακών προγονικών κυττάρων στην οξεία φάση του εμφράγματος»
17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2016
5. Βραβείο 4^{ης} καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης: **Ε.Λεβεντάκη**, Μ.Α.Νανά, Ν.Πουλιανίτης, Σ.Βάκρου, Δ.Περρέα, Δ.Ροντογιάννη, Ι.Νανάς, Κ.Μαλλιάρης.
Καρδιακά προγονικά κύτταρα για τη θεραπεία της αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας,
17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2016

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Ελληνικά συνέδρια

1. **Ε.Νανά**, Α.Τασούλης, Ι.Τατούλη, Σ.Νανάς
Αναπνευστική ενόρμηση και τύπος άσκησης σε ασθενείς καρδιακής ανεπάρκειας

13^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 1^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 2007

2. Μ.Γεωργίου, Φ.Μαρινέλη, **Ε.Νανά**, Σ.Σαμαρά, Μ.Σωτηράκη
IGF-1 knock out και οστική ανάπτυξη

15^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 3^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Θεσσαλονίκη 2009

3. **Ε.Νανά**, Ε. Ηλιοδρομίτης
Στρογγυλή τράπεζα Καρδιολογίας: «Έμφραγμα με ανάσπαση ST»

16^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 4^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 2010

4. **Ε.Νανά**

Επιδημιολογία και παράγοντες κινδύνου της στεφανιαίας νόσου

16^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 4^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 2010

5. **Ε.Νανά**, Χ.Μπακούλα

Στρογγυλή τράπεζα παιδιατρικής: «Κοινωνική διάσταση της υγείας-αρρώστιας στα παιδιά».

18^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 6^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 2012

6. **Ε.Νανά**

Διατροφή και καρκίνος του παχέος εντέρου

18^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 6^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 2012

7. **Ε.Νανά**

Παρεμβάσεις για την προώθηση του μητρικού θηλασμού

18^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 6^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 2012

8. **E. Naná**, Π. Πιτυχούτης, Β. Σουσώνης, Δ. Αρβανίτης, R. Bouchan, P. Barton, M. Yacoub, I. Τερροβίτης, Δ. Σανούδου
Εφαρμογή νέων τεχνολογιών στην σφαιρική διερεύνηση του γενετικού υποστρώματος της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας
34^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό συνέδριο, Αθήνα 2013

9. Μ.Μπόνιος, Μ.Νανά, **E.Νανά**, Τ.Σφακιανάκη, Β.Σουσώνης, Χ.Καπέλιος, Α.Νταλιάνης, Ε.Καλδάρα, Ι.Τερροβίτης
Η χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων σε συνδυασμό με τη χειρουργική επαναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας επιδρούν θετικά στη μετεμφραγματική αναδιαμόρφωση: πειραματική μελέτη
34^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό συνέδριο, Αθήνα 2013

10. Χ.Καπέλιος, Ε.Καλδάρα, Α.Γκουζιούτα, Α.Νταλιάνης, Τ.Σφακιανάκη, **E.Νανά**, J.Stehlik, Σ.Αδαμόπουλος, Σ.Δράκος, Ι.Νανάς Ι.Τερροβίτης
Υπολογισμός πίεσης ενσφήνωσης βάσει της πίεσης του δεξιού κόλπου και παλαιότερων πιέσεων πλήρωσης της αριστερής κοιλίας
34^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό συνέδριο Αθήνα 2013

11. **E.Νανά**, Ε.Καλδάρα
Παρουσίαση δεδομένων του ερευνητικού κέντρου της 3^η Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής κλινικής (centre experience) της πολυκεντρικής μελέτης CANTOS
Local investigator meeting CANTOS, Αθήνα 7/11/2013

12. Ε.Ρεπάσος, Ε.Καλδάρα, Α.Νταλιάνης, Μ.Μαρούγκας, **E.Νανά**, Χ.Καπέλιος, Β.Σουσώνης, Τ. Σφακιανάκη, Ι Μπολέτης, Ι.Τερροβίτης, Ι.Νανάς
Μέθοδος αγγειακής προσπέλασης και επιβίωση ασθενών με καρδιονεφρικό σύνδρομο
14^ο Πανελλήνιο συνέδριο καρδιακής ανεπάρκειας, Αθήνα 2013 (Στις 7 καλύτερες προφορικές ανακοινώσεις)

13. Μ. Μπόνιος, Χ. Μελεξοπούλου, **E.Νανά**, Μ.Α.Νανά, Ι.Τερροβίτης, Δ.Περρέα, Ι.Νανάς

Χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων και χειρουργική αναδιαμόρφωση επιδρούν θετικά στην μεταεμφραγματική λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας
15^ο Πανελλήνιο συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2014 (βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης)

14. Ε. Καλδάρα, **E. Νανά**, Χ. Καπέλιος, Ε. Ρεπάσος, Χ. Πάντσιος, Ζ. Μάργαρη, Ν. Τεντολούρης, Ι. Νανάς

Αυστηρός γλυκαιμικός έλεγχος συνδέεται με επιδείνωση καρδιακής ανεπάρκειας

15^ο Πανελλήνιο συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2014

15. Β. Σουσώνης, Ε. Καλδάρα, Ι. Ταχλιαμπούρης, Χ. Καπέλιος, Χ. Παντσιος, Ε. Ρεπάσος, **E. Νανά**, Ζ. Μάργαρη, Ι. Νανάς

Ανεπιθύμητες ενέργειες και η επίπτωσή τους μετά από χορήγηση αμιωδαρόνης σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια

15^ο Πανελλήνιο συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2014

16. Ε. Καλδάρα, **E. Νανά**, Χ. Καπέλιος, Κ. Μαλλιάρης, Χ. Πάντσιος, Ε. Ρεπάσος, Ι. Ταχλιαμπούρης, Ε. Βλάρης, Μ. Τσαματσούλης, Χ. Χαρίτος, Ι. Νανάς

Εμφάνιση λοιμώξεων στο σημείο εξόδου συσκευής υποβοήθησης σε ασθενείς υπό χρόνια μηχανική υποβοήθηση της αριστερής κοιλίας

35^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2014

17. Ε. Καλδάρα, Χ. Καπέλιος, **E. Νανά**, Κ. Μαλλιάρης, Ε. Ρεπάσος, Χ. Πάντσιος, Ζ. Μάργαρη, Ι. Ταχλιαμπούρης, Ε. Βλάρης, Μ. Τσαματσούλης, Χ. Χαρίτος, Ι. Νανάς

Προγνωστικοί παράγοντες εμφάνισης λοιμώξεων στο σημείο εξόδου συσκευής υποβοήθησης σε ασθενείς υπό χρόνια μηχανική υποβοήθηση της αριστερής κοιλίας

35^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2014

18. Χ. Καπέλιος, Ε. Καλδάρα, Ε. Ρεπάσος, Χ. Πάντσιος, Ε. Βλάρης, Ι. Ταχλιαμπούρης, **E. Νανά**, Κ. Μαλλιάρης, Ζ. Μάργαρη, Ι. Νανάς

Χρόνια συμφόρηση και ηπατική βιοχημεία

35^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2014

19. Ε. Ρεπάσος, Ι. Μακρυλού, Ε. Καλδάρα, Χ. Πάντσιος, Σ. Βερναδάκης, Χ. Καπέλιος, Α. Ευγενίδου, **Ε. Νανά**, Ζ. Μάργαρη, Ι. Μπολέτης, Σ. Νανάς, Ι. Νανάς
Η εφαρμογή χρόνιας διαλείπουσας υπερδιήθησης σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου βελτιώνει το λειτουργικό στάδιο και την ποιότητα ζωής
35^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2014

20. Δ. Αναγνώστου, Ε. Καλδάρα, Τ. Σφακιανάκη, Χ. Καπέλιος, Χ. Πάντσιος, Ε. Ρεπάσος, Ζ. Μάργαρη, **Ε. Νανά**, Ι. Ταχλιαμπούρης, Ι. Νανάς
Χορήγηση σιλδεναφίλης σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου και πνευμονική υπέρταση
35^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2014

21. Ε. Ρεπάσος, Ε. Καλδάρα, Χ. Σκαλιώτη, Σ. Βερναδάκης, **Ε. Λεβεντάκη**, Χ. Καπέλιος, Ι. Ταχλιαμπούρης, Ε. Βλάρας, Ζ. Μάργαρη, Κ. Μαλλιάρης, Ι. Μπολέτης, Ι. Νανάς.
Χρόνια διαλείπουσα εξωνεφρική κάθαρση σε τελικού σταδίου καρδιακή ανεπάρκεια: τυχαιοποιημένη μελέτη-αποτελέσματα έτους.
16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2015 (Στις 5 καλύτερες προφορικές ανακοινώσεις)

22. Χ. Καπέλιος, Ε. Καλδάρα, Ε. Ρεπάσος, **Ε. Λεβεντάκη**, Ι. Ταχλιαμπούρης, Ε. Βλάρας, Ζ. Μάργαρη, Κ. Μαλλιάρης, Ι. Νανάς
Επίδραση της διαχρονικής μεταβολής της πίεσης ενσφήνωσης και της δόσης φουροσεμίδης στην πρόγνωση ασθενών με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια
16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2015

23. Γ.Μήτσιου, Σ.Τοκμακίδης, Σ.Δημόπουλος, Κ.Ψαρρα, Η.Σμήλιος, **Ε.Νανά**, Μ.Κουτρούμπη, Α.Φιλίππου, Λ.Καρατζάνος, Σ.Νανάς.
Κινητοποίηση ενδοθηλιακών προγονικών κυττάρων σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια κατά την αερόβια άσκηση
16^ο πανελλήνιο συνέδριο καρδιακής ανεπάρκειας, Αθήνα 2015

24. **Ε. Λεβεντάκη**, Μ. Νανά, Σ. Βάκρου, Δ. Περρέα, Μ. Αναστασίου-Νανά, Κ. Μαλλιάρας
Καρδιακά προγονικά κύτταρα για τη θεραπεία αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας—
πειραματική μελέτη
36^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2015
25. Χ. Καπέλιος, Σ. Βάκρου, Μ. Νανά, **Ε. Λεβεντάκη**, Δ. Περρέα, Μ. Αναστασίου-Νανά, Κ. Μαλλιάρας
Οξείες και όψιμες καρδιοπροστατευτικές δράσεις της ενδοστεφανιαίας χορήγησης 4-
χλωροδιαζεπάμης σε πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας/επαναιμάτωσης.
36^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Θεσσαλονίκη 2015
26. Σ.Βάκρου, Μ.Α.Νανά, **Ε.Λεβεντάκη**, Δ.Περρέα, Ι.Νανάς, Κ.Μαλλιάρας
Ασφάλεια και αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης καρδιακών
προγονικών κυττάρων στην οξεία φάση του εμφράγματος.
17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2016 (Βραβείο 2^{ης}
καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης)
27. **Ε.Λεβεντάκη**, Μ.Α.Νανά, Ν.Πουλιανίτης, Σ.Βάκρου, Δ.Περρέα,
Δ.Ροντογιάννη, Ι.Νανάς, Κ.Μαλλιάρας.
Καρδιακά προγονικά κύτταρα για τη θεραπεία της αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας.
17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2016 (Βραβείο 4^{ης}
καλύτερης προφορικής ανακοίνωσης).
28. Χ. Καπέλιος, Σ. Βάκρου, Μ. Νανά, **Ε. Λεβεντάκη**, Δ. Περρέα, Μ. Αναστασίου-Νανά, Κ. Μαλλιάρας.
Η επίδραση της 4-χλωροδιαζεπάμης στη βλάβη από επαναιμάτωση.
17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2016
29. Β.Μπουρίκα, **Ε.Νανά**
Μητρικός θηλασμός και προστασία του περιβάλλοντος
16^η Ημερίδα Μητρικού Θηλασμού, Αθήνα 2016

30. **Ε. Λεβεντάκη**, Μ. Αθ. Νανά, Ν. Πουλιανίτης, Σ. Βάκρου, Δ. Ροντογιάννη, Δ. Περρέα, Α. Μανώλης, Μ. Αναστασίου-Νανά, Κ. Μαλλιάρης
Καρδιακά προγονικά κύτταρα σε πειραματικό μοντέλο αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας.
18^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2017

Διεθνή συνέδρια

1. Anastasiou E. , Loukas T. , Gerovasili V. ,**Nana E.** , Priovolos A. ,Papalois A. ,Nanas S.
Cardiopulmonary resuscitation in experimental sepsis
4th International State of the Art congress: “Rehabilitation: mobility, exercise and sports” Athens 2009
2. **E. Nana**, J. Terrovitis, P. Barton, P. Pitychoutis, V. Soussonis, D. Arvanitis, R. Bouchan, R. Wals, K. Al-Shafai, S. Cook, D. Sanoudou, M. Yacoub
New insights into the Genetics of DCM from the QCRC intercontinental Genetic Consortium(QCRC-IGC)
Qatar National Research Fund(QNRF) conference 2013.
3. K.Al-Shafai, D.Sanoudou , P.Barton , L.Shuayb , **E.Nana** , P.Pitychoutis , R.Buchan , R.Walsh , S.Cook , M.Yacoub , M.Alhashemi
Preliminary Results and Clinical Relevance of Next Generation Sequencing in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients in Qatar
Qatar National Research Fund(QNRF) conference 2013.
4. V. Sousonis, E. Kaldara, C. Pantsios, E. Repasos, C. Kapelios, **E. Nana**, Z. Margari, J. Nanas.
PVC suppression with amiodarone is associated with improvement in systolic function: a prospective, randomized study
European Heart Failure Congress, Athens 2014
European J of Heart Failure, # P 168, 2014

5. E. Kaldara, **E. Nana**, C. Kapelios, E. Repasos, C. Pantsios, Z. Margari, N. Tentolouris, J. Nanas.
Intensive glycemc control in patients with diabetes mellitus and chronic heart failure deterioration
European Heart Failure Congress, Athens 2014
European J of Heart Failure, # P 847, 2014

6. M. Bonios, C. Melexopoulou, **E. Nana**, M. Nana, J. Terrovitis, D. Perrea, J. Nanas.
Cardiac derived stem cells combine with left ventricular reconstruction surgery ameliorate remodelling after myocardial infarction: an experimental study
European Heart Failure Congress, Athens 2014
European J of Heart Failure, # P 996, 2014

7. V. Sousonis, E. Kaldara, J. Taxliampouris, C. Kapelios, C. Pantsios, E. Repasos, **E. Nana**, Z. Margari, J. Nanas
Adverse events in heart failure patients treated with long term administration of low dose amiodarone
European Heart Failure Congress, Athens 2014
European J of Heart Failure Suppl 2014

8. I. Makryllou, E. Repasos, E. Kaldara, **E. Leventaki**, I. Tachliabouris, E. Vlaras, C. Kapelios, J. Nanas
Quality of life in advanced heart failure is improved by chronic intermittent renal replacement therapy
European Heart Failure Congress, Seville 2015

9. E. Kaldara, **E. Leventaki**, C. Kapelios, K. Malliaras, E. Repasos, I. Tachliabouris, E. Vlaras, M. Tsamatsoulis, C. Charitos, J. Nanas
Prognostic factors for exit-site infections in patients with LVADs
European Heart Failure Congress, Seville 2015

10. E. Repasos, E. Kaldara, S. Vernadakis, **E. Leventaki**, C. Kapelios, I. Tachliabouris, E. Vlaras, Z. Margari, J. Boletis, J. Nanas
Chronic intermittent renal replacement therapy in end-stage heart failure patients: a randomized study- one-year results.
European Heart Failure Congress, Seville 2015

11. C. Kapelios, E. Kaldara, E. Repasos, **E. Leventaki**, K. Malliaras, I. Tachliabouris, E. Vlaras, Z. Margari, J. Nanas
Increase of furosemide dose has detrimental effects on chronic heart failure patients prognosis independently of the change in pulmonary capillary wedge pressure
European Heart Failure Congress, Seville 2015

12. E. Kaldara, C. Kapelios, **E. Leventaki**, E. Repasos, K. Malliaras, I. Tachliabouris, E. Vlaras, Z. Margari, J. Nanas
Severity of congestion in patients with chronic heart failure is not correlated to peripheral organ dysfunction
European Heart Failure Congress, Seville 2015

13. C. Kapelios, M. Nana, Y. Nanas, S. Vakrou, **E. Leventaki**, I. Tachliabouris, J. Nanas, K. Malliaras, D. Perrea
Early and late cardioprotective effects of intracoronary administration of 4-chlorodiazepam in a rat model of ischemia/reperfusion
European Heart Failure Congress, Seville 2015

14. C. Kapelios, M. Nana, S. Vakrou, C. Kontogiannis, **E. Leventaki**, M. Anastasiou-Nana, D. Perrea, K. Malliaras.
Early and Late Cardioprotective Effects of Intracoronary Administration of 4-Chlorodiazepam in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion
American College of Cardiology(ACC) Annual Scientific Sessions, Chicago 2016

15. **E. Leventaki**, M. Nana, N. Pouliantis, C.J. Kapelios, S. Vakrou, D. Rontogianni, D. Perrea, J. Nanas, K. Malliaras

Intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere-derived cells attenuates myocardial inflammation and prevents depression of systolic function in rats with autoimmune myocarditis.

European Heart Failure Congress, Florence 2016

16. **E. Leventaki**, M. Nana, N. Poulianitis, C. Kapelios, S. Vakrou, D.

Rontogianni, A.S. Manolis, D. Perrea, J. Nanas, K. Malliaras

Cardiosphere-derived cells exert anti-inflammatory effects and confer structural and functional benefits in rat hearts with autoimmune myocarditis.

European Heart Failure Congress, Paris 2017

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Loukas T, Vasileiadis I, Anastasiou H, Karatzanos E, Gerovasili V, **Nana E**, Tzanis G, Nanas S.

Resuscitation after cardiac arrest in a septic porcine model: adding vasopressin vs epinephrine alone administration.

BMC Res Notes. 2014 Aug 4;7:492.

2. Kapelios CJ, Kaldara E, Ntalianis A, **Nana E**, Pantsios C, Repasos E, Margari Z, Sousonis V, Malliaras K, Nanas JN.

Lowering furosemide dose in stable chronic heart failure patients with reduced ejection fraction is not accompanied by decompensation: a randomized study.

Int J Cardiol. 2014 Dec 15;177(2):690-2.

3. Repasos E, Kaldara E, Ntalianis A, Pantsios C, Kapelios C, **Nana E**, Grapsa E, Malliaras K, Nanas JN.

Intermittent renal replacement therapy for end stage drug refractory heart failure.

Int J Cardiol. 2015 Mar 15;183:24-6.

4. Ntalianis A, Kapelios CJ, Kanakakis J, Repasos E, Pantsios C, **Nana E**, Kontogiannis C, Malliaras K, Tsamatsoulis M, Kaldara E, Charitos C, Nanas JN.

Prolonged intra-aortic balloon pump support in biventricular heart failure induces right ventricular reverse remodeling.

Int J Cardiol. 2015 Aug 1;192:3-8.

5. Kapelios CJ, Charitos C, Kaldara E, Malliaras K, **Nana E**, Pantsios C, Repasos E, Tsamatsoulis M, Toumanidis S, Nanas JN.

Late-onset right ventricular dysfunction after mechanical support by a continuous-flow left ventricular assist device.

J Heart Lung Transplant. 2015 Dec;34(12):1604-10.

6. Tzanis G, Philippou A, Karatzanos E, Dimopoulos S, Kaldara E, **Nana E**, Pitsolis T, Rontogianni D, Koutsilieris M, Nanas S.

Effects of High-Intensity Interval Exercise Training on Skeletal Myopathy of Chronic Heart Failure.

J Card Fail. 2017 Jan;23(1):36-46.

7. Repasos E, Kaldara E, Pantsios C, Kapelios C, **Nana E**, Vernadakis S, Melexopoulou C, Malliaras K, Boletis J, Nanas JN.

Arteriovenous renal replacement therapy in end-stage left-sided heart failure patients has a detrimental effect on patients with impaired right ventricular function.

Hellenic J Cardiol. 2017 Jul - Aug;58(4):276-280.

8. Iacovidou N., Kollia M., **Nana E.**, Boutsikou T., Savvidis C., Kattamis A., Kyriakopoulou D., Ladis V.

Spontaneous fertility in a male thalassemic patient after allogeneic hematopoietic cell transplantation

Thalassemia Reports 2017; volume 7:7090

9. **Nana-Leventaki E**, Poulitanitis N, Sampaziotis D, Perrea D, Sanoudou D, Rontogianni D, Malliaras K

Cardiosphere-Derived Cells attenuate inflammation, preserve systolic function and prevent adverse remodelling in rat hearts with experimental autoimmune myocarditis.

J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2019 Jan;24(1):70-77.

doi: 10.1177/1074248418784287. Epub 2018 Jul 30.

ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΣΥΝΕΔΡΙΩΝ-ΣΕΜΙΝΑΡΙΩΝ

1. 13^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 1^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 20-22 Απριλίου 2007
2. Κλινικό φροντιστήριο «Η αρχική αντιμετώπιση του τραυματία-πολυτραυματία» στα πλαίσια 13^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος 20 Απριλίου 2007
3. 4^ο Ετήσιο Επιστημονικό Συνέδριο της Ιατρικής Σχολής Αθηνών, Αθήνα 1-2 Ιουνίου 2007
4. 1^ο Σεμινάριο Αντιμετώπισης Επειγόντων Περιστατικών για Φοιτητές Ιατρικής και Νέους Ιατρούς, Αθήνα 13 Ιουνίου 2007
5. Εκπαιδευτικό Σεμινάριο: «Σωστό και λάθος στη διαχείριση ασθενών με παράγοντες καρδιαγγειακού κινδύνου», Ναύπλιο 20 Οκτωβρίου 2007
6. 9^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 1-3 Φεβρουαρίου 2008
7. 14^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 2^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 9-11 Μαΐου 2008
8. 15^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 3^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Θεσσαλονίκη 8-10 Μαΐου 2009
9. 16^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 4^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 16-18 Απριλίου 2010
10. 36^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 4-8 Μαΐου 2010
11. Σεμινάριο του επιστημονικού και φιλανθρωπικού σωματίου ΚΕΔΑΣ με θέμα: «Ιατρική Αποστολή στην Αφρική», Αθήνα 19 Ιουνίου 2010
12. 4^ο Εντατικό Σεμινάριο Εφηβικής Ιατρικής, Αθήνα 18-19 Μαρτίου 2011
13. 37^ο Ετήσιο Πανελλήνιο Ιατρικό Συνέδριο, Αθήνα 17-21 Μαΐου 2011
14. 7^ο Ετήσιο Διεθνές Συνέδριο Καρδιολογίας «Εξελίξεις 2011 και Προοπτικές 2012 στην Καρδιολογία», Αθήνα 9-10 Δεκεμβρίου 2011
15. Εκπαιδευτική επίσκεψη στο Εγκληματολογικό Μουσείο της Ιατρικής Σχολής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, 26 Απριλίου 2012
16. 18^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 6^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 4-6 Μαΐου 2012

17. Συμμετοχή στην 16^η Ολυμπιάδα Ιατρικής Γνώσης στα πλαίσια του 18^ο Επιστημονικό Συνέδριο Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος και 6^ο διεθνές Forum Φοιτητών Ιατρικής και Νέων Ιατρών Ελλάδος, Αθήνα 5 Μαΐου 2012
18. 1ο Interactive Medical Course on Basic Clinical Cases- 1^ο Διαδραστικό Σεμινάριο για Βασικά Κλινικά Περιστατικά, Αθήνα 6 Ιουλίου 2012
19. 33ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 1-3 Νοεμβρίου 2012
20. 14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 1-3 Φεβρουαρίου 2013
21. Πανελλήνιο Σεμινάριο Ομάδων Εργασίας Ελληνικής Καρδιολογικής Εταιρείας, Θεσσαλονίκη 14-16 Φεβρουαρίου 2013
22. Ημερίδα: «Πρώιμη Κινητοποίηση και Αποκατάσταση μετά νοσηλεία σε ΜΕΘ», Αθήνα 15 Ιουνίου 2013
23. 2^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικού Κολλεγίου Γενικής ιατρικής και 8^ο Πανελλήνιο Πολυθεματικό Μετεκπαιδευτικό Σεμινάριο Πρωτοβάθμιας Φροντίδας Υγείας, Καλαμάτα 5-7 Ιουλίου 2013
24. 34^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 10-12 Οκτωβρίου 2013
25. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 31 Ιανουαρίου-2 Φεβρουαρίου 2014
26. Πανελλήνιο Σεμινάριο Ομάδων Εργασίας Ελληνικής Καρδιολογικής Εταιρείας, Θεσσαλονίκη 20-22 Φεβρουαρίου 2014
27. European Heart Failure Congress 2014, Athens 17-20 May 2014
28. 2^η Διεπιστημονική Ημερίδα Εκπαίδευσης: «Νέες οδηγίες για αποκατάσταση μετά από αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο», Αθήνα 14 Ιουνίου 2014
29. 16^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 30 Ιανουαρίου-1 Φεβρουαρίου 2015
30. 17^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 5-7 Φεβρουαρίου 2016
31. 16^η Ημερίδα Μητρικού Θηλασμού 26 Νοεμβρίου 2016
32. 5^η Διεπιστημονική Εκπαιδευτική Ημερίδα «Η νέα τεχνολογία και πληροφορική στην αποκατάσταση» Αθήνα, 10 Ιουνίου 2017

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΣΥΝΑΝΤΗΣΗ

Διεθνής ερευνητική συνάντηση για την πολυκεντρική μελέτη: «Μια τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλή, με διπλό εικονικό φάρμακο, πολυκεντρική μελέτη για την εκτίμηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας του BAY 94-8862 σε συμμετέχοντες που προσέρχονται επειγόντως στο Νοσοκομείο εξαιτίας επιδεινούμενης χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας με συστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και είτε με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με ή χωρίς χρόνια νεφρική νόσο είτε μόνο με μέτρια χρόνια νεφρική νόσο έναντι της επλερενόνης (ARTS-HF)»

Investigator Meeting ARTS-HF Βουδαπέστη, Ουγγαρία 17 και 18/9/2013

ΕΞΩΑΚΑΔΗΜΑΙΚΕΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ

2007 - 2012: Εθελοντική εργασία ως στέλεχος και ιατρός σε θερινές μαθητικές κατασκηνώσεις.

2/2009: Εθελοντική εργασία στο νοσοκομείο της Bukoba στην Τανζανία.

10/2009 έως 6/2011 Σεμινάριο Εκμάθησης Ελληνικής Νοηματικής Γλώσσας της Αποστολικής Διακονίας της Εκκλησίας της Ελλάδος.

2009 - 2012: Συμμετοχή σε μαθήματα και παραστάσεις Ελληνικών Παραδοσιακών χορών της πανεπιστημιακής λέσχης ΕΚΠΑ και σε άλλες χορευτικές ομάδες.

5/2011: Συμμετοχή σε προετοιμασία και παράσταση φοιτητικής χορωδίας.

7/2011: Συμμετοχή στο πρόγραμμα «Ιατρική απόβαση στα Ακριτικά νησιά 2011» της Ε.Ε.Φ.Ι.Ε (Επιστημονική Εταιρία Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος) με εθελοντική υπηρεσία στο Κέντρο Υγείας Μήλου.

7/2011 και 7/2015: Θεωρητική και πρακτική εκπαίδευση βασικών γνώσεων Πρώτων Βοηθειών σε δύο θερινές μαθητικές κατασκηνώσεις.

8/2012: Συμμετοχή στο πρόγραμμα «Ιατρική απόβαση στα Ακριτικά νησιά 2012» Ε.Ε.Φ.Ι.Ε (Επιστημονική Εταιρία Φοιτητών Ιατρικής Ελλάδος) με εθελοντική υπηρεσία στο νοσοκομείο της Κω.

11/2014-6/2015: Μαθήματα Ελληνικής Νοηματικής Γλώσσας στην Σχολή Ελληνικής Νοηματικής Γλώσσας της Ομοσπονδίας Κωφών Ελλάδος.

ΙΙΙ. ΠΙΝΑΚΑΣ ΚΥΡΙΩΤΕΡΩΝ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΑ	ΕΠΕΞΗΓΗΣΗ
PVB19	Παρβοϊός B19 - Parvovirus B19
HHV6	Ανθρώπινος ιός του έρπητα 6 - Human Herpesvirus 6
CVB3	Ιός Coxsackie B3 - Coxsackievirus B3
TLRs	Υποδοχείς τύπου Toll - Toll Like Receptors
TNF	Παράγοντας νέκρωσης των όγκων- Tumor Necrosis Factor
IL	Ιντερλευκίνη- Interleukin
Th1	T βοηθητικά (helper) λεμφοκύτταρα τύπου 1
Th2	T βοηθητικά (helper) λεμφοκύτταρα τύπου 2
Th17	T βοηθητικά (helper) λεμφοκύτταρα τύπου 17
IFN-γ	Ιντερφερόνη γ- Interferon γ
α-MyHC	Αλφα βαριά αλυσίδα της μυοσίνης – Alpha-Myosin Heavy Chain
IgG	Ανοσοσφαιρίνη G- Immunoglobulin G
ΗΚΓ	Ηλεκτροκαρδιογράφημα
CMR	Μαγνητική τομογραφία καρδιάς – Cardiac magnetic resonance imaging
EGE	Πρώιμη ενίσχυση με γαδολίνιο – Early Gadolinium Enhancement
LGE	Καθυστερημένη ενίσχυση με γαδολίνιο – Late Gadolinium Enhancement
EMB	Ενδομυοκαρδιακή Βιοψία
PCR	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης – Polymerase Chain Reaction
RNA	Ριβονουκλεϊκό οξύ - Ribonucleic Acid
DNA	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ - Deoxyribonucleic Acid

LVEF	Κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας – Left Ventricular Ejection Fraction
EAM	Πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα – Experimental Autoimmune Myocarditis
CPCs	Καρδιακά προγονικά κύτταρα - Cardiac Progenitor Cells
ESCs	Εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα - Embryonic Stem Cells
iPSCs	Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα – Induced Pluripotent Stem cells
MSCs	Μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα - Mesenchymal Stem Cells
HLA	Ανθρώπινα λευκοκυτταρικά αντιγόνα - Human Leukocyte Antigens
PBS	Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού άλατος – Phosphate-buffered saline
LVESV	Τελοσυστολικός όγκος αριστερής κοιλίας- Left Ventricular End Systolic Volume
LVEDV	Τελοδιαστολικός όγκος αριστερής κοιλίας- Left Ventricular End Diastolic Volume
CD	Δείκτης επιφανείας - Cluster of differentiation

IV. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΜΥΟΚΑΡΔΙΤΙΔΑ

1.1 Ορισμός

Η μυοκαρδίτιδα ορίζεται ως η μη ισχαιμική καρδιακή νόσος που χαρακτηρίζεται από τη φλεγμονή του μυοκαρδιακού ιστού με χαρακτηριστική διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα και προκαλείται από διάφορους λοιμώδεις και μη λοιμώδεις παράγοντες^{1-3,45,80}. Το 1995, η μυοκαρδίτιδα ορίστηκε από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και την Διεθνή Κοινότητα και Ομοσπονδία Καρδιολογίας (ISFC) ως η φλεγμονώδης νόσος του μυοκαρδίου, που διαγιγνώσκεται με συγκεκριμένα ιστολογικά, ανοσολογικά και ανοσοϊστοχημικά κριτήρια^{1,2,3}. Τα κριτήρια αυτά καθορίστηκαν από την Ομάδα Εργασίας για τις παθήσεις του μυοκαρδίου και του περικαρδίου της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρίας⁴ και έθεσαν ως ιστολογικά κριτήρια την παρουσία φλεγμονώδους διήθησης του μυοκαρδίου που συνοδεύεται από εκφύλιση του καρδιομυοκυττάρου και παρουσία νέκρωσης από μη ισχαιμικές αιτίες, σύμφωνα με τα κριτήρια Dallas^{5,6}. Ως ανοσολογικά και ανοσοϊστοχημικά κριτήρια έθεσαν την παρουσία τουλάχιστον 14 λευκοκυττάρων/mm², έως 4 μονοκυττάρων/mm² και τουλάχιστον 7 CD3 T λεμφοκυττάρων/mm² στο μυοκάρδιο.⁴

Η μυοκαρδίτιδα μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της λειτουργικότητας της καρδιάς και συχνά συναντούμε τον όρο φλεγμονώδεις μυοκαρδιοπάθειες που ορίζεται ως η μυοκαρδίτιδα που συνοδεύεται από δυσλειτουργία της καρδιάς που της περισσότερες φορές λαμβάνει τα χαρακτηριστικά της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας^{4,10}.

1.2 Αίτια

Η μυοκαρδίτιδα μπορεί να προκληθεί από λοιμογόνα αίτια, τοξικές ουσίες, ή αυτοάνοσες διεργασίες (Πίνακας 1). Η πιο κοινή αιτία μυοκαρδίτιδας στο Δυτικό κόσμο θεωρείται ότι είναι η ιογενής λοίμωξη. Τις τελευταίες δεκαετίες, έχει παρατηρηθεί μια αλλαγή ως προς το ποιος θεωρείται ο συχνότερος ιός που προκαλεί την μυοκαρδίτιδα, καθώς, μεταξύ του 1950 και του 1990 η ιογενής μυοκαρδίτιδα αποδίδονταν κυρίως σε λοίμωξη από εντεροϊούς και αδενοϊούς, με προεξάρχοντα και πιο καλά μελετημένο τον ιό coxsackie B3 (CVB3), ενώ τις τελευταίες δεκαετίες, μετά την ανάπτυξη των μεθόδων ανίχνευσης των ιών, ως κυρίως υπεύθυνοι ιοί θεωρούνται

ο παρβοϊός B19 (PVB19) και ο ανθρώπινος ιός του έρπητα 6 (HHV-6)^{8,9,10}. Ωστόσο, παρατηρούνται διαφορές στους καρδιοτρόπους ιούς που επικρατούν από περιοχή σε περιοχή αλλά και από καιρό σε καιρό^{9,3}. Επίσης περίπου το 30% των ασθενών έχουν συλλοίμωξη από περισσότερους από έναν ιούς^{21,3} κάνοντας πιο δύσκολο το να καθοριστεί ο συχνότερος ιός που προκαλεί την μυοκαρδίτιδα. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι ορισμένοι ιοί, για παράδειγμα ο PVB19, ανιχνεύονται συχνά στο μυοκάρδιο ακόμη και σε άτομα με φυσιολογική καρδιακή λειτουργία, εγείρετε το θέμα της πραγματικής σημασίας της παρουσίας των ιών στο μυοκάρδιο, ένα θέμα που έχει διχάσει την επιστημονική κοινότητα⁵⁸⁻⁶¹. Σύμφωνα με ορισμένους συγγραφείς, η παρουσία οποιουδήποτε ιού στο μυοκάρδιο είναι ένας αρνητικός προγνωστικός παράγοντας^{62,63}, ενώ άλλες μελέτες δεν επιβεβαιώνουν ότι η παρουσία του ιού έχει αρνητική επίδραση στην εξέλιξη της καρδιακής λειτουργίας^{46,64}. Σε καταγραφική μελέτη με δεδομένα από 12.500 ασθενείς φάνηκε ότι η ανίχνευση του PVB19 σε ασθενείς με φλεγμονή του μυοκαρδίου και δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας ήταν υψηλότερη από ό, τι στην ομάδα με φλεγμονή και διατήρηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας. Το ίδιο ίσχυε και στην σύγκριση των ασθενών με κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας κάτω του 45% με και χωρίς μυοκαρδίτιδα (παραύσία PVB19 στο 33,3% έναντι 17,6%, $p < 0,05$)⁷⁰. Παράγοντες που φαίνεται να επηρεάζουν τον αιτιολογικό ρόλο της παρουσίας των ιών PVB19 και HHV6 στο μυοκάρδιο είναι το ικό φορτίο, τα αντίγραφα του ενεργού ιού, η συλλοίμωξη με άλλους ιούς, το γενετικό υπόβαθρο και το φύλο^{44,65-68}.

Σε επιλεγμένους πληθυσμούς, ειδικές μη-ϊικές λοιμώξεις και αυτοάνοσα σύνδρομα παραμένουν σημαντικά αίτια μυοκαρδίτιδας¹¹. Βακτήρια, όπως της διφθερίτιδας, της νόσου του Lyme (*Borrelia burgdorferi*), και παραμελημένες περιπτώσεις στρεπτοκοκκικής λοίμωξης ή παράσιτα, όπως το *Trypanosoma cruzi* (ασθένεια Chagas) αποτελούν σημαντικές αιτίες μυοκαρδίτιδας σε συγκεκριμένες περιοχές^{12,13,14}. Μυοκαρδίτιδα από υπερευαισθησία μπορεί να προκληθεί από καρδιοεκλεκτική αυτοανοσία που σχετίζεται με φάρμακα ή με το εμβόλιο της ευλογιάς (Πίνακας 1). Μεθυλντόπα, υδροχλωροθειαζίδη, φουροσεμίδα, αμικιλίνη, τετρακυκλίνες, αζιθρομυκίνη, αμινοφυλλίνη, βενζοδιαζεπίνες, τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, και ανταγωνιστές του παράγοντα νέκρωσης όγκων μπορούν να προκαλέσουν μυοκαρδίτιδα όμως η πιθανότητα πρόκλησης μυοκαρδίτιδας μετά από χορήγηση των φαρμάκων αυτών είναι χαμηλή¹⁵. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις της

μυοκαρδίτιδας από υπερευαισθησία εκδηλώνονται νωρίς κατά τη διάρκεια της χορήγησης φαρμάκων, μέχρι και 15% της μυοκαρδίτιδας από κλοζαπίνη αναπτύσσεται αργότερα, μέχρι και 2 χρόνια μετά την έναρξη της θεραπείας με το φάρμακο^{16,17}. Ο εμβολιασμός κατά της ευλογιάς έχει συνδεθεί με μυοπερικαρδίτιδα έως και σε 6 ανά 10.000 εμβόλια¹⁸. Άλλες μη λοιμώδεις αιτίες της μυοκαρδίτιδας είναι η ακτινοβολία και τα συστηματικά αυτοάνοσα νοσήματα όπως το σκληρόδερμα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος και η γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα (Πίνακας 1). Συνολικά 20% των ασθενών με γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα έχουν ιστορικό και άλλων αυτοάνοσων διαταραχών.

Πίνακας 1. Αιτίες Μυοκαρδίτιδας	
Αιτίες	Παραδείγματα
Λοιμώδεις	Βακτήρια: <i>Chlamydia</i>, <i>Corynebacterium diphtheria</i>, <i>Legionella</i>, <i>Mycobacterium tuberculosis</i>, <i>Mycoplasma</i>, <i>Staphylococcus</i>, <i>Streptococcus A</i>, <i>Streptococcus pneumoniae</i>, <i>Borrelia burgdorferi</i>(νοσος Lyme) Μύκητες: <i>Actinomyces</i>, <i>Aspergillus</i>, <i>Candida</i>, <i>Cryptococcus</i> Έλμινθες: <i>Echinococcus granulosus</i>, <i>Trichinella spiralis</i> Πρωτόζωα: <i>Toxoplasma gondii</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i>(νοσος Chagas) Ιοί: <i>Adenoviruses</i>, <i>Echoviruses</i>, <i>Enteroviruses</i> (e.g., <i>Coxsackieviruses</i>), <i>Herpes Viruses</i> (<i>Human Cytomegalovirus</i>, <i>Epstein-Barr virus</i>, <i>Human Herpesvirus 6</i>), <i>Hepatitis C Virus</i>, <i>Human Immunodeficiency Virus (HIV)</i>, <i>Influenza A virus</i>, <i>Parvovirus B19</i> Ριχέτσιες: <i>Coxiella burnetti</i>, <i>Rickettsia typhi</i> Σπειροχαίτες: <i>Borrelia burgdorferi</i>, <i>Leptospira</i>, <i>Treponema pallidum</i>

Αυτοάνοσες	Κοιλιοκάκη, σύνδρομο Churg-Strauss, δερματομυοσίτιδα, γίγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα, υπερηωσινοφιλικό σύνδρομο Crohn, νόσος Kawasaki, ερυθρεματώδης λύκος, ρευματοειδής αρθρίτιδα, σαρκοείδωση, σκληρόδερμα, ελκώδης κολίτιδα, μυασθένεια gravis, ινσουλινοεξαρτώμενος διαβήτης, θυρεοειδοτοξίκωση
Αντίδραση υπερευαισθησίας σε φάρμακα	Πενικιλίνη, αμπικιλίνη, κεφαλοσπορίνες, τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, βενζοδιαζεπίνες, κλοζαπίνη, αγκύλης και θειαζιδικά διουρητικά, αζιθριμυκίνη, αμινοφυλλίνη, μεθυλντόπα, εμβόλια ευλογιάς, τοξοειδές του τετάνου, τρικυκλικά αντικαταθλιπτικά, ανταγωνιστές του παράγοντα νέκρωσης όγκων
Τοξικές αντιδράσεις σε φάρμακα	Αμφεταμίνες, ανθρακυκλίνες, κατεχολαμίνες, η κοκαΐνη, κυκλοφωσφαμίδη, 5-φθοριοουρακίλη, φαινυτοΐνη, trastuzumab
Τοξίνες	αιθανόλη
Φυσικοί παράγοντες	Αρσενικό, Λίθιο, χαλκός, σίδηρος, φώσφορο, υποθερμία, θερμοπληξία, ακτινοβολία
Άλλα	μετά-μεταμοσχευτική απόρριψη, δήγμα σκορπιού, φιδιού και αράχνης, τσίμπημα μέλισσας ή σφήγκας

2,3,4,7,11

1.3 Επιδημιολογία

Η πραγματική και ακριβής συχνότητα της μυοκαρδίτιδας είναι δύσκολο να καθορίσει λόγω των δυσκολιών στη διάγνωση της στη καθημερινή κλινική πράξη. Η συχνότητα εμφάνισης της μυοκαρδίτιδας, σύμφωνα με την Διεθνή Ταξινόμηση των Νόσων, στην 9η Αναθεώρηση, υπολογίζεται σε 22 ανά 100.000 άτομα ή περίπου 1,5 εκατομμύρια περιπτώσεις παγκοσμίως ετησίως²⁴. Μελέτες μακροχρόνιας παρακολούθησης σε ασθενείς με οξεία μυοκαρδίτιδα έχουν δείξει πως το 21% των ασθενών ανέπτυξαν διατακτική μυοκαρδιοπάθεια κατά τη διάρκεια μιας περιόδου μέσης

παρακολούθησης 3 ετών²⁵. Το ποσοστό μυοκαρδίτιδας σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια κυμαίνεται από 0,5% έως 4% ανάλογα με την ηλικιακή ομάδα και την περιοχή²⁶, ενώ άλλες μελέτες αναφέρουν ότι έως και 50% των ασθενών με κλινική διάγνωση διατατικής μυοκαρδιοπάθειας έχουν ανοσοϊστοχημικά χαρακτηριστικά μυοκαρδίτιδας^{21,46} κατατάσσοντας έτσι την μυοκαρδίτιδα ως την πιο κοινή αιτία διατατικής μυοκαρδιοπάθειας⁴⁷.

Όσο αφορά τους αιφνίδιους καρδιαγγειακούς θανάτους η μυοκαρδίτιδα θεωρείται υπεύθυνη για περίπου το 2% των αιφνίδιων θανάτων των βρεφών, 5% της παιδικής ηλικίας, 5% έως 12% των νεαρών αθλητών^{11,27} και 8,6% έως 12% των περιπτώσεων αιφνίδιου θανάτου σε νεαρούς ενήλικες²⁸. Μελέτες από την Αμερικανική Καρδιολογική Εταιρία και το Αμερικάνικο Κολέγιο Καρδιολογίας, έχουν κατατάξει την μυοκαρδίτιδα ως την τρίτη κύρια αιτία αιφνίδιου καρδιακού θανάτου σε αθλητές³⁶. Παρόλα αυτά τα ποσοστά μυοκαρδίτιδας σε νεκροτομικές μελέτες σε άτομα όλων των ηλικιών με αιφνίδιο θάνατο κυμαίνονται πολύ ανά χώρα και χρονική περίοδο. Το συνολικό ποσοστό της μυοκαρδίτιδας σε άτομα που εμφάνισαν αιφνίδιο θάνατο στην Ιαπωνία ήταν 3%²⁹. Μια πληθυσμιακή μελέτη στην Φιλανδία έδειξε ότι η μυοκαρδίτιδα ευθύνονταν για 0,47 ανά 1000 θανάτους στο γενικό πληθυσμό για την χρονική περίοδο 1970-1998³⁰. Στο Τόκιο για το χρονικό διάστημα 1958-1984, η μυοκαρδίτιδα θεωρήθηκε ως αιτία θανάτου στο 0,15% των νεκροτομών³¹. Σε μια μελέτη του 1996 από τη Γαλλία, αναφέρεται πως το 0,8% των αιφνίδιων θανάτων προκλήθηκαν από μυοκαρδίτιδα³². Σε πιο πρόσφατη μελέτη στο Μέρυλαντ των ΗΠΑ όπου χρησιμοποίησε δεδομένα από την δεκαετία 2005-2014, αναφέρεται πως η μυοκαρδίτιδα θεωρήθηκε ως αίτιο του 0,17% του συνόλου των αιφνίδιων θανάτων και του 0,70% των αιφνίδιων θανάτων που πραγματοποιήθηκε νεκροτομή²³.

Είναι αξιοσημείωτο ότι η επίπτωση της μυοκαρδίτιδας φαίνεται, σύμφωνα με την βιβλιογραφία, να κυμαίνεται ανάλογα την ηλικιακή ομάδα και το φύλο. Υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές όπου αναφέρουν ότι η συχνότητα της μυοκαρδίτιδας ως αίτιο αιφνίδιου καρδιακού θανάτου ήταν πολύ υψηλότερη σε νεότερες ηλικιακές ομάδες (λιγότερο από 35 ετών), με το 12% των αιφνίδιων καρδιακών θανάτων να αποδίδεται σε μυοκαρδίτιδα στους νέους Αυστραλούς³⁴ ενώ το αντίστοιχο ποσοστό σε μια κινεζική νεκροτομική μελέτη ανέρχεται στο 34,7%³⁵. Σε άλλη μελέτη το ηλικιακό όριο τέθηκε ακόμα πιο χαμηλά, με τους περισσότερους θανάτους να συμβαίνουν σε άτομα κάτω των 30 ετών²³. Τα νεογνά και τα παιδιά εκδηλώνουν μια πιο κεραυνοβόλο

μυοκαρδίτιδα και είναι συνήθως πιο επιρρεπή στην ιογενή μυοκαρδίτιδα σε σχέση με τους ενήλικες^{39,40}. Όσον αφορά το φύλο, οι νεαροί άνδρες προσβάλλονται από μυοκαρδίτιδα συχνότερα σε σχέση με τις γυναίκες. Μια μελέτη από την Φιλανδία όπου αξιολόγησε 3274 νοσηλευθέντα περιστατικά μυοκαρδίτιδας, έδειξε ότι η μυοκαρδίτιδα είναι σημαντικά πιο συχνή στους άντρες απ' ό τι στις γυναίκες³⁷. Όμως οι γυναίκες ασθενείς συχνά εμφανίζουν πιο σοβαρή κλινική εικόνα της νόσου σε μεγαλύτερη ηλικία. Οι γυναίκες ασθενείς με λεμφοκυτταρική μυοκαρδίτιδα έχουν μέση ηλικία τα 42 έτη, ενώ εκείνες με γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα τα 43 έτη³⁸. Οι περισσότερες μελέτες οξείας μυοκαρδίτιδας αναφέρουν μεγαλύτερη συχνότητα αλλά και σοβαρότητα της νόσου σε άνδρες ασθενείς, ως αποτέλεσμα της προστατευτικής επίδρασης των φυλετικών ορμονών πάνω στην ανοσολογική απόκριση των γυναικών⁴¹⁻⁴⁴.

Όσον αφορά τους επιμέρους αιτιολογικούς παράγοντες της μυοκαρδίτιδας, σε μελέτη από την Φιλανδία φαίνεται ότι η ετήσια συχνότητα, για τα έτη 2013 και 2014, ανίχνευσης καρδιακής σαρκοείδωση ήταν 0,6 ανά 100.000 ενήλικες (> 18 ετών). Η καρδιακή σαρκοείδωση φαίνεται να εμφανίζεται στο 2,3% έως 11% των ασθενών με σαρκοείδωση και είναι υπεύθυνη για το 2,5% των ανεξήγητων μυοκαρδιοπαθειών⁵¹. Η ασυμπτωματική συμμετοχή της καρδιάς στη σαρκοείδωση είναι ακόμα πιο συχνή, αφού σε νεκροτομικές μελέτες, καρδιακή συμμετοχή σε ασθενείς με σαρκοείδωση έχει παρατηρηθεί στο 20% έως 27%⁵². Η γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα είναι μία σπάνια, ταχέως εξελισσόμενη και κλινικά σημαντική μορφή μυοκαρδίτιδας όπου η εκτιμώμενη ετήσια συχνότητα στην Φιλανδία ήταν 0,13 ανά 100.000 άτομα για τα έτη 2013 και 2014^{53,54}. Από νεκροτομικά αρχεία φαίνεται ότι η γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα είναι ακόμα πιο συχνή αφού ανιχνεύτηκε ιστολογικά σε έως και 6,6 ανά 100,000 άτομα και στο 3% έως 5,6% των νεκροτομών σε άτομα με μυοκαρδίτιδα^{55,56}. Σε μελέτη ασθενών με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια όπου πραγματοποιήθηκε ενδομυοκαρδιακή βιοψία σε τριτοβάθμιο κέντρο, γιγαντοκυτταρική μυοκαρδιοπάθεια βρέθηκε στο 0,2% έως 1,2%, και στο 2% των ασθενών με μεταμόσχευση καρδιάς⁵⁷.

Ενδιαφέροντα είναι και τα επιδημιολογικά δεδομένα σχετικά με την συχνότερη αιτία της μυοκαρδίτιδας στον δυτικό κόσμο που είναι οι ιοί. Περίπου 1% έως 5% των ατόμων οι οποίοι έχουν θετικό τεστ για οξεία ιογενή λοίμωξη μπορεί να παρουσιάσουν μια μορφή μυοκαρδίτιδας⁹. Μέχρι και στο 60-80% των ασθενών με επηρεασμένη καρδιακή λειτουργία, ανιχνεύεται ιικό γονιδίωμα στο μυοκάρδιο^{21,46,58}. Όπως ήδη

αναφέρθηκε αλλά και όπως φαίνεται από την ποικιλία των ποσοστών στις μελέτες που προαναφέρονται, είναι δύσκολο να καθοριστεί η πραγματική συχνότητα της μυοκαρδίτιδας διότι εκτός των δυσκολιών αναγνώρισης της μυοκαρδίτιδας λόγω του εύρους των κλινικών εκδηλώσεων της, ανά μελέτη διαφοροποιείται ο πληθυσμός που είναι υπό μελέτη, τα κριτήρια και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί, μια επιδημιολογική μελέτη που αναφέρει την μυοκαρδίτιδα ως τελική διάγνωση για το 0,5% του συνόλου των εισαγωγών στο νοσοκομείο για καρδιαγγειακά αίτια³⁷ ενώ προηγούμενες μελέτες όπου πραγματοποίησαν ενδομυοκαρδιακή βιοψία σε ασθενείς με ανεξήγητη μυοκαρδιοπάθεια, έθεσαν ως συχνότητα της μυοκαρδίτιδας 10% με 17% των ασθενών αυτών^{48,49}. Ομοίως, μυοκαρδίτιδα βρέθηκε στο 5% των ατόμων σε μια σειρά μη επιλεγμένων και διαδοχικών νεκροτομιών, αλλά η ασθένεια θεωρήθηκε η κύρια αιτία θανάτου σε ένα μόνο μικρό ποσοστό⁵⁰. Έτσι γίνεται σαφές ότι η μυοκαρδίτιδα υποδιαγιγνώσκεται και δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε την ακριβή συχνότητα της. Παρόλα αυτά γίνεται σαφές από τα παραπάνω, ότι η μυοκαρδίτιδα αποτελεί μια αρκετά συχνή πάθηση με αρκετά συχνές και σοβαρές συνέπειες για την λειτουργία της καρδιάς έως και θανατηφόρες. Το γεγονός της αυξημένης επίπτωσης της νόσου σε νεαρές ηλικίες, κάνει την νόσο ακόμα πιο σοβαρή και απειλητική.

1.4 Παθοφυσιολογία

1.4.1 Οι 3 φάσεις της μυοκαρδίτιδας

Η παθοφυσιολογία της μυοκαρδίτιδας στους ανθρώπους δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί. Ωστόσο, χάρη στην διεξοδική μελέτη της ιογενούς μυοκαρδίτιδας από εντεροϊούς, ιδίως από τον ιό coxsackie B3 (CVB3), σε πειράματα με ζώα και σε καλλιέργειες κυττάρων, έχουν αποσαφηνιστεί αρκετοί μοριακοί μηχανισμοί της μυοκαρδίτιδας και της εξέλιξης της σε φλεγμονώδη μυοκαρδιοπάθεια⁷¹.

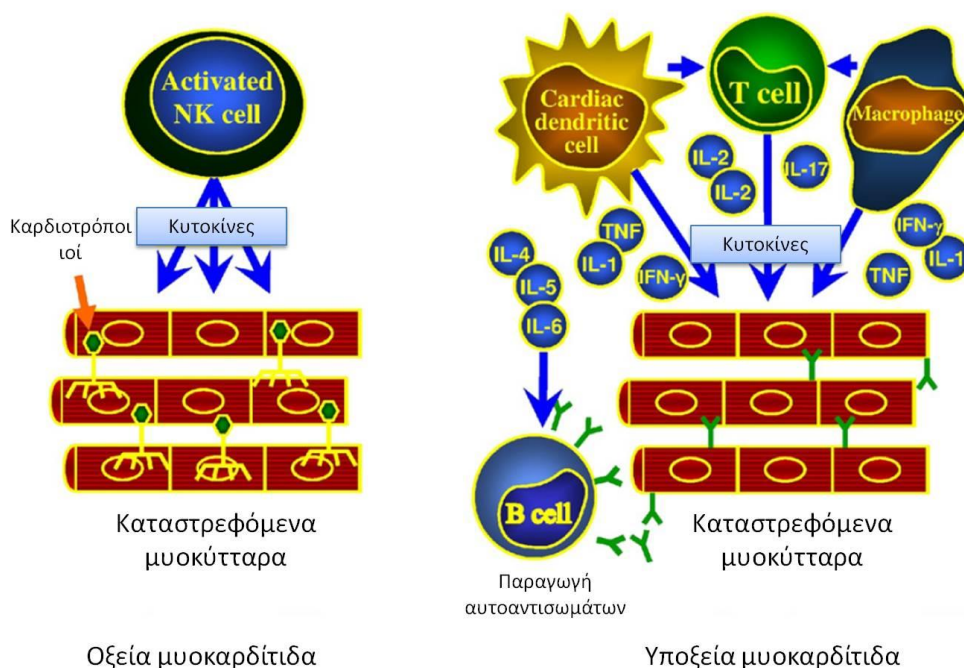
Σε επίπεδο ιστού και κυττάρου η παθολογική εξέλιξη της ιογενούς μυοκαρδίτιδας έχει 3 φάσεις: την οξεία φάση που ενεργοποιείται από την είσοδο του ιού και τον πολλαπλασιασμό του, την υποξεία φάση που χαρακτηρίζεται από την φλεγμονώδη κυτταρική διήθηση (Εικόνα 1), και το χρόνια στάδιο που χαρακτηρίζεται από την αναδιαμόρφωση της καρδιάς^{2,72,74,75}. Είναι γνωστό ότι στην παθοφυσιολογία της ιογενούς μυοκαρδίτιδας εμπλέκονται τόσο άμεσες βλάβες που προκαλούνται από την

ιογενή λοίμωξη και όσο και έμμεσες ως αποτέλεσμα της ανοσολογικής αντίδρασης του οργανισμού⁷³.

Αναλυτικά, στην πρώτη φάση πραγματοποιείται η είσοδος του ιού εντός των καρδιομυοκυττάρων με τη μεσολάβηση ενός ειδικού υποδοχέα. Ο ιός Cocksackie της ομάδας B και μερικοί αδενοϊοί χρησιμοποιούν κοινό διαμεμβρανικό υποδοχέα, τον υποδοχέα CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) για την είσοδο του ιικού γονιδιώματος εντός των καρδιομυοκυττάρων⁷⁶. Ως συνυποδοχέα, ο ιός Cocksackie χρησιμοποιεί τον παράγοντα DAF (decay accelerating factor) ενώ οι αδενοϊοί ειδικές ιντεγκρίνες ($\alpha_{v\beta 3}$ και $\alpha_{v\beta 5}$). Σε περίπτωση απουσίας έκφρασης του CAR στα καρδιομυοκύτταρα, ιογενείς μόλυνση και φλεγμονή δεν παρουσιάζεται⁷⁷. Στις καρδιές των ασθενών με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια, παρατηρείται αυξημένη έκφραση CAR σε σχέση με καρδιές ατόμων με άλλη καρδιακή πάθηση ή υγιή καρδιά⁷⁸. Το αν η αυξημένη έκφραση της ανθρώπινης CAR είναι ένα προδιαθεσικός παράγοντας για την πιο εύκολη προσβολή από την ιογενή μυοκαρδίτιδα μένει να διερευνηθεί σε μελλοντικές μελέτες². Μετά την είσοδο του ιού έχουμε την οξεία βλάβη των καρδιομυοκυττάρων, που προκαλείται από την αντιγραφή του ιού και οδηγεί σε νέκρωση των καρδιομυοκυττάρων, στην έκθεση των ενδοκυττάρων αντιγόνων (π.χ. καρδιακή μυοσίνη), και στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή. Πρώτα ενεργοποιούνται τα κύτταρα φυσικοί φονείς (NK cells) και τα μακροφάγα και στην συνέχεια τα CD4 και CD8 T λεμφοκύτταρα (εικόνα 1). Συμπερασματικά, η οξεία φάση της μυοκαρδίτιδας χαρακτηρίζεται από την αντιγραφή του ιού και την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών που ενεργοποιούν την μη ειδική ανοσία, διαρκεί λίγες ημέρες έως εβδομάδες και κλινικά είναι συνήθως ασυμπτωματική¹⁰.

Μετά την οξεία φάση της βλάβης του μυοκαρδίου, που επάγεται απευθείας από τον ιό, έχουμε την δεύτερη φάση με την ανοσολογική και αυτοάνοση αντίδραση². Η δεύτερη, υποξεία, φάση αρχίζει συνήθως 2-4 εβδομάδες μετά και χαρακτηρίζεται από την ειδική ανοσολογική αντίδραση του ξενιστή¹⁰. Κατά την υποξεία φάση, που διαρκεί από μερικές εβδομάδες έως και αρκετούς μήνες, ενεργοποιημένα ιό-ειδικά T λεμφοκύτταρα επιτίθενται στον ιό αλλά και στα όργανα του ξενιστή λόγω μοριακού μιμητισμού. Η ενεργοποίηση κυτοκινών (παράγοντας νέκρωσης όγκων άλφα, ιντερλευκίνη IL -1 και -6) και αντισωμάτων έναντι ιικών αλλά και καρδιακών πρωτεϊνών μπορεί να επιδεινώσει περεταίρω την καρδιακή βλάβη και να προκαλέσει

διαταραχή της συστολικής λειτουργίας της καρδιάς². Οι αυτοάνοσες αντιδράσεις που μπορεί να πραγματοποιηθούν σε αυτή την υποξεία φάση της μυοκαρδίτιδας βασίζονται σε δύο κύριους μηχανισμούς: πρώτον τη διασταυρούμενη αντίδραση ικών επιτόπων και ορισμένων καρδιακών δομών (μοριακό φαινόμενο μιμητισμού) και δεύτερον την έκθεση λόγω την βλάβη των καρδιομυοκυττάρων από τους ιούς, των αρχικά ενδοκυττάρων δομών, στο ανοσοποιητικό σύστημα¹⁰. Η παραγωγή αντισωμάτων εναντίον των άλφα και βήτα βαρέων αλυσίδων μυοσίνης, όπου τα αντίσωμα κατά της αλυσίδας άλφα θεωρούνται οργανοειδικά για την καρδιά, έχει αποδειχτεί in vitro και σε ζωικά πειράματα, ότι έχουν αρνητική επίδραση στην συσταλτικότητα των καρδιομυοκυττάρων. Σε ασθενείς με φλεγμονώδη μυοκαρδιοπάθεια, έχουν ανιχνευθεί και άλλα αυτοαντισώματα, για παράδειγμα, αντισώματα έναντι των βήτα-αδρενεργικών υποδοχέων, έναντι των M2 μουςκαρινικών υποδοχέων και κατά της τροπονίνης^{70,81-84}.



Εικόνα 1 Παθοφυσιολογία της ιογενούς μυοκαρδίτιδας.

Μετά την εισαγωγή του ιού στα μυοκαρδιοκύτταρα, η αντιγραφή του ιού οδηγεί σε οξεία βλάβη των καρδιομυοκυττάρων (οξεία μυοκαρδίτιδα) και στην ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (υποξεία μυοκαρδίτιδα).

Τροποποίηση από: Kindermann I et al, Update on myocarditis. J Am Coll Cardiol. 2012 Feb 28;59(9):779-92.²

Η τρίτη φάση της νόσου λαμβάνει χώρα μετά από αρκετές εβδομάδες ή μήνες και μπορεί να περιλαμβάνει είτε την αποδρομή της νόσου είτε την εμμένουσα δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και την ανάπτυξη φλεγμονώδους διατατικής μυοκαρδιοπάθειας. Στους περισσότερους ασθενείς με μυοκαρδίτιδα, 50-70% των περιστατικών μυοκαρδίτιδας, η ανοσολογική απόκριση μειώνεται με την αποβολή του ιού, και η λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας ανακτάται χωρίς επακόλουθα^{2,10}. Ωστόσο, σε ορισμένες πειραματικές μελέτες με ποντίκια και άρα πιθανόν σε ορισμένους ασθενείς, οι ανοσολογικές-αυτοάνοσες αποκρίσεις εξακολουθούν να δρουν ανεξάρτητα της ανίχνευσης γονιδιώματος του ιού στο μυοκάρδιο και έτσι οδηγούνται στην χρόνια φάση, η οποία χαρακτηρίζεται από μυοκαρδιακή αναδιαμόρφωση και ανάπτυξη διατατικής μυοκαρδιοπάθειας⁷⁹. Η σημασία της αυτοανοσίας στην εξέλιξη της νόσου εξαρτάται από τη γενετική προδιάθεση του ξενιστή, τις γενετικές παραλλαγές του υποκείμενου μικρόβιου, τον μοριακό μιμητισμό μεταξύ καρδιακών δομών και μικροβιακών πρωτεϊνών, και από περιβαλλοντικούς παράγοντες¹¹. Φαίνεται πιθανό ότι μια απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόκληση της μυοκαρδίτιδας είναι η γενετική προδιάθεση καθώς η συντριπτική πλειοψηφία των ατόμων ακόμη και μετά από επαφή με καρδιοτρόπους ιούς δεν θα αναπτύξουν μυοκαρδίτιδα ενώ είναι συχνή η εμφάνιση της μυοκαρδίτιδας σε μέλη της ίδιας οικογένειας^{75,88}. Επίσης μια σειρά από άλλους παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη που θα έχει η νόσος, για παράδειγμα, ο βαθμός της αρχικής βλάβης του μυοκαρδίου, η ένταση και η διάρκεια της φλεγμονής και ο βαθμός της ιικής αντιγραφής^{85,86}. Κατά τη μετάβαση από την οξεία φλεγμονή στη χρόνια ίνωση και φλεγμονή μπορεί να έχουμε πλήρη απουσία συμπτωμάτων¹¹.

Η επιστημονική κοινότητα δεν έχει ξεκαθαρίσει αν η ανωτέρω περιγραφόμενη πορεία της νόσου λαμβάνει χώρα σε κάθε περίπτωση μυοκαρδίτιδας που προκαλείται από οποιονδήποτε ιό, για παράδειγμα από ιούς όπως PVB19 ή HHV6 που προσβάλλουν κατά κύριο λόγο τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αιμοφόρων αγγείων και όχι τα καρδιομυοκύτταρα⁸⁹.

Ωστόσο εκτός από το πολύ καλά μελετημένο μοντέλο της ιογενούς μυοκαρδίτιδας από CVB3, επιπλέον πληροφορίες σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς της μυοκαρδίτιδας έχουν προκύψει από πειράματα πρόκλησης μυοκαρδίτιδας σε τρωκτικά με παράσιτα, ή βακτήρια καθώς επίσης και από μη λοιμώδη μοντέλα πρόκλησης μυοκαρδίτιδας όπου πραγματοποιείται έκθεση σε καρδιακά αντιγόνα μαζί με ισχυρά

ανοσοενισχυτικά⁹²⁻⁹⁴. Τα μη λοιμώδη μοντέλα παρέχουν πληροφορίες κυρίως σχετικά με τις τελευταίες φάσεις της μυοκαρδίτιδας.

Ανάλογα με τον αιτιολογικό παράγοντα, οι μηχανισμοί βλάβης των ιστών, καθώς και οι φλεγμονώδεις μεσολαβητές και κυτοκίνες διαφέρουν. Όπως ήδη αναφέρθηκε στην ιογενή μυοκαρδίτιδα από Coxsackie B έχουμε την είσοδο του ιού στα καρδιομυοκύτταρα που οδηγεί στον θάνατο των καρδιομυοκυττάρων μέσω απόπτωσης και αυτοφαγίας⁹⁵. Στην Chagas μυοκαρδίτιδα από το παράσιτο *Trypanosoma cruzi*, η βλάβη των ιστών προκύπτει μέσω απελευθέρωσης από τα παράσιτα βιοδραστικών ενώσεων και πρόκλησης οξειδωτικού στρες καθώς και από τα φλεγμονώδη κύτταρα⁹⁶. Καρδιακοί παρασυμπαθητικοί νευρώνες καταστρέφονται επίσης από το παράσιτο, με αποτέλεσμα την ανεμπόδιστη ενεργοποίηση του συμπαθητικού⁹⁷. Στην αντίστοιχη με την ιογενή μυοκαρδίτιδα, δεύτερη υποξεία φάση της μυοκαρδίτιδας από βακτήρια ή παράσιτα, έχουμε χαρακτηριστικά την δράση των ηωσινόφιλων και των πολυμορφοπύρηνων.

Η τρίτη φάση της αυτοάνοσης εξέλιξης της φλεγμονής μπορεί να ενεργοποιηθεί και μέσω μη λοιμογόνων παραγόντων όπως μέσω μη λοιμογόνων μικροβιακών τμημάτων, πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins), ανοσογόνων θραυσμάτων που απελευθερώνονται μετά την βλάβη των ιστών, έκθεσης σε φάρμακο, ή στο πλαίσιο συστημικών αυτοάνοσων νοσημάτων^{98,99}.

1.4.2 Φλεγμονή του μυοκαρδίου

Όπως και στα υπόλοιπα όργανα έτσι και στην φλεγμονή και αναδιαμόρφωση της καρδιάς συμμετέχουν διάφορες κυτταρικές ομάδες: 1) Τα κύτταρα από τον μυελό των οστών δηλαδή τα κύτταρα τελεστές της προσαρμοστικής-ειδικής ανοσίας, τα T- και B-κύτταρα, και μυελοειδής πληθυσμοί με καταπληκτική πλαστικότητα συμπεριλαμβανομένων υποσυνόλων από μακροφάγα, δενδριτικά κύτταρα, κοκκιοκύτταρα, ηωσινόφιλα, ιστιοκύτταρα, και ένα ανώριμο πρόδρομο πληθυσμό κυττάρων με τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν όχι μόνο σε φλεγμονώδη κύτταρα, αλλά και σε μυοϊνοβλάστες, 2) Το ενδοθήλιο, το οποίο χρησιμεύει ως ένα κρίσιμο φραγμό που ρυθμίζει την πρόσβαση των κυκλοφορούντων κυττάρων, που προέρχονται από μυελό των οστών, στην καρδιά, 3) Τα κύτταρα του διάμεσου χώρου, που αποτελούνται από ινοβλάστες, μυοϊνοβλάστες και άλλα στρωματικά κύτταρα, τα οποία είναι ενσωματωμένα στη διάμεση θεμέλια ουσία και αλληλοεπιδρώντας με το τοπικό

περιβάλλον, βοηθούν στην διαμόρφωση της φλεγμονώδους απάντησης και τέλος, 4) Τα καρδιομυοκύτταρα, τα οποία δεν είναι μόνο ένας στόχος της πρώιμης λοίμωξης, αλλά δείχνουν επίσης ειδικές προσαρμοστικές αποκρίσεις σε φλεγμονώδη ερεθίσματα, όπως υπερτροφία και ανώμαλη σηματοδότηση ασβεστίου^{100,101}. Αλλαγές σε αυτά τα κυτταρικά σύνολα μετά από καταστροφή του καρδιακού ιστού από μολύνσεις, τοξίνες, ισχαιμία ή ανοσολογική διαταραχή, καθορίζουν τα χαρακτηριστικά της φλεγμονής της καρδιάς. Οι αλλαγές στα κύτταρα αυτά, συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης, απενεργοποίησης και διαφοροποίησης τους σε διαφορετικές κυτταρικές υποομάδες, ρυθμίζονται από αλληλεπιδράσεις διακυτταρικές, από αυτοκρινείς και παρακρινείς μεσολαβητές, συμπεριλαμβανομένων χημειοκινών, κυτοκινών, ορμονών και προϊόντων αποδόμησης, δρώντας, για την ενεργοποίηση ή την αναστολή της γονιδιακής έκφρασης μέσω λιγότερο ή περισσότερο συγκεκριμένων υποδοχέων και των ενδοκυττάρων μονοπατιών τους¹⁰². Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία της καρδιάς, ένα περίπλοκο πρωτεϊνικό δίκτυο που γεμίζει τους εξωκυττάρους χώρους και παρέχει δομική υποστήριξη και οργάνωση του ιστού, μπορεί να θεωρηθεί ως πέμπτο στοιχείο στην ρύθμιση της καρδιακής φλεγμονής, ίνωσης, και αναδιαμόρφωσης του ιστού^{103,104}.

1.4.2.1 Έμφυτοι-μη ειδικοί ανοσολογικοί μηχανισμοί

Στα κύτταρα του έμφυτου ανοσοποιητικού συστήματος περιλαμβάνονται κυρίως τα μακροφάγα, τα κοκκιοκύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα, τα ιστιοκύτταρα, τα μαστοκύτταρα, και τα ηωσινόφιλα. Αυτά τα κύτταρα διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα ενδοκυττάρων και επιφανειακών υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων που αναγνωρίζουν μικροβιακές δομές που δεν είναι κοινές με αυτές του ξενιστή (μοριακά πρότυπα που σχετίζονται με παθογόνα- pathogen-associated molecular patterns)¹⁰⁵. Όταν τα μοριακά αυτά πρότυπα προσδεθούν στους υποδοχείς των κυττάρων, επάγουν το σχηματισμό φλεγμονοσωμάτων, που είναι πολυμοριακά συμπλέγματα πρωτεϊνών συμπεριλαμβανομένης της κασπάσης 1. Τα φλεγμονοσώματα ενεργοποιούν τον καταρράκτη της κασπάσης-1, οδηγώντας στην παραγωγή προφλεγμονωδών κυτοκινών. Σημαντικοί στην ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσολογικής απάντησης είναι μια οικογένεια μοριακών υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων που συνήθως εκφράζονται στην κυτταρική επιφάνεια και ονομάζονται υποδοχείς τύπου ToII (TLRs), εκφράζεται κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά σε μακροφάγα και δενδριτικά κύτταρα και διαδραματίζουν βασικό ρόλο στην πρώιμη ενεργοποίηση της έμφυτης ανοσολογικής απόκρισης έναντι ιικών και άλλων λοιμώξεων. Έντεκα TLRs έχουν εντοπιστεί σε

ανθρώπους αλλά μέχρι στιγμής, ειδικός ρόλος στην μυοκαρδίτιδα έχει αποδοθεί μόνο στους εξής 5: TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, και TLR9¹⁰⁶⁻¹¹¹. Η ενεργοποίηση των TLRs και των φλεγμονοσωμάτων έχει ως αποτελέσματα την απελευθέρωση κυτοκινών, όπως του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) -α, της ιντερλευκίνης (IL) -1β και IL-18, και των πρωτεϊνών της ομάδας υψηλής κινητικότητας Box-1 (high-mobility group box 1 protein) συμμετέχοντας έτσι στην ανάπτυξη της μυοκαρδίτιδας και της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας^{112,113}.

1.4.2.2 Ο ρόλος των μακροφάγων

Τα μονοκύτταρα φαγοκύτταρα, που ονομάζονται μακροφάγα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο ως οδοκαθαριστές, μικροβιοκτόνα, και ρυθμιστικά κύτταρα στη καρδιακή φλεγμονή. Κύτταρα της κυτταρικής σειράς των μονοκυττάρων και των μακροφάγων αντιπροσωπεύουν την πλειοψηφία των φλεγμονωδών κυττάρων που διηθούν το μυοκάρδιο στην ανθρώπινη και στην πειραματική μυοκαρδίτιδα. Ο σπλήνας είναι μια σημαντική δεξαμενή των προδρόμων μονοκυττάρων σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Η καρδιακή βλάβη στην μυοκαρδίτιδα έχει αρχικά ως αποτελέσματα την προσέλκυση Ly6Chi φλεγμονωδών μακροφάγων^{114,115}. Ο αποκλεισμός χημειοκινών που συνδέονται με την προσέλκυση των Ly6Chi μακροφάγων, φαίνεται να δρα θεραπευτικά σε πρωτόκολλα αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας^{116,117}. Τα τύπου 1 T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺Th1) επηρεάζουν έντονα τη λειτουργική διαφοροποίηση των μονοκυττάρων προς προφλεγμονώδη ή κλασικά M1 μακροφάγα¹¹⁸. Η ιντερφερόνη γ (IFN-γ) που εκκρίνουν τα Th1, ενισχύει την μικροβιοκτόνο δράση των μακροφάγων και, ως εκ τούτου, προωθεί την αντιγονοπαρουσίαση¹¹⁹. Ενεργοποιημένα Ly6Clow M2 μακροφάγα κυριαρχούν κατά τη διάρκεια της διαδικασίας επούλωσης του μυοκαρδίου^{120,121} καταστέλλοντας τη φλεγμονώδη απόκριση και προωθώντας την καρδιακή ίνωση και επούλωση^{105,120}. Οι κυτοκίνες που εκκρίνονται από τα τύπου 2 T βοηθητικά λεμφοκύτταρα (CD4⁺Th2), κυρίως η IL-4 και η IL-13, ενεργοποιούν τον αντι-φλεγμονώδη φαινότυπο των μακροφάγων, M2¹²¹. Αυτά τα κύτταρα M2 είναι επίσης χαρακτηριστικά της μετάβασης από την οξεία μυοκαρδίτιδα στη χρόνια με την αναδιαμόρφωση της καρδιάς, όπου τα μακροφάγα αντικαθίστανται από προϊνωτικούς μυοϊνοβλάστες^{122,123}. Συνοψίζοντας, οι φαινότυποι των μακροφάγων in vivo είναι μεταβλητοί, λόγω της υψηλής πλαστικότητας και ικανότητας τους να υιοθετούν διαφορετικές εξειδικευμένες λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένου της μικροβιοκτόνου δράσης, της

αντιγονοπαρουσίασης, της ανοσορύθμισης και της ίνωσης, ανάλογα με τις τοπικές κυτοκίνες και χημειοκίνες.

1.4.2.3 Ο ρόλος των T λεμφοκυττάρων

Τα T λεμφοκύτταρα παίζουν κεντρικό ρόλο στην εξέλιξη της μυοκαρδίτιδας. Οι κυτταρικές αποκρίσεις των T λεμφοκυττάρων είναι κρίσιμες για να ξεπεραστεί η πρώιμη οξεία ιογενείς λοίμωξη σε τρωκτικά και ανθρώπους¹²⁵⁻¹²⁷. Η απόκριση των T-κυττάρων, ιδίως των CD4⁺ κυττάρων, μπορεί να μετατρέψει την αρχική μυοκαρδίτιδα σε αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα, ακόμη και μετά την εκκαθάριση του αιτιολογικού παράγοντα¹²⁸, κυρίως μέσω της επίθεσης τους εναντίων της βαριάς αλυσίδας άλφα της μυοσίνης (α -MyHC)¹²⁹. Τα ενεργοποιημένα δενδριτικά κύτταρα που εκφράζουν τα αυτοαντιγόνα, προωθούν την εξάπλωση των αυτοαντιδραστικών CD4⁺ T-κύτταρων και την καρδιο-ειδική φλεγμονή^{92,130}. Διαγονιδιακοί ποντικοί που υπερεκφράζουν τους α -MyHC-ειδικούς υποδοχείς των T κυττάρων (TCR) σε όλα σχεδόν τα CD4⁺ T λεμφοκύτταρα, αναπτύσσουν αυθόρμητη αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα, ακόμη και μετά από ελάχιστη ενεργοποίηση των κυττάρων αντιγονοπαρουσίασης¹³¹. Τα CD4⁺ T κύτταρα μπορούν να χωριστούν ανάλογα με τις κυτοκίνες που παράγουν, σε 3 μεγάλα υποσύνολα: Th1 κύτταρα που κυρίως παράγουν ιντερφερόνη γ (IFN- γ), Th2 κύτταρα που κυρίως παράγουν ιντερλευκίνη 4, 5 και 13 (IL-4, -5, και -13), και Th17 κύτταρα που παράγουν κυρίως IL-17. Αυτές οι υποομάδες παίζουν διαφορετικούς ρόλους στη μυοκαρδίτιδα και στην εξέλιξη της σε διατακτική μυοκαρδιοπάθεια^{111,132-134}.

Τα Th1 κύτταρα που παράγουν IFN- γ κυριαρχούν στην αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα σε ποντικούς και σε πάσχοντες ανθρώπους. Επίσης, ποντίκια που υπερεκφράζουν IFN- γ αναπτύσσουν αυθόρμητα καρδιακή φλεγμονή¹³¹. Τα ευρήματα αυτά υποδεικνύουν πως τα CD4⁺ Th1 κύτταρα διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην μυοκαρδίτιδα. Ταυτόχρονα εκτός από την προώθηση της φλεγμονής, η IFN- γ έχει έναν παράδοξο ρόλο στην πρόληψη της υπερβολικής φλεγμονώδους απόκρισης. Σε ποντίκια που προσκλήθηκε ιική, παρασιτική ή αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα έχει παρατηρηθεί ότι σε περίπτωση απουσίας της IFN- γ , η καρδιακή φλεγμονή ήταν εντονότερη¹³⁵⁻¹³⁷. Η IFN- γ ουσιαστικά είναι ένας βασικός παράγοντας της αρνητικής ανάδρομης ρύθμισης της ενεργοποίησης των T-κυττάρων, προωθώντας την παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου από τα T_{reg}DCs, μία διακριτή υποομάδα CD68⁺ CD11b^{hi} CD11c⁺ δενδριτικών κυττάρων¹³⁸, το οποίο επάγει άμεσα την απόπτωση των ενεργοποιημένων Th1 και Th17 κυττάρων. Συνολικά τα Th1 κύτταρα παίζουν ένα διττό ρόλο: ως μεσολαβητές

στις αρχές της εξάπλωσης των αυτοάνοσων T κύτταρων, και ως ρυθμιστές μέσω αρνητικής ανάδρομης δράσης που προστατεύει από την εμφάνιση υπερβολικής καρδιακής φλεγμονής.

Όσον αφορά τον ρόλο των Th1 κύτταρων στην ανάπτυξη της ίνωσης, υπάρχει διχογνωμία στην επιστημονική κοινότητα καθώς άλλες μελέτες δείχνουν προινώδη και άλλες αντινώδη δράση. Σε μια μελέτη θεραπείας με αγγειοτενσίνη II σε IFN- γ R knockout ποντίκια, τα ποντίκια παρουσίασαν μειωμένη καρδιακή υπερτροφία, μειωμένη διήθηση του μυοκαρδίου από μακροφάγα και T κύτταρα και λιγότερη καρδιακή ίνωση. Από την άλλη η IFN- γ ασκεί την προϊνωτική της δράση μέσω της εντατικοποίησης της παραγωγής προφλεγμονωδών και προ-ινωτικών μεσολαβητών όπως ο παράγοντας νέκρωσης των όγκων α (TNF- α)^{90,91}. Επίσης τα T κύτταρα που παράγουν IFN- γ (Th1) είναι γνωστό ότι ελέγχουν τη διαφοροποίηση, μετανάστευση και ενεργοποίηση των μακροφάγων η οποία τελικά οδηγεί σε φλεγμονή και ίνωση^{175,184}. Η IFN- α και IFN- γ αναστέλλουν ισχυρά την παραγωγή κολλαγόνου από τους ανθρώπινους ινοβλάστες, που ρυθμίζουν την φυσιολογική και παθολογική ινογένεση¹⁸⁶. Η IFN- γ αναστέλλει την IL-4 και IL-13 διαμεσολαβούμενη διαφοροποίηση των ινοκυττάρων σε μυοϊνοβλάστες²³⁵. Σε ένα μοντέλο χρόνιας ιογενούς μυοκαρδίτιδας, η IFN- γ μείωσε την TGF- β 1, IL-1 β και IL-4 διαμεσολαβούμενη φλεγμονή και ίνωση¹⁴⁸. Έτσι γίνεται κατανοητό ότι μέχρι στιγμής δεν μπορούμε να χαρακτηρίσουμε την δράση των T λεμφοκυττάρων αμιγώς ινωτική ή αντιϊνωτική.

Η αναλογία των CD4 + T βοηθητικών κυτταρικών υποσυνόλων, Th1 και Th2, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις αλλεργικές και αυτοάνοσες νόσους. Τα βοηθητικά T κύτταρα τύπου 2 (Th2) όπως ήδη έχει αναφερθεί, μέσω των κυτοκινών τους IL-4 και η IL-13, ενεργοποιούν τον αντι-φλεγμονώδη φαινότυπο των μακροφάγων, M2¹²¹ ενώ επίσης έχει αποδειχθεί ότι επάγουν την διαφοροποίηση των ανθρώπινων ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστες²⁴⁹. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι η αναλογία των δύο τύπων των T βοηθητικών λεμφοκυττάρων μετατοπίζει την ανοσοαπόκριση από φλεγμονώδη σε αντιφλεγμονώδη και επουλωτική, και αντίστροφα.

Τα κύτταρα Th17 έχουν αναγνωριστεί ως ένας σημαντικός υποπληθυσμός T-κυττάρων στη μυοκαρδίτιδα. Η ελάττωση της IL-17 έχει ως επακόλουθο την μείωση της σοβαρότητας της αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας σύμφωνα με μελέτες σε

ποντικούς^{139,140}. Ωστόσο, η πλήρη απουσία της IL-17A σε knockout ποντίκια δεν φάνηκε να επηρεάζει την μυοκαρδίτιδα, αλλά συνδέθηκε με σημαντική μείωση της καρδιακής ίνωσης και της εξέλιξης σε διατακτική μυοκαρδιοπάθεια¹⁴¹. Επίσης, ποντικοί που έχουν έλλειψη IL-23 ή σήμα μορφοτροπέα και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3, όπου είναι κρίσιμοι για την διαφοροποίηση των Th17, παρουσιάζουν μειωμένης βαρύτητας μυοκαρδίτιδα^{133,136}. Είναι σημαντικό ότι, η απόκριση των Th17 στην καρδιακή μυοσίνη προωθεί, στην ανθρώπινη μυοκαρδίτιδα, την ανάπτυξη καρδιακής ανεπάρκειας¹⁴². Συνολικά, τα Th17 κύτταρα μαζί με τις σχετιζόμενες με αυτά κυτοκίνες ενισχύουν την φλεγμονώδη απάντηση και την αυτοανοσία και αποτελούν κύριους παράγοντες, κυρίως για την χρόνια μυοκαρδίτιδα¹⁵².

Τέλος, σημαντικός είναι ο ρόλος των T βοηθητικών κυττάρων για την παραγωγή αυτοαντισωμάτων καθώς καρδιο-ειδικά αυτοαντισώματα ανοσοσφαιρίνης G που εξαρτώνται από T-βοηθητικά κύτταρα είναι παρόντα στην μυοκαρδίτιδα και την διατακτική μυοκαρδιοπάθεια ανθρώπων και τρωκτικών. Η παρουσία των αυτοαντισωμάτων, όπως αναλυτικά αναφέρεται και στην συνέχεια, αποτελεί προγνωστικό παράγοντα για τους ασθενείς με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια¹⁴³⁻¹⁴⁶.

1.4.2.4 Ο ρόλος των καρδιακών ινοβλαστών

Οι ινοβλάστες αντιπροσωπεύουν το 60-70% των κυττάρων της καρδιάς^{154,155} και έχουν βασικό ρόλο στον σχηματισμό της καρδιακής εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας λόγω της ικανότητάς τους να συνθέτουν και να εκκρίνουν ινιδικό κολλαγόνο τύπου I και III¹⁵⁶. Εκτός από το ρόλο τους στην παραγωγή της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας, οι καρδιακή ινοβλάστες είναι στενά συνδεδεμένοι με άλλα καρδιακά κύτταρα μέσω επαφής κύτταρο με κύτταρο ενώ επίσης εκκρίνουν και βιοδραστικά ρυθμιστικά μόρια. Έτσι, οι καρδιακοί ινοβλάστες είναι σε θέση κλειδί και λειτουργούν ως κύτταρα φρουροί στο μυοκάρδιο¹⁵⁷. Οι καρδιακή ινοβλάστες λαμβάνουν ερεθίσματα από το περιβάλλον και απαντούν εκκρίνοντας βιοδραστικά μόρια όπως κυτοκίνες, αγγειοδραστικά πεπτίδια και αυξητικούς παράγοντες¹⁵⁷. Έτσι οι ινοβλάστες έχουν τη δυνατότητα να συμμετέχουν στη διατήρηση της φλεγμονώδους απόκρισης μέσω της έκφρασης χημειοκινών και αλληλοεπιδρώντας με φλεγμονώδη κύτταρα¹⁵⁵. Στην πρώτη γραμμή άμυνας κατά την παθογένεση της μυοκαρδίτιδας, το έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα ενεργοποιεί τους καρδιακούς ινοβλάστες μέσω υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων¹⁵⁴. Οι καρδιακοί ινοβλάστες, έχειδειχθεί ότι εκφράζουν ποικιλία υποδοχέων αναγνώρισης προτύπων, συμπεριλαμβανομένων των υποδοχέων

τύπου ΤοΠ (TLRs), και η ενεργοποίηση αυτών των υποδοχέων ενεργοποιεί άμεσα τους ινοβλάστες και προωθεί τη διαφοροποίηση τους σε μυοϊνοβλάστες που παράγουν κολλαγόνο¹⁵⁸. Η υπερβολική εναπόθεση κολλαγόνου τύπων Ι και ΙΙΙ στο διάμεσο και περιαγγειακό χώρο οδηγεί σε καρδιακή ίνωση¹⁵⁹. Αυτό προκαλεί καρδιακή δυσκαμψία και εξασθένηση της καρδιακής χαλάρωσης και πλήρωσης (διαστολική δυσλειτουργία), και υπερφόρτωση της καρδιάς¹⁶⁰. Κλινικά δεδομένα έχουν επιβεβαιώσει την περίσσεια συνθέσεως καρδιακού κολλαγόνου τύπου Ι και την εναπόθεσή του στην καρδιά ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια¹⁶¹. Ως εκ τούτου, συνεπάγεται ότι ένας θεραπευτικός παράγοντας ο οποίος είναι σε θέση να αναστείλει την διαφοροποίηση των ινοβλαστών προς μυοϊνοβλάστη μπορεί να αναστείλει την αναδιαμόρφωση της καρδιάς¹⁴⁸.

1.4.3 Αυτοανοσία στην μυοκαρδίτιδα

Απόδειξη για την αυτοανοσία στη μυοκαρδίτιδα αποτελεί η παρουσία διαφόρων αυτοαντισωμάτων έναντι καρδιακών αντιγόνων στο αίμα και στο μυοκάρδιο των ασθενών καθώς και η αυξημένη έκφραση των ανθρώπινων λευκοκυτταρικών αντιγόνων (HLA) στην καρδιά¹⁶². Γενετικές συσχετίσεις, αν και ασθενής, υπάρχουν μεταξύ της μυοκαρδίτιδας και των HLA-DR4 και HLA-DQB1^{163,164}. Ασυμπτωματικοί συγγενείς των ασθενών που έχουν αυτοαντισώματα έχουν προδιάθεση για εμφάνιση της νόσου¹⁶⁵. Η ακριβής αποτύπωση των μονοπατιών που οδηγούν από την ιική μόλυνση στην αυτοανοσία, δεν είναι εύκολη στους ανθρώπους λόγω του χρόνου που μεσολαβεί μεταξύ της αρχικής λοίμωξης και της κλινικής εκδήλωσης της νόσου. Επίσης, η παρουσία της αυτοανοσίας δεν έχει αποδειχθεί ότι είναι η πρωταρχική αιτία της καρδιακής δυσλειτουργίας και όχι ένα δευτερογενές αποτέλεσμα της βλάβη του ιστού. Φαίνεται ότι η IFN γ , που παράγεται από τα Th1, τα κύτταρα φυσικοί φονείς και τα $\gamma\delta$ +T κύτταρα, κύτταρα απαραίτητα για την πρόκληση της μυοκαρδίτιδας, σχετίζονται άμεσα με την παραγωγή καρδιακών αυτοαντισωμάτων.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί το πιο καλά μελετημένο μοντέλο μυοκαρδίτιδας είναι αυτό της μυοκαρδίτιδας από τον ιό coxsackie B3 (CVB3) σε ποντικούς. Χρησιμοποιώντας το συγκεκριμένο μοντέλο ανιχνεύτηκαν στους ποντικούς, CD4+T κύτταρα ενεργοποιημένα από ειδικούς επίτοπους της βαριάς αλυσίδας άλφα της καρδιακής μυοσίνης (aMYHC), χρησιμοποιώντας το σύμπλεγμα μείζονος ιστοσυμβατότητας (MHC) τάξης II dextramers^{167,168}. Ανοσοποίηση ποντικών με αυτο-επίτοπους επάγει την ανάπτυξη μυοκαρδίτιδας επιβεβαιώνοντας την αυτοανοσία. Είναι

σημαντικό ότι, το πεπτίδιο aMYHC δείχνει ισχυρή διασταυρούμενη αντιδραστικότητα με έναν πλήθος οργανισμών όπως *Bacillus* spp. και *Cryptococcus neoformans* και τα αντίστοιχα πεπτίδια από αυτούς τους οργανισμούς επάγουν την εμφάνιση ποικίλης βαρύτητας μυοκαρδίτιδα σε ποντικούς¹⁶⁹. Τα άτομα που μολύνονται από συγκεκριμένο παθογόνο μικροοργανισμό, όπως από τον CVB3, μπορούν να αναπτύξουν μακροχρόνια ανοσία που τους προστατεύει από την εκ νέου μόλυνση από το ίδιο μικρόβιο. Ωστόσο, οι επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις με μια ποικιλία μη σχετιζόμενων μικροβίων που μοιράζονται όμως τον ίδιο επίτοπο που μιμείται την καρδιακή μυοσίνη, μπορούν να οδηγήσουν σε συνεχώς αυξανόμενη αυτοάνοση απόκριση μνήμης οδηγώντας σε ποσοτική άθροιση της καρδιακής βλάβης. Αυτό το φαινόμενο μπορεί επίσης να εξηγήσει άλλες αυτοάνοσες ασθένειες, στις οποίες υπάρχει υποψία μολυσματικής αιτίας αλλά το παθογόνο αίτιο ήταν παροδικό. Αντί για ένα μόνο παθογόνο μικροοργανισμό που προκαλεί αυτοάνοση, υπάρχει μια ποικιλία παθογόνων που μοιράζονται έναν επίτοπο που προκαλεί διασταυρούμενη αντίδραση.

Η παρουσία των αυτοαντισωμάτων είναι χαρακτηριστικό όλων των μορφών φλεγμονώδους μυοκαρδιοπάθειας. Τα αυτοαντισώματα μπορεί να επιτίθενται προς έναν αριθμό διαφορετικών αντιγόνων, μερικά από τα οποία είναι ειδικά για τα κύτταρα της καρδιάς. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την ανίχνευση των αντισωμάτων έναντι της καρδιάς στον ανθρώπινο ορό είναι ο έμμεσος ανοσοφθορισμός^{172,173}. Αυτά τα αντισώματα μπορούν να βρεθούν σε πολλές μορφές καρδιακής φλεγμονής όπως ρευματική καρδιακή νόσος, Dressler σύνδρομο και σύνδρομο μετά την περικαρδιοτομή ή στην απόρριψη του καρδιακού μοσχεύματος. Σύμφωνα με στοιχεία από καρδιές επίμυων, IgG αντισώματα είναι παρόντα στο 59% των περιπτώσεων μυοκαρδίτιδας, στο 20% διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας και σε λιγότερο από το 5% των φυσιολογικών μαρτύρων. Ο πιο σημαντικός αντιγονικός στόχος είναι η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης¹⁷⁴. Σύμφωνα με μελέτες διακρίνονται αυτοαντισώματα ειδικά για το καρδιακό ισομερές της βαριάς αλυσίδας τη μυοσίνης, ενώ άλλα αντισώματα έχουν διασταυρούμενη αντίδραση και με την μυοσίνη των σκελετικών μυών και του εγκεφάλου. Τα καρδιοειδικά αντισώματα της κατηγορίας IgG είναι πιο στενά συνδεδεμένα με μυοκαρδιοπάθεια. Τα αντισώματα IgM που δεν είναι ειδικά για την καρδιακή μυοσίνη βρίσκονται συχνά σε άλλες φλεγμονώδεις διεργασίες.

Ένα σημαντικό ερώτημα είναι αν τα αυτοαντισώματα αυτά μπορούν να ξεκινήσουν μια αυτοάνοση απόκριση εναντίον των κανονικών καρδιακών κυττάρων ή αν είναι μια απάντηση στα κατεστραμμένα καρδιακά κύτταρα. Σε μια προοπτική μελέτη οικογενούς διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας αναφέρεται ότι καρδιοειδικά αυτοαντισώματα προηγούνται της ανάπτυξης της ασθένειας σε ασυμπτωματικούς συγγενείς των ασθενών με μυοκαρδιοπάθεια¹⁶⁵. Με αυτόν τον τρόπο, τα αντισώματα κατά της καρδιακής μυοσίνης θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικοί δείκτες.

Τα στοιχεία αυτά οδηγούν σε ένα δεύτερο ερώτημα: τι είναι αυτό που κάνει το αυτοαντιγόνο των μη μολυσμένων μυϊκών κυττάρων να έρχεται σε επαφή με το ανοσοποιητικό σύστημα. Ο IFN γ φαίνεται να παίζει τον βασικό ρόλο σε αυτή την διαδικασία. Ο IFN γ είναι υπεύθυνος για την ατροφία των καρδιομυοκυττάρων και την επιλεκτική αποδόμηση της α MYHC χωρίς να αυξάνεται η αποδόμηση των υπόλοιπων πρωτεϊνών του μυοκυττάρου¹⁷⁰. Αυτό σημαίνει ότι ο IFN γ προκαλεί την αύξηση της παραγωγής του πεπτιδίου της μυοσίνης χωρίς να προκαλεί γενικευμένη αύξηση όλων των καρδιακών πεπτιδίων, αυτό μπορεί να εξηγήσει γιατί η καρδιακή μυοσίνη είναι το πιο συχνά εμπλεκόμενο στη μυοκαρδίτιδα αυτοαντιγόνο. Απόδειξη ότι η καρδιακή μυοσίνη είναι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας στην μυοκαρδίτιδα αποτελεί και το γεγονός ότι σε μελέτες μετά από ρινική χορήγηση καρδιακής μυοσίνης αναπτύσσονταν ανοχή¹⁷¹, η οποία στη συνέχεια προστάτευε τους ποντικούς από CVB3 μυοκαρδίτιδα. Ωστόσο δεν είναι γνωστό πως τα αντισώματα έναντι καρδιακής μυοσίνης ασκούν λειτουργικό αποτέλεσμα *in vivo*, παρότι μελέτη σε ασθενείς με χρόνια μυοκαρδίτιδα έδειξε ότι τα αυτοαντισώματα έναντι της μυοσίνης συσχετίζονται με την συστολική και διαστολική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας¹⁷⁶.

Εκτός των αυτοαντισωμάτων έναντι στην καρδιακή μυοσίνη, έχουν βρεθεί και άλλα αυτοαντισώματα στην φλεγμονώδη μυοκαρδιοπάθεια με λειτουργική δράση *in vitro*¹⁷⁷. Στα αυτοαντισώματα αυτά περιλαμβάνονται αντισώματα έναντι διαφόρων μιτοχονδριακών αντιγόνων όπως ο μεταθέτης αδερίνης (adenine nucleotide translocator-ANT) και η αφυδρογονάση των αλφα-κετοξέων διακλαδισμένης αλυσίδας. Αν τα αντισώματα αυτά έχουν λειτουργική επίδραση *in vivo* εξακολουθεί να είναι αμφιλεγόμενο. Σε μια μελέτη με αντι-ANT αντισώματα φάνηκε να αντιδρούν με συμπλέγματα πρωτεϊνών των διαύλων ασβεστίου των καρδιομυοκυττάρων με αποτέλεσμα να αυξάνουν τις ενεργειακές απαιτήσεις εντός των καρδιομυοκυττάρων

και μετέπειτα να προκαλούν κυτταρικό θάνατο *in vivo*¹⁷⁸. Μια ομάδα αντισωμάτων που μπορεί να έχουν σαφή λειτουργική σημασία κατευθύνονται έναντι των υποδοχέων της κυτταρικής επιφάνειας. Τα αντισώματα προς τον αδρενοϋποδοχέα β1 συνδέονται εκλεκτικά με αλληλουχίες στο δεύτερο εξωκυττάριο βρόχο των β1 αδρενεργικών υποδοχέων και ασκούν ανασταλτική δράση^{179,180}. Αντισώματα αντι-βητα-1 αδρενοϋποδοχέα ανιχνεύονται σε ποσοστό έως 38% των ασθενών με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια¹⁴⁷ και φαίνεται να επιτρέπουν την πρόβλεψη της εξέλιξη της καρδιακής δυσλειτουργίας στους συγγενείς των ασθενών με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια¹⁴⁴. Άλλη μελέτη αναφέρει ανίχνευση IgG αντι-αδρενοϋποδοχέα β1 αντισώματα στον ορό του αίματος σε έως και το 75% των ασθενών με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια έναντι 18% των υγίων μαρτύρων. Το γεγονός ότι η απομάκρυνση των αυτοαντισωμάτων αυτών με ανοσοπροσρόφηση βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία, καταδεικνύει την αρνητική τους επίδραση στην καρδιακή λειτουργία^{162,166}. Επίσης 39% των ασθενών με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια είχε αντι-MII (έναντι μουσκαρινικών II υποδοχέων ακετυλοχολίνης) αντισώματα σε σύγκριση με το 7% των υγίων μαρτύρων. Τέλος πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι οι ασθενείς με μυοκαρδιοπάθεια παρήγαγαν αντισώματα έναντι της τροπονίνης I¹⁸³. Η πιθανή λειτουργική βλάβη που σχετίζεται με το αυτοαντίσωμα αυτό έχει δείχθει από πειράματα σε ποντικούς όπου η ανοσοποίηση των ποντικών με ανασυνδυασμένη τροπονίνη I οδήγησε σε σοβαρή φλεγμονή ακολουθούμενη από καρδιομεγαλία, ίνωση, μειωμένη κλασματική βράχυνση, και 30% θνησιμότητα¹⁵⁰.

Αποδεικτικά στοιχεία του λειτουργικού ρόλου των κυκλοφορούντων αντισωμάτων έχουν προέλθει και από κλινικές δοκιμές της *ex vivo* ανοσοπροσρόφησης^{181,182} όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη παράγραφο. Η ανοσοπροσρόφηση με στήλες αντι-ανοσοσφαιρίνης G εξαλείφει αποτελεσματικά τις IgG και οδηγεί σε μακροπρόθεσμο θεραπευτικό όφελος στη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια. Αντίθετα, η ανοσοπροσρόφηση με πρωτεΐνη A, η οποία δεν εξαλείφει τις IgG3, δεν επάγει βελτίωση της νόσου, δείχνοντας ότι τα λειτουργικά σημαντικά αντισώματα ανήκουν στην υποομάδα των ανοσοσφαιρινών IgG3.

Από τα ανωτέρω γίνεται σαφές ότι η αυτοανοσία στην μυοκαρδίτιδα διαδραματίζει σημαντικό και ενδεχομένως κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της μυοκαρδίτιδας και της εξέλιξη της σε φλεγμονώδη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια.

1.5 Κλινική εκδήλωση

Η μυοκαρδίτιδα κέρδισε εύλογα τον τίτλο του «μεγάλου μίμου-great mimic» καθώς μπορεί να παρουσιαστεί με διαφορετικές μορφές, «κεραυνοβόλου», οξείας, υποξείας, χρόνιας ή σιωπηλής φλεγμονής. Συνήθως εμφανίζεται σε υγιή άτομα, με ή χωρίς πρόδρομο νόσο και μπορεί να οδηγήσει σε αρρυθμία ή/και ταχέως εξελισσόμενη καρδιακή ανεπάρκεια. Ως πρόδρομη νόσος μπορεί να υπάρχει στο πρόσφατο ιστορικό ($\leq 1-2$ εβδομάδες) συμπτωματολογία γριπώδους συνδρομής όπως πυρετός, αρθραλγίες, κακουχία, λοίμωξη του αναπνευστικού ή του γαστρεντερικού συστήματος. Οι ασθενείς με μυοκαρδίτιδα μπορεί να έχουν ήπια συμπτώματα, κάνοντας την διάγνωση δύσκολη, με συνηθέστερα τον πόνο στο στήθος, τον πυρετό, την εφίδρωση, το ρίγος και την δύσπνοια. Επίσης μπορούν να προστεθούν στα συμπτώματα το αίσθημα παλμών, η συγκοπή αλλά και ο ξαφνικός θάνατος ως αποτέλεσμα των κοιλιακών αρρυθμιών ή του κολποκοιλιακού αποκλεισμού, ειδικά στην γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα. Μπορεί ακόμα σε ασθενείς με μυοκαρδίτιδα να παρατηρηθεί αιφνίδιας έναρξης ή οξεία αντιρροπούμενη καρδιακή ανεπάρκεια¹⁵¹.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η κλινική εκδήλωση της μυοκαρδίτιδας παρουσιάζεται με 3 κύρια μοντέλα: (1) πρόσφατης έναρξης καρδιακή ανεπάρκεια (<6μήνες), (2) αρρυθμίες, και (3) πόνος στο στήθος^{42,185}. Σύμφωνα με την Ομάδα Εργασίας για τις παθήσεις του μυοκαρδίου και του περικαρδίου της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρείας, η κλινική υποψία μυοκαρδίτιδας πρέπει να τίθεται σε κάθε ένα από τα προαναφερθέντα μοντέλα κλινικής εκδήλωσης, αφού αποκλειστούν καταστάσεις, όπως η ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, οι βαλβιδοπάθειες, οι συγγενείς καρδιοπάθειες και η υπερτασική καρδιοπάθεια⁴.

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μυοκαρδίτιδα καθώς και η βραχυχρόνια εξέλιξή τους θα μπορούσαν να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία στην προγνωστική διαστρωμάτωση των ασθενών, προκειμένου να καθοριστεί η περαιτέρω βέλτιστη διαχείρισή τους. Με βάσει της τρέχουσες συστάσεις⁴ οι ασθενείς με μυοκαρδίτιδα μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 ομάδες βάσει της πρόγνωσης τους: (1) Υψηλού κινδύνου-μείζων κλινική συνδρομή. Κυρίως περιλαμβάνονται οι περιπτώσεις με πρόσφατης έναρξης καρδιακή ανεπάρκεια με σοβαρή δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας ή / και απειλητικές για τη ζωή αρρυθμίες. Η πρόγνωση εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη βραχυπρόθεσμη ανταπόκριση στη θεραπεία και την εξέλιξη των

κλινικών και λειτουργικών παραμέτρων. (2) Χαμηλού κινδύνου κλινική συνδρομή. Οι περιπτώσεις αυτές είναι συνήθως που χαρακτηρίζονται από μια καλή μακροπρόθεσμη πρόγνωση όπως για παράδειγμα η εκδήλωση της μυοκαρδίτιδας με πόνο στο στήθος ή / και υπερκοιλιακές αρρυθμίες με μη επηρεασμένη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας και ταχεία, μέσα σε 1-4 εβδομάδες, πλήρη επαναφορά των ηλεκτροκαρδιογραφικών και των υπερηχοκαρδιογραφικών ανωμαλιών. (3) Ενδιάμεσου κινδύνου κλινική συνδρομή. Αν και οι περισσότερες περιπτώσεις μυοκαρδίτιδας ταξινομούνται ως υψηλής ή χαμηλής επικινδυνότητας, μερικές χαρακτηρίζονται από την παρουσία δομικών ή λειτουργικών ανωμαλιών, όπως ήπια έως μέτρια κοιλιακή δυσλειτουργία ή ηλεκτροκαρδιογραφικές ανωμαλίες όπως η συχνή μη εμμένουσα κοιλιακή ταχυκαρδία, οι οποίες θέτουν τις περιπτώσεις αυτές στην γκρίζα ζώνη με αβέβαιη πρόγνωση²².

1.6 Διάγνωση

Αρκετές μη επεμβατικές διαγνωστικές εξετάσεις με διαφορετικές διαγνωστικές δυνατότητες και ακρίβεια είναι διαθέσιμες για τον διαγνωστικό έλεγχο επί υποψίας μυοκαρδίτιδας. Το ιστορικό μαζί με το ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ), τους βιοδείκτες, το Holter παρακολούθησης και τα υπερηχοκαρδιογραφικά χαρακτηριστικά, θα πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά αφού αποκλειστούν άλλες πιθανές αιτίες όπως η ισχαιμική και υπερτασική μυοκαρδιοπάθεια και οι βαλβιδοπάθειες. Το πλήρες ιατρικό ιστορικό είναι απαραίτητο και πληροφορίες όπως συμπτώματα γρίπης, τσίμπημα εντόμου (υποψία για *Borrelia* ή *Rickettsia*), ο χρόνος έναρξης συμπτωμάτων, το οικογενειακό ιστορικό μυοκαρδιοπάθειας, η κατανάλωση φαρμάκου ή τοξικής ουσίας, μπορούν να κατευθύνουν τον θεράπων ιατρό και να οδηγήσουν στην διάγνωση²².

Τα ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα είναι συνήθως μη ειδικά και περιλαμβάνουν φλεβοκομβική ταχυκαρδία, παράταση του διαστήματος PR και μη ειδικές ST αλλαγές. Οι ανωμαλίες του τμήματος ST και του κύματος T είναι το τυπικό ΗΚΓ της μυοκαρδίτιδας, αλλά είναι συνήθως παροδικές. Άλλες ΗΚΓ ανωμαλίες που παρατηρούνται είναι οι κολπικές και κοιλιακές αρρυθμίες, τα Q κύματα, οι διαταραχές της καρδιακής αγωγιμότητας και επαναπόλωσης^{187,188}. Καρδιακά μπλοκ, κολπική ή κοιλιακή αρρυθμία, και ST αλλαγές ενδεικτικές μυοκαρδιακής ισχαιμίας ή περικαρδίτιδας μπορεί να είναι κακοί προγνωστικοί δείκτες. Η παράταση του QRS

είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για δυσμενή έκβαση, δηλαδή μεταμόσχευση καρδιάς ή θάνατο¹⁸⁹. Σύμφωνα με μια μελέτη στο 24,4% της μυοκαρδίτιδας, το ΗΚΓ ήταν απολύτως φυσιολογικό, ενώ στο 39% παρατηρήθηκε ανάσπαση του ST. Ανωμαλίες του QRS βρέθηκαν στο 29% και συσχετίστηκαν με χαμηλότερο κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας¹⁵¹.

Ο συνήθης εργαστηριακός αιματολογικός έλεγχος περιλαμβάνει γενική αίματος, ταχύτητα καθίζησης ερυθρών αιμοσφαιρίων, C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, ρευματολογικούς δείκτες, τίτλο ικών αντισωμάτων ορού και επίπεδα καρδιακών ενζύμων όπως η κρεατινική κινάση και η καρδιακή τροπονίνη. Αυξημένα επίπεδα τροπονίνης αντανακλούν μυοκαρδιακή νέκρωση¹⁹⁰. Ωστόσο, η τροπονίνη δεν αποτελεί προγνωστικό δείκτη^{191,192} και έχει μικρή ακρίβεια στην ανίχνευση της καρδιακής φλεγμονής¹⁹³. Σύμφωνα με νεκροτομική μελέτη μετά από θανατηφόρα μυοκαρδίτιδα μόνο στο 18% των ασθενών είχαν αυξημένα επίπεδα κρεατινικής κινάσης¹⁹⁴. Σε γενικές γραμμές, σε ασθενείς με οξεία πόνο στο στήθος, αυξημένη τροπονίνη και μη αποφραγμένα στεφανιαία αγγεία, η μυοκαρδίτιδα είναι η συχνότερη αιτία και ένα φυσιολογικό ΗΚΓ, μια αρνητική τροπονίνη ή / και κρεατινική κινάση δεν αποκλείουν τη διάγνωση της μυοκαρδίτιδας^{195,196}.

Τα κύρια ηχοκαρδιογραφικά ευρήματα της μυοκαρδίτιδας περιλαμβάνουν περιοχική ή/και ολική δυσλειτουργία και διάταση της αριστερής κοιλίας. Σε μια μελέτη με ιστολογικά επιβεβαιωμένη μυοκαρδίτιδα, η δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και η ασυνέργια ήταν τα πιο κοινά ευρήματα¹⁹⁷. Η δυσλειτουργία της δεξιάς κοιλίας αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη για δυσμενή έκβαση, συμπεριλαμβανομένου του θανάτου ή της καρδιακής μεταμόσχευσης¹⁹⁸. Αν και το κλασικό υπερηχογράφημα καρδιάς θεωρείται ως πολύ σημαντικό εργαλείο για την αξιολόγηση της λειτουργίας του μυοκαρδίου, η εκτίμηση και αξιολόγηση του είναι υποκειμενική και έχει υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ των εξεταστών^{199,200}. Νέες υπερηχογραφικές τεχνικές έχουν αναδειχθεί ως πιο αξιόπιστα εργαλεία για την αξιολόγηση της καρδιακής λειτουργίας. Ωστόσο υπάρχουν μόνο λίγες αναφορές σχετικά με το ρόλο αυτών των νέων υπερηχοκαρδιογραφικών τεχνικών όπως είναι το ιστικό Doppler (TDI), η ποσοστιαία παραμόρφωση (strain), ο ρυθμός ποσοστιαίας παραμόρφωσης (strain rate) και το τρισδιάστατο υπερηχοκαρδιογράφημα, και δεν μπορούν τα μέχρι τώρα δεδομένα να υποστηρίξουν ότι οι τεχνικές αυτές μπορούν να είναι εξίσου αξιόπιστες με την μαγνητική απεικόνιση που περιγράφεται παρακάτω¹⁵¹.

Η μαγνητική τομογραφία καρδιάς (CMR) αποτελεί χρήσιμο εργαλείο για τη μορφολογική και λειτουργική αξιολόγηση των καρδιακών δομών και το χαρακτηρισμό του μυοκαρδιακού ιστού, παρέχοντας χρήσιμες διαγνωστικές και προγνωστικές πληροφορίες^{42,191}. Για τη διάγνωση της μυοκαρδίτιδας χρησιμοποιούνται τρεις τύποι εικόνων CMR: T2-W, T1 εικόνες πρώιμης ενίσχυσης με γαδολίνιο (EGE) όπου εικόνες λαμβάνονται 1 λεπτό μετά την έγχυση γαδολινίου και εικόνες καθυστερημένες ενίσχυσης με γαδολίνιο (LGE) με εικόνες που λαμβάνονται 15 λεπτά μετά την έγχυση του γαδολινίου²⁰². Οι T2-W εικόνες ανιχνεύουν το ελεύθερο νερό των ιστών το οποίο αυξάνεται κατά τη διάρκεια μιας φλεγμονώδους ή νεκρωτικής διεργασίας, όπως σε μυοκαρδίτιδα ή έμφραγμα του μυοκαρδίου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, υπάρχει μεγάλη ευαισθησία και ειδικότητα των T2-W εικόνων σε σύγκριση με την βιοψία²⁰²⁻²⁰⁴. Ωστόσο, η διαφοροποίηση μεταξύ νέκρωσης και φλεγμονής δεν μπορεί να επιτευχθεί μόνο με τη χρήση T2-W εικόνων, έτσι είναι αναγκαία η συναξιολόγηση εικόνων EGE και LGE. Μια συνδυασμένη εκτίμηση της CMR χρησιμοποιώντας T2-W, EGE και LGE εικόνες έχει ευαισθησία 76%, ειδικότητα 95,5% και μία διαγνωστική ακρίβεια 85% για την ανίχνευση της φλεγμονής του μυοκαρδίου²⁰². Αν και η CMR δεν έχει μεγάλη ευαισθησία, έχει μεγάλη ειδικότητα και ως εκ τούτου είναι πολύ χρήσιμη όταν είναι θετική για φλεγμονή. Επιπλέον, η CMR παίζει ένα σημαντικό ρόλο όχι μόνο για τη διάγνωση αλλά και για την πρόγνωση της μυοκαρδίτιδας. Επί του παρόντος, η LGE 4 εβδομάδες μετά την έναρξη των συμπτωμάτων αποτελεί δείκτη μακροπρόθεσμης πρόγνωσης, έτσι η CMR μπορεί ίσως να προβλέπει νωρίς την μακροπρόθεσμη έκβαση²⁰⁵. Επίσης πρόσφατα αναπτυχθείσες πιο εξελιγμένες τεχνικές CMR όπως η T1 και T2 χαρτογράφηση, έχουν δώσει έως τώρα ενθαρρυντικά αποτελέσματα για την διάγνωση της μυοκαρδίτιδας, εκεί που η κλασικές εικόνες της CMR απέτυχαν. Η CMR μπορεί να χρησιμεύσει ως ιδανικό μη επεμβατικό εργαλείο για τον εντοπισμό της μυοκαρδίτιδας σε ασθενείς που είναι υποψήφιοι για ενδομυοκαρδιακή βιοψία. Παρά το γεγονός ότι υπάρχει μια αυξανόμενη εμπειρία γύρω από την χρήση και την αξιολόγηση της CMR στη μυοκαρδίτιδα, χρειάζονται περαιτέρω πολυκεντρικά δεδομένα και καλύτερη τυποποίηση των πρωτοκόλλων CMR για την χρήση διαφόρων αλληλουχιών και τεχνικών¹⁵¹.

Όσον αφορά τις πυρηνικές τεχνικές διαγνώσεις, έχουν δοκιμαστεί πολλές κατά περιόδους, χωρίς κάποια να χρησιμοποιείται επί του παρόντος ως μέθοδος διάγνωσης της μυοκαρδίτιδας. Η απεικόνιση με γάλλιο είχε αρχικά χρησιμοποιηθεί, ωστόσο, η

εφαρμογή της έχει μειωθεί στην πάροδο του χρόνου λόγω χαμηλής ειδικότητας²⁰⁶. Η απεικόνιση με Ίνδιο-111-μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της μυοσίνης έχει ευαισθησία 100% αλλά ειδικότητα 58% στην ανίχνευση της μυοκαρδίτιδας²⁰⁷⁻²¹¹ και είχε με επιτυχία χρησιμοποιηθεί για περισσότερο από δύο δεκαετίες στη διάγνωση της μυοκαρδίτιδας, ωστόσο, η εφαρμογή της έχει μειωθεί κατά τα τελευταία χρόνια λόγω της χαμηλής διαθεσιμότητας, της έκθεσης σε ακτινοβολία και της 48ωρης καθυστέρησης των απεικονιστικών αποτελεσμάτων²¹². Η τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων PET/CT έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της φλεγμονής σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και σε οξεία περικαρδίτιδα και μυοκαρδίτιδα. Από τις απεικονίσεις με PET/CT έχει φανεί μια στενή σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης των μακροφάγων και των δομικών αλλαγών της καρδιάς, γεγονός που θέτει το ενδεχόμενο ενός νέου βιοδείκτη που μπορεί να προβλέψει την καρδιακή αναδιαμόρφωση και την εξέλιξη σε καρδιακή ανεπάρκεια²¹³. Τέλος, αναμένεται η χρήση PET / MRI να ανοίξει νέους διαγνωστικούς ορίζοντες²¹⁴.

Για την διαφοροδιάγνωση της μυοκαρδίτιδας πρέπει να αποκλειστούν παθήσεις με παρόμοια συμπτώματα, ΗΚΓ και εργαστηριακά όπως η περικαρδίτιδα και το οξύ στεφανιαίο σύνδρομο και η Takotsubo μυοκαρδιοπάθεια. Έτσι εξετάσεις όπως στεφανιαία αγγειογραφία ή/και αριστερή κοιλιογραφία χρειάζονται να πραγματοποιηθούν όχι για διάγνωση της μυοκαρδίτιδας αλλά για αποκλεισμό των άλλων παθήσεων σε ασθενείς με πόνο στο στήθος, δύσπνοιας ή/και δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας ή/και αύξηση της τροπονίνης. Λεπτομερής αξιολόγηση του ΗΚΓ, των μυοκαρδιακών ένζυμων, της στεφανιογραφίας, του ηχοκαρδιογραφήματος και της CMR μπορεί να οδηγήσει στη τελική διάγνωση. Χαρακτηριστική είναι η απόφραξη των στεφανιαίων αγγείων στο οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, το οίδημα χωρίς ίνωση στην μαγνητική στην νόσο Takotsubo και το περικαρδιακό υγρό χωρίς οποιαδήποτε άλλη ανωμαλία στο υπέρηχο ή στην μαγνητική στην περικαρδίτιδα²⁰¹.

1.6.1 Ενδομυοκαρδιακή βιοψία

Ιστοπαθολογική ανάλυση δειγμάτων του μυοκαρδίου που συλλέγονται με ενδομυοκαρδιακή βιοψία (EMB) είναι ο μόνος τρόπος για να εξασφαλίσουμε την οριστική διάγνωση της μυοκαρδίτιδας²¹⁵. Η EMB πραγματοποιείται συνήθως μέσω της σφαγίτιδας ή της μηριαίας φλέβες και ιδανικά υπό την καθοδήγηση των εικόνων της CMR¹⁵¹. Οι διεθνείς συστάσεις σχετικά με την εφαρμογή της EMB στην κλινική πράξη

είναι αμφιλεγόμενες. Οι κατευθυντήριες οδηγίες του Αμερικάνικου Κολλεγίου Καρδιολογίας και της Αμερικάνικης Καρδιολογικής Εταιρίας^{216,217} προτείνουν η EMB να πραγματοποιείται σε ασθενείς με σοβαρή κλινική εικόνα με πρόσφατης έναρξης καρδιακή ανεπάρκεια ή απειλητικές για τη ζωή αρρυθμίες, και πιο συγκεκριμένα σε ασθενείς με αιμοδυναμική αστάθεια διάρκειας λιγότερο από 2 εβδομάδες ή λιγότερο από 3 μήνες αν συνοδεύεται από καρδιακό block ή νέα κοιλιακή αρρυθμία¹⁵¹. Αντίθετα, η Ομάδα Εργασία για τις παθήσεις του μυοκαρδίου και του περικαρδίου της Ευρωπαϊκής Καρδιολογικής Εταιρείας επέκτεινε το φάσμα των ενδείξεων για EMB, συνιστώντας να πραγματοποιείται σε όλες τις περιπτώσεις κλινικής υποψίας μυοκαρδίτιδας ανεξάρτητα από το πρότυπο και τη σοβαρότητα των κλινικών εκδηλώσεων⁴. Στην κλινική πράξη, η αξία της EMB είναι ζωτικής σημασίας για την ανίχνευση του ειδικού ιστολογικού τύπου της μυοκαρδίτιδας και την αξιολόγηση της ανοσολογικής και ιολογικής κατάσταση μέσω ανοσοϊστοχημικής και βιομοριακής PCR ανάλυσης.

Συγκεκριμένα για την διάγνωση της μυοκαρδίτιδας πρέπει να γίνει ιστολογική ανίχνευση τουλάχιστον 14 λευκοκυττάρων / mm², κατεστραμμένων καρδιομυοκυττάρων ή / και ταυτόχρονη παρουσία ίνωσης. Επιπροσθέτως με την βοήθεια της ανοσοϊστοχημείας μπορεί να γίνει ακριβής χαρακτηρισμός των φλεγμονωδών κυττάρων με την βοήθεια των συμπλεγμάτων CD, καθώς για την ολοκληρωμένη διάγνωση της μυοκαρδίτιδας χρειαζόμαστε την ανίχνευση μονοκυττάρων(έως 4 μονοκυττάρων/mm²) και τουλάχιστον 7 CD3+ T λεμφοκύτταρα/mm² στο μυοκάρδιο. Τα B-κύτταρα είναι CD20 θετικά, τα μακροφάγα είναι CD68 και CD11 θετικά, όλα τα κύτταρα T είναι CD3 θετικά και οι υποπληθυσμοί των T κυττάρων περιλαμβάνουν CD4⁺ (T βοηθητικά), CD8⁺(T κατασταλτικά) και CD45R0 (μνήμη ή ενεργοποιημένα T-κύτταρα) ή περφορίνη-θετικά κυτταροτοξικά λεμφοκύτταρα¹⁵³.

Η βιομοριακή ανίχνευση του ιικού γονιδιώματος έχει μεγάλη σημασία για τον εντοπισμό του αιτιολογικού παράγοντα της μυοκαρδίτιδας δεδομένου και του ότι οι ιοί είναι οι πιο κοινοί αιτιολογικοί παράγοντες της μυοκαρδίτιδας. Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) για την ανίχνευση του ιικού γονιδιώματος μπορεί να αλλάξει το ρόλο της EMB από ένα απλό διαγνωστικό εργαλείο σε τεκμήριο για την έναρξη στοχευμένης θεραπείας²¹⁸. Βέλτιστη ευαισθησία μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση κατεψυγμένου ιστού σε υγρό άζωτο και αποθήκευση στους -80 ° C, ειδικά για

την ανίχνευση των RNA ιών¹⁵¹. Με αυτούς τους τρόπους η EMB επιτρέπει την εξατομίκευση της θεραπευτικής αγωγής^{220,221} καθώς και την εκτίμηση της πρόγνωσης.

Ωστόσο, η EMB συνοδεύεται από μικρό, αλλά όχι αμελητέο, ποσοστό επιπλοκών (<6%) ακόμα και όταν εκτελείται από έμπειρους χειριστές. Στις πιθανές επιπλοκές περιλαμβάνονται το αιμάτωμα, ο αποκλεισμός του δεξιού σκέλους, οι αρρυθμίες, η παλινδρόμηση της τριγλώχινας και η πνευμονική εμβολή^{22,151}. Επιπλέον, η EMB έχει περιορισμούς ως προς την ακρίβεια καθώς έχει τον περιορισμό της δειγματοληψίας αφού η μυοκαρδίτιδα έχει ανομοιογενή κατανομή στο μυοκάρδιο. Είναι σημαντικό όταν πραγματοποιείται η EMB, να συλλέγεται επαρκής αριθμός δειγμάτων ιστού, τουλάχιστον 4-5^{22,151}. Παρόλα αυτά, αυτός ο αριθμός δειγμάτων εξασφαλίζει μόλις 45% ευαισθησία για τη διάγνωση της μυοκαρδίτιδας²¹⁹. Είναι επίσης σημαντικό να εξασφαλιστεί η κατάλληλη συντήρηση του υλικού της βιοψίας αλλά και η κατάλληλη και προσεκτική επεξεργασία και αξιολόγηση των δειγμάτων προκειμένου να προκύψουν όσο το δυνατόν πιο λεπτομερείς και αξιόπιστες πληροφορίες²²².

Ο συνδυασμός της CMR και της EMB ως διαγνωστικά εργαλεία αποδίδουν μια σημαντική διαγνωστική συνέργεια ξεπερνώντας τους περιορισμούς που έχουν κάθε μια από τις τεχνικές όταν χρησιμοποιούνται μεμονομένα²²³.

Συνοψίζοντας, στην κλινική πράξη το ΗΚΓ και το υπερηχοκαρδιογράφημα παραμένουν οι ακρογωνιαίοι λίθοι της αξιολόγησης κάθε ασθενή με υποψία μυοκαρδίτιδας. Οι πυρηνικές τεχνικές αυτή τη στιγμή δεν έχουν καμία θέση στην διάγνωση της μυοκαρδίτιδας, λόγω της χαμηλής ειδικότητας και της έκθεσης του ασθενούς σε ακτινοβολία. Επί του παρόντος η CMR, χρησιμοποιώντας τόσο κλασικές όσο νέες τεχνικές, έχει γίνει η “gold standard” τεχνική απεικόνισης για την μυοκαρδίτιδα καθώς αποτελεί την πιο αξιόπιστη μη επεμβατική διαγνωστική μέθοδο. Η EMB πρακτικά σήμερα χρησιμοποιείται μόνο σε περιπτώσεις αιφνίδιας έναρξης καρδιακής ανεπάρκειας ή ταχέως εξελισσόμενης νόσου ή σε περιστατικά με επαναλαμβανόμενα επεισόδια μυοκαρδίτιδας ή μη ανταπόκριση στην συμβατική θεραπεία ή σε περιπτώσεις με γνωστή αυτοάνοση νόσο¹⁵¹.

1.7 Θεραπεία

Ανεξάρτητα από την αιτιολογία της μυοκαρδίτιδας, η βασική αντιμετώπιση της μυοκαρδίτιδας στην κλινική πράξη είναι η υποστηρικτική θεραπεία των επιπλοκών της

μυοκαρδίτιδας²²⁴. Οι ειδικές θεραπείες εξαρτώνται από το αποτέλεσμα της EMB, λαμβάνοντας υπόψη τα συμπτώματα των ασθενών και την πορεία της νόσου^{225,226, 227}.

1.7.1 Υποστηρικτική θεραπεία της μυοκαρδίτιδας

Στους ασθενείς με μυοκαρδίτιδα και επηρεασμένη καρδιακή λειτουργία δίδεται οδηγία περιορισμού της σωματικής δραστηριότητας για 6 μήνες ή μέχρι της υποχώρησης της φλεγμονής στη EMB ή/και μέχρι την αποκατάσταση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας⁴. Όσον αφορά την φαρμακευτική θεραπεία της μυοκαρδίτιδας με δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, βασίζεται στην χορήγηση της τυπικής θεραπείας της καρδιακής ανεπάρκειας σύμφωνα με τις τρέχουσες κατευθυντήριες οδηγίες, και αποτελείται από αναστολείς του άξονα ρενίνης αγγειοτενσίνης αλδοστερόνης (αναστολείς του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης[α-MEA], αναστολείς του υποδοχέα αγγειοτενσίνης[ARBs] και ανταγωνιστές αλδοστερόνης), βήτα-αναστολείς και διουρητικά^{228,229}. Για τα φάρμακα αυτά υπάρχουν κάποια πειραματικά και κλινικά στοιχεία που τεκμηριώνουν τη πιθανή θετική επίδραση τους στις φλεγμονώδεις διεργασίες και τη πρόγνωση των ασθενών^{230,231,232,234}. Δεν έχει ακόμα καλά τεκμηριωθεί ποτέ είναι η κατάλληλη στιγμή διακοπής αυτών των φαρμάκων μετά την ανάκτηση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας³. Η χορήγηση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φάρμακα και διγοξίνης δεν συστήνεται ως θεραπεία της μυοκαρδίτιδας αφού σύμφωνα με αποτέλεσμα από πειράματα σε ζώα, τα φάρμακα αυτά οδηγούν σε επιδείνωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας. Επίσης, η χορήγηση των ινοτρόπων μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω επιδείνωση της κατάστασης του μυοκαρδίου που ήδη έχει καταστραφεί από την φλεγμονή και θα πρέπει να χορηγείται μόνο σε εξαιρετικές περιπτώσεις²³⁶. Η εμφύτευση απινιδωτή συστήνεται μόνο εάν τα συμπτώματα και η συστολική δυσλειτουργία παραμένουν μετά την οξεία φάση³.

Οι αιμοδυναμικά ασταθείς ασθενείς πρέπει να μεταφέρονται σε μονάδες εντατικής θεραπείας για εντατική παρακολούθηση και για τον καρδιακό καθετηριασμό και την λήψη EMB από έμπειρη ομάδα επαγγελματιών υγείας. Σε ασθενείς που αναπτύσσουν προοδευτική επιδείνωση της καρδιακής λειτουργίας παρά την συμβατική θεραπεία, η EMB είναι απαραίτητη για τη διάγνωση δυνητικά θεραπεύσιμων με ειδικές θεραπείες αιτίων όπως η γιγαντοκυτταρική ή ηωσινοφιλική μυοκαρδίτιδα. Επιπροσθέτως, όταν η οξεία μυοκαρδίτιδα συνοδεύεται από σοβαρή δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας,

πρέπει να παρθούν σημαντικές κλινικές αποφάσεις, όπως η παραπομπή για μεταμόσχευση καρδιάς, για συσκευή υποβοήθησης της αριστερής κοιλίας ή προφυλακτική εμφύτευση απινιδωτή για 3 ή 6 μήνες, εάν είναι εφικτό, και επαναξιολόγηση με βάση την βραχυπρόθεσμη εξέλιξη¹⁸⁵.

1.7.2 Ειδικές Θεραπείες

Έχουν δοκιμαστεί πολλές θεραπευτικές παρεμβάσεις που στοχεύουν είτε στα ιικά συστατικά είτε στην ανοσολογική απόκριση, όπως για παράδειγμα τα ανοσοκατασταλτικά^{220,221,237}, τα αντιικά φάρμακα²³⁸, και οι ενδοφλέβιες ανοσοσφαιρίνες²³⁹, όμως καμία δεν έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την επιβίωση. Ωστόσο, αρκετές μικρές μελέτες σε καλά επιλεγμένους ασθενείς δείχνουν ευνοϊκά αποτελέσματα όσο αφορά την καρδιακή λειτουργία και την κλινική βελτίωση^{220,221} ανοίγοντας τον δρόμο για να ακολουθήσουν καλά σχεδιασμένες, μεγάλες τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες.

1.7.2.1 Ανοσοκαταστολή

Η οξεία ιογενής μυοκαρδίτιδα που είναι επιβεβαιωμένη με βιοψία, βελτιώνεται αυθόρμητα σε ποσοστό άνω του 60% των ασθενών, αποκλειστικά με την υποστηρικτική θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας²⁴⁰. Στην πραγματικότητα, η αρχική καρδιακή φλεγμονή επιτυγχάνει να εξαλείψει τον ιό σύντομα, αποτρέποντας έτσι την μη αναστρέψιμη καρδιακή βλάβη, επομένως η χορήγηση αντι-φλεγμονώδους θεραπείας ή ανοσοκαταστολής μπορεί να ευνοήσει την ιογενή παραμονή και ως εκ τούτου να επιδεινώσει την κατάσταση του ασθενούς²⁴¹. Παρόλα αυτά για ορισμένες περιπτώσεις λεμφοκυτταρικής μυοκαρδίτιδας αλλά και για ορισμένους ειδικούς υποτύπους της μυοκαρδίτιδας όπως είναι η γιγαντοκυτταρική, η ηωσινοφιλική μυοκαρδίτιδα και η καρδιακή σαρκοείδωση, η ανοσοκαταστολή προσφέρει ξεκάθαρο όφελος.

Η ιστοπαθολογική διάγνωση γιγαντοκυτταρικής μυοκαρδίτιδας, νεκρωτικής ηωσινοφιλικής μυοκαρδίτιδας, ή καρδιακής σαρκοείδωσης αποτελεί σαφή ένδειξη για ανοσοκατασταλτική θεραπεία²⁴². Η συνδυασμένη θεραπεία της γιγαντοκυτταρικής μυοκαρδίτιδας με αντιθυμοκυτταρική σφαιρίνη, κυκλοσπορίνη (σε επίπεδα 100-120 mg / mL) και κορτιζόνη έχει αποδειχθεί σε μελέτες ότι βελτιώνει την επιβίωση²⁴³. Ο κίνδυνος μεταμόσχευσης και θανάτου των ασθενών με γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα φαίνεται να μειώθηκε με την βοήθεια της ανοσοκαταστολής με

αναστολείς καλσινευρίνης¹⁹. Ωστόσο στο 12% των ασθενών με γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα έχουμε υποτροπή της νόσου έως και 8 χρόνια μετά την επιτυχή θεραπεία, τόσο σε ασθενείς χωρίς μεταμόσχευση όσο και σε ασθενείς με μεταμόσχευση καρδιάς²⁰. Κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της ηωσινοφιλικής μυοκαρδίτιδας, στην οποία δεν παρατηρείται εκτεταμένη μη αναστρέψιμη ίνωση, ανθελμινθικά ή αντιπρωτοζωικά φάρμακα μπορούν να φανούν χρήσιμα στην τροπική μορφή της νόσου. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις της ηωσινοφιλικής μυοκαρδίτιδας συνίσταται ανοσοκαταστολή κυρίως με το θεραπευτικό σχήμα κορτιζόνης και αζαθειοπρίνης, με μείωση της κορτιζόνης κάθε 2 εβδομάδες ανά 10 mg, με αρχική δόση 1 mg / kg, έως την δόση συντήρησης 10 mg για 6 μήνες. Άλλες θεραπευτικές επιλογές που έχουν δείξει κάποιο όφελος στην οντότητα αυτή, είναι η ιντερφερόνη (IFN) και οι αναστολείς τυροσινικής κινάσης (Imatinib)²⁴⁴. Κοκκιωματώδεις οξεία μυοκαρδίτιδα μπορεί να εμφανιστεί σε ασθενείς με σαρκοείδωση ή ρευματοειδή αρθρίτιδα. Πρεδνιζόνη, μόνη της είναι μια καλή επιλογή σε αυτές τις περιπτώσεις, με μια αρχική δόση 1 mg / kg, αν και άλλα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα όπως είναι η αζαθειοπρίνη, μπορούν να προστεθούν στο θεραπευτικό σχήμα και η θεραπεία πρέπει να είναι μακροχρόνια, για τουλάχιστον 6 μήνες³.

Στην λεμφοκυτταρική μυοκαρδίτιδα υπάρχουν περιπτώσεις που η χρήση ανοσοκαταστολής είναι επιβεβλημένη και αποτελεσματική. Η ανοσοκατασταλτική θεραπεία με πρεδνιζολόνη και αζαθειοπρίνη έχει θεωρηθεί κατάλληλη θεραπεία για ασθενείς με αποδεδειγμένη με EMB ενεργό μυοκαρδίτιδα που συνοδεύεται από έντονη κλινική εικόνα καρδιακής ανεπάρκειας με σοβαρή κοιλιακή δυσλειτουργία ή/και απειλητικές για τη ζωή κοιλιακές αρρυθμίες, στους οποίους η υποστηρικτική θεραπεία έχει αποτύχει για ένα βραχυχρόνιο διάστημα από 7 έως 10 ημέρες. Υπάρχουν επίσης δεδομένα από μελέτες σε ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική μυοκαρδίτιδα, με συμπτώματα για περισσότερο από έξι μήνες, που δείχνουν επιπρόσθετη βελτίωση ηχοκαρδιογραφικών παραμέτρων, μετά από χορήγηση ανοσοκατασταλτικής θεραπείας (πρεδνιζόνη και αζαθειοπρίνη) σε σύγκριση με την υποστηρικτική θεραπεία μόνη της^{245,246}. Τα τρέχοντα στοιχεία δείχνουν ότι σε ασθενείς με λεμφοκυτταρική μυοκαρδίτιδα, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία θα πρέπει να χορηγείται μόνο επί παρουσίας αυξημένων φλεγμονωδών ιστικών δεικτών²²⁰ και επί απουσίας ιικού γονιδιώματος²²¹, όπως αυτά αποδεικνύονται από την ανοσοϊστοχημική και PCR ανάλυση των μυοκαρδιακών δειγμάτων της EMB. Μελέτη σε ασθενείς με χρόνια

μυοκαρδίτιδα και αρνητικό ιικό φορτίο με κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας λιγότερο από 45%, οι οποίοι έλαβαν υποστηρικτική θεραπεία για την καρδιακή ανεπάρκεια για τουλάχιστον 6 μήνες τυχαιοποιήθηκαν για να λάβουν εικονικό φάρμακο ή κορτιζόνη και αζαθειοπρίνη²²⁷. Το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF) βελτιώθηκε στο 89% των ασθενών από την ομάδα παρέμβασης και σε κανέναν από την ομάδα του εικονικού φαρμάκου. Σύμφωνα με το συμπέρασμα μια μετανάλυσης πάνω στο θέμα την ανοσοκατασταλτικής θεραπείας για την μυοκαρδίτιδα, η ανοσοκατασταλτική θεραπεία πρέπει να χρησιμοποιείται ως συμπληρωματική θεραπεία όταν η υποστηρικτική θεραπεία δεν είναι αποτελεσματική²⁴⁷. Έτσι θα μπορούσαμε συνοπτικά να πούμε πως επί απουσίας ιικού γονιδιώματος στο μυοκάρδιο, δηλαδή όχι κατά την οξεία φάση της ιογενούς μυοκαρδίτιδας, η ανοσοκαταστολή αποτελεί χρήσιμο θεραπευτικό μέσω ειδικά επί αποτυχίας της υποστηρικτικής θεραπείας.

Επί του παρόντος, η σημασία της παραμονής του ιού στο μυοκαρδιακό δείγμα της βιοψίας είναι υπό συζήτηση λόγω των αντιφατικών ευρημάτων^{42,64,238,248}. Ειδικότερα οι διαμάχες έχουν επικεντρωθεί στο ρόλο της παρβοϊού B19 που πρόσφατα έχει αναδειχθεί σε έναν ενδημικό ιό που εντοπίζεται περίπου στο ήμισυ των ασθενών με περιμυοκαρδίτιδα¹⁹⁵, διατακτική μυοκαρδιοπάθεια²¹ ή άλλες μη φλεγμονώδεις καρδιακές παθήσεις^{250,251,252}. Η πλήρης κατανόηση του ρόλου του παρβοϊού B19 και των άλλων ιών είναι ζωτικής σημασίας, διότι σήμερα, η παρουσία του ιικού γονιδιώμα στο μυοκάρδιο ανιχνεύεται με PCR και αποτελεί αντένδειξη για ανοσοκατασταλτική θεραπεία σε ασθενείς, οι οποίοι θα ήταν διαφορετικά, κλινικά υποψήφιοι για ανοσοκατασταλτική θεραπεία²².

1.7.2.1.1 Ανοσοπροσρόφηση

Ασαφής είναι η θέση της ανοσοπροσρόφησης ως θεραπευτική επιλογή για την θεραπεία της μυοκαρδίτιδας. Μερικές μελέτες έχουν δείξει μικρή βελτίωση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας, μείωση των επιπέδων των βιοδεικτών, και υποχώρηση της φλεγμονώδους διήθησης του μυοκαρδίου στην χρόνια φάση της μυοκαρδίτιδας²⁵³⁻²⁵⁵. Ωστόσο, μεγαλύτερες έρευνες απαιτούνται και σήμερα η ανοσοπροσρόφηση εξακολουθεί να είναι μια πειραματική θεραπεία¹⁰.

1.7.2.1.2 Ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη

Η ενδοφλέβια θεραπεία με ανοσοσφαιρίνη έχει συσχετιστεί με σημαντική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και τη μείωση του ιικού φορτίου στη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια²⁴⁸ και φαίνεται να προλαμβάνει τις υποτροπές των ασθενών με υποτροπιάζουσα περικαρδίτιδα²⁶⁰. Η θεραπεία της μυοκαρδίτιδας με ενδοφλέβια ανοσοσφαιρίνη φαίνεται να έχει καλά αποτελέσματα σε μικρές μελέτες^{248, 403}, αλλά η μεγαλύτερη πολυκεντρική μελέτη από τους McNamara et al. δεν έδειξε κανένα όφελος της θεραπείας έναντι του εικονικού φαρμάκου²³⁹. Κατά συνέπεια, μέχρι στιγμής δεν υπάρχουν κατευθυντήριες οδηγίες για την χρήση ενδοφλέβιων ανοσοσφαιρινών ως ρουτίνα στη θεραπεία της μυοκαρδίτιδας⁴.

1.7.2.3 Αντιϊκή θεραπεία

Η αντιϊκή θεραπεία θα πρέπει να είναι συγκεκριμένη ανάλογα με το είδος του ιού καθώς οι ιοί έχουν διαφορετικό τρόπο δράσης, για παράδειγμα οι εντεροϊοί και οι αδενοϊοί μολύνουν κατευθείαν τα καρδιομυοκύτταρα ενώ οι ιοί PVB19 και HHV-6 ασκούν την δράση τους μέσω πρόκλησης βλάβης στα ενδοθηλιακά κύτταρα³. Υπάρχει μεγάλος αριθμός μελετών σε ζωικά μοντέλα αλλά έλλειψη αποτελεσμάτων από κλινικές μελέτες¹⁰.

Παρά το πιθανό ρόλο της ιντερφερόνης(INF) στην θεραπεία της μυοκαρδίτιδας από εντεροϊό²³⁸ δεν υπάρχουν διαθέσιμα στοιχεία από τυχαιοποιημένες μελέτες σχετικά την επίδραση μιας τέτοιας θεραπείας σε όλους τους ασθενείς με μυοκαρδίτιδα²². Σε μη τυχαιοποιημένη μελέτη σε ασθενείς με χρόνια μυοκαρδίτιδα από εντεροϊό ή αδενοϊό, μετά από εξάμηνη θεραπεία με IFNβ, μαζί με την ιική κάθαρση επετεύχθη και βελτίωση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας και σημαντική μείωση των διαστάσεων της αριστερής κοιλίας²⁵⁶. Μετά από μια 5 έτη παρακολούθηση, το 92% των ασθενών που είχαν απαλλαγεί από τον ιό ήταν εν ζωή, σε σύγκριση με μόνο το 69% των ασθενών με παραμονή του ιού⁶³.

Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι ασθενείς που απέβαλαν τον ιό αυθόρμητα είχαν υψηλότερα επίπεδα της ενδογενούς IFNβ από εκείνους με ιική παραμονή. Τα ευρήματα αυτά υποστηρίζουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας με IFNβ.

Σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από PVB19, είναι πολύ σημαντικό να γίνει διαφοροποίηση μεταξύ λανθάνουσας μόλυνσης (μόνο DNA θετικός ασθενείς) και ιογενούς ενεργού νόσου (ασθενείς θετικός και για αγγελιοφόρο RNA). Ουσιαστικά μια

μελέτη παρατήρησε ότι το B19 V αγγελιοφόρο RNA ήταν παρόν μόνο σε μυοκαρδιακά δείγματα από βιοψίες ασθενών με φλεγμονή και ήταν απών στους ασθενείς θετικούς για DNA B19 V χωρίς παρουσία φλεγμονής²⁵⁷. Όσον αφορά συγκεκριμένες θεραπευτικές αγωγές, η IFNβ δεν πετυχαίνει την εξάλειψη του ιού. Ωστόσο, μια μελέτη με PVB19 έδειξε ότι η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τα δευτερογενή συμπτώματα βελτιώθηκαν με υψηλές δόσεις IFNβ, υποδηλώνοντας ότι αυτή η θεραπεία θα μπορούσε να αναστείλει πιθανόν την επανενεργοποίηση του PVB19 και να βελτιώσει την βιωσιμότητα του ενδοθηλίου²⁵⁸. Άλλες πιθανές θεραπευτικές επιλογές είναι ακόμα υπό μελέτη. Για παράδειγμα, το ανάλογο θυμιδίνης, τελμπιβουδίνη καταστέλλει την αντιγραφή του ιού in vitro και σε μια πιλοτική έρευνα με 8 συμπτωματικούς ασθενείς θετικούς για PVB19, όπου τους χορηγήθηκε για 6 μήνες, επιτεύχθηκε σίγαση της μεταγραφικής δραστηριότητας στους 7 από τους 8 ασθενείς και βελτίωση των συμπτώματα μέσα στις πρώτες εβδομάδες.

Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε μια μείωση της επανενεργοποίησης του HHV-6 μετά από θεραπεία με βαλγκανσικλοβίρη για 6 μήνες σε συμπτωματικούς ασθενείς με ενεργό μυοκαρδίτιδα (θετικοί για αγγελιοφόρο RNA). Τα συμπτώματα επίσης βελτιώθηκαν με την θεραπεία²⁵⁹. Προς το παρόν, μόνο οι ασθενείς με επανενεργοποιημένο HHV-6 επωφελούνται από την αντιϊκή θεραπεία, αλλά θα πρέπει να χρησιμοποιείται ως εναλλακτική επιλογή σε ασθενείς με επίμονα συμπτώματα παρά την υποστηρικτική θεραπεία³.

Συμπερασματικά η μυοκαρδίτιδα αντιμετωπίζεται στην κλινική πράξη με συντηρητικό τρόπο, αντιμετώπισης των συνεπειών της μυοκαρδίτιδας, ελλείψει στοχευμένης αποτελεσματικής θεραπείας. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται για την καλύτερη αξιολόγηση του ρόλου των ειδικών αντιικών και ανοσοτροποποιητικών θεραπευτικών αγωγών σε ασθενείς με μυοκαρδίτιδα και καλά ταυτοποιημένο ιολογικό και ανοσολογικό προφίλ.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗ ΜΥΟΚΑΡΔΙΤΙΔΑ

Χρήσιμο εργαλείο για την διερεύνηση της παθοφυσιολογίας, της διάγνωσης και της θεραπείας της μυοκαρδίτιδας αποτελεί η πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα (experimental autoimmune myocarditis - EAM). Για την πρόκληση της EAM πραγματοποιείται αυτοανοσοποίηση των πειραματόζωων με καρδιακή μυοσίνη²⁶¹. Η αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα που προκαλείται είναι μια T διαμεσολαβούμενη αυτοάνοση νόσος²⁶² και προσομοιάζει με την γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα του ανθρώπου^{261,266-268}, μία σπάνια και συχνά οξεία μορφή μυοκαρδίτιδας, που χαρακτηρίζεται από την παρουσία πολυπύρηνων γιγαντοκυττάρων με απουσία κοκκιωμάτων³⁹¹.

Διαφορετικά πρωτόκολλα έχουν χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση EAM σε πειραματόζωα μέσω ανοσοποίησης με καρδιακή μυοσίνη, χρησιμοποιώντας διαφορετικές τρόπους έγχυσης του αντιγόνου και δόσεις. Μερικά πρωτόκολλα περιγράφουν υποδόρια έγχυση στον αυχένα και την πλάγια λαγόνια χώρα, αλλά τα περισσότερα χρησιμοποιούν την έγχυση στα πίσω πέλματα, με πιο διαδεδομένο το πρωτόκολλο δυο δόσεων, σε διαφορετικούς χρόνους, στα πίσω πέλματα. Η δόση της μυοσίνης και συνολικός εγχέομενος όγκος του διαλύματος επίσης διαφέρουν μεταξύ των πρωτοκόλλων²⁸¹.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία υπάρχουν διαφορές ως προς την ευαισθησία των διάφορων στελεχών ποντικών και επίμυων στην EAM. Οι διαφορές αυτές υποδηλώνουν ότι οι γενετικοί παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ευαισθησία στην ασθένεια. Οι Shioji και συνεργάτες²⁶⁵ έλεγξαν την επίπτωση της μυοκαρδίτιδας, την ιστοπαθολογία και τα χαρακτηριστικά ιστοσυμβατότητας 5 συγγενών στελεχών επίμυων, μετά την ευαισθητοποίησή τους με καρδιακή μυοσίνη χοίρου. EAM προκλήθηκε στους επίμυες Lewis, Dahl (DIR / Eis) (RT-1) και Fisher αλλά όχι στους καφέ επίμυες Νορβηγίας και σε ένα δεύτερο στέλεχος επίμυων Dahl (DIS / Eis) (RT-1). Η ασθένεια ήταν πιο σοβαρή στους αρουραίους Lewis και οι διαφορές στην ευαισθησία της νόσου συσχετίστηκαν με τις διαφορές των στελεχών στο κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας τάξης II (HLA-II). Σύμφωνα με τους Myers και συνεργάτες²⁸², EAM μπορεί να προκληθεί σε μεγάλη ποικιλία στελεχών ποντικών, με μεγαλύτερη ευαισθησία να παρατηρείται στα στελέχη: A/J, A.CA/SnJ, B10.BR, CBA/J, C57Br/cdJ, BALB/c, C.B-17. Αντίστοιχα, στους επίμυες υψηλή ευαισθησία στην EAM παρουσιάζεται μόνο στους Lewis επίμυες.

Παρότι η παθοφυσιολογία της EAM δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, η σοβαρή φλεγμονώδης κυτταρική διήθηση αποτελεί αδιαμφισβήτητο χαρακτηριστικό της νόσου^{261,268,269}. Στην EAM πρωταγωνιστούν τα CD4 + T κύτταρα που παράγουν ιντερφερόνη-γ και τα μακροφάγα που παράγουν παράγοντα νέκρωσης των όγκων και οξείδιο του αζώτου²⁶³. Οι ιστολογικές και οι αιμοδυναμικές αλλαγές σχετίζονται με την έκφραση της επαγωγίμης συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου, ενώ οι αλλαγές αυτές εξασθενούν από την αμινογουανιδίνη, έναν αναστολέα της επαγωγίμης συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου²⁶⁴. Τα CD4 + T βοηθητικά κύτταρα αποτελούν την βασική κυτταρική ομάδα καθώς ρυθμίζουν την εξέλιξη και την σοβαρότητα της νόσου ενώ τα CD8 + T κύτταρα δεν είναι απαραίτητα για την επαγωγή της μυοκαρδίτιδας στην EAM^{262,270,271}. Τα ενεργοποιημένα Th κύτταρα εκκρίνουν διάφορες κυτοκίνες οι οποίες ενεργοποιούν άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, όπως μακροφάγα, ουδετερόφιλα και ιστιοκύτταρα²⁷². Η ιστολογική εξέταση της καρδιάς των πειραματόζων με EAM αποκαλύπτει διείσδυση φλεγμονωδών κυττάρων δύο εβδομάδες μετά την ανοσοποίηση, και η μυοκαρδίτιδα κορυφώνεται μια εβδομάδα αργότερα, δηλαδή γύρω στην τρίτη βδομάδα μετά την ανοσοποίηση^{268,273}. Κατά την έναρξη της EAM, τα CD4 + Th κύτταρα διαφοροποιούνται σε υποομάδες: Th1 που παράγουν ιντερφερόνη γ²⁷⁵ και Th2 κύτταρα που παράγουν IL-4²⁷⁶. Η ισορροπία μεταξύ της INF-γ που έχει προφλεγμονώδη δράση και της IL-4 που έχει αντιφλεγμονώδη δράση, δηλαδή των κυτοκινών των δυο υποομάδων βοηθητικών T κυττάρων, Th1 / Th2, είναι σημαντική για την παθογένεση της EAM^{276,277}. Επίσης τα κύτταρα Th17 που παράγουν IL-17 εμπλέκονται στην ανάπτυξη της EAM²⁷⁸ καθώς συμμετέχουν στην ενεργοποίηση των B κυττάρων και την παραγωγή αυτοαντισωμάτων²⁸⁰, και η σοβαρότητα της EAM συνδέεται με την έκφραση της IL-17 στο μυοκάρδιο^{279,274}.

Το μοντέλο της EAM είναι τριφασικό και αποτελείται από την αρχική φάση της επαφής με το αντιγόνο που διαρκεί από την ημέρα 0 της έγχυσης του αντιγόνου έως την 13^η μέρα, την δεύτερη φάση της αυτοάνοσης απάντησης, από την 14^η έως την 21^η μέρα που ξεκινάει η χρόνια φάση της επούλωσης που χαρακτηρίζεται από ίνωση. Η οξεία φάση χαρακτηρίζεται από την ισορροπία των κυτοκινών των Th κυττάρων Th1/Th2/Th17 ενώ η αυτοάνοση φάση από την παραγωγή αυτοαντισωμάτων κατά της καρδιακής μυοσίνης. Τα αντισώματα παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική μείωση στον ορό στους 4 μήνες, σε σχέση με την 21^η μέρα όπου θεωρείται η κορύφωση της φλεγμονής, αλλά παραμένουν αυξημένα στα πειραματόζωα με EAM σε σχέση με τα

πειραματόζωα μαρτυρες²⁶⁶. Η ΕΑΜ έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί, μετά την αυτοάνοση φάση, σε μια κλινοπαθολογική κατάσταση παρόμοια με την διατακτική μυοκαρδιοπάθεια της χρόνιας φάσης της ιογενούς μυοκαρδίτιδας. Παθολογικά ευρήματα του μοντέλου της ΕΑΜ όπως η μεγέθυνση της καρδιάς, η διεύρυνση και των δύο κοιλοτήτων, η διάχυτη και εκτεταμένη μυοκαρδιακή ίνωση, οι υπερτροφικές αλλά και ατροφικές αλλοιώσεις των καρδιακών ινών, προσομοιάζουν με αυτές της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας του ανθρώπου²⁶⁶.

3. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τα τελευταία χρόνια μετά την επιτυχή απομόνωση και πολλαπλασιασμό των βλαστοκυττάρων και την ανακάλυψη της αναγεννητικής ικανότητας της καρδιάς, διερευνώνται εκτενώς οι πιθανές θεραπευτικές εφαρμογές των βλαστοκυττάρων σε ποικιλία καρδιακών παθήσεων. Η θεραπεία των καρδιακών παθήσεων με βλαστοκύτταρα είναι πολλά υποσχόμενη βάση των μέχρι τώρα ερευνητικών μελετών, και βρίσκεται σε ταχεία ανάπτυξη.

3.1 Βασικές αρχές καρδιακής αναγέννησης

Η καρδιακή αναγέννηση στην οποία βασίζεται η κυτταρική θεραπεία, διακατέχεται από τρεις βασικές αρχές²⁸³. Πρώτον, στις εμβρυικές καρδιές των θηλαστικών υπάρχουν πολυδύναμα καρδιακά προγονικά κύτταρα (CPCs)^{284,285}. Δεύτερον, παραγωγή, περιορισμένου αριθμού, νέων καρδιακών κυττάρων γίνεται καθ' όλη την διάρκεια ζωής των θηλαστικών^{286,287,288,289,290}. Τρίτον, έχειδειχθεί ότι κάποια σπονδυλωτά, όπως η σαλαμάνδρα²⁹¹, το zebrafish^{292,293} και οι νεογνικοί ποντικοί²⁹⁴, μπορούν να αναγεννήσουν το μυοκάρδιο τους μετά από ιατρογενή τραυματισμό του.

Αναλυτικότερα, κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, τα CPCs προέρχονται από έναν υποπληθυσμό μεσοδερματικών πρόδρομων κυττάρων που μπορούν να προκύψουν *in vitro* από διαφοροποιημένα εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ESC)²⁹⁵. Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί παρέχουν σαφή στοιχεία για την ύπαρξη πολυδύναμων προγονικών κυττάρων κατά την ανάπτυξη της καρδιάς του εμβρύου^{284,285,296,297}. Η κατανόηση των μηχανισμών της εμβρυϊκής καρδιακής ανάπτυξης, και ειδικότερα ο εντοπισμός των μοριακών σημάτων που ξεκινούν και τερματίζουν την ανάπτυξη της καρδιάς, θα είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη θεραπευτικών αναγεννητικών προσεγγίσεων.

Η άποψη που επικρατούσε τον 20ο αιώνα ήταν ότι τα καρδιομυοκύτταρα των θηλαστικών παύουν να αναπαράγονται σύντομα μετά τη γέννηση, με αποτέλεσμα η ανάπτυξη της καρδιάς να αποδίδεται στην υπερτροφία των καρδιομυοκυττάρων και όχι στον πολλαπλασιασμό τους. Πρόσφατες μελέτες όμως απέδειξαν ότι τα καρδιομυοκύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται καθ' όλη τη διάρκεια ζωής των θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων, αλλά ο ρυθμός της καρδιακής αναγέννησης των καρδιομυοκυττάρων ποικίλει δραματικά μεταξύ των μελετών. Η

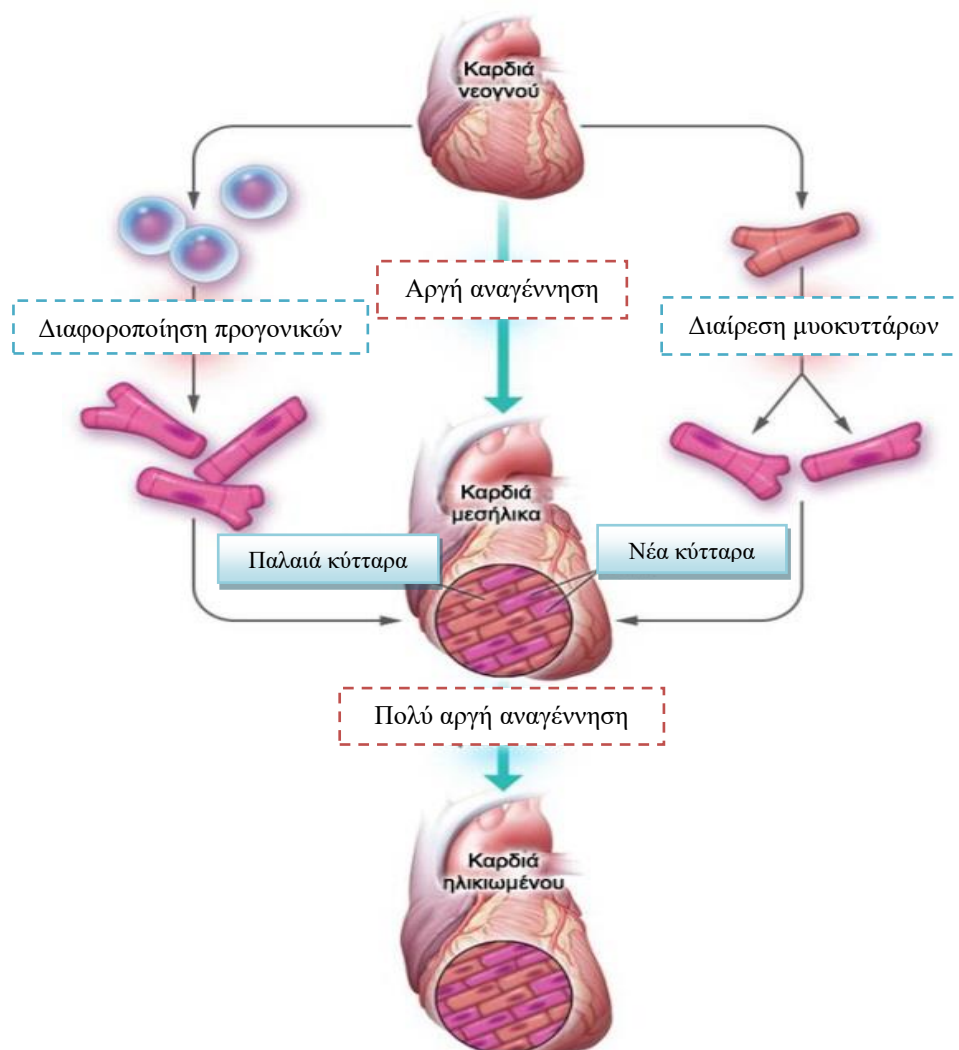
πλειονότητα των μελετών δείχνει ότι αυτό το ποσοστό είναι πολύ χαμηλό, της τάξης του 1% ετησίως, και ότι το ποσοστό μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας²⁸³.

Η βασική ιδέα για την δυνατότητα αναγέννηση της ανθρώπινης καρδιάς προήλθε από την αναγεννητική ικανότητα της καρδιάς σπονδυλωτών που έχουν την ικανότητα μετά από τραυματισμό και αφαίρεση τμήματος της καρδιάς να αναγεννήσουν πλήρως το χαμένο τους μυοκάρδιο. Αυτή η εντυπωσιακή αναγεννητική ικανότητα θεωρείται ότι οφείλεται σε περιορισμένη αποδιαφοροποίηση των ώριμων καρδιομυοκυττάρων και επανεισαγωγή τους στον κυτταρικό κύκλο²⁹⁸. Επιπλέον, έχει φανεί από μελέτες ότι η καρδιά του νεογέννητου ποντικού, ηλικίας 1 ημέρας, είναι ικανή για αναγέννηση μετά από εκτομή περίπου τους 15% της κορυφής της αριστερής κοιλίας²⁹⁴. Αυτή η αναγέννηση της καρδιάς των νεογνικών ποντικών φαίνεται, όπως και στα σπονδυλωτά, να είναι αποτέλεσμα της αποδιαφοροποίησης των προϋπαρχόντων καρδιομυοκυττάρων και της επανεισαγωγής τους στον κυτταρικό κύκλο με τελικό αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό τους. Ωστόσο, η ικανότητα αναγέννησης του μυοκαρδίου χάνεται γρήγορα, 7 ημέρες μετά τη γέννηση και αντί αυτού, μετά από τραυματισμό, η καρδιά αναπτύσσει ουλώδη ιστό, μια ανταπόκριση που παρατηρείται και σε ενήλικες ποντικούς και ανθρώπους μετά από τραυματισμό του μυοκαρδίου²⁹⁴. Αυτά τα αποτελέσματα θέτουν το κρίσιμο ερώτημα, τι εμποδίζει την αναγέννηση της καρδιάς του ποντικού μετά τις πρώτες μέρες της ζωής, και αναδεικνύουν την πρώτη εβδομάδα της ζωής του ως μια κρίσιμη περίοδο για την κατανόηση των εγγενών αναγεννητικών μηχανισμών στα θηλαστικά.

3.2 Μηχανισμοί αναγέννησης

Δύο θεωρίες έχουν επικρατήσει τις τελευταίες δεκαετίες για την εξήγηση της προέλευσης των νέων καρδιομυοκυττάρων στα ενήλικα θηλαστικά: (1) προγονικά βλαστοκύτταρα παράγουν νέα καρδιομυοκύτταρα ή (2) ώριμα καρδιομυοκύτταρα εισέρχονται στο μιτωτικό κυτταρικό κύκλο για να δημιουργήσουν νέα καρδιομυοκύτταρα (Εικόνα 2). Ενήλικα προγονικά κύτταρα στο μυοκάρδιο έχουν αναγνωριστεί από πολλούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των c-Kit^{286,299} και Sca-1³⁰⁰. Παρόλα αυτά δεν έχει ακόμα διαλευκανθεί λόγω των αντικρουόμενων μελετών, αν ο κύριος μηχανισμός αναγέννησης είναι μέσω της διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων που υπάρχουν στο ώριμο μυοκάρδιο ή μέσω της αποδιαφοροποίησης των

προϋπαρχόντων καρδιομυοκυττάρων²⁹⁰. Ωστόσο και οι δύο μηχανισμοί μπορούν να λαμβάνουν χώρα ταυτόχρονα αφού η μια διεργασία δεν αποκλείει την άλλη²⁸³.

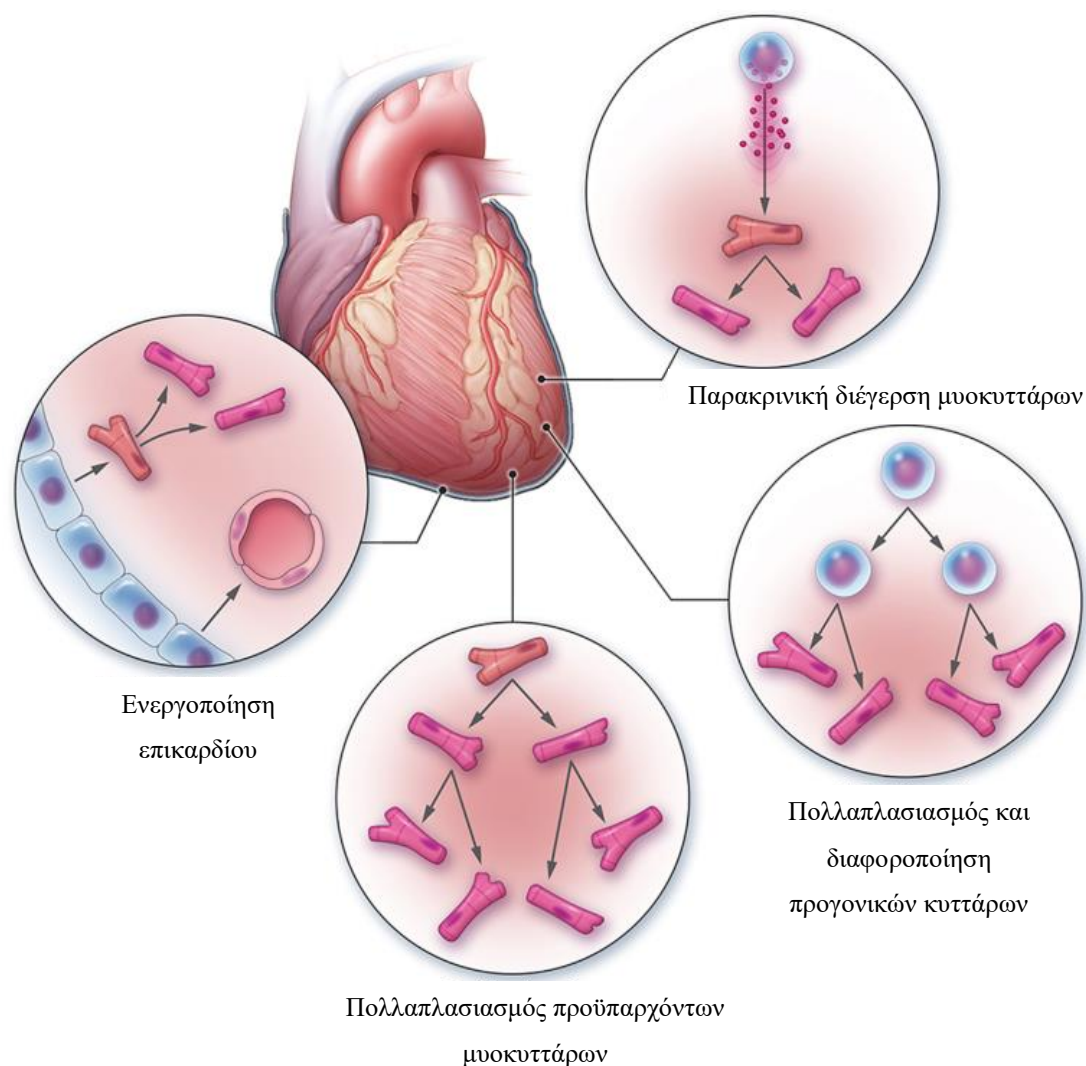


Εικόνα 2. Καρδιακή αναγέννηση στα θηλαστικά

Υπάρχουν πολλαπλές ενδείξεις ότι τα καρδιομυοκύτταρα ανανεώνονται κατά την διάρκεια της ζωής των θηλαστικών, με δύο κύριους μηχανισμούς που επεξηγούν την προέλευση των νέων καρδιομυοκυττάρων: (1) Τα νέα καρδιομυοκύτταρα προέρχονται από τα προγονικά κύτταρα που υπάρχουν στην καρδιά καθ' όλη την διάρκεια ζωής των θηλαστικών (2) Τα ώριμα καρδιομυοκύτταρα υφίστανται μερική αποδιαφοροποίηση, επανεισαγωγή στον κυτταρικό κύκλο και πολλαπλασιασμό παράγοντας νέα καρδιομυοκύτταρα. Τα αποτελέσματα από την πλειοψηφία των ερευνών υποδηλώνουν ότι το ποσοστό ανανέωσης των καρδιομυοκυττάρων κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα (περίπου 1% ετησίως σε νέους ενήλικες) και μειώνεται ακόμη περισσότερο με την πάροδο του χρόνου.

Τροποποίηση από: Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell*. 2013 Jun 6;12(6):689-98.²⁸³

Οι μηχανισμοί για την ομοιοστασία των καρδιομυοκυττάρων στο φυσιολογικό μυοκάρδιο των θηλαστικών είναι πιθανόν διαφορετικοί από τους μηχανισμούς αναγέννησης του μυοκαρδίου μετά από τραυματισμό. Ο τραυματισμός της καρδιάς μπορεί να πυροδοτήσει μια σειρά από μοριακά σήματα που ενεργοποιούν τα αδρανολοποιημένα προγονικά κύτταρα ή/και επάγουν των πολλαπλασιασμό των προϋπαρχόντων καρδιομυοκυττάρων. Ταυτόχρονα, η ενεργοποίηση του επικαρδίου, του λεπτού στρώματος μη καρδιομυοκυττάρων και συνδετικού ιστού στην εξωτερική επιφάνεια της καρδιάς, μπορεί να συμβάλει στην αποκατάσταση του μυοκαρδίου μετά από τραυματισμό³⁰¹ (Εικόνα 3). Ωστόσο υπάρχει διαφωνία στην επιστημονική κοινότητα σχετικά με το αν η ενεργοποίησή του οδηγεί σε παραγωγή καρδιομυοκυττάρων ή μόνο σε αγγειογένεση^{283,302}. Υπάρχουν όλο και περισσότερα στοιχεία ότι η αποδιαφοροποίηση των προϋπαρχόντων καρδιομυοκυττάρων είναι το κυρίαρχο μονοπάτι για την ανανέωση των κυττάρων σε μοντέλα τραυματισμού^{290,294}, ενώ το μέγεθος της απόκριση ίσως σχετίζεται με τα σήματα που ενεργοποιούνται μετά από τον τραυματισμό.



Εικόνα 3. Προτεινόμενοι μηχανισμοί για τη δημιουργία νέων καρδιομυοκυττάρων μετά από τραυματισμό

Τέσσερις πιθανοί μηχανισμοί μπορεί να οδηγήσουν σε αναγέννηση ως απόκριση της καρδιάς στον τραυματισμό (δεξιόστροφα από την κορυφή): (1) Παρακρινικοί διαμεσολαβητές απελευθερώνονται από μη καρδιομυοκύτταρα για να προάγουν τον πολλαπλασιασμό των ήδη υπαρχόντων καρδιομυοκυττάρων. (2) Τα προγονικά κύτταρα ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και υφίστανται διαφοροποίηση σε νέα καρδιομυοκύτταρα. (3) Τα ώριμα καρδιομυοκύτταρα υφίστανται αποδιαφοροποίηση, επανεισαγωγή στον κυτταρικό κύκλο και πολλαπλασιασμό δίνοντας νέα καρδιομυοκύτταρα, (4) Η ενεργοποίηση του επικαρδίου ως αποτελέσματα του τραυματισμού, οδηγεί στην ανάπτυξη νέων αιμοφόρων αγγείων ή/και στην παραγωγή νέων καρδιομυοκυττάρων.

Τροποποίηση από: Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell*. 2013 Jun 6;12(6):689-98.²⁸³

3.3 Κυτταρική θεραπεία

Η ενδογενής ικανότητα της καρδιάς για αναγέννηση μετά από μια εκτενή βλάβη είναι περιορισμένη, όπως αποδεικνύεται από το μεγάλο ποσοστό των ασθενών που οδηγούνται σε καρδιακή ανεπάρκεια μετά από καρδιακή βλάβη όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου ή την μυοκαρδίτιδα. Παρά την πρόοδο που έχει επιτευχθεί στην φαρμακευτική και μηχανική υποστήριξη και θεραπεία τις τελευταίες δεκαετίες, η καρδιακή ανεπάρκεια συνεχίζει να πλήττει την σύγχρονη κοινωνία με δυσμενείς επιπτώσεις και πρόγνωση. Αν και οι τρέχουσες θεραπευτικές επιλογές της καρδιακής ανεπάρκειας έχουν αποδειχθεί ότι βελτιώνουν την επιβίωση και μειώνουν τα συμπτώματα της καρδιακής ανεπάρκειας³⁶³, καμιά θεραπευτική προσέγγιση δεν έχει αποδειχθεί ότι προάγει την αναγέννηση του προσβεβλημένου μυοκαρδίου, και επομένως δεν καταπολεμεί το βασικό υποκείμενο παθοφυσιολογικό μηχανισμό της καρδιακής ανεπάρκειας³⁶⁴.

Η έλλειψη αναγεννητικής θεραπείας των καρδιακών παθήσεων έστρεψε το ερευνητικό ενδιαφέρον στην κυτταρική θεραπεία. Η ικανότητα των βλαστοκυττάρων να διαφοροποιούνται και να πολλαπλασιάζονται αναγεννώντας ποικιλία κυτταρικών πληθυσμών, οδήγησε το 2001 στην πρώτη δημοσίευση χορήγησης βλαστοκυττάρων στην καρδιά με σκοπό την αναγέννηση του προσβεβλημένου μυοκαρδίου³⁶². Συγκεκριμένα ήταν η πρώτη επιτυχής χορήγηση βλαστοκυττάρων προερχόμενων από τον μυελό των οστών σε πειραματικό μοντέλο οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου, με πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα, ανοίγοντας τον δρόμο για την κυτταρική θεραπεία των καρδιακών παθήσεων. Η κυτταρική θεραπεία αποτελεί βασικό κομμάτι της αναγεννητικής ιατρικής και τις τελευταίες δεκαετίες έχει αποτελέσει εντατικό πεδίο έρευνας για την αναγεννητική θεραπεία της ισχαιμικής και μη καρδιακής νόσου. Τα αποτελέσματα πολυάριθμων προκλινικών αλλά και κλινικών μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί υποστηρίζουν τη δυνατότητα των βλαστοκυττάρων να βελτιώνουν το μυοκαρδιακή λειτουργία και να περιορίζουν την αναδιαμόρφωση της καρδιάς²⁶⁴. Ωστόσο υπάρχουν παράμετροι οι οποίοι δεν έχουν πλήρως καθοριστεί όπως είναι ο βέλτιστος τύπος βλαστοκυττάρων, η δόση και η οδός χορήγησης, και διερευνώνται από πλήθος ερευνητών παγκοσμίως ώστε να γίνει υλοποιήσιμη η ασφαλής και αποτελεσματική κυτταρική θεραπεία των καρδιακών παθήσεων του ανθρώπου^{264,265}.

3.4 Μηχανισμοί δράσης της κυτταρικής θεραπείας

Ο μηχανισμός με τον οποίο η εξωγενής χορήγηση βλαστοκυττάρων συμβάλλει στη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας παραμένει ασαφής. Η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας μετά από θεραπεία με βλαστοκύτταρα έχει κυρίως αποδοθεί στην απελευθέρωση παρακρινικών παραγόντων που εμποδίζουν την απόπτωση των καρδιομυοκυττάρων, ενεργοποιούν τα ενδογενή καρδιακά προγονικά κύτταρα και την αγγειογένεση^{336,337}. Επιπλέον μελέτες έχουν αποδείξει πως τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα έχουν ανοσοτροποποιητικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες ανοίγοντας δρόμους για τον περιορισμό/ τροποποίηση της φλεγμονώδους απάντησης μέσω της κυτταρικής θεραπείας^{338,339,320}.

Μεγάλος αριθμός μελετών δείχνουν ότι τα περισσότερα κύτταρα που μεταμοσχεύονται στην καρδιά δεν επιβιώνουν μακροπρόθεσμα, και έτσι η θεωρία της παρακρινικής δράση των εξωγενών χορηγούμενων κυττάρων έχει επικρατήσει^{322,323,324}. Τα εγχέόμενα κύτταρα απελευθερώνουν κυτοκίνες, χημειοκίνες και αυξητικούς παράγοντες που επάγουν την κυτταροπροστασία των ενδογενών καρδιομυοκυττάρων, την επανείσοδό τους στον κυτταρικό κύκλο, την κινητοποίηση ενδογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων, την αγγειογένεση και την τροποποίηση της φλεγμονώδους διεργασίας και του μεταβολισμού των ενδογενών κυττάρων^{336,342,343}. Οι ακριβείς παράγοντες που εκκρίνουν τα εγχέόμενα κύτταρα και ωφελούν την καρδιακή λειτουργία δεν έχουν καθοριστεί πλήρως. Μια μεγάλη πρόκληση της κυτταρικής θεραπείας είναι η βελτίωση της επιβίωσης και της ενσωμάτωσης των εγχέομένων κυττάρων στο μυοκάρδιο³²⁵.

3.5 Κυτταρικές ομάδες υπό μελέτη για καρδιακές παθήσεις

Οι τύποι των κυττάρων που έχουν μελετηθεί για εξωγενή χορήγηση με σκοπό την θεραπεία καρδιακών παθήσεων περιλαμβάνουν εμβρυϊκά βλαστοκύτταρα (ESCs), επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSCs), σκελετικοί μυοβλάστες, κύτταρα του μυελού των οστών, μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) και προγονικά ενήλικα κύτταρα της καρδιάς.

Τα βασικά χαρακτηριστικά που ιδανικά πρέπει να πληρεί ένας κυτταρικός πληθυσμός για να θεωρηθεί κατάλληλος για χορήγηση σε καρδιακές παθήσεις είναι:

1. Να είναι ασφαλής, για παράδειγμα να μη δημιουργεί όγκους (όπως έχει παρατηρηθεί μετά από χορήγηση μη διαφοροποιημένων ESCs και iPSCs στην καρδιά) ή αρρυθμίες (αποτελεί έναν καλά τεκμηριωμένο κίνδυνο μετά τη χορήγηση σκελετικών μυοβλαστών)
2. Να βελτιώνει την καρδιακή λειτουργία.
3. Να δημιουργεί υγιή και λειτουργικό μυοκάρδιο που να ενσωματώνεται στον ήδη υπάρχων ιστό.
4. Να μπορεί να χορηγηθεί με όσο το δυνατόν λιγότερο επεμβατικές μεθόδους.
5. Να είναι εύκολα διαθέσιμος.
6. Να είναι ανεκτός από το ανοσοποιητικό σύστημα.
7. Να μην εγείρει θέματα βιοηθικής δεοντολογίας.

Επί του παρόντος, δεν είναι σαφές εάν υπάρχει ένας τέτοιος «ιδανικός» τύπος κυττάρου για κυτταρική θεραπεία που να πληρεί όλα τα απαραίτητα κριτήρια. Ωστόσο, ορισμένοι κυτταρικοί τύποι είναι περισσότερο υποσχόμενοι απ' ότι κάποιοι άλλοι³⁴³.

3.5.1 Εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs)

Τα ESC προέρχονται από την εσωτερική μάζα του αναπτυσσόμενου εμβρύου στο στάδιο της βλαστοκύστης και είναι τα πρωτότυπα βλαστοκύτταρα. Έχουν την ικανότητα αυτοανανέωση, δημιουργίας κυτταρικών κλώνων και είναι ικανά να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου του σώματος, συμπεριλαμβανομένων των καρδιομυοκυττάρων^{345,346}. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σχετικά με την ικανότητα των ESCs να διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα³⁰³, η κλινική τους δοκιμή και χρήση περιορίζεται από ηθικούς περιορισμούς, την απόρριψη από το ανοσοποιητικό σύστημα λόγω της αλλογενούς μεταμόσχευσης, αλλά και από την πιθανότητα ανάπτυξης τερατωμάτων^{304,343}. Παρόλα αυτά τα ανθρώπινα ESCs παραμένουν σημαντικά εργαστηριακά εργαλεία για την κατανόηση της διαφοροποίησης και της πολυπλοκότητας της καρδιογένεσης²⁸³.

3.5.2 Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα (iPSC)

Η ανακάλυψη ότι οι εμβρυικοί και ώριμοι ινοβλάστες ποντικού μπορούν να καταστούν πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα μετά από ρετροϊκή μεταγωγή τεσσάρων παραγόντων μεταγραφής, OCT3 / 4, SOX2, c-MYC και KLF4, έφερε επανάσταση στην

αναγεννητική βιολογία³⁰⁵. Η δημιουργία των iPSCs από ανθρώπινους ινοβλάστες^{306,307} αύξησαν το ενδιαφέρον και οδήγησαν σε γρήγορη χρήση των iPSCs ως πηγή καρδιομυοκυττάρων^{308,309}. Όπως και τα ESC, τα iPSCs είναι πολυδύναμα και κλωνογόνα κύτταρα. Ωστόσο, τα iPSCs παρακάμπτουν πολλά από τα ηθικά ζητήματα που σχετίζονται με τη χρήση ESC καθώς δίνουν την δυνατότητα δημιουργίας αυτόλογων iPSCs από βιοψία δέρματος, από κύτταρα των θυλάκων της τρίχας ή από το αίμα³¹⁰, και δίνουν την δυνατότητα δημιουργίας μεγάλου αριθμού αυτόλογων καρδιομυοκυττάρων. Ωστόσο παραμένει ο κίνδυνος δημιουργίας τερατωμάτων λόγω του πολυδύναμου χαρακτήρα τους καθώς και η πιθανότητα γενετικών ανωμαλιών. Επιπροσθέτως έχουν χαμηλή αποτελεσματικότητα όσον αφορά την διαφοροποίηση τους σε καρδιομυοκύτταρα, απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για την παρασκευή τους (περίπου 4 μήνες) και υψηλό κόστος^{347,348}. Επίσης ένα σημαντικό ζήτημα σχετικά με την καρδιογένεση μέσω iPSCs είναι κατά πόσο επιτυγχάνεται η μακροπρόθεσμη σταθερότητα και ολοκλήρωση της διαφοροποίησης στο μυοκάρδιο, καθώς πολλοί τύποι κυττάρων που προέρχονται από iPSCs δεν είναι πλήρως διαφοροποιημένοι σε σύγκριση με τα ώριμα κύτταρα²⁸³.

3.5.3 Σκελετικοί μυοβλάστες

Οι σκελετικοί μυοβλάστες αποτέλεσαν ελκυστική ομάδα κυττάρων για κυτταρική θεραπεία των καρδιακών παθήσεων λόγω της ικανότητάς τους για συστολή και της δυνατότητα εύκολης συλλογής τους για αυτόλογη μεταμόσχευση. Οι σκελετικοί μυοβλάστες ήταν τα πρώτα κύτταρα που δοκιμάστηκαν κλινικά για την κυτταρική θεραπεία των καρδιακών παθήσεων (Ιούνιος του 2000)³⁴⁹. Έγιναν αρκετές μικρές μη τυχαιοποιημένες κλινικές δοκιμές φάσης I που έδειξαν λειτουργικό όφελος, αν και με υψηλή συχνότητα εμφάνισης κοιλιακών αρρυθμιών^{350,351,352}. Σε αντίθεση με το λειτουργικό όφελος που παρατηρήθηκε στις πρώιμες μελέτες, η πρώτη προοπτική τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη με εικονικό φάρμακο κλινική δοκιμή φάσης II (μελέτη MAGIC), παρουσίασε έλλειψη αποτελεσματικότητας και διακόπηκε πρόωρα. Τα αποτελέσματα της κλινικής μελέτης MAGIC ήταν απογοητευτικά λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας αλλά και πρόκλησης αρρυθμιών στους ασθενείς³¹¹. Η πιο πρόσφατη κλινική μελέτη SEISMIC έδειξε πως η χορήγηση αυτόλογων σκελετικών μυοβλαστών σε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια ήταν ασφαλής και είχε την τάση να αυξάνει την ικανότητα των ασθενών για άσκηση, όμως δεν έδειξε καμία

σημαντική βελτίωση στο κλάσμα εξώθησης των ασθενών³⁴⁴. Τα αποθαρρυντικά αποτελέσματα σε συνδυασμό με την ύπαρξη πιο ελκυστικών πηγών κυττάρων, περιόρισαν το ενδιαφέρον για τη χρήση σκελετικών ινοβλαστών τα τελευταία χρόνια^{283,343}.

3.5.4 Κύτταρα που προέρχονται από τον μυελό των οστών.

Ο μυελός των οστών είναι ένας πολύ ετερογενής ιστός, που περιέχει πολλούς διαφορετικούς πληθυσμούς κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων των αιμοποιητικών, ενδοθηλιακών και μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων. Τα ανθρώπινα αιμοποιητικά βλαστοκύτταρα βρίσκονται σε μικρό αριθμό μέσα στον μυελό των οστών, είναι ικανά να ανασυνθέτουν όλες τις σειρές των κυττάρων του αίματος³⁵⁵ και, ενδεχομένως, έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης *in vivo*, σε καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα³⁵⁶. Τα ενδοθηλιακά βλαστοκύτταρα είναι ένα υποσύνολο αιμοποιητικών κυττάρων που προάγουν τη νεοαγγειογένεση είτε άμεσα, μέσω της διαφοροποίησης τους σε ενδοθηλιακά κύτταρα³⁵⁷ είτε έμμεσα, μέσω έκκρισης προ-αγγειογόνων κυτοκινών³⁵⁸. Τα μεσεγχυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs) είναι κύτταρα CD105 + CD90 + και είναι ικανά για οστεογένεση, χονδρογένεση και λιπογένεση³⁵⁹. Τα κύτταρα που απομονώνονται από τον μυελό των οστών (bone-marrow-derived cells) μετά από φυγοκέντριση του υλικού που αναρροφάτε από τον μυελό των οστών, αποτελούνται από πάρα πολύ λίγα βλαστοκύτταρα, 2-4% αιμοποιητικά και ενδοθηλιακά βλαστοκύτταρα και 0.01% MSCs, ενώ η συντριπτική πλειοψηφία των κυττάρων είναι αιμοποιητικά κύτταρα σε διάφορα στάδια ωρίμανσης³⁶¹.

Τα κύτταρα από τον μυελό των οστών πολύ γρήγορα πέρασαν από τις πειραματικές στις κλινικές δοκιμές λόγω της σχετικά εύκολης πρόσβασης στον μυελό των οστών, του διαθέσιμου μεγάλου αριθμού μη διαφοροποιημένων αυτόλογων κυττάρων χωρίς *ex vivo* επεξεργασία, και τη μεγάλη κλινική εμπειρία στην μεταμόσχευση μυελού των οστών. Τα κύτταρα από τον μυελό των οστών είναι ικανά να διαφοροποιούνται *in vitro* σε μεγάλη ποικιλία κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων σύμφωνα με μελέτες και των καρδιομυοκυττάρων και αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων³¹². Η αντίληψη για εκτεταμένη διαφοροποίηση των κυττάρων του μυελού των οστών σε καρδιομυοκύτταρα έχει τεθεί υπό αμφισβήτηση, δεδομένου ότι υπήρξαν αρκετά εργαστήρια που δεν μπόρεσαν να αναπαράγουν τα ίδια ευρήματα^{353,354}. Παρόλα αυτά οι μελέτες συνεχίστηκαν.

Τα αυτόλογα κύτταρα από τον μυελό των οστών είναι μακράν ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος κυτταρικός τύπος για τη θεραπεία του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου στον άνθρωπο και έχουν διεξαχθεί πάρα πολλές κλινικές μελέτες παγκοσμίως. Από το πλήθος των δεδομένων^{313,314,361}, μπορούν να εξαχθούν ορισμένα συμπεράσματα: 1) Η ενδοστεφανιαία χορήγηση κυττάρων που προέρχονται από τον μυελό των οστών είναι εφικτή και ασφαλής. 2) Τα κλινικά αποτελέσματα είναι απογοητευτικά αφού οι πιο πρόσφατες πολυκεντρικές τυχαιοποιημένες μελέτες δεν έδειξαν κανένα κλινικό όφελος⁴⁰⁴. 3) Κατά βάση ο πληθυσμός των ασθενών που έχουν χορηγηθεί τα εν λόγω κύτταρα δεν ήταν ιδιαίτερα βαριά καθώς οι περισσότεροι είχαν υποστεί για πρώτη φορά έμφραγμα του μυοκαρδίου με άμεση επαναιμάτωση και ένα μέσο κλάσμα εξώθησης (EF) της τάξης του 50% πριν από την κυτταρική θεραπεία, αφήνοντας ελάχιστα περιθώρια βελτίωσης. Ωστόσο τα κύτταρα από τον μυελό των οστών ως θεραπεία της ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας συνεχίζουν να αποτελούν πεδίο έρευνας με σκοπό να διευκρινιστεί οριστικά ο ρόλος τους και η αποτελεσματικότητά τους στην θεραπεία της ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας^{314, 315, 316}.

3.5.5 Μεσεγγυματικά βλαστοκύτταρα (MSCs)

Τα MSCs είναι πολυδύναμα μη αιμοποιητικά κύτταρα που εκφράζουν τους μεσεγγυματικούς δείκτες CD105, CD90 και CD73, και όχι τους αιμοποιητικούς CD45, CD34, CD14, CD79a, CD11b και HLA-DR³⁷². Έχουν την ικανότητα να διαφοροποιούνται σε ποικιλία κυττάρων μεσοδερματικής προέλευσης (π.χ. χονδροβλάστες, οστεοβλάστες και λιποκύτταρα), μεταξύ των οποίων και σε καρδιομυοκύτταρα³⁶⁶ και ενδοθηλιακά κύτταρα³⁶⁷. Τα MSCs ανευρίσκονται σε πολλούς ιστούς συμπεριλαμβανομένου του μυελού των οστών, του ομφάλιου λώρου, των μυών και του λιπώδη ιστού³⁷¹. Τα MSCs εκφράζουν λίγα μόρια των HLA τάξης I και καθόλου HLA τάξης II, αποφεύγοντας έτσι την αλλογενή ανοσολογική απάντηση. Αυτό το "ανοσολογικό προνόμιο" των MSCs τα κάνει κατάλληλα τόσο για αυτόλογη όσο και για αλλογενή μεταμόσχευση^{360,365,373}. Τα MSCs έχουν αποδειχθεί από πειραματικές αλλά και κλινικές μελέτες ότι έχουν ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες και ικανότητα ιστικής επιδιόρθωσης³⁷⁴.

Όσον αφορά την ισχαιμική καρδιακή νόσο, έχει φανεί ότι τόσο η αυτόλογη όσο και αλλογενή χορήγηση MSCs μπορεί να βελτιώσει την καρδιακή λειτουργία σε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια βελτιώνοντας και το τελικό κλινικό

αποτέλεσμα^{368,369,370,374}. Πολλές μελέτες έχουν δείξει τον ανοσοτροποποιητικό ρόλο των MSCs, συμπεριλαμβανομένων των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων τους, παρεμβαίνοντας τόσο στο έμφυτο-ενδογενές όσο και στο επίκτητο-προσαρμοστικό ανοσοποιητικό σύστημα, μέσω διακυτταρικής αλληλεπίδρασης και παρακρινικών παραγόντων³⁷⁴. Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν τα MSCs ελκυστική και πολλά υποσχόμενη κυτταρική θεραπεία για φλεγμονώδεις, αυτοάνοσες ασθένειες^{375,376}. Συγκεκριμένα, τα MSCs έχουν δοκιμαστεί σε ασθένειες όπως η νόσος Crohn, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, ο διαβήτης τύπου 1, η νόσος Alzheimer και η ρευματοειδής αρθρίτιδα. Έχουν πραγματοποιηθεί επίσης πειραματικές μελέτες με MSCs για την θεραπεία αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας. Συγκεκριμένα έχουν πραγματοποιηθεί πειραματικά πρωτόκολλα με χορήγηση MSCs από τον μυελό των οστών, από την εμβρυική μεμβράνη ή το λιπώδη ιστό πειραματόζωων, σε επίμυες στους οποίους είχε προκληθεί αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα (EAM)^{269,274,330,387,388}. Τα αποτελέσματα από την μεταμόσχευση των MSC σε επίμυες με EAM ήταν ενθαρρυντικά καθώς έδειξαν βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και εξασθένιση της φλεγμονής του μυοκαρδίου. Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, τα κύτταρα ασκούν την καρδιοπροστατευτική τους δράση μέσω παρακρινικών μηχανισμών^{269,274,330}, και οι ευεργετικές τους επιδράσεις οφείλονται κυρίως στην καταστολή του πολλαπλασιασμού και της δράσης των T-λεμφοκυττάρων και όχι στην μυοκαρδιακή τους διαφοροποίηση και την αγγειογενετική τους δράση²⁶⁹. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως τα MSC καταστέλλουν τα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα 1 και 17 (Th1 και Th17) τροποποιώντας έτσι την φλεγμονώδη απάντηση στην πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα²⁷⁴. Άλλη μελέτη υποστηρίζει ότι οι ευεργετικές δράσεις των MSCs στην EAM οφείλονται στην νεοαγγειογενετική τους δράση και την αναστολή της παραγωγής φλεγμονωδών κυτοκινών³⁸⁸.

Συνολικά, λόγω των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων των μελετών, η ασφάλεια και το κλινικό όφελος της θεραπείας με MSCs δεν έχει ακόμη αποδειχθεί. Επίσης, ο μηχανισμός ή οι μηχανισμοί με τους οποίους τα MSCs ασκούν την ρυθμιστική τους δράση *in vivo* παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστοι³⁷⁵.

3.5.6 Καρδιακά προγονικά κύτταρα (CPCs)

Μετά την ανατροπή της αντίληψης πως η καρδιά είναι ένα τελικώς διαφοροποιημένο όργανο χωρίς δυνατότητα αυτο-ανανέωσης, η επιστημονική

κοινότητα στράφηκε στην αναζήτηση θεραπευτικών στρατηγικών που θα εκμεταλλεύονταν την πολύτιμη ικανότητα της για αναγέννηση^{286,287}. Καρδιακά προγονικά κύτταρα (cardiac progenitor cells CPCs), που εκφράζουν αντιγόνα επιφανείας προγονικών κυττάρων - c-Kit (CD117, υποδοχέας για τον παράγοντα των βλαστοκυττάρων), Sca-1(stem cell antigen-1) - ανευρίσκονται φυσιολογικά στο μυοκάρδιο. Πρόκειται για πολυδύναμα κύτταρα με δυνατότητα αυτό-ανανέωσης, δημιουργίας κυτταρικών κλώνων και διαφοροποίησης σε καρδιομυοκύτταρα, λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα^{286,317}. Σε ορισμένες δημοσιεύσεις, η παρουσία του δείκτη c-Kit χρησιμοποιείται ως ορισμός των CPCs^{318,319}.

Επειδή τα CPCs είναι καρδιακά κύτταρα που θεωρητικά έχουν προγραμματιστεί εκ των προτέρων για την αναγέννηση όλων των καρδιακών σειρών (αλλά όχι εξωκαρδιακών ιστών), αποτέλεσαν εύλογα υποψήφιο κυτταρικό πληθυσμό για την ιατρογενή αναγέννηση της καρδιάς³⁴³.

Η ανάπτυξη μεθόδων για απομόνωση και καλλιέργεια in vitro των προγονικών κυττάρων απευθείας από την καρδιά, έθεσε τις προϋποθέσεις για τη χρήση τους^{317,320,327}. Τα προγονικά κύτταρα μπορούν να απομονωθούν από τον καρδιακό ιστό που λαμβάνεται είτε κατά τη διάρκεια της εγχείρησης της καρδιάς είτε με βιοψία του μυοκαρδίου, και στη συνέχεια καλλιεργούνται και πολλαπλασιάζονται με ή χωρίς το στάδιο δημιουργίας καρδιοσφαιρών^{320,327}. Ακολουθώντας τυποποιημένες μεθόδους καλλιέργειας κυττάρων απευθείας από την καρδιά^{320,327} επιτυγχάνεται η απομόνωση και ο πολλαπλασιασμός κυττάρων που εκφράζουν τους δείκτες των προγονικών κυττάρων c-Kit, Abcg2 και SSEA-1 και δείκτες της πρώιμης καρδιακής σειράς GATA-4, MEF-2C, Nkx2.5. Το ποσοστό των κυττάρων c-Kit+ μετά τη δεύτερη συγκομιδή των κυττάρων από την καλλιέργεια, αρχίζει να μειώνεται σταδιακά. Το ποσοστό των κυττάρων που εκφράζουν δείκτες εμβρυϊκής προέλευσης (SSEA-1) είναι μικρό και σταδιακά μειώνεται με αποτέλεσμα μετά τις πρώτες συγκομιδές να μην είναι πλέον ανιχνεύσιμος αυτός ο υποπληθυσμός κυττάρων. Αντίθετα, η αναλογία κυττάρων που εκφράζουν δείκτες του πλευρικού κυτταρικού πληθυσμού (abcg2 +) αυξάνονται με την πάροδο του χρόνου στην καλλιέργεια. Κατά την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των CPCs έχουμε και την κυτταρική καλλιέργεια υποπληθυσμών που φαινοτυπικά μοιάζουν με μεσεγχυματικά κύτταρα (CD90 +) που παραμένουν καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου της καλλιέργειας των CPCs, και μικρούς υποπληθυσμούς

με δείκτες ενδοθηλίου (CD31 + , CD34 +) που τείνουν να μειώνονται προοδευτικά μέσα στον χρόνο της καλλιέργειας³²⁷.

Η χορήγηση CPCs με ή χωρίς το στάδιο των καρδιόσφαιρων έχει μελετηθεί σε πειραματικά πρωτόκολλα ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας με ενθαρρυντικά αποτελέσματα^{327,328}. Συγκεκριμένα η χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων έχει αποδειχθεί αποτελεσματική σε πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας σε ποντικούς, επίμυες και χοίρους. Επίσης ενθαρρυντικά ήταν τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών πρώιμης φάσης σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου^{321,381,390} διατακτική μυοκαρδιοπάθεια³⁸⁰ και σύνδρομο υποπλαστικής αριστερής κοιλίας^{382,383}. Μετά την τεκμηρίωση πως το στάδιο των καρδιόσφαιρων δεν είναι απαραίτητο για την καλλιέργεια CPCs, καλλιέργειά τους έγινε πιο εύκολη και γρήγορη³²⁷. Όσον αφορά την ασφάλεια της χορήγησης των εν λόγω κυττάρων δεν έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη όγκων ή αρρυθμιών και δεν έχουν προκαλέσει αύξηση της νοσηρότητας και της θνητότητας στους πληθυσμούς που χορηγήθηκαν συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου³⁴³.

Δύο σημαντικές κλινικές δοκιμές έχουν αναφέρει πρώιμα αποτελέσματα μετά από μεταμόσχευση αυτόλογων κυττάρων με προγονικά χαρακτηριστικά. Η μελέτη φάσης 1 SCPIO έδειξε 12,3% βελτίωση στο LVEF σε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια και αορτοστεφανιαία παράκαμψη 1 χρόνο μετά την ενδοστεφανιαία έγχυση αυτόλογων c-kit + CPCs³¹⁹. Στη μελέτη φάσης 1 CADUCEUS, ασθενείς 2-4 εβδομάδες μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν ενδοστεφανιαίως αυτόλογα προγονικά κύτταρα (που καλλιεργήθηκαν με το στάδιο των καρδιόσφαιρων) ή την καθιερωμένη φαρμακευτική θεραπεία³²¹. Ενώ δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων στις μετρήσεις της λειτουργικότητας της καρδιάς, όπως στο LVEF, υπήρξε μείωση της μάζας της ουλής και αύξηση του βιώσιμου μυοκαρδίου και της περιφερειακής συσταλτικότητας σύμφωνα με την αξιολόγηση που έγινε με CMR μετά από 6 και 12 μήνες³²¹. Δεν αναφέρθηκαν ανεπιθύμητες ενέργειες που να σχετίζονται με τη μεταμόσχευση των κυττάρων είτε στους 6 μήνες παρακολούθησης (CADUCEUS) είτε στο 1 έτος παρακολούθησης (CADUCEUS, SCPIO).

V.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΠΟΘΕΣΗ

Η έλλειψη στοχευμένης θεραπείας σε συνδυασμό με τη δυνητική σοβαρότητα της μυοκαρδίτιδας κάνουν επιτακτική την ανάγκη για νέες, αποτελεσματικές και στοχευμένες θεραπευτικές στρατηγικές για την αντιμετώπιση της. Η κυτταρική θεραπεία αποτελεί τα τελευταία χρόνια μια ελκυστική προσέγγιση για την θεραπεία των καρδιακών παθήσεων με υποσχόμενα προκαταρκτικά αποτελέσματα στην καρδιακή επούλωση και λειτουργία. Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία που υποδεικνύει την ευεργετική επίδραση των μεσεγχυματικών καρδιακών κυττάρων (MSC) στην πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα σε επίμυες, αλλά και την ευεργετική επίδραση των καρδιακών προγονικών κυττάρων (CPCs) στην ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια, υποθέσαμε ότι η χορήγηση των CPCs σε επίμυες με αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα, θα καταστείλει τη φλεγμονή του μυοκαρδίου και θα βελτιώσει την λειτουργικότητα της καρδιάς. Έως τώρα η επίδραση των CPCs στην πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα δεν έχει μελετηθεί.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των αυτόλογων CPCs στην φλεγμονώδη απάντηση και την λειτουργικότητα της καρδιάς σε επίμυες με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα, επαγόμενη από χοίρεια μυοσίνη.

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

3.1 Πειραματόζωα

Τα πειραματόζωα που χρησιμοποιήθηκαν για την πρόκληση πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας και για την απομόνωση CPCs ήταν επίμυες Lewis, οι οποίοι έχει αποδειχθεί στη βιβλιογραφία ότι είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην ΕΑΜ και έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για πρωτόκολλα αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας^{265,282}. Οι επίμυες Lewis είναι λευκοπαθικοί επίμυες, γενετικά ταυτόσημοι μεταξύ τους, που αναπτύχθηκαν από τον Δρ. Lewis από Wistar επίμυες στις αρχές της δεκαετίας του 1950³⁴¹. Το γεγονός ότι οι Lewis επίμυες είναι γενετικά ταυτόσημοι, επιτρέπουν την πραγματοποίηση μεταμόσχευσης κυττάρων χωρίς τη χρήση ανοσοκαταστολής.

Για την επίτευξη του στόχου της παρούσας μελέτης συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη πενήντα δυο (52) Lewis (Charles River) επίμυες, ηλικίας έξι έως δώδεκα εβδομάδων. Από αυτούς, στους σαράντα πέντε (45) επίμυες χορηγήθηκε χοίρεια μυοσίνη για την πρόκληση ΕΑΜ ενώ οι επτά (7) επίμυες, ηλικίας περίπου έξι εβδομάδων, θυσιάστηκαν για την απομόνωση καρδιακών προγονικών κυττάρων. Λόγο των δυσκολιών που αντιμετωπίστηκαν στην πρόκληση αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας, όπως αναλυτικά θα αναφερθούν σε επόμενη ενότητα, αλλά και της θνησιμότητας των πειραματόζωων, η μελέτη βασίστηκε στα δεδομένα που συλλέχθηκαν από δεκατέσσερις (14) επίμυες, εννέα θηλυκούς και πέντε αρσενικούς, εκ των οποίων οι έξι ανήκαν στην ομάδα παρέμβασης και οι οκτώ στην ομάδα ελέγχου.

3.2 Παρακολούθηση και ευζωία των πειραματόζωων

Οι επίμυες που χρησιμοποιήθηκαν για τους ερευνητικούς σκοπούς της μελέτης διαβιούσαν σε κατάλληλα διαμορφωμένους κλωβούς, με ειδικά διαμορφωμένο δάπεδο και υπό σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας και διάρκεια φωτός/σκότους 12/12 ώρες βάσει των προδιαγραφών(ΠΔ 56/2013). Η πρόσβαση σε τροφή και νερό ήταν ελεύθερη και βάσει των αναγκών των ζώων. Τα πειραματόζωα ελέγχονταν τακτικά για σημάδια νοσηρότητας και καταγραφή των θανάτων. Επίσης ζυγίζονταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, και συγκεκριμένα την 0, 7η, 10η και 28η μέρα του πειραματικού πρωτοκόλλου.

Τα πειραματόζωα για να υποβληθούν στις πειραματικές διαδικασίες της μελέτης, πραγματοποιούνταν προνάρκωση σε ειδικό θάλαμο με παροχή οξυγόνου και διαλύματος ισοφλουρανίου 4%, χρησιμοποιώντας το σκεύασμα Iso-Vet με Ισοφλουρανίο 100mg/g υγρού διαλύματος για εισπνεόμενους ατμούς (Piramal Healthcare). Στην συνέχεια πραγματοποιούνταν ενδοτραχειακή διασωλήνωση του πειραματόζωου και καθ' όλη την διάρκεια των διαδικασιών παρέμεναν σε μηχανική υποστήριξη της αναπνοής με 60-65 αναπνοές/λεπτό στον αναπνευστήρα Small Animal Ventilation 683, Harvard Apparatus, Inc, διατηρώντας την αναισθησία με διάλυμα ισοφλουρανίου 2-2,5%. Αναλγησία επιτυγχάνονταν με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση μελοξικάμης 0,1mg ανά 100gr του βάρους των επίμυων.

3.3 Απομόνωση και καλλιέργεια προγονικών καρδιακών κυττάρων

Καρδιές από υγιείς αρσενικούς Lewis επίμυες 5-6 εβδομάδων, απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και την καλλιέργεια προγονικών καρδιακών κυττάρων σύμφωνα με τυποποιημένη μέθοδο^{320,327}. Συγκεκριμένα, οι επίμυες, υπό γενική αναισθησία και υπό μηχανική υποστήριξη της αναπνοής, όπως περιεγράφηκε ήδη, υποβλήθηκαν σε χειρουργική διάνοιξη του θώρακα με 2 τομές κατά μήκος των μεσοκλειδικών γραμμών, εκτομή του θωρακικού διαφράγματος (τομή σε σχήμα "Π"), και εκτομή της καρδιάς από την έκφυση των μεγάλων αγγείων, τηρώντας τους κανόνες αντισηψίας.

Εν συνεχεία, μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής (Safemate 1.2), η καρδιά κάθε επίμυα, τεμαχίστηκε και πάρθηκαν δείγματα μυοκαρδίου τα οποία αρχικά ξεπλύθηκαν σε PBS (Phosphate-buffered saline), επεξεργάστηκαν μερικώς, ενζυμικά με θρυψίνη (0,05% Trypsin-EDTA, phenol red) για 4 λεπτά, και εν συνεχεία τεμαχίστηκαν σε ιστοτεμάχια πάχους 1-2mm. Τα ιστοτεμάχια αυτά τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία διαστάσεων 100mm x 20mm (Cell Culture Dishes, Corning), τα οποία είχαν προηγουμένως επωαστεί για 24 ώρες με φμπρονεκτίνη, και τελικά τοποθετούνταν σε κλίβανο επώασης (37°C, CO₂ 5%) με θρεπτικό υλικό [Iscove's Modified Dulbecco's Medium (GIBCO), fetal bovine serum 20% (HyClone, Logan, UT), 100 U/ml penicillin G (GIBCO), 100 U/ml streptomycin (GIBCO) και 0.1 mmol/l 2-mercaptoethanol

(GIBCO)]. Το θρεπτικό υλικό στα τρυβλία ανανεωνόταν ανά 3 ημέρες, ενώ οι καλλιέργειες αξιολογούνταν τακτικά στο μικροσκόπιο.

Μετά από περίπου 3 με 5 ημέρες, ένα στρώμα από μικρά διαυγή κύτταρα αναδεικνύονταν από τα ιστοτεμάχια και, όταν τα κύτταρα αυτά επικάλυπταν πλήρως τα τρυβλία, γίνονταν συλλογή τους (πρώτη συγκομιδή-harvest). Συγκεκριμένα, στο θάλαμο νηματικής ροής, αφού αφαιρούνταν το θρεπτικό υλικό από τα τρυβλία και ξεπλένονταν με PBS, υποβάλλονταν σε ήπια ενζυμική πέψη με θρυψίνη για 4 λεπτά. Στην συνέχεια συλλέγονταν τα κύτταρα που αποκολλιούνται με την ενζυμική πέψη, και μετά την φυγοκέντριση (1000rpm, 3min, Centrifuge 5810 R, eppendorf) και την αναδιάλυση τους σε θρεπτικό υλικό, καταμετρούνταν σε πλάκα Neubauer. Τα κύτταρα τοποθετούνταν ανά δυο εκατομμύρια σε φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας (75cm² Cell Culture Flask, Canted Neck, Corning) όπου καλλιεργούνταν σε μονές στιβάδες (37°C, CO₂ 5%), με αλλαγή του θρεπτικού τους υλικού κάθε 3 ημέρες και τακτική μικροσκόπηση των κυτταροκαλλιέργειας. Στις περιπτώσεις όπου παρέμεναν ιστοτεμάχια προσκολλημένα πάνω στα τρυβλία, τότε αυτά τοποθετούνταν εκ νέου στον επωαστικό κλίβανο με θρεπτικό υλικό ώστε να δώσουν νέα κύτταρα και να πραγματοποιηθεί δεύτερη συγκομιδή κυττάρων.

Όταν λόγω πολλαπλασιασμού τους, τα κύτταρα επικάλυπταν πλήρως την επιφάνεια της φλάσκας, αφαιρούνταν το θρεπτικό υλικό από τις φλάσκες και τα κύτταρα ξεπλένονταν με PBS, και αποκολλιούνται/συλλέγονταν με ήπια ενζυμική πέψη με θρυψίνη για 4 λεπτά. Στη συνέχεια μετά την φυγοκέντριση τους και την αναδιάλυσή τους σε συγκεκριμένο όγκο, καταμετρούνταν σε πλάκα Neubauer και είτε τοποθετούνταν σε νέες φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας για τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό τους, ή καταψύχονταν στους -80°C (Thermo Scientific Forma 700 Series), σε φιαλίδια κατάψυξης (cryogenic vials 2.0mL self standing, Round Bottom, Corning) σε διάλυμα DMSO (διμεθυλοσουλφοξείδιο) ανά πέντε εκατομμύρια, ή αναδιαλύονταν σε διάλυμα PBS ώστε να χορηγηθούν σε πειραματόζωα. Συγκεκριμένα όταν τα κύτταρα συλλέγονταν για την χορήγηση τους σε πειραματόζωο, επιλέγονταν τμήμα του διαλύματος ώστε να έχουμε το επιθυμητό αριθμό κυττάρων δηλαδή 5x10⁵ CPCs και γίνονταν αναδιάλυση ώστε να έχουμε τελικό διάλυμα 200 μl με 176μl PBS, 20μl νιτρογλυκερίνη (nitroglycerina 50mg/50ml, ACARPIA) και 4μl ηπαρίνη (Heparin 5000 i.u./ml, LEO).

Για την χρήση κυττάρων που είχαν καταψυχθεί γίνονταν, μια εβδομάδα τουλάχιστον πριν την χρήση τους, απόψυξη τους σε υδατόλουτρο 37°C, αναδιάλυσή τους σε καθαρό θρεπτικό υλικό και καλλιέργειά τους σε φλάσκες στον επωαστικό κλίβανο (37°C, CO₂ 5%).

3.4 Πρόκληση πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας

Για την πρόκληση αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας δοκιμάστηκαν 7 διαφορετικά πρωτόκολλα πρόκλησης EAM με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, τα οποία θα περιγραφούν σε επόμενη ενότητα. Το επιθυμητό αποτέλεσμα με ιστολογικά επιβεβαιωμένη μυοκαρδίτιδα επιτεύχθηκε με το έβδομο πρωτόκολλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε τελικά για την παρούσα πειραματική μελέτη και το οποίο θα περιγραφεί αναλυτικά στην συνέχεια.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο, για την πρόκληση EAM, χρησιμοποιήθηκε ως αντιγόνο μυοκαρδιακή μυοσίνη χοίρου σε διάλυμα με συγκέντρωση μυοσίνης 2,6mg/ml. Η παρασκευή του διαλύματος γίνονταν ως εξής: Για την παρασκευή 4ml διαλύματος, 0,95ml PBS αναμιγνύονταν με 1,05ml διαλύματος μυοσίνης από καρδιά χοίρου (Myosin, Calcium activated from porcine heart, 9,8 mg/ml διαλύματος γλυκερόλης 50%, Sigma-Aldrich) και στην συνέχεια αναμιγνύονταν με ίσο όγκο, 2ml ανοσοενισχυτικού Complete Freund's Adjuvant (1 mg/ml Mycobacterium tuberculosis (H37Ra), Sigma-aldrich) στο οποίο έχει προστεθεί Mycobacterium tuberculosis H37 Ra (DIFCO) σε τελική συγκέντρωση 11mg/ml. Τα παραπάνω συστατικά ανακατεύονταν με την βοήθεια συσκευής vortex (GVLab GILSON) για 2-3 λεπτά και στην συνέχεια αναρροφούνταν σε γυάλινη σύριγγα (Hypodermic Syringe, Ideal). Αφού αφαιρούνταν ο αέρας από την σύριγγα, συνδεόταν μέσω μιας σύνδεσης τριών κατευθύνσεων (3-way stop cock) με μια κενή σύριγγα ίδιου τύπου και με την μετακίνηση των εμβόλων των συρίγγων, μεταφέρονταν το μίγμα μέσα στην διάταξη για 10 λεπτά ώστε να ομογενοποιηθεί (Εικόνα 4). Η ομογενοποίηση επιβεβαιωνόταν με την ενστάλαξη μιας σταγόνας σε δοχείο με νερό, και θεωρούνταν επιτυχής όταν η σταγόνα παρέμενε αδιάλυτη μέσα στο νερό^{281,378} (Εικόνα 5). Τέλος, το διάλυμα αναρροφούνταν σε αποστειρωμένη σύριγγα ώστε να χρησιμοποιηθεί για την ανοσοποίηση των ζώων. Το διάλυμα παρασκευάζονταν πάντα την ημέρα της ανοσοποίησης και δεν φυλάσσονταν για επόμενη χρήση.



Εικόνα 4. Διάταξη ομογενοποίησης διαλύματος μυοσίνης.

Το διάλυμα μυοσίνης και ανοσοενισχυτικού, αναρροφούνται σε γυάλινη σύριγγα η οποία συνδεόταν μέσω μιας σύνδεσης τριών κατευθύνσεων (3-way) σε μια κενή σύριγγα ίδιου τύπου όπως φαίνεται στην εικόνα. Η τρίτη οδός παρέμενε κλειστή και με την μετακίνηση των εμβόλων των συριγγών, μεταφέρονταν το μίγμα μέσα στην διάταξη για 10 λεπτά ώστε να επιτευχθεί η ομογενοποίηση του μίγματος.



Εικόνα 5. Επιβεβαίωση ομογενοποίησης του μίγματος.

Μετά τα 10 λεπτά μετακίνησης του διαλύματος στην διάταξη των γυάλινων συριγγών, σταγόνα του παχύρευστου λευκού μίγματος ενσταλάζονταν σε δοχείο με νερό, ώστε να επιβεβαιωθεί ότι έχουμε μίγμα παχύρευστο το μίγμα ήταν πλέον ομογενές όταν δεν διαλυόταν η σταγόνα στο νερό όπως φαίνεται στην εικόνα.

Την πρώτη μέρα που πραγματοποιούνταν η είσοδος των πειραματόζωων στο πρωτόκολλο, παίρνοντας τον αύξων αριθμό τους για την πειραματική μελέτη (μέρα 0) και επτά μέρες μετά (7η μέρα) γίνονταν έγχυση 0,4ml διαλύματος μυοσίνης-ανοσοενισχυτικού υποδόρια μισό μισό στα δυο πίσω πέλματα των επίμυων με σκοπό την ευαισθητοποίηση τους και την πρόκληση EAM^{281,377}. Συγκεκριμένα τις ημέρες 0 και 7, με σύριγγα 1ml και βελόνα 27G (0.4x13mm), 0,2ml του διαλύματος εγχέονταν υποδόρια στο δεξί και τα υπόλοιπα 0,2ml στο αριστερό πίσω πέλμα των επίμυων. Οι επίμυες ήταν υπό γενική αναισθησία με ισοφλουράνιο και υπό μηχανική υποστήριξη της αναπνοής όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Τα 0,4 ml μίγματος, σύμφωνα και με τα όσα περιγράφηκαν και ανωτέρω, περιέχουν 1,03 mg χοίρειας μυοσίνης σε διάλυμα γλυκερίνης και PBS με τελικό όγκο διαλύματος 0,2ml, αναμεμιγμένα με ίσο όγκο, 0,2ml, ανοσοενισχυτικού Freund's συγκέντρωσης 11mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*. Μετά την έγχυση χορηγούνταν ενδοπεριτοναϊκή αναλγητική ένεση με μελοξικάμη σε δόση 0,1mg/100gr του βάρους των επίμυων. Τέλος οι επίμυες αφού απένιπταν, αποσωληνώνονταν και επέστρεφαν στο χώρο φύλαξης τους.

3.5 Έγχυση καρδιακών προγονικών κυττάρων

Την 10η μέρα από την ευαισθητοποίηση με χοίρεια καρδιακή μυοσίνη, τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε χειρουργική επέμβαση υπό γενική αναισθησία και μηχανική υποστήριξη της αναπνοής όπως περιγράφηκε ανωτέρω. Στη συνέχεια με αριστερή πλάγια θωρακοτομή κατά μήκος περίπου του 2ου μεσοπλεύριου διαστήματος (ένα μεσοπλεύριο διάστημα πάνω από την ώση της καρδιάς), γίνονταν εφικτή η πρόσβαση στην καρδιά. Στην συνέχεια πραγματοποιούνταν περικαρδιοτομή, παρασκευή της αορτής και καθαρισμός του πεδίου της καρδιάς, με αφαίρεση του θύμου αδένος, εάν αυτό ήταν απαραίτητο, και νωπή απολίνωση (2-0) τοποθετούνταν στην ρίζα της αορτής, λίγο μετά την έκφυση της. Κατόπιν πραγματοποιούνταν η έγχυση στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο παροδικό, για 10 δευτερόλεπτα, αποκλεισμό της ανιούσας αορτής, 0,2ml PBS (ομάδα ελέγχου) ή 5×10^5 CPCs (ομάδα παρέμβασης), ανάλογα με την ομάδα που είχε τυχαιοποιηθεί το εκάστοτε πειραματόζωο, με σύριγγα μιας χρήσης 1ml και βελόνα 29G (0.33x12,7mm)³³¹.

Οι επίμυες τυχαιοποιήθηκαν την 10η μέρα από την πρώτη ευαισθητοποίηση με χοίρεια μυοσίνη, σε δυο ομάδες:

A. Ομάδα ελέγχου: Οι επίμυες την ημέρα 0 και 7 υποβλήθηκαν σε υποδόρια έγχυση διαλύματος χοίρειας μυοσίνης σύμφωνα με το μοντέλο που περιγράφηκε παραπάνω και την ημέρα 10 σε ενδοστεφανιαία έγχυση 0.2ml διαλύματος PBS που αποτελούνταν από 176μl PBS (1x), 20μl νιτρογλυκερίνης (nitroglicerina 50mg/50ml, ACARPIA) και 4μl ηπαρίνης (Heparin 5000 i.u./ml, LEO).

B. Ομάδα παρέμβασης: Όπως και στην ομάδα ελέγχου, οι επίμυες την ημέρα 0 και 7 υποβλήθηκαν σε υποδόρια έγχυση διαλύματος χοίρειας μυοσίνης σύμφωνα με το μοντέλο που περιγράφηκε παραπάνω, αλλά την ημέρα 10 υποβλήθηκαν σε ενδοστεφανιαία έγχυση 5×10^5 CPCs σε διάλυμα 0.2 ml με: 176μl PBS, 20μl νιτρογλυκερίνη και 4μl ηπαρίνη.

Τα κύτταρα που χορηγούνταν στους επίμυες συλλέγονταν πριν το χειρουργείο από τις φλάσκες κυτταροκαλλιέργειών όπως περιγράφηκε στην παράγραφο για την απομόνωση και την καλλιέργεια των καρδιακών προγονικών κυττάρων.

Μετά την ολοκλήρωση της έγχυσης, πραγματοποιούνταν σύγκληση του θωρακικού τοιχώματος σε τρία επίπεδα: θωρακικός κλωβός (με ράμματα silk 2-0), θωρακικοί μύες και δέρμα (με ράμματα vicryl 2-0). Οι επίμυες αφού απένιπταν, επέστρεφαν στο χώρο φύλαξης τους.

Η χειρουργική τεχνική και η ενδοστεφανιαία έγχυση πραγματοποιήθηκε με ακριβώς τον ίδιο τρόπο στις δυο ομάδες.

3.6 Ευθανασία πειραματόζωων

Την 28^η ημέρα μετά την πρώτη ευαισθητοποίηση με χοίρεια μυοσίνη, πραγματοποιούνταν η ευθανασία των πειραματόζωων. Οι επίμυες υπό γενική αναισθησία και μηχανική υποστήριξη της αναπνοής υποβάλλονταν σε εκτεταμένη χειρουργική διάνοιξη του θωρακικού τοιχώματος με τομές κατά μήκος των μεσοκλειδικών γραμμών και του διαφράγματος (τομή σε σχήμα "Π") και αφαίρεση της καρδιάς από την έκφυση των μεγάλων αγγείων. Η καρδιά στην συνέχεια ζυγίζονταν με ζυγαριά ακριβείας (Fisher Scientific SG-123), τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο δοχείο με διάλυμα φορμόλης 4% και μεταφέρονταν στο παθολογοανατομικό εργαστήριο προκειμένου να πραγματοποιηθεί ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη.

3.7 Παράμετροι υπό μελέτη

3.7.1 Διαθωρακική υπερηχογραφική μελέτη

Την ημέρα 0 πριν την έγχυση του διαλύματος χοίρειας μυοσίνης για την πρόκληση αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας, την 10^η ημέρα πριν την έναρξη της χειρουργικής επέμβασης και την 28^η ημέρα μετά την αναισθησία και την διασωλήνωση των επίμυων, πραγματοποιούνταν διαθωρακικό υπερηχογράφημα με ηχοβολέα 10MHz συνδεδεμένο με υπερηχογράφο Vivid Q (GE Healthcare, 10S-RS probe collector) με σκοπό να μελετηθεί η καρδιακή τους λειτουργία. Καθ' όλη την διάρκεια της υπερηχογραφικής μελέτης οι επίμυες ήταν υπό γενική αναισθησία με ισοφλουράνιο, παρακολούθηση της καρδιακής συχνότητας και πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα και πρωκτική θερμομέτρηση ώστε να διατηρούν θερμοκρασία σώματος 37°C (TCAT-2LV CONTROLLER physitemp). Οι καρδιές απεικονίστηκαν δισδιάστατα κατά τον επιμήκη άξονα της καρδιάς, στο επίπεδο της μεγαλύτερης διαμέτρου της αριστερής κοιλίας και πάρθηκαν εικόνες και βίντεο. Στην συνέχεια τα βίντεο μελετήθηκαν στον ηλεκτρονικό υπολογιστή με το λογισμικό ECHOpac (GE Healthcare, Visual Sonics V1.3.8) όπου έγινε ο υπολογισμός του κλάσματος εξώθησεως της αριστερής κοιλίας (LVEF) καθώς και του τελοσυστολικού (LVESV) και τελοδιαστολικού (LVEDV) όγκου αριστερής κοιλίας της καρδιάς των επίμυων.

3.7.2 Ιστοπαθολογική ανάλυση

Αφού γίνει η υπερηχογραφική μελέτη την 28^η μέρα μετά από την πρώτη έγχυση διαλύματος μυοσίνης, τα ζώα θυσιάζονταν όπως περιγράφηκε ανωτέρω, αφαιρούνταν η καρδιά από την έκφυση των μεγάλων αγγείων και μονιμοποιούνταν σε υδάτινο διάλυμα φορμόλης (φορμαλδεΰδη 4%, Mayers BioGnost Ltd). Οι καρδιές από δέκα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη στο Παθολογοανατομικό εργαστήριο του ΓΝΑ "Ευαγγελισμός".

Μετά τη μονιμοποίηση στο υδάτινο διάλυμα φορμόλης για χρονικό διάστημα 24ωρών, πραγματοποιήθηκαν τομές πάχους ενός εκατοστού κατά τον βραχύ άξονα της καρδιάς, και κάθε τομή τοποθετήθηκε σε ειδική κασέτα ιστολογικών τομών (Thermo Scientific). Ακολούθησαν οι διαδικασίες της αφυδάτωσης και της διαύγασης (clearing). Η αφυδάτωση έγινε με μεταφορά των ιστολογικών τομών σε διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης βαθμιαία αυξανόμενης συγκέντρωσης (70-80-90-100%w/v), για

χρονικό διάστημα 1 ώρας σε κάθε διάλυμα. Μετά την πλήρη αφυδάτωση του ιστού ακολούθησε η διαδικασία της διαύγασης. Με τη διαδικασία αυτή η αιθυλική αλκοόλη αντικαθίσταται από οργανικό διαλύτη (ξυλόλη), ο οποίος μπορεί να αναμιχθεί τόσο με την αλκοόλη όσο και με την υγρή παραφίνη. Η διαδικασία της διαύγασης πραγματοποιήθηκε με εμβάπτιση σε διαδοχικά διαλύματα ξυλόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης 50 και 100% για χρονικό διάστημα συνολικά μίας ώρας. Μετά το τέλος της διαδικασίας οι κασέτες με τις τομές εμβαπτίστηκαν σε υγρή παραφίνη στους 60-65°C. Οι κύβοι παραφίνης, που προέκυψαν από την στερεοποίηση της παραφίνης, τοποθετήθηκαν σε μικροτόμο Leica και πάρθηκαν ιστολογικές τομές πάχους 5μm. Στην συνέχεια οι ιστολογικές τομές τοποθετήθηκαν πάνω σε αντικειμενοφόρες πλάκες (Thermo Scientific). Τέσσερις με έξι ιστολογικές τομές από την καρδιά κάθε πειραματόζωου ανά 400 μm, χρωματίστηκαν κατά αιματοξυλίνη-ηωσίνη (Mayers BioGnost) για την ανάδειξη της φλεγμονώδους διήθησης και με τριχρωμη χρώση Masson (Sakura Tissue Tec-Manarini) για την ανάδειξη της ίνωσης του μυοκαρδίου.

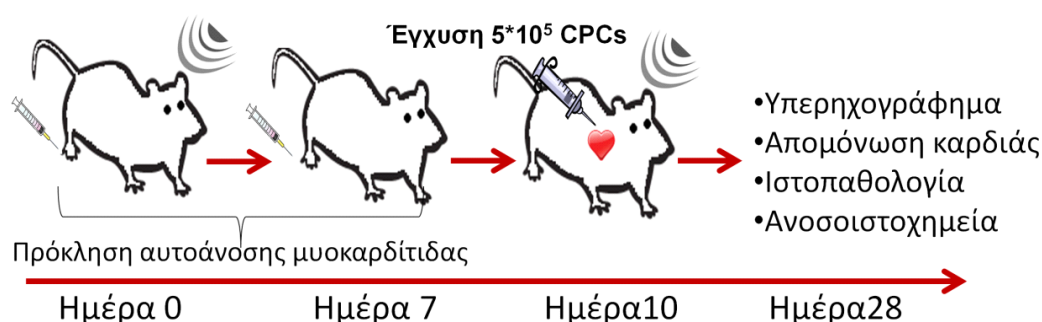
Οι τομές φωτογραφήθηκαν (LEICA DFC500-colour) με την βοήθεια στερεοσκοπίου (Nikon SMZ800, φακός PlanApo 1xWD70 Nikon), και στην συνέχεια αναλύθηκαν στο πρόγραμμα ImageJ ώστε να μετρηθεί το ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης και ίνωσης στην συνολική επιφάνεια των τομών του μυοκαρδίου.

3.7.3 Ανοσοϊστοχημική μελέτη

Τέσσερις με έξι ιστολογικές τομές ανά πειραματόζωο, πάρθηκαν από τους κύβους παραφίνης που προέρχονταν οι τομές που εμφάνιζαν την μεγαλύτερη ένταση φλεγμονής, και υπέστησαν ανοσοϊστοχημική μελέτη για τον έλεγχο της διήθησης του μυοκαρδίου συγκεκριμένα από T λεμφοκύτταρα. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι αντιγόνων επιφανείας 3 (CD3, cluster of differentiation 3), τα οποία εκφράζονται εκλεκτικά στα T λεμφοκύτταρα. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα της εταιρίας Agilent (DAKO), και συγκεκριμένα τα CD3, clone F7.2.38 Mouse anti-Human. Η διαδικασία της μονιμοποίησης μπορεί να οδηγήσει σε διασύνδεση μεταξύ των υπολειμμάτων των αμινοξέων των πρωτεϊνών και να καλύψει τους αντιγονικούς επιτόπους και να διαταράξει έτσι την σύνδεση αντιγόνου αντισώματος. Για τον σκοπό αυτό, οι ιστολογικές τομές θερμάνθηκαν πρώτα στους 60°C για μία ώρα σε κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα της εταιρίας Agilent (DAKO laboratories) για αποπαραφίνωση και απελευθέρωση των επιτόπων. Στην συνέχεια οι

τομές υπέστησαν τις απαραίτητες διαδικασίες για την ανοσοιστοχημική μελέτη που επιγραμματικά έχουν ως εξής: αρχικά εφαρμόζεται το πρωτογενές αντίσωμα-primary antibody, mouse anti—CD3, το οποίο αναγνωρίζει το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει. Στην συνέχεια εφαρμόζεται ένα δεύτερο αντίσωμα (secondary antibody) το οποίο αναγνωρίζει το σταθερό τμήμα (Fc) του πρώτου αντισώματος. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι συνδεδεμένο με ένα μικρό μόριο που λέγεται βιοτίνη. Στην συνέχεια εφαρμόζεται ένα σύμπλοκο αβιδίνης-περοξιδάσης. Η αβιδίνη συνδέεται με την βιοτίνη και κατά συνέπεια με το δευτερογενές αντίσωμα. Τέλος εφαρμόζεται το χρωμογόνο (3-3'δυσάμινοβενζιδίνη-DAB), το οποίο οξυδώνεται από την περοξιδάση και παράγει ένα καφεκίτρινο χρώμα. Οι διαδικασίες της ανοσοϊστοχημείας πραγματοποιήθηκαν σε αυτοματοποιημένο μηχάνημα της εταιρίας Agilent(DAKO laboratories).

Οι ανοσοϊστοχημικά επεξεργασμένες τομές φωτογραφήθηκαν(LEICA DFC500-colour) σε 20x και 40x εστίαση του μικροσκοπίου (Leica DM LS2). Στην συνέχεια σε 40x εστίαση, έγινε χειροκίνητη καταμέτρηση των T λεμφοκυττάρων σε 5, τυχαία επιλεγμένα, οπτικά πεδία ανά πειραματόζωο, με το πρόγραμμα ImageJ.



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου της πειραματικής μελέτης.

Την μέρα 0 και 7 του πρωτοκόλλου γίνονταν η πρόκληση EAM με υποδόρια έγχυση διαλύματος αντιγόνου-ανοσοενισχυτικού στα δυο πίσω πέλματα των επίμυων. Την ημέρα 0 πραγματοποιούνταν υπερηχογραφικός έλεγχος πριν την πρώτη έγχυση αντιγόνου. Την 10η μέρα από την ευαισθητοποίηση με χοίρεια καρδιακή μυοσίνη οι επίμυες, μετά από υπερηχογραφικό έλεγχο, υποβάλλονταν σε χειρουργική επέμβαση με θωρακοτομή και αποκάλυψη της καρδιάς και πραγματοποιούνταν ενδοστεφανιαία έγχυση μέσω ενδοκοιλοτικής έγχυσης στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο παροδικό αποκλεισμό της ανιούσας αορτής, 0,2ml PBS (ομάδα ελέγχου) ή 5x10⁵ CPCs (ομάδα παρέμβασης). Την 28η μέρα γίνονταν η ευθανασία των επίμυων όπου μετά την υπερηχογραφική μελέτη αφαιρούνταν η καρδιά από την έκφυση των αγγείων και στην συνέχεια πραγματοποιούνταν ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη.

3.7.4 Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση των διαφόρων ποσοτικών, συνεχών, παραμέτρων, μεταξύ των πειραματικών ομάδων έγινε με τη δοκιμασία t-test (independent samples t test) για την εκτίμηση της στατιστικής σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των μέσων τιμών των παραμέτρων των δυο ομάδων. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ήταν το $p < 0,05$. Τα αποτελέσματα θα παρουσιαστούν ως μέση τιμή και σταθερή απόκλιση. Στην διαγραμματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα ως διάμεσος και ενδοτεταρτημοριακό εύρος. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις στατιστικές δοκιμασίες ήταν το IBM SPSS statistics, version 24.

Αντικείμενο αξιολόγησης αποτέλεσαν το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας και οι όγκοι της αριστερής κοιλίας, τελosuστολικός και τελoδιαστολικός, από την υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη, ο βαθμός της φλεγμονώδους διήθησης και ίνωσης στα ιστολογικά παρασκευάσματα και ο αριθμός των T λεμφοκυττάρων από την ανοσοϊστοχημική μελέτη.

4. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΠΡΟΚΛΗΣΗΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΑΥΤΟΑΝΟΣΗΣ ΜΥΟΚΑΡΔΙΤΙΔΑΣ

Για να επιβεβαιώσουμε υπερηχογραφικά και ιστοπαθολογικά την πρόκληση της μυοκαρδίτιδας στους επίμυες χρειάστηκε μια εκτενής προσπάθεια εδραίωσης του κατάλληλου πειραματικού πρωτοκόλλου. Στην διαδικασία αυτή δοκιμάστηκαν διαφορετικά πρωτόκολλα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, αλλά και συνδυασμός επιλεγμένων παραμέτρων εξ αυτών ^{261,269,274,281,282,330,377}.

Συνολικά, όπως παρουσιάζεται στον πίνακα 2, δοκιμάστηκαν 7 διαφορετικά πρωτόκολλα σε συνολικά 45 πειραματόζωα και αριθμούνται και παρουσιάζονται με χρονική σειρά. Με το έβδομο πρωτόκολλο που δοκιμάστηκε (πρωτόκολλο 7 του πίνακα 2) επιτεύχθηκε η πρόκληση, υπερηχογραφικά και ιστοπαθολογικά επιβεβαιωμένης, μυοκαρδίτιδας και αποτελεί το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τους σκοπούς της παρούσας πειραματικής μελέτης και περιγράφηκε αναλυτικά ανωτέρω. Υποβλήθηκαν σε αυτό το πρωτόκολλο 26 πειραματόζωα αλλά 14 επίμυες ολοκλήρωσαν τις 28 μέρες του πρωτοκόλλου και τελικά αποτέλεσαν τον πληθυσμό της παρούσας πειραματικής μελέτης.

Πίνακας 2. Πρωτόκολλα πρόκλησης πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας που αξιολογήθηκαν στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής.					
A/A Πρωτοκόλλου	Πλήθος πειραματόζωων	Mg μυοσίνης 0 ημέρα	Mg μυοσίνης 7 ^η ημέρα	Τοξίνη <i>Bordetella</i> <i>pertussis</i> 0 ^η ημέρα	Τοξίνη <i>Bordetella</i> <i>pertussis</i> 3 ^η ημέρα
#1	1	1,96	3,92	ναι	όχι
#2	1	2,35	2,35	ναι	όχι
#3	6	2,94	2,94	ναι	όχι
#4	2	2,94	3,92	ναι	όχι
#5	4	1,18	-	ναι	ναι

#6	5	1,03	-	όχι	όχι
#7	26	1,03	1,03	όχι	όχι

Πιο συγκεκριμένα, στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται 7 διαφορετικά πρωτόκολλα με την σειρά που δοκιμάστηκαν, αναφέροντας τις δόσεις και την ποσότητα της χοίρειας μυοσίνης καθώς και τις δόσεις της τοξίνης του κοκκύτη (*Bordetella pertussis*). Στα τέσσερα πρώτα πρωτόκολλα έγινε προσπάθεια πρόκλησης της μυοκαρδίτιδας με διαφορετικές συγκεντρώσεις μυοσίνης στο διάλυμα χοίρειας μυοσίνης (Myosin, Calcium activated from porcine heart, 9,8 mg/ml διαλύματος γλυκερόλης 50%, Sigma-Aldrich) και ίσου όγκου ανοσοενισχυτικού Complete Freund's Adjuvant (1mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra), Sigma-Aldrich) που χορηγούνταν υποδόρια στα δυο πίσω πέλματα των επίμυων την 0 και 7η μέρα. Η ενδοπεριτοναϊκή χορήγηση 100μl διαλύματος τοξίνης του κοκκύτη (*Bordetella pertussis*, 500ng) την ημέρα 0 του πρωτοκόλλου παρέμεινε σταθερή και στα 10 πειραματόζωα που υποβλήθηκαν στα 4 πρώτα πρωτόκολλα.

Στο πρώτο πρωτόκολλο που δοκιμάστηκε έγινε χορήγηση 1,96mg μυοσίνης την ημέρα 0 και αύξηση της δόσης σε 3,92mg μυοσίνης την 7η μέρα. Το πειραματόζωο παρουσίασε ιστολογική εικόνα μυοκαρδίτιδας χωρίς όμως απεικονιστική ένδειξη επιβάρυνσης της καρδιακής λειτουργίας. Στην συνέχεια στο δεύτερο και στο τρίτο πρωτόκολλο αυξήθηκαν οι δόσεις την ημέρα 0 από 1,96mg του πρώτου πρωτοκόλλου σε 2,35mg μυοσίνης στο δεύτερο πρωτόκολλο και 2,94mg στο τρίτο και οι δόσεις επαναλήφθηκαν την 7η μέρα, καθώς επιθυμούσαμε την πρόκληση και υπερηχογραφικά επιβεβαιωμένης μυοκαρδίτιδας. Όμως στις ιστολογικές εικόνες του μυοκαρδίου των πειραματόζωων φάνηκαν μόνο ήπιες υπενδοκάρδιες φλεγμονώδης εστίες. Για το λόγο αυτό στο τέταρτο πρωτόκολλο έγινε αύξηση της δόσης της μυοσίνης την 7η μέρα, καθώς ιστολογικά είχε επιτευχθεί μυοκαρδίτιδα με το πρώτο πρωτόκολλο που υπήρξε αύξηση της δόσης την 7η μέρα, με την υπόθεση ότι με συνολικά μεγαλύτερες δόσεις θα επιτύχουμε ιστολογικά αλλά και υπερηχογραφικά επιβεβαιωμένη μυοκαρδίτιδα. Παρόλα αυτά και με αυτο το πρωτόκολλο αναδείχθηκαν μόνο ήπιες υπενδοκάρδιες φλεγμονώδης εστίες στις ιστολογικές τομές του μυοκαρδίου των επίμυων.

Καθώς οι αλλαγές στις δόσεις της μυοκαρδίτιδας αποδείχθηκαν μη επαρκείς για την πρόκληση της μυοκαρδίτιδας δοκιμάστηκαν τροποποιήσεις και στην χορήγηση της

τοξίνης του κοκκύτη, στην συγκέντρωση του ανοσοενισχυτικού και της μυοσίνης και στο τρόπο μίξης και ανάδευσης των συστατικών του διαλύματος μυοσίνης. Συγκεκριμένα, στο πέμπτο πρωτόκολλο έγινε προσπάθεια πρόκλησης μυοκαρδίτιδας χορηγώντας 2 δόσεις τοξίνης του κοκκύτη (*Bordetella Pertussis*) σε δυο διαφορετικές μέρες, την 0 και την 3η. Επίσης έγινε αύξηση της συγκέντρωσης του ανοσοενισχυτικού Complete Freund's Adjuvant σε *Mycobacterium tuberculosis* από 1mg/ml σε 11mg/ml. Η συγκέντρωση του *Mycobacterium tuberculosis* στο ανοσοενισχυτικό διατηρήθηκε στην συνέχεια των πειραμάτων στο 11mg/ml Complete Freund's Adjuvant καθώς στην βιβλιογραφία πολλές πειραματικές μελέτες πρόκλησης EAM χρησιμοποιούσαν ανοσοενισχυτικό complete Freud με επιπλέον ποσότητα *Mycobacterium tuberculosis*, με την συγκέντρωση 11mg/ml να είναι η επικρατέστερη^{269,274,281,282,330}. Από τα 4 ζώα του 5ου πρωτοκόλλου ένα μόνο ολοκλήρωσε τις μέρες του πρωτοκόλλου και δεν αξιολογήθηκε καθώς δεν θεωρήθηκε ολοκληρωμένος ο τρόπος μίξης και ανάδευσης του διαλύματος μυοσίνης όπως περιγράφεται παρακάτω.

Βασική παράμετρος στην αδυναμία πρόκλησης EAM θεωρήθηκε ο τρόπος ανάδευσης του μίγματος της μυοσίνης με το ανοσοενισχυτικό ώστε τελικά να έχουμε λευκό παχύρευστο μίγμα αδιάλυτο στο νερό. Αυτό επιβεβαιώνεται με ρίψη μιας σταγόνας του διαλύματος σε δοχείο με νερό όπου αναμένεται η λευκή σταγόνα να μείνει ανέπαφη στην επιφάνεια του νερού^{281,282} (Εικόνα 2). Το αποτέλεσμα αυτό επιτεύχθηκε μετά τα πρώτα 14 πειράματα με τα 5 πρώτα πρωτόκολλα. Συγκεκριμένα για να επιτύχουμε την ομογενοποίηση του μίγματος χρησιμοποιήθηκε η διάταξη που περιγράφηκε αναλυτικά ανωτέρω (Εικόνα 1). Συνοπτικά, 2 γυάλινες σύριγγες συνδέονταν μέσω μιας σύνδεσης τριών κατευθύνσεων (3-way) και στην συνέχεια πραγματοποιούνταν μετακίνηση των εμβόλων για 10 λεπτά, με αποτέλεσμα το μίγμα να μετακινείται μέσα στην διάταξη και με τον τρόπο αυτό να επιτυγχάνεται η παρασκευή ομοιογενούς παχύρευστου αδιάλυτου λευκού μίγματος. Στα 14 πρώτα πειράματα με τα 5 πρωτόκολλα που αναφέρθηκαν έως τώρα το μίγμα μυοσίνης και ανοσοενισχυτικού αναδευόταν μέσα σε δοκιμαστικό σωλήνα (eppendorf) με συσκευή vortex (GVLab GILSON) για 60 sec και στην συνέχεια φυγοκεντρούνταν (Mini Spin plus, eppendorf) με 3000 rpm για 10 min και συλλέγονταν με σύριγγα. Μεταβατικό στάδιο ήταν τα 4 πειράματα του 5ου πρωτόκολλου που έγινε προσπάθεια πιο αποτελεσματικής ανάδευσης με ανεβοκατέβασμα του εμβόλου της γυάλινης σύριγγας

με αποτέλεσμα την μετακίνηση του μίγματος εντός της γυάλινης σύριγγας και πίσω στο erppendorf.

Ύστερα από δοκιμές στην ανάδευση του μίγματος αλλά και βιβλιογραφική ανασκόπηση καταλήξαμε σε λευκό μίγμα μη διαλυτό στο νερό, με ανεβοκατέβασμα του εμβόλου για 10 λεπτά, διαδικασία που έγινε πιο αποτελεσματική και υλοποιήσιμη με την διάταξη των γυάλινων συριγγών και του 3-way.

Βάση των ανωτέρω στο 6ο και 7ο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε ο νέος, αποτελεσματικός τρόπος ανάδευσης. Επιπροσθέτως, γίνεται αραίωση της μυοσίνης (συγκέντρωση μυοσίνης 9,8mg/ml διαλύματος γλυκερόλης) σε PBS (συγκέντρωση μυοσίνης 5,2mg/ml διαλύματος γλυκερόλης και PBS) προτού αναμιχθεί με ίσο όγκο ανοσοεπισχυτικού²⁸¹.

Στο 6ο πρωτόκολλο χορηγήθηκε μόνο μια δόση μυοσίνης κατά την ημέρα 0 και εγκαταλείφτηκε λόγω της μη επίτευξης ιστολογικά αλλά και υπερηχογραφικά επιβεβαιωμένης μυοκαρδίτιδας. Τέλος, το 7ο πρωτόκολλο αποτέλεσε το μόνο αποτελεσματικό τρόπο για την επίτευξη ιστολογικά και υπερηχογραφικά επιβεβαιωμένης μυοκαρδίτιδας.

Ένα πειραματόζωο του 6ου και τέσσερα του 7ου πρωτοκόλλου παρακολουθήθηκαν για 60 μέρες με υπερηχογραφήματα σε τακτά διαστήματα, τις ημέρες 0, 10, 21, 28, 42 και 60 με σκοπό να καταγραφεί η εξέλιξη της μυοκαρδίτιδας. Τελικά επιλέχτηκε η 28η μέρα ως ημέρα ευθανασίας των ζώων και τερματισμού του πρωτοκόλλου, καθώς σύμφωνα με τη βιβλιογραφία γύρω στην τρίτη εβδομάδα μετά την έναρξης της EAM παρατηρείται η κορύφωση της φλεγμονής του μυοκαρδίου^{268,273}. Παράλληλα στους υπέρηχους που πραγματοποιήθηκαν παρατηρήθηκε βελτίωση του κλάσματος εξωθήσεως μετά την 28η μέρα σε κάθε πειραματόζωο.

5.ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

5.1 Ανεπιθύμητα συμβάματα και θνησιμότητα

Για τους σκοπούς της μελέτης έγινε προσπάθεια πρόκλησης πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας στους επίμυες με 7 διαφορετικά πρωτόκολλα, όπως αναλυτικά περιγράφηκε στην ενότητα V. 4. , ώστε να επιτευχθεί τελικά ιστολογικά και υπερηχογραφικά τεκμηριωμένη μυοκαρδίτιδα. Συνολικά έγινε προσπάθεια πρόκλησης μυοκαρδίτιδας σε 45 επίμυες. Με το έβδομο πρωτόκολλο που δοκιμάστηκε επιτεύχθηκε η πρόκληση, υπερηχογραφικά και ιστοπαθολογικά επιβεβαιωμένης, μυοκαρδίτιδας και αποτέλεσε το πρωτόκολλο πρόκλησης ΕΑΜ της παρούσας μελέτης. Σε αυτό υποβλήθηκαν οι 26 από τους 45 επίμυες, αλλά 14 επίμυες ολοκλήρωσαν τις 28 μέρες του πρωτοκόλλου και τελικά αποτέλεσαν τον πληθυσμό της παρούσας πειραματικής μελέτης .

Αναλυτικότερα, το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε 26 επίμυες από τους οποίους οι 13 τυχαιοποιήθηκαν στην ομάδα ελέγχου, 9 στην ομάδα παρέμβασης και έλαβαν ενδοστεφανιαία CPCs και 4 κατέληξαν προτού τυχαιοποιηθούν . Από τους τέσσερις επίμυες που κατέληξαν πριν τυχαιοποιηθούν σε ομάδα κατά την 10η μέρα του πρωτοκόλλου, ένας κατέληξε πριν την ημέρα του χειρουργείου, μια μέρα μετά την 2η δόση διαλύματος μυοσίνης και τρεις κατά τις χειρουργικές παρασκευές πριν την τυχαιοποίηση και την ενδοστεφανιαία έγχυση διαλύματος PBS ή CPCs την 10η μέρα του πρωτοκόλλου λόγω τραυματισμού της αορτής που οδηγούσε σε αιμορραγικό shock. Από τους 22 επίμυες (13 ομάδα ελέγχου και 9 ομάδα παρέμβασης) ολοκλήρωσαν τις μέρες παρακολούθησης του πρωτοκόλλου 14 επίμυες (8 ομάδα ελέγχου και 6 ομάδα παρέμβασης). Η κύρια αιτία θανάτου των επίμυων μετά την ολοκλήρωση της ενδοστεφανιαίας έγχυσης ήταν ο πνευμοθώρακας και κατά δεύτερο λόγο η αιμορραγία που τελικά οδηγούσε σε αιμορραγικό shock, μετά από τραυματισμό της αορτής.

5.2 Περιγραφή πειραμάτων που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο

Πείραμα1ο

Ομάδα ελέγχου

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	81,21	79,98	62,7
LVESV (μL)	20	40	80
LVEDV(μL)	120	200	210

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 242 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος PBS στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη

Ημέρα 60η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου

Πείραμα 2ο**Ομάδα ελέγχου***Υπερηχογραφικές μετρήσεις*

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	78,25	77,00	49,7
LVESV (μL)	30	60	150
LVEDV(μL)	140	280	300

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 236 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος PBS στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη

Ημέρα 60η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου

Πείραμα 3ο

Ομάδα ελέγχου

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
--	---------	-----------	-----------

EF (%)	86,36	85,46	69,88
LVESV (μL)	30	30	80
LVEDV(μL)	180	220	260

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 246 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος PBS στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη

Ημέρα 60η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου

Πείραμα 4ο

Ομάδα ελέγχου

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	87,00	77,93	62,9

LVESV (μL)	30	30	90
LVEDV(μL)	200	150	240

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 230 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος PBS στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη

Ημέρα 60η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου

Πείραμα 5ο

Ομάδα παρέμβασης

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	85,63	84	84,65
LVESV (μL)	20	30	30

LVEDV(μL)	130	180	170
-----------	-----	-----	-----

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	12,7
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	9,5
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	21,38

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 196 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος CPCs στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου
- προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και

ανοσοϊστοχημική επεξεργασία

Πείραμα 6ο

Ομάδα παρέμβασης*Υπερηχογραφικές μετρήσεις*

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	80	75,81	79
LVESV (μL)	40	30	40
LVEDV(μL)	180	110	180

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	17,2
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	83
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	27,16

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 167 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος CPCs στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

-διασωλήνωση
 -υπερηχογραφική μελέτη
 -ευθανασία πειραματόζωου
 -προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική επεξεργασία

Πείραμα 7ο

Ομάδα παρέμβασης

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	82,2	78,75	82,58
LVESV (μL)	30	60	30
LVEDV(μL)	180	300	190

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	0,4
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	13
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	4

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 210 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

-διασωλήνωση
 -υπερηχογραφική μελέτη
 -έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

-διασωλήνωση
 -έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος CPCs στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο αποκλεισμό της ανιούσας αορτής
- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου
- προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική επεξεργασία

Πείραμα 8ο

Ομάδα παρέμβασης

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	83,21	80,47	81
LVESV (μL)	30	30	40
LVEDV(μL)	150	160	200

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	3,8
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	13
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	6,59

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 160 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος CPCs στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου
- προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και

ανοσοϊστοχημική επεξεργασία

Πείραμα 9ο

Ομάδα ελέγχου

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	87,18	78,52	72,04
LVESV (μL)	30	60	100
LVEDV(μL)	220	300	360

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
-------	-----------------------	------------

Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	18,3
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	83
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	36,58

Πειραματόζωο θήλυ σωματικού βάρους 148 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος PBS στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου
- προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και

ανοσοϊστοχημική επεξεργασία

Πείραμα 10ο

Ομάδα ελέγχου

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	78	82	74,82
LVESV (μL)	70	30	100
LVEDV(μL)	300	190	380

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	22,6
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	85
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	38,93

Πειραματόζωο άρρεν σωματικού βάρους 244 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος PBS στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου

-προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική επεξεργασία.

Πείραμα 11ο

Ομάδα παρέμβασης

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	77,18	75	78
LVESV (μL)	70	80	70
LVEDV(μL)	300	310	310

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	8,9
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	46
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	34,11

Πειραματόζωο άρρεν σωματικού βάρους 270 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές

-έγχυση διαλύματος CPCs στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

-συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

-διασωλήνωση

-υπερηχογραφική μελέτη

-ευθανασία πειραματόζωου

-προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική επεξεργασία

Πείραμα 12ο

Ομάδα ελέγχου

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	78,71	73,74	68,42
LVESV (μL)	60	60	80
LVEDV(μL)	280	220	240

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	17,2
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	180
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	35,48

Πειραματόζωο άρρεν σωματικού βάρους 232 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

-διασωλήνωση

-υπερηχογραφική μελέτη

-έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

-διασωλήνωση

-έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

-διασωλήνωση

-υπερηχογραφική μελέτη

-Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές

-έγχυση διαλύματος PBS στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

-συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

-διασωλήνωση

-υπερηχογραφική μελέτη

-ευθανασία πειραματόζωου

-προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική επεξεργασία.

Πείραμα 13ο

Ομάδα ελέγχου

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	86,86	72,96	62,51
LVESV (μL)	40	50	120
LVEDV(μL)	290	200	310

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	24,6
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	155

Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	41,34
-----------------	---	-------

Πειραματόζωο άρρεν σωματικού βάρους 258 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος PBS στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου
- προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και ανοσοϊστοχημική επεξεργασία.

Πείραμα 14ο

Ομάδα παρέμβασης

Υπερηχογραφικές μετρήσεις

	Ημέρα 0	Ημέρα 10η	Ημέρα 28η
EF (%)	82,43	76,01	83,92
LVESV (μL)	50	50	50
LVEDV(μL)	260	220	300

Αποτελέσματα ιστολογικής και ανοσοϊστοχημικής μελέτης

Χρώση	Υπό μελέτη παράμετρος	Αποτέλεσμα
Αιματοξυλίνης ηωσίνης	Ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	1,4
Ανοσοϊστοχημική χρώση	Αριθμός T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο	18
Τρίχρωμη masson	Ποσοστό ίνωσης ανά επιφάνεια ιστολογικής τομής του μυοκαρδίου	6,55

Πειραματόζωο άρρεν σωματικού βάρους 282 gr.

Ημέρα 0: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα.

Ημέρα 7η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- έγχυση διαλύματος μυοσίνης στα δυο πίσω πέλματα του επίμυα

Ημέρα 10η:-αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- Θωρακοτομή, χειρουργικές παρασκευές
- έγχυση διαλύματος CPCs στην αριστερή κοιλία με ταυτόχρονο

αποκλεισμό της ανιούσας αορτής

- συρραφή θωρακικού τοιχώματος

Ημέρα 28η: -αναισθησία

- διασωλήνωση
- υπερηχογραφική μελέτη
- ευθανασία πειραματόζωου
- προετοιμασία καρδιάς πειραματόζωου για ιστολογική και
ανοσοϊστοχημική επεξεργασία

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση των αυτόλογων CPCs στην φλεγμονώδη απάντηση και την λειτουργικότητα της καρδιάς σε επίμυες με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα. Προς την κατεύθυνση αυτή, η πειραματική στρατηγική μας περιλάμβανε την βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου πρόκλησης της πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας επαγόμενης από χοίρεια μυοσίνη όπως περιγράφηκε στην ενότητα Υλικά και Μέθοδοι, και στην συνέχεια την εφαρμογή του για την προκλινική μελέτη της επίδρασης των αυτόλογων CPCs ως θεραπευτικό μέσο της ΕΑΜ σε επίμυες. Το βελτιστοποιημένο πρωτόκολλο εφαρμόστηκε σε 26 επίμυες από τους οποίους οι 14 ολοκλήρωσαν τις 28 μέρες του πρωτοκόλλου και τελικά αποτέλεσαν τον πληθυσμό της πειραματικής μελέτης της επίδρασης των CPCs στην μυοκαρδίτιδα.

Όλοι οι επίμυες της μελέτης υποβλήθηκαν σε διαθωρακική υπερηχογραφική μελέτη την ημέρα 0, 10 και 28 για την αξιολόγηση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας υπολογίζοντας το κλάσμα εξώθησης και το τελοσυστολικό και τελοδιαστολικό όγκο της αριστερής κοιλίας της καρδιάς των επίμυων. Οι υπερηχογραφικοί αυτοί παράμετροι συγκρίθηκαν μεταξύ των ομάδων ανάλογα με την ημέρα λήψης. Οι καρδιές από δέκα επίμυες υπέστησαν ιστολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη με σκοπό την μελέτη του ποσοστού της φλεγμονώδους διήθησης, της διήθησης από Τ λεμφοκύτταρα και του ποσοστού της ίνωσης του μυοκαρδίου. Τα αποτελέσματα κάθε σκέλους της μελέτης, παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια.

6.1 Διαθωρακική υπερηχογραφική μελέτη

Διαθωρακικό υπερηχογράφημα πραγματοποιούνταν την ημέρα 0 πριν την έγχυση του διαλύματος χοίρειας μυοσίνης για την πρόκληση αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας, την 10^η ημέρα πριν την έναρξη της χειρουργικής επέμβασης και την 28^η μέρα μετά την αναισθησία και την διασωλήνωση των επίμυων, με τα πειραματόζωα υπό γενική αναισθησία. Κατά τη διάρκεια της υπερηχογραφικής μελέτης η καρδιακή συχνότητα των επίμυων και η θερμοκρασία σώματος ήταν υπό παρακολούθηση. Η διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας σώματος 37°C των επίμυων γίνονταν με την τοποθέτηση τους επί θερμαινόμενης πλάκας που ρυθμίζονταν βάση συνεχής πρωκτικής θερμομέτρησης. Με το διαθωρακικό μηχάνημα των υπερήχων Vivid Q και τον ηχοβολέα 10MHz (GE

Medical Systems, Horten, Norway, 10S-RS probe collector) οι καρδιές απεικονίστηκαν δισδιάστατα κατά τον επιμήκη άξονα της καρδιάς, στο επίπεδο της μεγαλύτερης διαμέτρου της αριστερής κοιλίας και πάρθηκαν εικόνες και βίντεο. Στην συνέχεια τα βίντεο μελετήθηκαν στον ηλεκτρονικό υπολογιστή με το λογισμικό ECHOpac (Visual Sonics V1.3.8) όπου έγινε ο υπολογισμός του κλάσματος εξώθησεως της αριστερής κοιλίας (LVEF) καθώς και του τελοσυστολικού (LVESV) και τελοδιαστολικού (LVEDV) όγκου αριστερής κοιλίας.

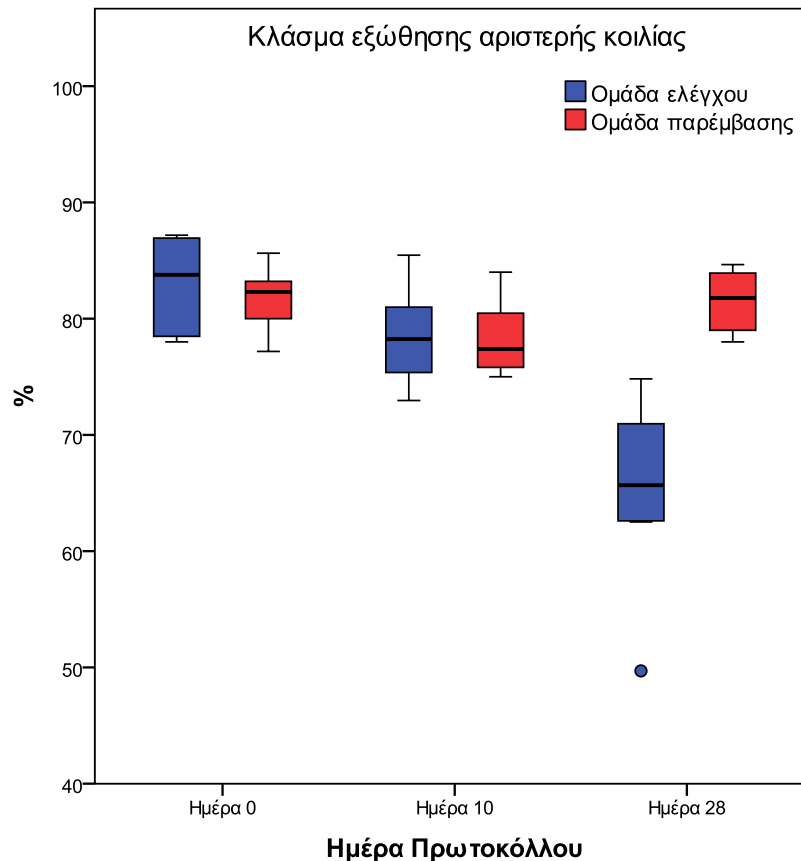
Στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 3) παρουσιάζονται αναλυτικά οι υπολογισθείσες τιμές του κλάσματος εξώθησεως αριστερής κοιλίας (LVEF). Σε κάθε ένα από τα 14 πειραματόζωα της μελέτης αντιστοιχούν τρεις τιμές LVEF για την 0, 10η και 28η μέρα του πρωτοκόλλου. Δίπλα από τον αύξοντα αριθμό του πειραματόζωου αναφέρεται η ομάδα στην οποία έχει τυχαιοποιηθεί κάθε πειραματόζωο. Συγκεκριμένα στην ομάδα ελέγχου περιλαμβάνονται οι επίμυες οι οποίοι την 10η μέρα του πρωτοκόλλου έλαβαν διάλυμα PBS ενώ στην ομάδα παρέμβασης οι επίμυες που έλαβαν καρδιακά προγονικά κύτταρα.

Πίνακας 3. Κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας (LVEF) (%) επίμυων ανά ημέρα.				
Α/α επίμυων	Ομάδα τυχαιοποίησης	Ημέρα		
		0	10	28
1	ομάδα ελέγχου	81,21	79,98	62,7
2	ομάδα ελέγχου	78,25	77,00	49,7
3	ομάδα ελέγχου	86,36	85,46	69,88
4	ομάδα ελέγχου	87,00	77,93	62,9
5	ομάδα παρέμβασης	85,63	84	84,65
6	ομάδα παρέμβασης	80,00	75,81	79,00
7	ομάδα παρέμβασης	82,2	78,75	82,58
8	ομάδα παρέμβασης	83,21	80,47	81,00
9	ομάδα ελέγχου	87,18	78,52	72,04
10	ομάδα ελέγχου	78,00	82,00	74,82
11	ομάδα παρέμβασης	77,18	75,00	78,00
12	ομάδα ελέγχου	78,71	73,74	68,42
13	ομάδα ελέγχου	86,86	72,96	62,51
14	ομάδα παρέμβασης	82,43	76,01	83,92

Πραγματοποιήθηκε στατιστική ανάλυση independent samples t-test του λογισμικού SPSS statistics 24 ώστε να συγκριθεί το κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας μεταξύ των δύο ομάδων τυχαιοποίησης. Όπως φαίνεται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα 4, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας κατά την υπερηχογραφική μελέτη των

ημερών 0 και 10, δεν διαφέρει στατιστικά σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων τυχαιοποίησης, ομάδα παρέμβασης και ελέγχου (0 ημέρα: $81,8 \pm 2,9$ vs $82,9 \pm 4,3$, $p=0,55$, 10η μέρα: $78,3 \pm 3,5$ vs $78,4 \pm 4,1$, $p=0,96$ στην ομάδα παρέμβασης και ελέγχου αντίστοιχα). Αντίθετα, την 28η μέρα του πρωτοκόλλου, 18 μέρες μετά την 10η μέρα που πραγματοποιούνταν η παρέμβαση με την χορήγηση διαλύματος PBS ή κυττάρων, το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας των επίμυων που έλαβαν κύτταρα είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο από το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας των επίμυων της ομάδας ελέγχου (ομάδα παρέμβασης $81,5 \pm 2,7$ vs ομάδα ελέγχου $65,4 \pm 7,8$, $p<0,001$). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται με θηκογράμματα στην εικόνα 7.

Πίνακας 4. Στατιστική ανάλυση (t test) κλάσματος εξώθησης αριστερής κοιλίας(%)				
Ημέρα πρωτοκόλλου	Ομάδα τυχαιοποίησης	Μέση τιμή	Σταθερά απόκλιση	Στατιστική σημαντικότητα p value
0 μέρα	Ομάδα Ελέγχου	82,9	4,3	0,55
	Ομάδα παρέμβασης	81,8	2,9	
10η μέρα	Ομάδα Ελέγχου	78,4	4,1	0,96
	Ομάδα παρέμβασης	78,3	3,5	
28η μέρα	Ομάδα Ελέγχου	65,4	7,8	<0,001
	Ομάδα παρέμβασης	81,5	2,7	



Εικόνα 7. Θηκόγραμμα (Box plot) κλάσματος εξωθήσεως αριστερής κοιλίας ανά ημέρα του πρωτοκόλλου. Η οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε παραλληλόγραμμο απεικονίζει την διάμεσο, το μήκος κάθε κουτιού το ενδοτεταρτημοριακό εύρος και τα άκρα των εξωτερικών γραμμών απεικονίζουν τις ακραίες τιμές, ελάχιστες και μέγιστες του κλάσματος εξωθήσεως ανά ομάδα και ημέρα. Με κουκίδα απεικονίζεται ακραία τιμή που απέχει από το πέρας του ενδοτεταρτημοριακού εύρους περισσότερο από το 1,5 επί το ενδοτεταρτημοριακό εύρος. $n = 8-6$ / ομάδα

Κατά τον ίδιο τρόπο με τον πίνακα 3, στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι υπολογισθείσες τιμές των τελοσυστολικών (LVESV) και τελοδιαστολικών (LVEDV) όγκων αριστερής κοιλίας και σε κάθε ένα από τα 14 πειραματόζωα της μελέτης, αντιστοιχούν τρεις τιμές LVESV και τρεις τιμές LVEDV για την 0, 10η και 28η μέρα του πρωτοκόλλου.

Πίνακας 5. Τελοσυστολικοί(LVESV) και τελοδιαστολικοί(LVEDV) όγκοι αριστερής κοιλίας (μL) επίμυων ανά ημέρα.

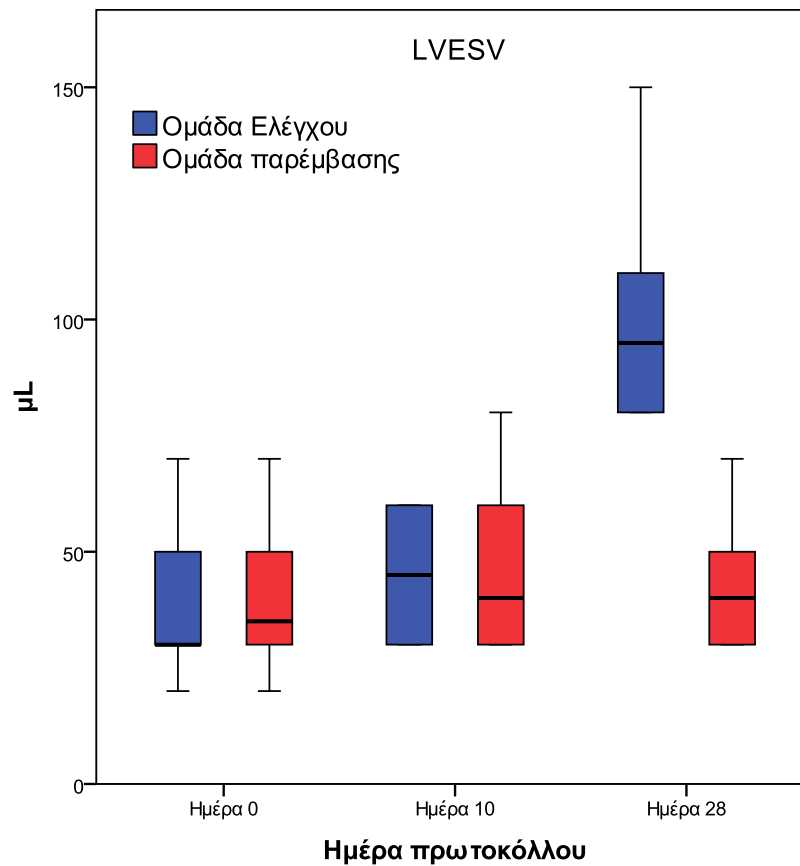
Α/α επίμυων	Ομάδα τυχαιοποίησης	Ημέρα					
		0		10		28	
		LVESV	LVEDV	LVESV	LVEDV	LVESV	LVEDV
1	ομάδα ελέγχου	20	120	40	200	80	210
2	ομάδα ελέγχου	30	140	60	280	150	300
3	ομάδα ελέγχου	30	180	30	220	80	260
4	ομάδα ελέγχου	30	200	30	150	90	240
5	ομάδα παρέμβασης	20	130	30	180	30	170
6	ομάδα παρέμβασης	40	180	30	110	40	180
7	ομάδα παρέμβασης	30	180	60	300	30	190
8	ομάδα παρέμβασης	30	150	30	160	40	200
9	ομάδα ελέγχου	30	220	60	300	100	360
10	ομάδα ελέγχου	70	300	30	190	100	380
11	ομάδα παρέμβασης	70	300	80	310	70	310
12	ομάδα ελέγχου	60	280	60	220	80	240
13	ομάδα ελέγχου	40	290	50	200	120	310
14	ομάδα παρέμβασης	50	260	50	220	50	300

Για την σύγκριση των όγκων LVESV και LVEDV της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των επίμυων που έλαβαν κυτταρική θεραπεία χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία independent samples t test και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (πίνακας 6 και 7) και με γράφημα (θηκόγραμμα) στις εικόνες 8 και 9. Όπως και το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας, έτσι και οι όγκοι των δυο ομάδων, ελέγχου και παρέμβασης, τις ημέρες 0 και 10 του πρωτοκόλλου παρέμειναν σε συγκρίσιμα επίπεδα, χωρίς να παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά στις δυο ομάδες τυχαιοποίησης(0 ημέρα LVESV: $40 \pm 17,9$ μl vs $38,8 \pm 17,3$ μl, $p=0.90$, LVEDV: 200 ± 66 μl vs $216,3 \pm 68,9$ μl, $p=0.67$, 10η μέρα LVESV: $46,7 \pm 20,7$ μl vs $45 \pm 14,1$ μl, $p=0.86$ LVEDV: $213,3 \pm 79,4$ μl vs $220 \pm 48,7$ μl, $p=0.85$, στην ομάδα παρέμβασης και ελέγχου αντίστοιχα). Ο LVESV, 18 μέρες μετά την έγχυση των προγονικών κυττάρων ή του PBS(28η μέρα πρωτοκόλλου), είναι στατιστικά σημαντικά μικρότερος στην ομάδα που έλαβε κύτταρα σε σχέση με τον όγκο στην ομάδα ελέγχου ($43,3 \pm 15,1$ μl vs $100 \pm 24,5$ μl, $p<0.001$). Τέλος ο LVEDV ,την 28η μέρα του πρωτοκόλλου, είναι μικρότερος στην ομάδα παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα

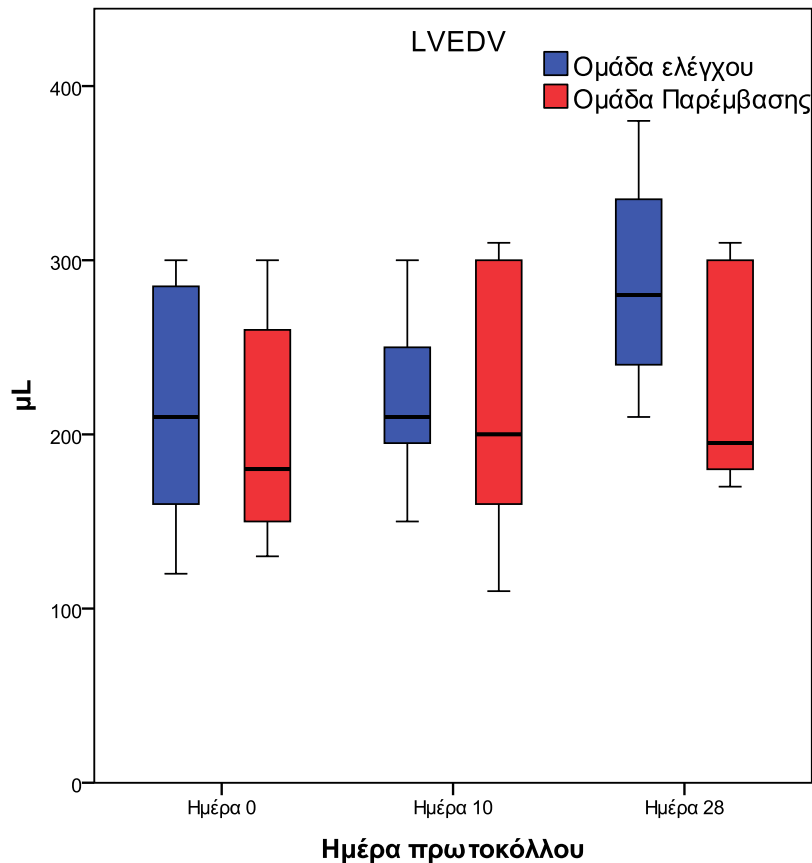
ελέγχου χωρίς όμως να έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($225 \pm 62,8 \mu\text{l}$ vs $287,5 \pm 60,7 \mu\text{l}$, $p=0.085$).

Πίνακας 6. Στατιστική ανάλυση (t test) τελουστολικού όγκου αριστερής κοιλίας(μL)				
Ημέρα πρωτοκόλλου	Ομάδα τυχαιοποίησης	Μέση τιμή	Σταθερά απόκλιση	Στατιστική σημαντικότητα p value
0 ημέρα	ομάδα ελέγχου	38,8	17,3	0,90
	ομάδα παρέμβασης	40	17,9	
10η ημέρα	ομάδα ελέγχου	45	14,1	0,86
	ομάδα παρέμβασης	46,7	20,7	
28η ημέρα	ομάδα ελέγχου	100	24,5	<0,001
	ομάδα παρέμβασης	43,3	15,1	

Πίνακας 7. Στατιστική ανάλυση (t test) τελοδοιαστολικού όγκου αριστερής κοιλίας(μL)				
Ημέρα πρωτοκόλλου	Ομάδα τυχαιοποίησης	Μέση τιμή	Σταθερά απόκλιση	Στατιστική σημαντικότητα p value
0 ημέρα	ομάδα ελέγχου	216,3	68,9	0,67
	ομάδα παρέμβασης	200	66	
10η ημέρα	ομάδα ελέγχου	220	48,7	0,85
	ομάδα παρέμβασης	213,3	79,4	
28η ημέρα	ομάδα ελέγχου	287,5	60,7	0,085
	ομάδα παρέμβασης	225	62,8	

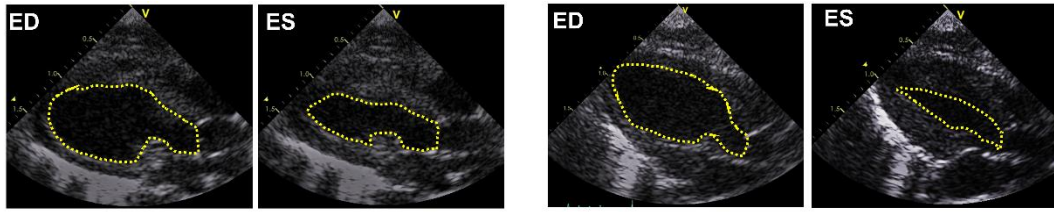


Εικόνα 8. Θηκόγραμμα (Box plot) τελοσυστολικού όγκου αριστερής κοιλίας(LVESV) ανά ημέρα του πρωτοκόλλου. Η οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε παραλληλόγραμμο απεικονίζει την διάμεσο, το μήκος κάθε κουτιού το ενδοτεταρτημοριακό εύρος και τα άκρα των εξωτερικών γραμμών απεικονίζουν τις ακραίες τιμές, ελάχιστες και μέγιστες που έλαβε η παράμετρος ανά ομάδα και ημέρα. $n = 8-6$ / ομάδα



Εικόνα 9. Θηκόγραμμα (Box plot) τελοδιαστολικού όγκου αριστερής κοιλίας(LVEDV) ανά ημέρα του πρωτοκόλλου. Η οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε παραλληλόγραμμο απεικονίζει την διάμεσο, το μήκος κάθε κουτιού το ενδοτεταρτημοριακό εύρος και τα άκρα των εξωτερικών γραμμών απεικονίζουν τις ακραίες τιμές, ελάχιστες και μέγιστες που έλαβε η παράμετρος ανά ομάδα και ημέρα. $n = 8-6$ / ομάδα

Συμπερασματικά οι επίμνες που έλαβαν ενδοστεφανιαία έγχυση CPCs διατήρησαν το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας σε στατιστικά σημαντικό βαθμό και είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο LVESV σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Ο LVEDV παρουσίασε τάση μείωσης στην ομάδα παρέμβασης χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Η διαφορές των υπερηχογραφικών παραμέτρων μεταξύ των ομάδων είναι εμφανής συγκρίνοντας τις υπερηχογραφικές εικόνες όπως φαίνεται στην εικόνα 10.



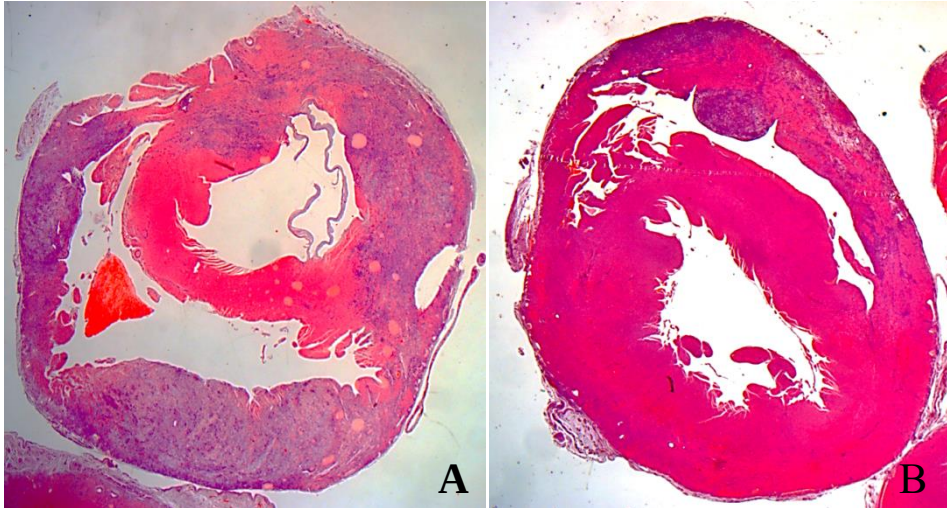
Ομάδα Ελέγχου(28η μέρα)

Ομάδα Παρέμβασης(28η μέρα)

Εικόνα 10. Υπερηχογραφική απεικόνιση μυοκαρδιακής λειτουργίας. Παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικές υπερηχογραφικές εικόνες στην τελοδιαστολή (ED) και στην τελοσυστολή (ES) που ελήφθησαν την 28η μέρα του πρωτοκόλλου από επίμυα της ομάδας ελέγχου και επίμυα που έλαβε CPCs. Αξιοσημείωτος είναι ο σημαντικά αυξημένος τελοσυστολικός όγκος του επίμυα της ομάδας ελέγχου.

6.2 Φλεγμονώδης διήθηση

Μετά την ευθανασία, όπως περιγράφηκε ανωτέρω, οι καρδιές από δέκα πειραματόζωα και από τις δύο ομάδες, ελέγχου και παρέμβασης, αφαιρέθηκαν από την έκφυση των μεγάλων αγγείων την 28η μέρα του πρωτοκόλλου και υπέστησαν ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική επεξεργασία. Οι καρδιές μονιμοποιήθηκαν σε φορμόλη 4% και αφού στερεοποιήθηκαν με παραφίνη, πάρθηκαν τομές κατά τον εγκάρσιο άξονα, με μικροτόμο. Στη συνέχεια, τέσσερις με έξι τομές από την καρδιά κάθε πειραματόζωου χρωματίστηκαν με χρώση αιματοξυλίνης και ηωσίνης με σκοπό να αναδειχθούν οι περιοχές στις οποίες υπήρχε διήθηση από φλεγμονώδη κύτταρα (εικόνα 11). Συγκεκριμένα, η αιματοξυλίνη είναι βασεόφιλη και αντιδρά με τα βασεόφιλα συστατικά του ιστού και έτσι βάφει τον πυρήνα των κυττάρων μωβ, ενώ η ηωσίνη οξεόφιλη, και άρα αντιδρά με τα οξεόφιλα συστατικά των ιστών και βάφει το κυτταρόπλασμα ροζ. Τα ώριμα λεμφοκύτταρα έχουν πολύ λίγο κυτταρόπλασμα και επομένως είναι βασεόφιλα και βάφονται μωβ, ενώ τα μυοκαρδιοκύτταρα έχουν άφθονο κυτταρόπλασμα και επομένως είναι οξεόφιλα και βάφονται ροζ.



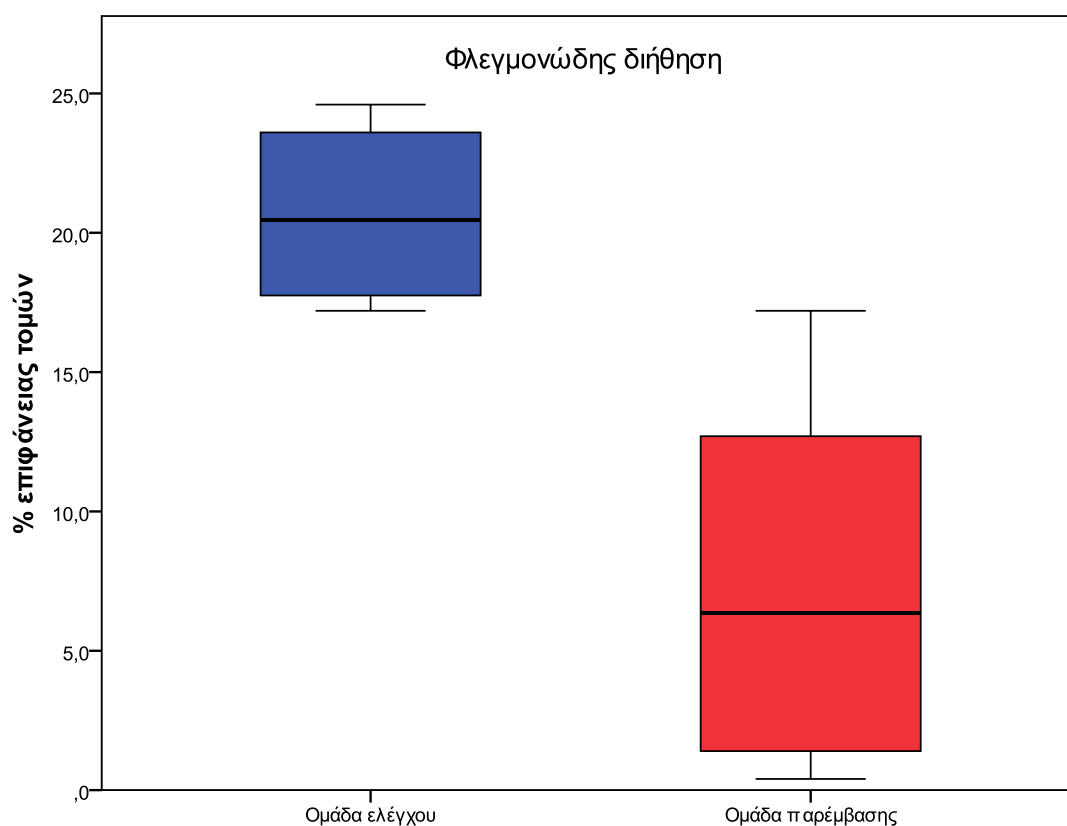
Εικόνα 11. Χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης. Απεικονίζονται τομές κατά των εγκάρσιο άξονα της καρδιάς, δύο επίμυων μετά την ευθανασία τους την 28η μέρα του πρωτοκόλλου, βαμμένες με χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης. Είναι ευδιάκριτες και οι δύο κοιλίες της καρδιάς, δεξιά και αριστερή. Τα μυοκαρδιοκύτταρα βάφονται σε απόχρωση του ροζ ενώ τα φλεγμονώδη κύτταρα μοβ. Εικόνα 11Α Ιστολογική τομή από καρδιά πειραματόζωου της ομάδας ελέγχου. Εικόνα 11Β Ιστολογική τομή από καρδιά πειραματόζωου που έλαβε καρδιακά προγονικά κύτταρα(ομάδα παρέμβασης). Η φλεγμονώδης διήθηση είναι σημαντικά μικρότερη στην ομάδα παρέμβασης (11Β), συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (11Α).

Οι ιστολογικές τομές κάθε πειραματόζωου φωτογραφήθηκαν (LEICA DFC500-colour) με την βοήθεια στερεοσκοπίου (Nikon SMZ800, φακός PlanApo 1xWD70 Nikon), και στην συνέχεια αναλύθηκαν με το πρόγραμμα ImageJ, προκειμένου να προσδιορισθεί το ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης επί την συνολική επιφάνεια των τομών. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (πίνακας 8), όπου αναγράφεται ο αύξων αριθμός των πειραματόζωων και η ομάδα στην οποία τυχαιοποιήθηκε κάθε ένα (ομάδα ελέγχου ή παρέμβασης). Σε κάθε πειραματόζωο αντιστοιχεί μια τιμή που αντιπροσωπεύει το ποσοστό της συνολικής επιφάνειας των ιστολογικών τομών των καρδιών, με φλεγμονώδη διήθηση όπως προέκυψε από τον μέσο όρο του ποσοστού της επιφάνειας των τομών με φλεγμονώδη διήθηση από τις τομές κάθε πειραματόζωου.

Πίνακας 8. Ποσοστό(%) της επιφάνειας των τομών με φλεγμονώδη διήθηση		
Α/α επίμυων	Ομάδα τυχαιοποίησης	Ποσοστό επιφάνειας φλεγμονώδους διήθησης
5	ομάδα παρέμβασης	12,7
6	ομάδα παρέμβασης	17,2
7	ομάδα παρέμβασης	0,4
8	ομάδα παρέμβασης	3,8
9	ομάδα ελέγχου	18,3
10	ομάδα ελέγχου	22,6
11	ομάδα παρέμβασης	8,9
12	ομάδα ελέγχου	17,2
13	ομάδα ελέγχου	24,6
14	ομάδα παρέμβασης	1,4

Με την βοήθεια του SPSS statistics 24 πραγματοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία t test (independent samples t test) με το οποίο έγινε σύγκριση της μέσης τιμής του ποσοστού της φλεγμονώδους διήθησης στην επιφάνεια των μυοκαρδιακών τομών μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των επίμυων που έλαβαν κυτταρική θεραπεία. Η φλεγμονώδης διήθηση στην ομάδα ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτήν της ομάδας παρέμβασης (ομάδα παρέμβασης $7,4 \pm 6,7\%$ vs ομάδα ελέγχου $20,7 \pm 3,5\%$, $p=0,007$). Τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας παρουσιάζονται στον πίνακα 9 και με το γράφημα της εικόνας 12.

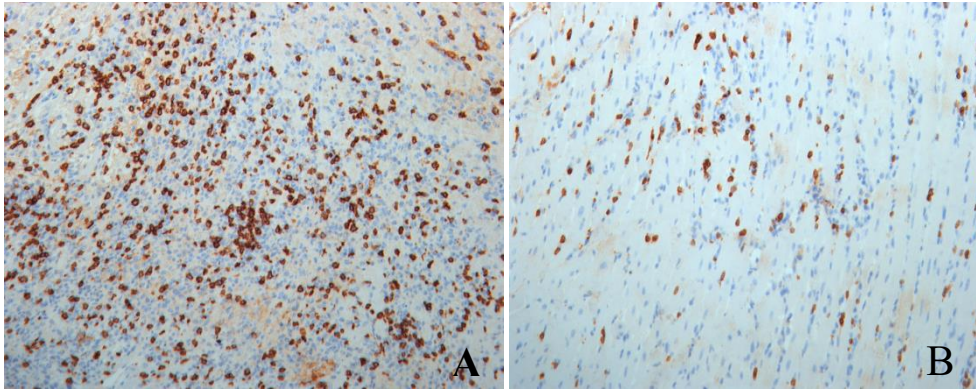
Πίνακας 9. Στατιστική ανάλυση (t test) ποσοστού φλεγμονώδους διήθησης			
Ομάδα τυχαιοποίησης	Μέση τιμή	Σταθερά απόκλιση	Στατιστική σημαντικότητα p value
ομάδα ελέγχου	20,7	3,5	0,007
ομάδα παρέμβασης	7,4	6,7	



Εικόνα 12. Θηκόγραμμα (Box plot) ποσοστού φλεγμονώδους διήθησης. Η οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε παραλληλόγραμμο απεικονίζει την διάμεσο, το μήκος κάθε κουτιού είναι η περιοχή μεταξύ 1ο και 3ο τεταρτημορίου(ενδοτεταρτημοριακό εύρος) και τα άκρα των εξωτερικών γραμμών απεικονίζουν το μέγιστο και το ελάχιστο ποσοστό φλεγμονώδους διήθησης ανά ομάδα τυχαιοποίησης. $n = 4-6$ / ομάδα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημική ανάλυση με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι του cluster of differentiation 3 (CD3) για την εκτίμηση της διήθησης

του μυοκαρδίου από T λεμφοκύτταρα(εικόνα 13). Ο αντιγονικός δείκτης επιφανείας CD3 είναι χαρακτηριστικός για τα T λεμφοκύτταρα. Έτσι με ανοσοϊστοχημεία CD3 έγινε ο εντοπισμός και η καταμέτρηση των T λεμφοκυττάρων στις ιστολογικές τομές των καρδιών.



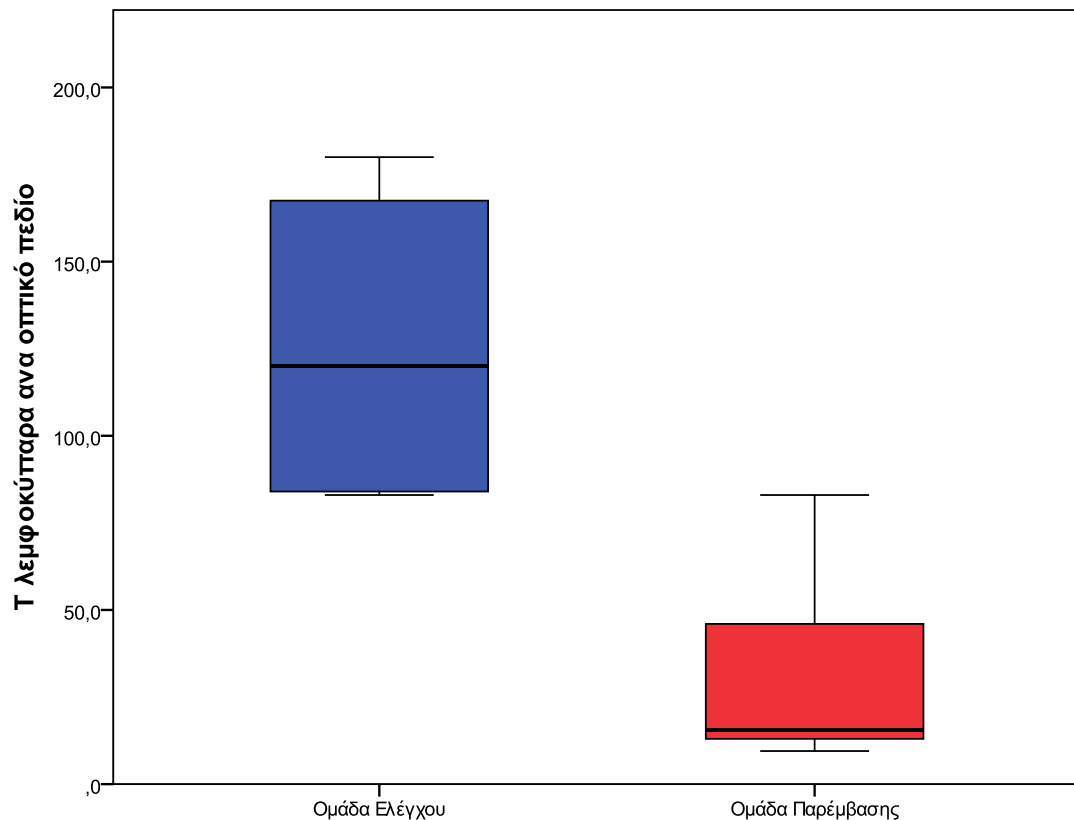
Εικόνα 13. Ανοσοϊστοχημική ανίχνευση T λεμφοκυττάρων (CD3+). Απεικονίζονται οπτικά πεδία του μυοκαρδίου με 20x εστίαση από τομές κατά των βραχύ άξονα της καρδιάς δύο επίμυων που έχουν υποστεί ανοσοϊστοχημική επεξεργασία με μονοκλωνικό αντίσωμα CD3, μετά την ολοκλήρωση των 28 ημερών του πρωτοκόλλου. Τα T λεμφοκύτταρα είναι CD3+ κύτταρα και έτσι αναδεικνύονται με το καφέ χρώμα στις εικόνες. Εικόνα 13Α Οπτικό πεδίο(20x) καρδιάς πειραματόζωου της ομάδας ελέγχου. Εικόνα 13Β Οπτικό πεδίο(20x) καρδιάς πειραματόζωου της ομάδας παρέμβασης. Η μυοκαρδιακή διήθηση από CD3+ T λεμφοκύτταρα είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα ελέγχου (13Α) συγκριτικά με την ομάδα παρέμβασης(13Β).

Οι ιστολογικές τομές φωτογραφήθηκαν (LEICA DFC500-colour) σε 20x και 40x εστίαση του μικροσκοπίου (Leica DM LS2). Στην συνέχεια σε 40x εστίαση, έγινε χειροκίνητη καταμέτρηση των T λεμφοκυττάρων σε 5 τυχαία επιλεγμένα οπτικά πεδία των ιστολογικών τομών των καρδιών των πειραματόζωων, με την χρήση του πρόγραμμα ImageJ. Στον πίνακα 10 παρατίθεται ο αύξων αριθμός του πειραματόζωου, η ομάδα τυχαιοποίησης του (ελέγχου ή παρέμβασης), και ο απόλυτος αριθμός των T λεμφοκυττάρων ανά οπτικό πεδίο. Ο αριθμός των T λεμφοκυττάρων προέκυψε μετά από χειροκίνητη καταμέτρηση των T λεμφοκυττάρων σε 5 οπτικά πεδία των τομών των καρδιών ανά πειραματόζωο και υπολογισμό του μέσου όρου αυτών ώστε να έχουμε τελικά έναν μόνο αντιπροσωπευτικό αριθμό ανά πειραματόζωο.

Πίνακας 10. Αριθμός μέσου όρου T λεμφοκυττάρων ανά οπτικό πεδίο ανά πειραματόζωο		
A/α επίμυων	Ομάδα τυχαιοποίησης	T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο
5	ομάδα παρέμβασης	9,5
6	ομάδα παρέμβασης	83
7	ομάδα παρέμβασης	13
8	ομάδα παρέμβασης	13
9	ομάδα ελέγχου	83
10	ομάδα ελέγχου	85
11	ομάδα παρέμβασης	46
12	ομάδα ελέγχου	180
13	ομάδα ελέγχου	155
14	ομάδα παρέμβασης	18

Για την σύγκριση του μέσου αριθμού T λεμφοκυττάρων ανά οπτικό πεδίο μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των επίμυων που έλαβαν κυτταρική θεραπεία χρησιμοποιήθηκε η στατιστική δοκιμασία t test (independent samples t test) του λογισμικού SPSS statistics 24. Στην ομάδα ελέγχου υπήρχαν κατά μέσο όρο πολύ περισσότερα T λεμφοκύτταρα ανά οπτικό πεδίο σε σύγκριση με την ομάδα παρέμβασης, και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (ομάδα παρέμβασης $30,4 \pm 29$ vs ομάδα ελέγχου $125,8 \pm 49,3$, $p < 0,01$). Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 11 και στο θηκόγραμμα της εικόνας 14.

Πίνακας 11. Στατιστική ανάλυση (t test) T λεμφοκυττάρων ανά οπτικό πεδίο			
Ομάδα τυχαιοποίησης	Μέση τιμή	Σταθερά απόκλιση	Στατιστική σημαντικότητα p value
ομάδα ελέγχου	125,8	49,3	0,005
ομάδα παρέμβασης	30,4	29	

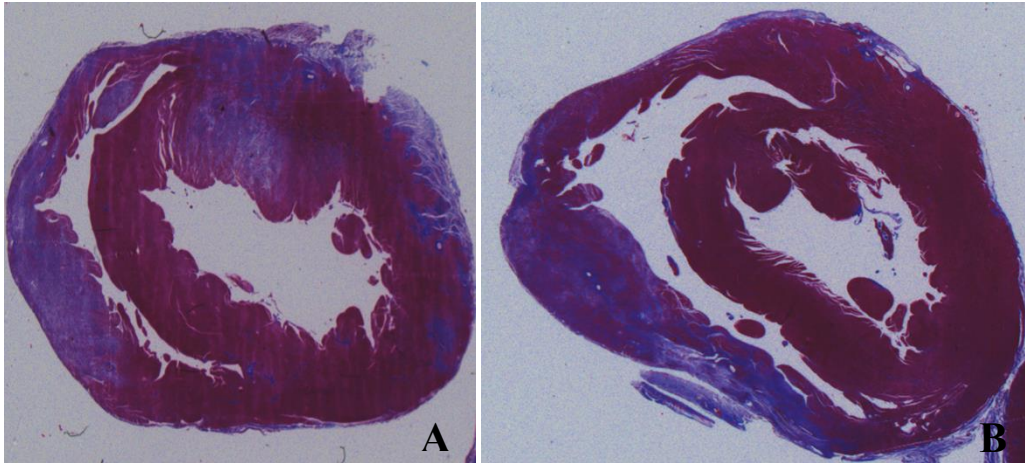


Εικόνα 14. Θηκόγραμμα (Box plot) T λεμφοκυττάρων ανά οπτικό πεδίο. Η οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε παραλληλόγραμμο απεικονίζει την διάμεσο, το μήκος κάθε κουτιού το ενδοτεταρτημοριακό εύρος και τα άκρα των εξωτερικών γραμμών απεικονίζουν το μέγιστο και τον ελάχιστο αριθμό T λεμφοκυττάρων ανά ομάδα τυχαιοποίησης. $n = 4-6$ / ομάδα.

6.3 Ύψωση του μυοκαρδίου

Τέσσερις έως έξι ιστολογικές τομές από τις μονιμοποιημένες σε φορμόλη και έγκλειστες σε παραφίνη καρδιές των πειραματόζωων πάρθηκαν και χρωματίστηκαν με

τρίχρωμη χρώση Masson (Sakura Tissue Tec-Manarini) (Εικόνα 15). Η τρίχρωμη χρώση Masson είναι κατάλληλη για την ανάδειξη της ίνωσης στον μυοκαρδιακό ιστό καθώς χρωματίζει τις κολλαγόνες ίνες .



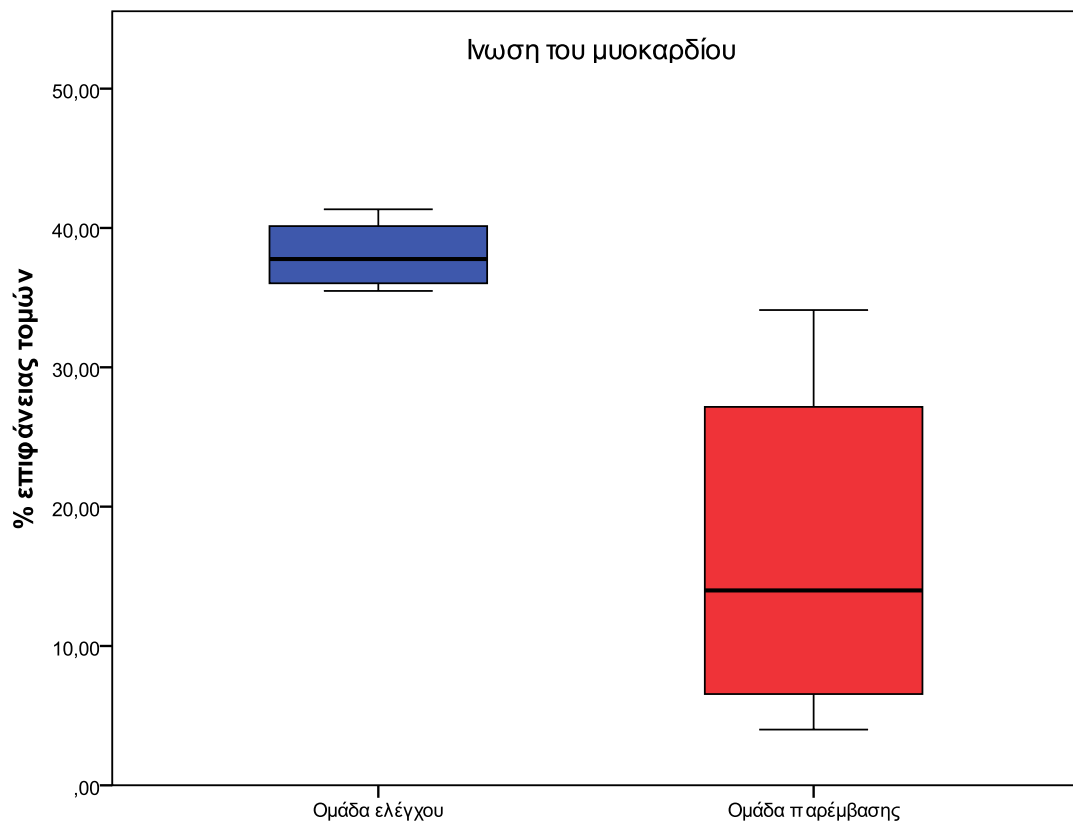
Εικόνα 15. Τρίχρωμη χρώση Masson. Παρουσιάζονται τομές κατά των εγκάρσιο άξονα της καρδιάς δύο επίμυων μετά την ευθανασία τους την 28η μέρα του πρωτοκόλλου, βαμμένες με τρίχρωμη χρώση Masson. Απεικονίζονται και οι δύο κοιλίες της καρδιάς, δεξιά και αριστερή. Το μυοκάρδιο είναι βαμμένο με χρώμα ροζ ενώ μπλε-μοβ φαίνονται οι περιοχές ίνωσης του μυοκαρδίου. Εικόνα 15Α Ιστολογική τομή από καρδιά πειραματόζωου της ομάδας ελέγχου. Εικόνα 15Β Ιστολογική τομή από καρδιά πειραματόζωου της ομάδας παρέμβασης. Η μυοκαρδιακή ίνωση είναι σημαντικά μεγαλύτερη στην ομάδα ελέγχου(15Α) συγκριτικά με την ομάδα παρέμβασης(15Β).

Οι τομές των πειραματόζωων φωτογραφήθηκαν (LEICA DFC500-colour) με την βοήθεια στερεοσκοπίου (Nikon SMZ800, φακός PlanApo 1xWD70 Nikon) και στην συνέχεια αναλύθηκαν στο πρόγραμμα ImageJ ώστε να μετρηθεί το ποσοστό ίνωσης του μυοκαρδίου στην συνολική επιφάνεια των τομών του μυοκαρδίου. Τα αποτελέσματα ανά πειραματόζωο φαίνονται στον Πίνακα 8. Το ποσοστό ανά πειραματόζωο υπολογίστηκε ως ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων από τις τομές κάθε πειραματόζωου.

Πίνακας 12. Ποσοστό(%) της επιφάνειας των τομών με ίνωση του μυοκαρδίου		
Α/α επίμυων	Ομάδα τυχαιοποίησης	Ποσοστό επιφάνειας ίνωσης
5	ομάδα παρέμβασης	21,38
6	ομάδα παρέμβασης	27,16
7	ομάδα παρέμβασης	4,00
8	ομάδα παρέμβασης	6,59
9	ομάδα ελέγχου	36,58
10	ομάδα ελέγχου	38,93
11	ομάδα παρέμβασης	34,11
12	ομάδα ελέγχου	35,48
13	ομάδα ελέγχου	41,34
14	ομάδα παρέμβασης	6,55

Τα δεδομένα του πίνακα 12 υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση με την δοκιμασία independent samples t-test του λογισμικού SPSS statistics 24. Συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση του ποσοστού της επιφάνειας της ιστολογικής τομής με ίνωση μεταξύ της ομάδας ελέγχου και της ομάδας των επίμυων που έλαβαν κυτταρική θεραπεία. Η ίνωση στην ομάδα ελέγχου ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερη από αυτήν της ομάδας παρέμβασης (ομάδα ελέγχου $38,1 \pm 2,6$ vs ομάδα παρέμβασης $16,6 \pm 12,7$, $p < 0,01$). Τα αποτελέσματα της στατιστικής δοκιμασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 13 και στο γράφημα της εικόνας 16.

Πίνακας 13. Στατιστική ανάλυση (t test) του ποσοστού ίνωσης του μυοκαρδίου			
Ομάδα τυχαιοποίησης	Μέση τιμή	Σταθερά απόκλιση	Στατιστική σημαντικότητα p value
ομάδα ελέγχου	38,1	2,6	0,008
ομάδα παρέμβασης	16,6	12,7	



Εικόνα 16. Θηκόγραμμα (Box plot) ίνωσης του μυοκαρδίου. Η οριζόντια γραμμή μέσα σε κάθε παραλληλόγραμμο απεικονίζει την διάμεσο, το μήκος κάθε κουτιού το ενδοτεταρτημοριακό εύρος και τα άκρα των εξωτερικών γραμμών απεικονίζουν το ελάχιστο και το μέγιστο ποσοστό ίνωσης του μυοκαρδίου ανά ομάδα τυχαιοποίησης. $n = 4-6$ / ομάδα.

7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μυοκαρδίτιδα αποτελεί μια δυνητικά θανατηφόρο νόσο χωρίς αποτελεσματική στοχευμένη θεραπεία. Επί του παρόντος στην κλινική πράξη εφαρμόζεται μόνο υποστηρικτική θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας και των αρρυθμιών που προκαλεί η μυοκαρδίτιδα, σύμφωνα με τις υπάρχουσες κατευθυντήριες οδηγίες²²⁴. Κατά συνέπεια, υπάρχει επιτακτική ανάγκη για την ανεύρεση νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων που να αμβλύνουν τη φλεγμονώδη διεργασία που οδηγεί σε μυοκαρδιακή νέκρωση με αποτέλεσμα την καρδιακή ανεπάρκεια και τον αιφνίδιο θάνατο. Προς αυτή την κατεύθυνση εστιάστηκε η παρούσα διδακτορική διατριβή.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα από πειραματικές μελέτες μεσεγγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSCs) από τον μυελό των οστών ή από την εμβρυϊκή μεμβράνη σε πειραματόζωα με EAM^{269,274,330} -που έδειξαν βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και εξασθένιση της φλεγμονής του μυοκαρδίου- σε συνδυασμό με ενδείξεις αποτελεσματικής κυτταρικής θεραπείας σε άλλες καρδιακές παθήσεις^{264,321,327-329,343,380-383,390}, κατευθύνουν το επιστημονικό ενδιαφέρον προς την κυτταρική θεραπεία της μυοκαρδίτιδας. Η παρούσα μελέτη διερεύνησε την επίδραση των καρδιακών προγονικών κυττάρων στην εξέλιξη της φλεγμονής και της αναδιαμόρφωσης της καρδιάς επίμυων με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα.

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η ενδοστεφανιαία χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων σε επίμυες με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα, περιορίζει δραματικά τη μυοκαρδιακή φλεγμονή, την ίνωση και τη διήθηση του μυοκαρδίου από T λεμφοκύτταρα. Ταυτόχρονα φάνηκε ότι η χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων αποτρέπει την προκαλούμενη από την πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα έκπτωση της συστολικής απόδοσης και την αύξηση των όγκων της αριστερής κοιλίας των επίμυων. Το λειτουργικό (αύξηση του κλάσματος εξωθήσεως της αριστερής κοιλίας) και δομικό (μείωση των όγκων της αριστερής κοιλίας και μείωση της ίνωσης του μυοκαρδίου) όφελος της χορήγησης καρδιακών προγονικών κυττάρων φαίνεται ιδιαίτερα σημαντικό από κλινικής άποψης. Η μείωση του κλάσματος εξώθησης, η αύξηση των όγκων της αριστερής κοιλίας και η αύξηση της μυοκαρδιακής ίνωσης έχουν συσχετιστεί με αύξηση της συνολικής θνησιμότητας ανεξαρτήτου αιτίας, αύξηση της θνησιμότητας καρδιακής αιτιολογίας και αυξημένη εμφάνιση αιφνίδιων καρδιακών θανάτων σε ασθενείς με -αποδεδειγμένη με βιοψία- μυοκαρδίτιδα⁶⁹.

Δύο παράμετροι της παρούσας μελέτης αναδεικνύουν ιδιαίτερος τη σημασία και την πρωτοτυπία της. Πρώτον, η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη που διερευνήσε την επίδραση των καρδιακών προγονικών κυττάρων στην μυοκαρδίτιδα. Τα καρδιακά προγονικά κύτταρα (cardiac progenitor cells - CPCs) τα οποία μελετήθηκαν στην παρούσα πειραματική μελέτη εκφράζουν αντιγόνα επιφανείας προγονικών κυττάρων, ανευρίσκονται φυσιολογικά στο μυοκάρδιο και απομονώθηκαν απευθείας από την καρδιά. Η χορήγηση CPCs σε πειραματικά πρωτόκολλα ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας αυξάνει το βιώσιμο μυοκάρδιο και βελτιώνει την λειτουργικότητα της καρδιάς^{321,327-329,343}. Επίσης ελπιδοφόρα ήταν τα αποτελέσματα κλινικών δοκιμών πρώιμης φάσης σε ασθενείς με έμφραγμα του μυοκαρδίου^{321,381,390}, διατατική μυοκαρδιοπάθεια³⁸⁰, και σύνδρομο υποπλαστικής αριστερής κοιλίας^{382,383}. Αν και η υπεροχή τους έναντι άλλων τύπων ενηλίκων προγονικών κυττάρων δεν έχει εδραιωθεί, οι προκλινικές μελέτες που πραγματοποίησαν συγκρίσεις μεταξύ διαφορετικών τύπων κυττάρων υποδεικνύουν ότι τα CPCs φαίνεται να υπερέχουν^{324,385} ή τουλάχιστον να είναι ισοδύναμα³⁸⁴ συγκριτικά με άλλους τύπους κυττάρων. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο σε προκλινικά μοντέλα όσο και σε κλινικές μελέτες, τα CPCs δεν είχαν δοκιμαστεί σε πειραματόζωα με ΕΑΜ πριν την μελέτη μας.

Δεύτερον, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που χρησιμοποιεί την ενδοστεφανιαία οδό χορήγησης προγονικών κυττάρων (ανεξαρτήτως του τύπου των κυττάρων) σε μυοκαρδίτιδα. Η αποτελεσματική κατακράτηση των εγχέομενων κυττάρων στην καρδιά παραμένει μια μεγάλη πρόκληση καθώς η απομάκρυνση τους μέσω της φλεβικής κυκλοφορίας οδηγεί σε σημαντική απώλεια κυττάρων αμέσως μετά τη χορήγησή τους^{326,332,333}. Έχουν δοκιμαστεί διαφορετικοί τρόποι για τη χορήγηση των κυττάρων στην καρδιά (ενδοφλεβίως, ενδοστεφανιαίως και ενδομυοκαρδιακώς). Σε προηγούμενες προκλινικές μελέτες κυτταρικής θεραπείας στη μυοκαρδίτιδα, τα κύτταρα χορηγήθηκαν μέσω της ενδοφλέβιας οδού^{269,274,330} ή της ενδομυοκαρδιακής οδού^{387,388} - και οι δυο αυτοί οδοί χορήγησης κυττάρων παρουσιάζουν σημαντικά μειονεκτήματα. Όσον αφορά την ενδοφλέβια χορήγηση κυττάρων έχουμε σημαντικού βαθμού «παγίδευση» κυττάρων στην πνευμονική κυκλοφορία με αποτέλεσμα μικρό ποσοστό να φτάνει στην καρδιά⁴⁰². Συγκεκριμένα οι Freyman και συνεργάτες, έδειξαν ότι 14 μέρες μετά την ενδοφλέβια χορήγηση κυττάρων σε χοίρους με έμφραγμα του μυοκαρδίου, δεν υπήρχαν ανιχνεύσιμα κύτταρα στο μυοκάρδιό τους, σε αντίθεση με τους χοίρους που έλαβαν κύτταρα ενδοστεφανιαία ή ενδομυοκαρδιακά (που είχαν

διατηρήσει το 6 και 3% της χορηγούμενης δόσης κυττάρων αντίστοιχα). Από την άλλη, η ενδομυοκαρδιακή χορήγηση είναι (σε κλινικό τουλάχιστον επίπεδο) τεχνικά δύσκολη, αποκλείοντας την ευρεία εφαρμογή της. Επιπροσθέτως, η ενδομυοκαρδιακή χορήγηση οδηγεί σε ανομοιογενή κατανομή των κυττάρων στο μυοκάρδιο, καθώς τα εγχέόμενα κύτταρα συσσωρεύονται κοντά στο σημείο έγχυσης³⁸⁶. Με την βοήθεια του ανοσοφθορισμού οι Li και συνεργάτες έδειξαν ότι 2 μέρες μετά την ενδομυοκαρδιακή χορήγηση κυττάρων σε ποντικούς (4 μέρες μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου) η κατανομή των κυττάρων ήταν ανομοιογενής και εστιασμένη μόνο στα μυοκάρδιο πέριξ των σημείων ένεσης των κυττάρων. Αντίθετα, με την ενδοστεφανιαία χορήγηση επιτυγχάνεται ευρεία και ομοιογενής κατανομή των εγχόμενων κυττάρων στο μυοκαρδίο^{386,389}, πράγμα ιδιαίτερα σημαντικό για τη θεραπεία διάχυτων μυοκαρδιακών παθήσεων όπως η μυοκαρδίτιδα. Παράλληλα η ενδοστεφανιαία μέθοδος χορήγησης είναι τεχνικά απλή στην εκτέλεση της³³⁴, επιτρέποντας την ευρεία κλινική εφαρμογή της. Επιπλέον, η ενδοστεφανιαία έγχυση κυττάρων έχει αποδειχτεί (τόσο σε προκλινικό όσο και σε κλινικό επίπεδο) ότι είναι ασφαλής³³⁵. Τα σημαντικά πλεονεκτήματα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης την καθιστούν ιδιαίτερα ελκυστική επιλογή για τη χορήγηση κυττάρων στην καρδιά³³¹.

Τόσο ο αριθμός των CPCs που εγχύθηκαν ενδοστεφανιαία όσο και η χρονική στιγμή χορήγησης των κυττάρων στους επίμυες βασίζονται σε αποτελέσματα προηγούμενων προκλινικών μελετών. Η δόση 500.000 CPCs που επιλέχθηκε στην παρούσα μελέτη έχει χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες που διερευνούσαν τα αποτελέσματα της κυτταρικής θεραπείας σε επίμυες με EAM. Συγκεκριμένα οι δόσεις των κυττάρων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην βιβλιογραφία για την θεραπεία της EAM σε επίμυες κυμαίνονται από 500.000 έως 5 εκατομμύρια κύτταρα (που όμως χορηγήθηκαν είτε ενδοφλεβίως είτε ενδομυϊκά)^{391,269,274,387,388}. Παράλληλα η δόση που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη είναι η μέγιστη δόση που έχει δείχθει ότι μπορεί να χορηγηθεί με ασφάλεια μέσω της ενδοστεφανιαίας οδού χωρίς να προκληθούν μικροαγγειακές αποφράξεις και καρδιακή βλάβη σε επίμυες³³¹. Συγκεκριμένα οι Cheng και συνεργάτες προσπάθησαν να καθορίσουν την ενδοστεφανιαία δόση κυττάρων με τη μέγιστη κατακράτηση κυττάρων (αξιολόγηση με απεικόνιση με φθορισμό και real time PCR) και την ελάχιστη βλάβη του μυοκαρδίου (αξιολόγηση με τον υπολογισμό της τροπονίνης I με ELISA) συγκρίνοντας 5 διαφορετικές δόσεις 1,3,5,10 και 20 x 10⁵. Με βάση την απεικόνιση με φθορισμό και την real time PCR η κατακράτηση κυττάρων

αυξάνεται με την αύξηση της δόσης των χορηγούμενων κυττάρων. Όμως, ενώ στις τρεις μικρότερες δόσεις τα επίπεδα της τροπονίνης ήταν αντίστοιχα με την ομάδα ελέγχου που δεν έλαβε κύτταρα, στις 2 μεγάλες δόσεις η τροπονίνη αυξήθηκε σημαντικά ($p=0,001$ vs ομάδα ελέγχου). Έδειξαν επίσης πως η αύξηση της τροπονίνης οφείλονταν συγκεκριμένα στην μικροαγγειακή απόφραξη από τα χορηγούμενα κύτταρα. Συγκεκριμένα έδειξαν ότι οι επίμυες που έλαβαν δόση κυττάρων 10×10^5 είχαν μεγάλο ποσοστό αποφραγμένων αγγείων από κύτταρα σε αντίθεση με αυτούς που έλαβαν δόση κυττάρων 5×10^5 που είχαν ανιχνεύσιμα κύτταρα στα αιμοφόρα αγγεία τους χωρίς να προκαλούν απόφραξη. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα χρησιμοποιήσαμε για τους σκοπούς της μελέτης μας τη δόση 500.000 κυττάρων ως την δόση με το μέγιστο όφελος που δεν προκαλεί βλάβη στην καρδιακή μικροκυκλοφορία.

Ως βέλτιστη χρονική στιγμή του πρωτοκόλλου για την έγχυση των CPCs επιλέχτηκε, βάση της βιβλιογραφίας, η 10η μέρα μετά την πρώτη ανοσοποίηση των επίμυων με χοίρεια μυοσίνη. Οι Ohshima και συνεργάτες²⁷⁴ εξέτασαν την ενδοφλέβια χορήγηση αλλογενών μεσεγχυματικών βλαστοκυττάρων (MSCs) σε τρεις διαφορετικές χρονικές στιγμές: την 7^η, την 10^η και την 14^η μέρα μετά των ανοσοποίηση των επίμυων για πρόκληση EAM. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η χορήγηση των κυττάρων την 10^η μέρα είχε το μέγιστο όφελος συνεκτιμώντας την λειτουργικότητα της καρδιάς και τη μυοκαρδιακή φλεγμονή.

Η πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα (experimental autoimmune myocarditis-EAM) αποτελεί πολύτιμο εργαλείο για τη μελέτη νέων θεραπευτικών παρεμβάσεων στη μυοκαρδίτιδα. Οι δυσκολίες χρήσης των ιών και των βακτηρίων για την πειραματική πρόκληση μυοκαρδίτιδας καθιστούν τα πρωτόκολλα EAM ιδιαίτερα ελκυστικά ως πειραματικά μοντέλα μυοκαρδίτιδας. Η αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα που προκαλείται είναι μια T-διαμεσολαβούμενη αυτοάνοση νόσος²⁶² και προσομοιάζει στη γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα του ανθρώπου^{261,266-268}. Η ανθρώπινη γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα οδηγεί σε ταχέως εξελισσόμενη ανεπάρκεια αριστερής κοιλίας και συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση με το ποσοστό θανάτου ή μεταμόσχευσης καρδιάς να ανέρχεται περίπου στο 70% σε 1 έτος³⁹¹. Παρότι η μυοκαρδίτιδα στους ανθρώπους δύναται να οδηγήσει σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων (που κυμαίνονται από υποκλινική εκδήλωση μέχρι οξεία καρδιακή ανεπάρκεια^{2,11}), η επιλογή του πειραματικού μοντέλου της EAM (που προσομοιάζει στη γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα) επιτρέπει την αξιολόγηση της

αποτελεσματικότητας της κυτταρικής θεραπείας με CPCs στην βαρύτερη από τις μορφές μυοκαρδίτιδας.

Αν και στην κλινική πράξη η ιογενής μυοκαρδίτιδα είναι πιο συχνή από τη γιγαντοκυτταρική μυοκαρδίτιδα, έχει αποδειχθεί ότι οι ιογενείς μυοκαρδιακές λοιμώξεις μπορούν να πυροδοτήσουν μια αυτοάνοση απάντηση σε καρδιακά αυτό-αντιγόνα, με αποτέλεσμα την παρατεταμένη φλεγμονή του μυοκαρδίου χωρίς ιική παραμονή^{11,128}. Επιπλέον σύμφωνα με πλήθος μελετών η αυτοανοσία στην μυοκαρδίτιδα διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της μυοκαρδίτιδας σε φλεγμονώδη διατακτική μυοκαρδιοπάθεια ανεξάρτητα του αρχικού αιτιολογικού παράγοντα^{144,147,150,162,165,166,170-174,176-183}. Κατά συνέπεια, δεδομένου ότι η καρδιακή αυτοανοσία φαίνεται να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο στην παθογένεση και την εξέλιξη τόσο της ιογενούς όσο και της γιγαντοκυτταρικής μυοκαρδίτιδας, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η ευεργετική επίδραση των CPCs στην εξέλιξη της EAM που παρατηρήθηκε στη μελέτη μας θα ήταν λογικό να λάβει χώρα και στην ιογενή μυοκαρδίτιδα.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες χρησιμοποιώντας αλλά και συγκρίνοντας διαφορετικά πρωτόκολλα για την πρόκληση EAM σε πειραματόζωα, χρησιμοποιώντας διαφορετικές δόσεις αντιγόνου, διαφορετικού συνολικού εγγεόμενου όγκου και με διαφορετικούς τρόπους έγχυσης του διαλύματος της μυοσίνης²⁸¹. Βάση αυτών των πρωτοκόλλων στην παρούσα πειραματική μελέτη εξετάσαμε 7 διαφορετικά πρωτόκολλα πρόκλησης, που εφαρμόστηκαν συνολικά σε 45 επίμνες. Καταλήξαμε στην επιτυχή πρόκληση υπερηχογραφικά και ιστολογικά επιβεβαιωμένης μυοκαρδίτιδας, όπως περιεγράφηκε αναλυτικά στην ενότητα V.4., το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της θεραπείας με CPCs.

Από την διαδικασία πειραματικής δοκιμής και συνδυασμού διάφορων παραμέτρων, ώστε τελικά να εδραιωθεί ένα επιτυχημένο πρωτόκολλο EAM, έγινε σαφές ότι εκτός από την συγκέντρωση του αντιγόνου (χοίρεια καρδιακή μυοσίνη) και του *Mycobacterium tuberculosis*, που ήταν προφανές να αποτελούν βασικό στοιχείο για την επιτυχή πρόκληση EAM λόγω της ανοσολογικής τους δράσης, βασικό ρόλο στην πρόκληση EAM διαδραματίζει ο τρόπος ανάδευσης του διαλύματος έγχυσης. Απαραίτητη προϋπόθεση για την πρόκληση EAM είναι η παρασκευή ενός παχύρευστου λευκού διαλύματος έγχυσης που να είναι αδιάλυτο στο νερό. Για την παρασκευή του διαλύματος αυτού είναι αναγκαία η πολύ καλή ανάδευση του

διαλύματος. Στην παρούσα μελέτη η ανάδευση που έδωσε το επιθυμητό αποτέλεσμα επετεύχθη, όπως αναφέρεται αναλυτικά στην ενότητα V.3. , με μια ειδική διάταξη δυο γυάλινων συρίγγων και μιας σύνδεσης τριών κατευθύνσεων (three way) ώστε να γίνει εφικτή η επί 10 λεπτά μετακίνηση των εμβόλων των συρίγγων. Με τον τρόπο αυτό το υγρό διάλυμα μυοσίνης, PBS και ανοσοενισχυτικού, μετατράπηκε τελικά σε ένα λευκό, παχύρευστο, αδιάλυτο στο νερό διάλυμα το οποίο επέτρεψε την επιτυχή πρόκληση EAM.

Μετά την επιτυχή πρόκληση EAM στους επίμυες ήταν πλέον δυνατός ο έλεγχος της επίδρασης των CPCs στην πορεία και την έκβαση της EAM. Η ιστολογική χρώση αιματοξυλίνης ηωσίνης την 28^η μέρα του πρωτοκόλλου, στις τομές από τις καρδιές των επίμυων που έλαβαν CPCs , έδειξαν σαφή μείωση της διήθησης του μυοκαρδίου από φλεγμονώδη κύτταρα. Συμπληρωματικά η ανοσοϊστοχημική μελέτη CD3 ανέδειξε τη μείωση της διήθησης του μυοκαρδίου από T λεμφοκύτταρα στις τομές από καρδιές επίμυων που έλαβαν ενδοστεφανιαία έγχυση CPCs. Τα αποτελέσματα αυτά αποδεικνύουν την στοχευμένη δράση των κυττάρων επί της φλεγμονώδους δραστηριότητας της μυοκαρδίτιδας και συγκεκριμένα στα T λεμφοκύτταρα που αποτελούν τον βασικό κυτταρικό πληθυσμό της EAM.

Παράλληλα με τον έλεγχο της επίδρασης των CPCs στην φλεγμονή, πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής και έλεγχος της επίδρασης των κυττάρων στην ίνωση του μυοκαρδίου. Η πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα προκαλεί εκτεταμένη βλάβη των μυοκαρδίου και αντικατάστασή του με ουλώδη ιστό^{261,266,394}. Σημαντικό είναι ότι από κλινικής άποψης, η ανίχνευση ίνωσης του μυοκαρδίου με μαγνητική τομογραφία σε ασθενείς με ιστολογικά επιβεβαιωμένη μυοκαρδίτιδα συνδέεται με δραματική αύξηση της θνησιμότητας από καρδιολογικά αίτια⁶⁹. Με την βοήθεια της τρίχρωμης χρώσης Masson αναδείχτηκε σημαντική μείωση της ίνωσης του μυοκαρδίου στις καρδιές των επίμυων της ομάδας παρέμβασης. Κατά συνέπεια η αντι-ινωτική αυτή δράση των CPCs αποτελεί ενθαρρυντικό προγνωστικό στοιχείο για την εξέλιξη της μυοκαρδίτιδας και την αναδιαμόρφωση της καρδιάς.

Με την βοήθεια της υπερηχογραφικής μελέτης σε συγκεκριμένα χρονικά σημεία του πρωτοκόλλου (0, 10^η και 28^η μέρα) έγινε εφικτός ο έλεγχος της επίδρασης των CPCs στην λειτουργικότητα της καρδιάς των επίμυων. Για τον σκοπό αυτό αξιολογήθηκαν τρεις υπερηχογραφικές παράμετροι: το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF), ο τελοσυστολικός όγκος αριστερής κοιλίας (LVESV) και ο τελοδιαστολικός

όγκος αριστερής κοιλίας (LVEDV). Το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας αποτελεί αξιόπιστο δείκτη της αποδοτικότητας της καρδιάς καθώς αντανακλά το ποσοστό του αίματος που εξωθείται από την καρδιά σε κάθε συστολή. Τα αποτελέσματα από την σύγκριση των ποσοστών του LVEF μεταξύ των δύο ομάδων τυχαιοποίησης έδειξαν πως την 0 και 10^η μέρα το κλάσμα εξώθησης και στις δύο ομάδες κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, όπως ήταν αναμενόμενο, ενώ την 28^η μέρα υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Οι επίμυες που έλαβαν θεραπεία με CPCs διατήρησαν το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας, ενώ στην ομάδα ελέγχου το κλάσμα εξώθησης παρουσίασε σημαντική πτώση. Όσον αφορά τους όγκους της αριστερής κοιλίας, ήταν παρόμοιοι, χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά, στις δύο ομάδες τυχαιοποίησης, την 0 και 10^η μέρα του πρωτοκόλλου. Ο τελοδιαστολικός όγκος της αριστερής κοιλίας την 28^η μέρα του πρωτοκόλλου φάνηκε μειωμένος σε σχέση με την ομάδα ελέγχου χωρίς όμως στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Ο τελοσυστολικός όγκος της αριστερής κοιλίας την 28^η μέρα του πρωτοκόλλου ήταν σε σημαντικό βαθμό μικρότερος στην ομάδα παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Επομένως τα CPCs αποτρέπουν την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας.

Ένας σημαντικός περιορισμός της μελέτης μας είναι ότι δεν παρέχει πληροφορίες για τους μηχανισμούς μέσω των οποίων τα CPCs ασκούν την ευεργετική τους δράση στη μυοκαρδίτιδα. Ωστόσο, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι τα CPCs έχουν σημαντικές ανοσοτροποποιητικές ιδιότητες και μπορούν να επηρεάσουν την ανοσολογική απόκριση τόσο των Τ λεμφοκυττάρων όσο και των μακροφάγων^{379,392} που αντιπροσωπεύουν τους δύο επικρατέστερους τύπους κυττάρων της φλεγμονώδους διήθησης του μυοκαρδίου στην πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα³⁹³. Συγκεκριμένα, όσον αφορά τα Τ λεμφοκύτταρα, που διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην παθογένεση της πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας^{262, 394}, οι Lauden και συνεργάτες έδειξαν ότι τα CPCs μπορούν να καταστείλουν σημαντικά μια εξελισσόμενη Τ-λεμφοκυτταρική φλεγμονώδη απόκριση *in vitro*. Η ανοσοτροποποιητική αυτή ικανότητα των CPCs προέρχεται από την επαγόμενη από CPCs ενεργοποίηση κατασταλτικών Τ ρυθμιστικών λεμφοκυττάρων. Αυτό συμβαίνει μέσω αλληλεπίδρασης του PD-1, που εκφράζεται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων Τ λεμφοκυττάρων, με τον προσδέτη του, PD-L1, που εκφράζεται στην επιφάνεια των CPCs³⁹². Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι το μονοπάτι PD-

1 / PD-L1 φαίνεται να ασκεί ρυθμιστική δράση στη λειτουργία των T λεμφοκυττάρων σε πολυάριθμες φλεγμονώδεις ασθένειες^{395,396}, συμπεριλαμβανομένης της πειραματικής αυτοάνοσης μυοκαρδίτιδας³⁹⁷. Ειδικότερα, οι Tarrío και συνεργάτες έδειξαν ότι τα ποντίκια με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα που είχαν έλλειψη PD-1 εμφανίζουν αυξημένη λεμφοκυτταρική διήθηση, αυξημένη καρδιακή έκφραση προ-φλεγμονωδών κυτοκινών και αυξημένη μυοκαρδιοκυτταρική βλάβη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου³⁹⁷. Όσον αφορά την ανοσορυθμιστική επίδραση των CPCs στα μακροφάγα, οι De Couto και συνεργάτες έδειξαν ότι τα CPCs, τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, οδηγούν σε διαφοροποίηση των μακροφάγων σε ένα διακριτό φαινότυπο, διαφορετικό από τον M1 και M2, που χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκφραση κυτταροτοξικών, προφλεγμονωδών κυτοκινών και αυξημένη έκφραση της αντιφλεγμονώδους κυτοκίνης IL-10. Πολύ σημαντικό είναι το γεγονός ότι ο μοναδικός αυτός φαινότυπος μακροφάγων προσδίδει καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, μέσω ενεργοποίησης ενός αντιαποπτωτικού προγράμματος στα καρδιομυοκύτταρα³⁷⁹. Κατά συνέπεια, οι ανοσοτροποποιητικές δράσεις των CPCs στα T λεμφοκύτταρα και μακροφάγα θα μπορούσαν να εξηγήσουν την μειωμένη λεμφοκυτταρική διήθηση που παρατηρείται στις καρδιές των επίμυων με EAM που έχουν λάβει CPCs. Επιπροσθέτως, εκτός από τα ανοσοτροποποιητικά / ανοσοκατασταλτικά τους αποτελέσματα, τα CPCs έχουν φανεί ότι ασκούν επίσης ισχυρή αναγεννητική^{288,384,398-400} και αντι-ινωτική δράση⁴⁰¹ στο μυοκάρδιο, αμφότερες αυτές οι δράσεις θα μπορούσαν, τουλάχιστον εν μέρει, να εξηγήσουν σε μηχανιστικό επίπεδο τις θετικές επιδράσεις που παρατηρήθηκαν στη μελέτη μας.

Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης που υποδεικνύουν την θετική επίδραση των CPCs στην εξέλιξη της EAM, ανοίγουν νέα πεδία για περαιτέρω έρευνα ώστε η χρήση των CPCs να αποτελέσει μελλοντικά μια θεραπευτική επιλογή κατά της μυοκαρδίτιδας. Σημαντικά επόμενα βήματα στην ανάπτυξη αυτής της μορφής θεραπείας θα ήταν ερευνητικές μελέτες πάνω στους υποκείμενους μηχανισμούς της δράσης των CPCs στην μυοκαρδίτιδα, καθώς επίσης και μελέτες που να επιβεβαιώνουν την θετική επίδραση των CPCs σε άλλες μορφές μυοκαρδίτιδας, όπως η ιογενής. Η ολοκλήρωση των απαιτούμενων επόμενων, σημαντικών για την επιβεβαίωση των δικών μας θετικών ευρημάτων, πειραματικών και κλινικών μελετών θα αποσαφηνίσει το αν η ενδοστεφανιαία χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων μπορεί να

αποτελέσει μια νέα στοχευμένη και αποτελεσματική θεραπευτική επιλογή για την μυοκαρδίτιδα στην κλινική πράξη.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Συμπερασματικά, στην παρούσα -πρώτη μέχρι σήμερα- μελέτη που διερεύνησε την επίδραση των καρδιακών προγονικών κυττάρων στην μυοκαρδίτιδα, διαπιστώθηκε ότι η ενδοστεφανιαία έγχυση CPCs μειώνει δραματικά τη φλεγμονή του μυοκαρδίου, τη διήθηση του μυοκαρδίου από T λεμφοκύτταρα και την ίνωση του μυοκαρδίου, διατηρώντας παράλληλα τη συστολική απόδοση και παρεμποδίζοντας τη δυσμενή αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας. Τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της μελέτης δικαιολογούν περαιτέρω πειραματική διερεύνηση της ενδοστεφανιαίας έγχυσης CPCs ως πιθανή θεραπευτική στρατηγική στην οξεία μυοκαρδίτιδα.

VI. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Τα καρδιακά προγονικά κύτταρα (CPCs) ασκούν καρδιοπροστατευτική, αναγεννητική, ανοσοτροποποιητική και αντι-ινωτική δράση στην ισχαιμική και μη ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια. Έως τώρα δεν είχε διερευνηθεί η επίδραση των CPCs στην οξεία μυοκαρδίτιδα, μια δυνητικά θανατηφόρα φλεγμονώδη νόσο του μυοκαρδίου χωρίς στοχευμένη αποτελεσματική θεραπεία.

Σκοπός: Η διερεύνηση της επίδρασης της ενδοστεφανιαίας έγχυσης CPCs σε επίμυες με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα.

Μέθοδοι: Καρδιές από υγιείς επίμυες Lewis χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και καλλιέργεια των CPCs. Σε 26 Lewis επίμυες προκλήθηκε αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα με υποδόρια έγχυση χοίρειας καρδιακής μυοσίνης με ανοσοενισχυτικό Freund που περιείχε *Mycobacterium Tuberculosis* τις ημέρες 0 και 7 του πρωτοκόλλου. Τη 10η ημέρα οι επίμυες υποβλήθηκαν σε πλάγια θωρακοτομή και στη συνέχεια τυχαιοποιήθηκαν είτε στην ομάδα παρέμβασης και υποβλήθηκαν σε ενδοστεφανιαία έγχυση 500.000 CPCs, είτε στην ομάδα ελέγχου και έλαβαν ενδοστεφανιαία έγχυση φυσιολογικού ορού με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων (PBS). Η ενδοστεφανιαία έγχυση επιτεύχθηκε με έγχυση κυττάρων ή PBS στην κοιλότητα της αριστερής κοιλίας κατά τη διάρκεια σύντομου αποκλεισμού της ανιούσας αορτής. Οι επίμυες παρακολούθηθηκαν για 18 ημέρες μετά την έγχυση και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε ευθανασία (28^η ημέρα του πρωτοκόλλου). Οι επίμυες υποβλήθηκαν σε υπερηχογραφική μελέτη της καρδιακής τους λειτουργίας τις ημέρες 0, 10 (πριν την έγχυση) και 28 του πρωτοκόλλου. Οι καρδιές των επίμυων μετά την ευθανασία τους απομονώθηκαν και υποβλήθηκαν σε ιστοπαθολογική και ανοσοϊστοχημική μελέτη για την αξιολόγηση της φλεγμονώδους διήθησης και της ίνωσης του μυοκαρδίου. Δέκα τέσσερις επίμυες ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο, εκ των οποίων 8 επίμυες ανήκαν στην ομάδα ελέγχου και 6 στην ομάδα παρέμβασης.

Αποτελέσματα: Ιστολογικά επιβεβαιωμένη αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα προκλήθηκε στο σύνολο των επίμυων που ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο (n=14). Το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF) και ο τελοδιαστολικός και τελοσυστολικός όγκος της αριστερής κοιλίας δεν παρουσίασαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δυο ομάδων την 0 και την 10η μέρα. Η ενδοστεφανιαία έγχυση CPCs απέτρεψε την

επαγόμενη από την μυοκαρδίτιδα λειτουργική έκπτωση και διάταση της αριστερής κοιλίας. Συγκεκριμένα το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας ήταν σημαντικά μεγαλύτερο (81.5 ± 2.7 vs 65.4 ± 7.8 , $p < 0.001$) και ο τελοσυστολικός όγκος της αριστερής κοιλίας σημαντικά μικρότερος (43.3 ± 15.1 μ l vs 100 ± 24.5 μ l, $p < 0.001$) στην ομάδα παρέμβασης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου την 28^η μέρα του πρωτοκόλλου. Επίσης, η έγχυση CPCs οδήγησε σε σημαντική ελάττωση της φλεγμονώδους διήθησης του μυοκαρδίου ($7.4 \pm 6.7\%$ vs $20.7 \pm 3.5\%$ του μυοκαρδίου, $p = 0.007$), σημαντική μείωση της ίνωσης του μυοκαρδίου ($16.6\% \pm 12.7\%$ vs $38.1 \pm 2.6\%$ του μυοκαρδίου, $p = 0.008$), και σημαντικό περιορισμό της διήθησης του μυοκαρδίου από T λεμφοκύτταρα (30.4 ± 29 vs 125.8 ± 49.3 κύτταρα ανά οπτικό πεδίο, $p = 0.005$).

Συμπεράσματα: Η ενδοστεφανιαία έγχυση CPCs οδηγεί σε μείωση της φλεγμονώδους διήθησης, της ίνωσης και της T λεμφοκυτταρικής διήθησης του μυοκαρδίου, διατηρώντας συγχρόνως τη συστολική απόδοση και αποτρέποντας τη δυσμενή αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας σε επίμυες με πειραματική αυτοάνοση μυοκαρδίτιδα.

VII.SUMMARY

Background: Cardiac progenitor cells (CPCs) exert cardioprotective, regenerative, immunomodulatory and anti-fibrotic effects in hearts with ischemic and non-ischemic cardiomyopathy. The effect of CPC therapy in the setting of acute myocarditis (a potentially lethal inflammatory myocardial disease without targeted effective treatment options) is unknown.

Purpose: To investigate the effects of intracoronary infusion of CPCs in rats with experimental autoimmune myocarditis.

Methods: CPCs were grown from hearts explanted from healthy Lewis rats. Autoimmune myocarditis was induced in 26 Lewis rats by subcutaneous rear footpad injection of porcine cardiac myosin supplemented with Freund's Adjuvant with Mycobacterium Tuberculosis on days 0 and 7. On day 10, rats underwent lateral thoracotomy and were subsequently randomized to undergo intracoronary infusion of 500,000 CPCs or vehicle solution. Intracoronary infusion was achieved through infusion of cells or vehicle into the left ventricular cavity during brief aortic clamping. Rats were followed for 18 days post-infusion and underwent echocardiography on days 0, 10 (prior to infusion) and 28. Afterwards, rats were euthanized, hearts were explanted and studied at the histological and immunohistochemical level to assess inflammatory infiltration and fibrosis of myocardium. 14 rats reached the 28 days of the protocol. Of those, 8 rats belonged in the control group and 6 in the cell therapy group.

Results: Histologically-confirmed autoimmune myocarditis was induced in all 14 rats which completed the 28days of protocol. Left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular volumes (end systolic and end diastolic) were comparable on day 0 and on day 10 between groups. Intracoronary CPC infusion prevented myocarditis-induced functional depression and left ventricular dilation; LVEF was significantly increased (81.5 ± 2.7 vs 65.4 ± 7.8 , $p < 0.001$) and left ventricular end systolic volume (LVESV) was significantly decreased (43.3 ± 15.1 μ l vs 100 ± 24.5 μ l, $p < 0.001$) in CPC-treated animals compared to controls at 18 days post-infusion. Infusion of CPCs resulted in significant attenuation inflammatory infiltration of myocardial ($7.4 \pm 6.7\%$ vs $20.7 \pm 3.5\%$ of the myocardium, $p = 0.007$), significant reduction of cardiac fibrosis ($16.6\% \pm 12.7\%$ vs $38.1 \pm 2.6\%$ of the myocardium, $p = 0.008$) and significant reduction of myocardial T cell

infusion (30.4 ± 29 vs 125.8 ± 49.3 cells per high power field, $p=0.005$) at 28 day of protocol compared to controls.

Conclusions: Intracoronary infusion of CPCs attenuates myocardial inflammation, fibrosis and T cell infiltration, while preserving systolic function and preventing adverse remodeling in rats with experimental autoimmune myocarditis.

VIII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996;93:841–2.
2. Kindermann I, Barth C, Mahfoud F, Ukena C, Lenski M, Yilmaz A, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U, Cooper LT, Böhm M. Update on myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Feb 28;59(9):779-92.
3. Dominguez F, Kühl U, Pieske B, Garcia-Pavia P, Tschöpe C. Update on Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy: Reemergence of Endomyocardial Biopsy. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2016 Feb;69(2):178-87.
4. Caforio AL, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J*. 2013; 34:2636–48.
5. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis: a histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol*. 1987;1(1):3-14.
6. Aretz HT. Myocarditis: The Dallas criteria. *Hum Pathol*. 1987;18:619–24.
7. Mason, Trehan, Renlund, Myocarditis in Cardiovascular Disease, Willerson and Cohn, 2007
8. Breinholt JP, Moulik M, Dreyer WJ, Denfield SW, Kim JJ, Jefferies JL, Rossano JW, Gates CM, Clunie SK, Bowles KR, Kearney DL, Bowles NE, Towbin JA. Viral epidemiologic shift in inflammatory heart disease: the increasing involvement of parvovirus B19 in the myocardium of pediatric cardiac transplant patients. *J Heart Lung Transplant*. 2010;29:739–746.
9. Fung G, Luo H, Qiu Y, Yang D, McManus B. Myocarditis. *Circ Res*. 2016 Feb 5;118(3):496-514. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306573.
10. Krejci J, Mlejnek D, Sochorova D, Nemec P, Inflammatory Cardiomyopathy: A Current View on the Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment. *Biomed Res Int*. 2016;2016:4087632. doi: 10.1155/2016/4087632. Epub 2016 Jun 12.
11. Heymans S, Eriksson U, Lehtonen J³, Cooper LT Jr The Quest for New Approaches in Myocarditis and Inflammatory Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 2016 Nov 29;68(21):2348-2364. doi: 10.1016/j.jacc.2016.09.937.
12. Ellis NM, Kurahara DK, Vohra H, et al. Priming the immune system for heart disease: a perspective on group A streptococci. *J Infect Dis* 2010; 202:1059–67.
13. Karatolios K, Maisch B, Pankuweit S. Suspected inflammatory cardiomyopathy. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in endomyocardial biopsies with positive serological evidence. *Herz* 2015;40 Suppl 1:91–5.

14. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, et al. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007;115:1109–23.
15. Burke A, Saenger J, Mullick F, et al. Hypersensitivity myocarditis. *Arch Pathol Lab Med* 1991; 115:764–9.
16. Haas SJ, Hill R, Krum H, et al. Clozapine associated myocarditis: a review of 116 cases of suspected myocarditis associated with the use of clozapine in Australia during 1993–2003. *Drug Safety* 2007;30:47–57.
17. Cook SC, Ferguson BA, Cotes RO, et al. Clozapine-induced myocarditis: prevention and considerations in rechallenge. *Psychosomatics* 2015;56:685–90.
18. Engler RJ, Nelson MR, Collins LC Jr., et al. A prospective study of the incidence of myocarditis/ pericarditis and new onset cardiac symptoms following smallpox and influenza vaccination. *PLoS One* 2015;10:e0118283.
- 19.. Kandolin R, Lehtonen J, Salmenkivi K, et al. Diagnosis, treatment, and outcome of giant-cell myocarditis in the era of combined immunosuppression. *Circ Heart Failure* 2013;6:15–22.
20. Maleszewski JJ, Orellana VM, Hodge DO, et al. Long-term risk of recurrence, morbidity and mortality in giant cell myocarditis. *Am J Cardiol* 2015; 115:1733–8.
21. Kuhl U, Pauschinger M, Noutsias M, Seeberg B, Bock T, Lassner D, et al. High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with “idiopathic” left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2005;111: 887–93.
22. Sinagra G, Anzini M, Pereira NL, Bussani R, Finocchiaro G, Bartunek J, Merlo M. Myocarditis in Clinical Practice. *Mayo Clin Proc*. 2016 Sep;91(9):1256-66. doi: 10.1016/j.mayocp.2016.05.013. Review.
23. Li L, Zhang Y, Burke A, Xue A, Zhao Z, Fowler D, Shen Y, Li L. Demographic, clinical and pathological features of sudden deaths due to myocarditis: Results from a state-wide population-based autopsy study. *Forensic Sci Int*. 2017 Mar;272:81-86. doi: 10.1016/j.forsciint.2016.12.037. Epub 2017 Jan 3.
24. Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015;386:743–800.
25. D’Ambrosio A, Patti G, Manzoli A, et al. The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review. *Heart* 2001;85:499 –504.
26. Cooper LT Jr., Keren A, Sliwa K, et al. The global burden of myocarditis: part 1: a systematic literature review for the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors 2010 study. *Glob Heart* 2014;9:121–9.

27. Maron BJ, Udelson JE, Bonow RO, et al. Eligibility and disqualification recommendations for competitive athletes with cardiovascular abnormalities: Task Force 3: hypertrophic cardiomyopathy, arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy and other cardiomyopathies, and myocarditis: a scientific statement from the American Heart Association and American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:2362–71.
28. Fabre A, Sheppard MN. Sudden adult death syndrome and other non-ischaemic causes of sudden cardiac death. *Heart* 2006;92: 316 –20.
29. Matoba R, Shikata I, Iwai K, et al. An epidemiologic and histopathological study of sudden cardiac death in Osaka Medical Examiner's Office. *Jpn Circ J* 1989;53:1581–8.
30. Kyto V., Saraste A., Voipio-Pulkki L.M., Saukko P., Incidence of fatal myocarditis: a population-based study in Finland, *Am. J. Epidemiol.* 165 (2007) 570- 574.
31. Okada R., Kawai S., Kasyuya H., Nonspecific myocarditis: a statistical and clinicopathological study of autopsy cases, *Jpn Circ J* 53 (1989) 40-48.
32. Loire R., Tabib A., [Unexpected sudden cardiac death. An evaluation of 1000 autopsies], *Arch Mal Coeur Vaiss* 89 (1996) 13-18.
33. Wentworth P., Jentz L.A., Croal A.E., Analysis of sudden unexpected death in 13 southern Ontario, with emphasis on myocarditis, *Can. Med. Assoc. J.* 120 (1979) 676-680, 706.
34. Doolan A., Langlois N., Semsarian C., Causes of sudden cardiac death in young Australians, *Med J Aust* 180 (2004) 110-112.
35. Wang H., Yao Q., Zhu S., Zhang G., Wang Z., Li Z., et al., The autopsy study of 553 cases of sudden cardiac death in Chinese adults, *Heart Vessels* 29 (2014) 486- 495.
36. Maron BJ, Levine BD, Washington RL, Baggish AL, Kovacs RJ, Maron MS; American Heart Association Electrocardiography and Arrhythmias Committee of the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Cardiovascular and Stroke Nursing, Council on Functional Genomics and Translational Biology, and the American College of Cardiology. Eligibility and Disqualification Recommendations for Competitive Athletes With Cardiovascular Abnormalities: Task Force 2: Preparticipation Screening for Cardiovascular Disease in Competitive Athletes: A Scientific Statement From the American Heart Association and American College of Cardiology. *Circulation*. 2015;132:e267–e272. doi: 10.1161/CIR.0000000000000238.
37. Kyto V, Sipila J, Rautava P. Gender differences in myocarditis: A nationwide study in Finland. *Eur Heart J*. 2013;34
38. Cooper LT Jr, Berry GJ, Shabetai R. Idiopathic giant-cell myocarditis– natural history and treatment. Multicenter Giant Cell Myocarditis StudyGroup Investigators. *N Engl J Med*. 1997;336:1860–1866. doi: 10.1056/ NEJM199706263362603.

39. Amabile N, Fraisse A, Bouvenot J, Chetaille P, Ovaert C. Outcome of acute fulminant myocarditis in children. *Heart*. 2006;92:1269–1273. doi: 10.1136/hrt.2005.078402.
40. Saji T, Matsuura H, Hasegawa K, Nishikawa T, Yamamoto E, Ohki H, Yasukochi S, Arakaki Y, Joo K, Nakazawa M. Comparison of the clinical presentation, treatment, and outcome of fulminant and acute myocarditis in children. *Circ J*. 2012;76:1222–1228.
41. Mason JW, O’Connell JB, Herskowitz A, Rose NR, McManus BM, Billingham ME, Moon TE. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. The Myocarditis Treatment Trial Investigators. *N Engl J Med*. 1995;333:269–275. doi: 10.1056/NEJM199508033330501.
42. Caforio AL, Calabrese F, Angelini A, Tona F, Vinci A, Bottaro S, Ramondo A, Carturan E, Iliceto S, Thiene G, Daliento L. A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis. *Eur Heart J*. 2007;28:1326–1333. doi: 10.1093/eurheartj/ehm076.
43. Magnani JW, Danik HJ, Dec GW Jr, DiSalvo TG. Survival in biopsy-proven myocarditis: a long-term retrospective analysis of the histopathologic, clinical, and hemodynamic predictors. *Am Heart J*. 2006;151:463–470. doi: 10.1016/j.ahj.2005.03.037.
44. Fairweather D, Cooper LT Jr, Blauwet LA. Sex and gender differences in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Curr Probl Cardiol*. 2013;38:7–46. doi: 10.1016/j.cpcardiol.2012.07.003.
45. Magnani JW, Dec GW. Myocarditis: current trends in diagnosis and treatment. *Circulation*. 2006;113:876–890.
- 46 Krejc J., Poloczko H., Hude P. et al., “Impact of inflammatory infiltration and viral genome presence in myocardium on the changes of echocardiographic parameters,” *Cor et Vasa*, vol. 55, no. 4, pp. e333–e340, 2013.
47. Kühl U, “Antiviral treatment of myocarditis and acute dilated cardiomyopathy,” *Heart Failure Clinics*, vol. 1, no. 3, pp. 467–474, 2005.
48. Felker GM, Thompson RE, Hare JM, et al. Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2000;342(15):1077-1084.
49. Hufnagel G, Pankuweit S, Richter A, Schönlau U, Maisch B. The European Study of Epidemiology and Treatment of Cardiac Inflammatory Diseases (ESETCID): first epidemiological results. *Herz*. 2000;25(3):279-285.
50. Carniel E, Sinagra G, Bussani R, et al. Fatal myocarditis: morphologic and clinical features. *Ital Heart J*. 2004;5(9):702-706.

51. Kandolin R, Lehtonen J, Airaksinen J, et al. Cardiac sarcoidosis: epidemiology, characteristics, and outcome over 25 years in a nationwide study. *Circulation* 2015;131:624–32.
52. Roberts WC, McAllister HA Jr., Ferrans VJ. Sarcoidosis of the heart. A clinicopathologic study of 35 necropsy patients (group I) and review of 78 previously described necropsy patients (group II). *Am J Med* 1977;63:86–108.
53. Kandolin R, Lehtonen J, Salmenkivi K, et al. Diagnosis, treatment, and outcome of giant-cell myocarditis in the era of combined immunosuppression. *Circ Heart Failure* 2013;6:15–22.
54. Ekström K, Lehtonen J, Kandolin R, et al. Longterm outcome and its predictors in giant cell myocarditis. *Eur J Heart Failure* 2016 Jul 13
55. Whitehead R. Isolated myocarditis. *Brit Heart J* 1965;27:220–30.
56. Kytö V, Saukko P, Lignitz E, et al. Diagnosis and presentation of fatal myocarditis. *Hum Pathol* 2005;36:1003–7.
57. Davidoff R, Palacios I, Southern J, et al. Giant cell versus lymphocytic myocarditis. A comparison of their clinical features and long-term outcomes. *Circulation* 1991;83:953–61.
58. Kuethe F, Lindner J, Matschke K, Wenzel JJ, Norja P, Ploetze K, Schaal S, Kamvissi V, Bornstein SR, Schwanebeck U, Modrow S. Prevalence of parvovirus B19 and human bocavirus DNA in the heart of patients with no evidence of dilated cardiomyopathy or myocarditis. *Clin Infect Dis*. 2009 Dec 1;49(11):1660-6. doi: 10.1086/648074.
59. Escher F., Modrow S., Sabi T. et al., “Parvovirus B19 profiles in patients presenting with acute myocarditis and chronic dilated cardiomyopathy,” *Medical Science Monitor*, vol. 14, no. 12, pp. CR589–CR597, 2008.
60. Koepsell S. A., Anderson D. R., and Radio S. J., “Parvovirus B19 is a bystander in adult myocarditis,” *Cardiovascular Pathology*, vol. 21, no. 6, pp. 476–481, 2012.
61. Stewart G. C., Lopez-Molina J., R. V. S. R. K. Gottumukkala et al., “Myocardial Parvovirus B19 persistence: lack of association with clinicopathologic Phenotype in adults with heart failure,” *Circulation: Heart Failure*, vol. 4, no. 1, pp. 71–78, 2011.
62. Caforio A. L. P., Calabrese F., Angelini A. et al., “A prospective study of biopsy-proven myocarditis: prognostic relevance of clinical and aetiopathogenetic features at diagnosis,” *European Heart Journal*, vol. 28, no. 11, pp. 1326–1333, 2007.
63. Kühl U., Lassner D., von Schlippenbach J., Poller W., and Schultheiss H.-P., “Interferon-beta improves survival in enterovirus associated cardiomyopathy,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 60, no. 14, pp. 1295–1296, 2012.
64. Kindermann I., Kindermann M., Kandolf R. et al., “Predictors of outcome in patients with suspected myocarditis,” *Circulation*, vol. 118, no. 6, pp. 639–648, 2008.

65. Bock C.-T., Klingel K., and Kandolf R., “Humanparvovirus B19-associated myocarditis,” *New England Journal of Medicine*, vol. 362, no. 13, pp. 1248–1249, 2010.
66. Pankuweit S. and Klingel K., “Viral myocarditis: from experimental models to molecular diagnosis in patients,” *Heart Failure Reviews*, vol. 18, no. 6, pp. 683–702, 2013.
67. Bock C. T., Duchting A., and Utta F., “Molecular phenotypes of human parvovirus B19 in patients with myocarditis,” *World Journal of Cardiology*, vol. 6, pp. 183–195, 2014.
68. Lassner D., Rohde M., Siegismund C. S. et al., “Myocarditis—personalized medicine by expanded endomyocardial biopsy diagnostics,” *World Journal of Cardiovascular Diseases*, vol. 4, no. 6, pp. 325–340, 2014.
69. Grun S, Schumm J, Greulich S, et al. Long-term follow-up of biopsy-proven viral myocarditis: predictors of mortality and incomplete recovery. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:1604-1615.
70. Maisch B. and Pankuweit S., Current treatment options in (peri)myocarditis and inflammatory cardiomyopathy, *Herz*, vol. 37, no. 6, pp. 644–656, 2012.
71. Klingel K, Sauter M, Bock CT, Szalay G, Schnorr JJ, Kandolf R. Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. *Med Microbiol Immunol*. 2004;193:101–107. doi: 10.1007/s00430-003-0190-1.
72. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation*. 2001;104:1076–1082.
73. Yajima T, Knowlton KU. Viral myocarditis: from the perspective of the virus. *Circulation*. 2009;119:2615–2624. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.766022.
74. Cooper Jr. L. T., “Myocarditis,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 15, pp. 1526–1538, 2009.
75. Dennert R., Crijns H. J., and Heymans S., “Acute viralmyocarditis,” *EuropeanHeart Journal*, vol. 29,no. 17, pp. 2073–2082, 2008.
76. Freimuth P, Philipson L, Carson SD. The coxsackievirus and adenovirus receptor. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008;323:67– 87.
77. Shi Y, Chen C, Lisewski U, et al. Cardiac deletion of the Cocksackievirus-adenovirus receptor abolishes Cocksackievirus B3 infection and prevents myocarditis in vivo. *J Am Coll Cardiol* 2009;53:1219 –26.
78. Noutsias M, Fechner H, de Jonge H, et al. Human coxsackieadenovirus receptor is colocalized with integrins alpha(v)beta(3) and alpha(v)beta(5) on the cardiomyocyte sarcolemma and upregulated in dilated cardiomyopathy: implications for cardiotropic viral infections. *Circulation* 2001;104:275– 80.

79. Liu PP, Mason JW. Advances in the understanding of myocarditis. *Circulation* 2001;104:1076–82.
80. Kawai C. From myocarditis to cardiomyopathy: mechanisms of inflammation and cell death: learning from the past for the future. *Circulation*. 1999;99:1091–1100.
81. Caforio A. L. P., Bottaro S., and Iliceto S., “Dilated cardiomyopathy (DCM) and myocarditis: classification, clinical and autoimmune features,” *Applied Cardiopulmonary Pathophysiology*, vol.16, no. 1, pp. 82–95, 2012.
82. Wehlou C. and Delanghe J. R., “Detection of antibodies in cardiac autoimmunity,” *Clinica Chimica Acta*, vol. 408, no. 1-2, pp. 114–122, 2009.
83. Caforio A. L. P., Mahon N. J., Tona F., and McKenna W. J., “Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance,” *European Journal of Heart Failure*, vol. 4, no. 4, pp. 411–417, 2002.
84. Rose N. R., “Myocarditis: infection versus autoimmunity,” *Journal of Clinical Immunology*, vol. 29, no. 6, pp. 730–737, 2009.
85. Schultheiss H.-P., Kühl U., and Cooper L.T., “The management of myocarditis,” *European Heart Journal*, vol. 32, no. 21, pp. 2616–2625, 2011.
86. D’Ambrosio A., Patti G., Manzoli A. et al., “The fate of acute myocarditis between spontaneous improvement and evolution to dilated cardiomyopathy: a review,” *Heart*, vol. 85, no. 5, pp.499–504, 2001.
88. Caforio A. L. P., Pankuweit S., Arbustini E. et al., “Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: a position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases,” *European Heart Journal*, vol. 34, no. 33, pp. 2636–2648, 2013.
89. Caforio A. L. P., Marcolongo R., Basso C., and Iliceto S., “Clinical presentation and diagnosis of myocarditis,” *Heart*, vol. 101, no.16, pp. 1332–1344, 2015.
90. Nathan C, Prendergast TJ, Wiebe M et al. Activation of human macrophages. Comparison of other cytokines with interferon gamma. *J Exp Med* 1984;160:600–5.
91. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P. Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 1989;170:655–63.
92. Eriksson U, Ricci R, Hunziker L, et al. Dendritic cell-induced autoimmune heart failure requires cooperation between adaptive and innate immunity. *Nat Med* 2003;9:1484–90.
93. Kaya Z, Katus HA, Rose NR. Cardiac troponins and autoimmunity: their role in the pathogenesis of myocarditis and of heart failure. *Clin Immunol* 2010;134:80–8.

94. Watanabe K, Arumugam S, Sreedhar R, et al. Small interfering RNA therapy against carbohydrate sulfotransferase 15 inhibits cardiac remodeling in rats with dilated cardiomyopathy. *Cell Signal* 2015;27:1517–24.
95. Kandolf R, Canu A, Hofschneider PH. Coxsackie B3 virus can replicate in cultured human foetal heart cells and is inhibited by interferon. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:167–81.
96. Bonney K, Engman D. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. *Am J Pathol* 2015;185:1537–47.
97. Mocelin A, Issa V, Bacal F, et al. The influence of aetiology on inflammatory and neurohumoral activation in patients with severe heart failure: a prospective study comparing Chagas' heart disease and idiopathic dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Failure* 2005;7:869–73.
98. Blyszczuk P, Kania G, Dieterle T, et al. Myeloid differentiation factor-88/interleukin-1 signaling controls cardiac fibrosis and heart failure progression in inflammatory dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2009;105:912–20.
99. Kania G, Blyszczuk P, Eriksson U. Mechanisms of cardiac fibrosis in inflammatory heart disease. *Trends Cardiovasc Med* 2009;19:247–52.
100. Frieler RA, Mortensen RM. Immune cell and other noncardiomyocyte regulation of cardiac hypertrophy and remodeling. *Circulation* 2015;131: 1019–30.
101. Delgado C, Ruiz-Hurtado G, Gómez- Hurtado N, et al. NOD1, a new player in cardiac function and calcium handling. *Cardiovasc Res* 2015;106:375–86.
102. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Kothe K, et al. Mphi1 and Mphi2 can be re-polarized by Th2 or Th1 cytokines, respectively, and respond to exogenous danger signals. *Immunobiology* 2006;211:473–86.
103. Cheung C, Luo H, Yanagawa B, et al. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in coxsackievirus-induced myocarditis. *Cardiovasc Pathol* 2006;15:63–74.
104. Rienks M, Papageorgiou AP. Novel regulators of cardiac inflammation: matricellular proteins expand their repertoire. *J Mol Cell Cardiol* 2016; 91:172–8.
105. Epelman S, Liu PP, Mann DL. Role of innate and adaptive immune mechanisms in cardiac injury and repair. *Nat Rev Immunol* 2015;15:117–29.
106. Jenke A, Wilk S, Poller W, et al. Adiponectin protects against Toll-like receptor 4-mediated cardiac inflammation and injury. *Cardiovasc Res* 2013;99:422–31.
107. Frisancho-Kiss S, Davis SE, Nyland JF, et al. Cutting edge: cross-regulation by TLR4 and T cell Ig mucin-3 determines sex differences in inflammatory heart disease. *J Immunol* 2007;178: 6710–4.

108. Fairweather D, Yusung S, Frisancho S, et al. IL-12 receptor b1 and Toll-like receptor 4 increase IL-1b- and IL-18-associated myocarditis and coxsackievirus replication. *J Immunol* 2003;170: 4731–7.
109. Riad A, Meyer zu Schwabedissen H, Weitmann K, et al. Variants of Toll-like receptor 4 predict cardiac recovery in patients with dilated cardiomyopathy. *J Biol Chem* 2012;287:27236–43.
110. Pagni PP, Traub S, Demaria O, et al. Contribution of TLR7 and TLR9 signaling to the susceptibility of MyD88-deficient mice to myocarditis. *Autoimmunity* 2010;43:275–87.
111. Abston ED, Coronado MJ, Bucek A, et al. Th2 regulation of viral myocarditis in mice: different roles for TLR3 versus TRIF in progression to chronic disease. *Clin Dev Immunol* 2012;2012: 129486.
112. Su Z, Zhang P, Yu Y, et al. HMGB1 facilitated macrophage reprogramming towards a proinflammatory M1-like phenotype in experimental autoimmune myocarditis development. *Sci Rep* 2016;6:21884.
113. Eriksson U, Kurrer MO, Sonderegger I, et al. β Activation of dendritic cells through the interleukin 1 receptor 1 is critical for the induction of autoimmune myocarditis. *J Exp Med* 2003;197: 323–31.
114. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, et al. Macrophages participate in IL-17-mediated inflammation. *Eur J Immunol* 2012;42:726–36.
115. Leuschner F, Courties G, Dutta P, et al. Silencing of CCR2 in myocarditis. *Eur Heart J* 2015;36:1478–88.
116. Cooper LT Jr., Fairweather D. Nano-scale treatment for a macro-scale disease: nanoparticle-delivered siRNA silences CCR2 and treats myocarditis. *Eur Heart J* 2015;36:1434–6.
117. Göser S, Ottl R, Brodner A, et al. Critical role for monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-1a in induction of experimental autoimmune myocarditis and effective anti-monocyte chemoattractant protein- 1 gene therapy. *Circulation* 2005;112:3400–7.
118. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010;11:889–96.
119. Martinez FO, Sica A, Mantovani A, et al. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci* 2008;13:453–61.
120. Barin JG, Rose NR, Ciháková D. Macrophage diversity in cardiac inflammation: a review. *Immunobiology* 2012;217:468–75.
121. Cihakova D, Barin JG, Afanasyeva M, et al. Interleukin-13 protects against experimental autoimmune myocarditis by regulating macrophage differentiation. *Am J Pathol* 2008;172: 1195–208.

122. Kania G, Blyszczuk P, Stein S, et al. Heart infiltrating prominin-1+/CD133+ progenitor cells represent the cellular source of transforming growth factor b-mediated cardiac fibrosis in experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 2009;105:462–70.
123. Blyszczuk P, Müller-Edenborn B, Valenta T, et al. Transforming growth factor-b-dependent Wnt secretion controls myofibroblast formation and myocardial fibrosis progression in experimental autoimmune myocarditis. *Eur Heart J* 2016 Apr 20 [E-pub ahead of print].
124. Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Belardi DF, et al. Quantitative analysis of myocardial inflammation by flow cytometry in murine autoimmune myocarditis: correlation with cardiac function. *Am J Pathol* 2004;164:807–15.
125. Noutsias M, Rohde M, Göldner K, et al. Expression of functional T-cell markers and T-cell receptor Vbeta repertoire in endomyocardial biopsies from patients presenting with acute myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Failure* 2011;13:611–8.
126. Cihakova D, Rose NR. Pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Adv Immunol* 2008;99:95–114.
127. Huber SA. Viral myocarditis and dilated cardiomyopathy: etiology and pathogenesis. *Curr Pharm Des* 2016;22:408–26.
128. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, et al. From infection to autoimmunity. *J Autoimmun* 2001;16: 175–86.
129. Lv H, Havari E, Pinto S, et al. Impaired thymic tolerance to α -myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J Clin Invest* 2011;121: 1561–73.
130. Marty RR, Dirnhofer S, Mauermann N, et al. MyD88 signaling controls autoimmune myocarditis induction. *Circulation* 2006;113:258–65.
131. Nindl V, Maier R, Ratering D, et al. Cooperation of Th1 and Th17 cells determines transition from autoimmune myocarditis to dilated cardiomyopathy. *Eur J Immunol* 2012;42:2311–21.
132. Chen P, Baldeviano GC, Ligons DL, et al. Susceptibility to autoimmune myocarditis is associated with intrinsic differences in CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol* 2012;169:79–88.
133. Eriksson U, Kurrer MO, Sebald W, et al. Dual role of the IL-12/IFN- γ axis in the development of autoimmune myocarditis: induction by IL-12 and protection by IFN- γ . *J Immunol* 2001;167:5464–9.
134. Barin JG, Baldeviano GC, Talor MV, et al. Fatal eosinophilic myocarditis develops in the absence of IFN- γ and IL-17A. *J Immunol* 2013;191: 4038–47.
135. Eriksson U, Kurrer MO, Bingisser R, et al. Lethal autoimmune myocarditis in interferon- γ receptor-deficient mice: enhanced disease severity by impaired inducible nitric oxide synthase induction. *Circulation* 2001;103:18–21.

136. Afanasyeva M, Wang Y, Kaya Z, et al. Interleukin-12 receptor/STAT4 signaling is required for the development of autoimmune myocarditis in mice by an interferon-g-independent pathway. *Circulation* 2001;104:3145–51.
137. Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, et al. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002645.
138. Kania G, Siegert S, Behnke S, et al. Innate signaling promotes formation of regulatory nitric oxide-producing dendritic cells limiting T-cell expansion in experimental autoimmune myocarditis. *Circulation* 2013;127:2285–94.
139. Valaperti A, Marty RR, Kania G, et al. CD11b+ monocytes abrogate Th17 CD4+ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2008;180:2686–95.
140. Rangachari M, Mauermann N, Marty RR, et al. T-bet negatively regulates autoimmune myocarditis by suppressing local production of interleukin17. *J Exp Med* 2006;203:200–19.
141. Baldeviano GC, Barin JG, Talor MV, et al. Interleukin-17A is dispensable for myocarditis but essential for the progression to dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2010;106:1646–55.
142. Myers JM, Cooper LT, Kem DC, et al. Cardiac myosin-Th17 responses promote heart failure in human myocarditis. *JCI Insight* 2016;1:e85851.
143. Ameling S, Herda LR, Hammer E, et al. Myocardial gene expression profiles and cardiodepressant autoantibodies predict response of patients with dilated cardiomyopathy to immunoadsorption therapy. *Eur Heart J* 2013;34:666–75.
144. Staudt A, Böhm M, Knebel F, et al. Potential role of autoantibodies belonging to the immunoglobulin G-3 subclass in cardiac dysfunction among patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 2002;106:2448–53.
145. Caforio AL, Angelini A, Blank M, et al. Passive transfer of affinity-purified anti-heart autoantibodies (AHA) from sera of patients with myocarditis induces experimental myocarditis in mice. *Int J Cardiol* 2015;179:166–77.
146. Okazaki T, Tanaka Y, Nishio R, et al. Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 2003;9:1477–83.
147. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 1989;64:97–103.
148. Amoah BP, Yang H, Zhang P, Su Z, Xu H. Immunopathogenesis of Myocarditis: The Interplay Between Cardiac Fibroblast Cells, Dendritic Cells, Macrophages and CD4+ T Cells. *Scand J Immunol*. 2015 Jul;82(1):1-9. doi: 10.1111/sji.12298.

149. Reddy J, Massilamany C, Buskiewicz I, Huber SA. Autoimmunity in viral myocarditis. *Curr Opin Rheumatol*. 2013 Jul;25(4):502-8. doi: 10.1097/BOR.0b013e3283620036. Review.
150. Rose NR. Myocarditis: infection versus autoimmunity. *J Clin Immunol*. 2009 Nov;29(6):730-7. doi: 10.1007/s10875-009-9339-z. Review.
151. Mavrogeni S., Markousis-Mavrogenis G., Kolovou G. How to approach the great mimic? Improving techniques for the diagnosis of myocarditis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016;14(1):105-15. doi: 10.1586/14779072.2016.1110486. Epub 2015 Nov 11.
152. Jensen LD, Marchant DJ. Emerging pharmacologic targets and treatments for myocarditis. *Pharmacol Ther*. 2016 May;161:40-51. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.03.006. Epub 2016 Mar 20.
153. Escher F, Kuhl U, Lassner D, Stroux A, Westermann D, Skurk C, et al. Presence of perforin in endomyocardial biopsies of patients with inflammatory cardiomyopathy predicts poor outcome. *Eur J Heart Fail*. 2014;16:1066–72.
154. Camelliti P, Green C, Kohl P. Structural and Functional Coupling of Cardiac Myocytes and Fibroblasts, Vol. 42. Basel, Switzerland: Karger Publishers, 2006.
155. Hogaboam CM, Steinhauser ML, Chensue SW, Kunkel SL. Novel roles for chemokines and fibroblasts in interstitial fibrosis. *Kidney Int* 1998;54:2152–9.
156. Eghbali M, Blumenfeld O, Seifter S et al. Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol* 1989;21:103–13.
157. Zhu J, Carver W. Effects of interleukin-33 on cardiac fibroblast gene expression and activity. *Cytokine* 2012;58:368–79.
158. Meneghin A, Hogaboam CM. Infectious disease, the innate immune response, and fibrosis. *J Clin Invest* 2007;117:530–8.
- 159 D_1ez J, Querejeta R, L_opez B, Gonz_alez A, Larman M, Ubago JLM. Losartan-dependent regression of myocardial fibrosis is associated with reduction of left ventricular chamber stiffness in hypertensive patients. *Circulation* 2002;105:2512–7.
- 160 Long CS, Brown RD. The cardiac fibroblast, another therapeutic target for mending the broken heart? *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:1273–8.
- 161 Querejeta R, L_opez B, Gonz_alez A et al. Increased collagen type I synthesis in patients with heart failure of hypertensive origin relation to myocardial fibrosis. *Circulation* 2004;110:1263–8.
162. Caforio AL, Marcolongo R, Jahns R, et al. Immune-mediated and autoimmune myocarditis: clinical presentation, diagnosis and management. *Heart Fail Rev* 2012. [Epub ahead of print].

163. Portig I, Sandmoeller A, Kreilinger S, et al. HLA-DQB1_ polymorphism and associations with dilated cardiomyopathy, inflammatory dilated cardiomyopathy and myocarditis. *Autoimmunity* 2009; 42:33–40.
164. Jin B, Ni H, Geshang Q, et al. HLA-DR4 antigen and idiopathic dilated cardiomyopathy susceptibility: a meta-analysis involving 11,761 subjects. *Tissue Antigens* 2011; 77:107–111.
165. Caforio AL, Mahon NG, Baig MK, et al. Prospective familial assessment in dilated cardiomyopathy: cardiac autoantibodies predict disease development in asymptomatic relatives. *Circulation* 2007; 115:76–83.
166. Dandel M, Wallukat G, Potapov E, et al. Role of beta(1)-adrenoceptor autoantibodies in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy. *Immunobiology* 2012; 217:511–520.
167. Gangaplara A, Massilamany C, Brown DM, et al. Coxsackievirus B3 infection leads to the generation of cardiac myosin heavy chain-alpha-reactive CD4 T cells in A/J mice. *Clin Immunol* 2012; 144:237–249.
168. Massilamany C, Upadhyaya B, Gangaplara A, et al. Detection of autoreactive CD4 T cells using major histocompatibility complex class II dextramers. *BMC Immunol* 2011; 12:40.
169. Massilamany C, Gangaplara A, Steffen D, et al. Identification of novel mimicry epitopes for cardiac myosin heavy chain-alpha that induce autoimmune myocarditis in A/J mice. *Cell Immunol* 2011; 271:438–449.
170. Cosper PF, Harvey PA, Leinwand LA. Interferon-gamma causes cardiac myocyte atrophy via selective degradation of myosin heavy chain in a model of chronic myocarditis. *Am J Pathol* 2012; 181:2038–2046.
171. Fousteri G, Dave A, Morin B, et al. Nasal cardiac myosin peptide treatment and OX40 blockade protect mice from acute and chronic virally-induced myocarditis. *J Autoimmun* 2011; 36:210–220.
172. Caforio AL, Mahon NJ, McKenna WJ. Cardiac autoantibodies to myosin and other heart-specific autoantigens in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity*. 2001;34:199–204.
173. Caforio AL, Tona F, Bottaro S, Vinci A, Dequal G, Daliento L, et al. Clinical implications of anti-heart autoantibodies in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Autoimmunity*. 2008; 41:35–45.
174. Neumann DA, Burek CL, Baughman KL, Rose NR, Herskowitz A. Circulating heart-reactive antibodies in patients with myocarditis or cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol*. 1990;16:839–46.
175. Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199–210.

176. Lauer B, Schannwell M, Kuhl U, Strauer BE, Schultheiss HP. Antimyosin autoantibodies are associated with deterioration of systolic and diastolic left ventricular function in patients with chronic myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:11–8.
177. Wehlou C, Delanghe JR. Detection of antibodies in cardiac autoimmunity. *Clin Chim Acta*. 2009;408(1–2):144–22.
178. Kallwellis-Opara A, Dorner A, Poller WC, Noutsias M, Kuhl U, Schultheiss HP, et al. Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy. *Clin Res Cardiol*. 2007;96: 469–80.
179. Limas CJ, Goldenberg IF, Limas C. Autoantibodies against betaadrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 1989;64:97–103.
180. Fu LX, Magnusson Y, Bergh CH, Liljeqvist JA, Waagstein F, Hjalmarson A, et al. Localization of a functional autoimmune epitope on the muscarinic acetylcholine receptor-2 in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 1993;91:1964–8.
181. Warraich RS, Noutsias M, Kazak I, Seeberg B, Dunn MJ, Schultheiss HP, et al. Immunoglobulin G3 cardiac myosin autoantibodies correlate with left ventricular dysfunction in patients with dilated cardiomyopathy: immunoglobulin G3 and clinical correlates. *Am Heart J*. 2002;143:1076–84.
182. Staudt A, Dorr M, Staudt Y, Bohm M, Probst M, Empen K, et al. Role of immunoglobulin G3 subclass in dilated cardiomyopathy: results from protein A immunoadsorption. *Am Heart J*. 2005;150:729–36.
183. Goser S, Andrassy M, Buss SJ, Leuschner F, Volz CH, Ottl R, et al. Cardiac troponin I but not cardiac troponin T induces severe autoimmune inflammation in the myocardium. *Circulation*. 2006;114:1693–1702.
184. Han Y-l, Li Y-L, Jia L-X et al. Reciprocal interaction between macrophages and T cells stimulates IFN- γ and MCP-1 production in Ang II-induced cardiac inflammation and fibrosis. *PLoS ONE* 2012;7:e35506.
185. Anzini M, Merlo M, Sabbadini G, et al. Long-term evolution and prognostic stratification of biopsy-proven active myocarditis. *Circulation*. 2013;128(22):2384–2394.
186. Jimenez S, Freundlich B, Rosenbloom J. Selective inhibition of human diploid fibroblast collagen synthesis by interferons. *J Clin Invest* 1984;74:1112.
187. Morgera T, Di Lenarda A, Dreaz L, et al. Electrocardiography of myocarditis revisited: clinical and prognostic significance of electrocardiographic changes. *Am Heart J*. 1992;124:455–467.
188. Eckart RE, Love SS, Atwood JE, et al. Incidence and follow-up of inflammatory cardiac complications after smallpox vaccination. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:201–205.

189. Ukena C, Mahfoud F, Kindermann I, et al. Prognostic electrocardiographic parameters in patients with suspected myocarditis. *Eur J Heart Fail*. 2011;13:398–405.
190. Lauer B, Niederau C, Kühl U, et al. Cardiac troponin T in patients with clinically suspected myocarditis. *J Am Coll Cardiol*. 1997;30:1354–1359.
191. Buiatti A, Merlo M, Pinamonti B, De Biasio M, Bussani R, Sinagra G. Clinical presentation and long-term follow-up of perimyocarditis. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*. 2013;14(3): 235-241.
192. Imazio M, Brucato A, Barbieri A, et al. Good prognosis for pericarditis with and without myocardial involvement: results from a multicenter, prospective cohort study. *Circulation*. 2013; 128(1):42-49.
193. Sramko M, Kubánek M, Tintera J, et al. Utility of combination of cardiac magnetic resonance imaging and high-sensitivity cardiac troponin T assay in diagnosis of inflammatory cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 2013;111(2):258-264.
194. Carniel E, Sinagra G, Bussani R, et al. Fatal myocarditis: morphologic and clinical features. *Ital Heart J*. 2004;5:702– 706.
195. Kühl U, Pauschinger M, Bock T, et al. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation*. 2003;108:945–950.
196. Assomull RG, Lyne JC, Keenan N, et al. The role of cardiovascular magnetic resonance in patients presenting with chest pain, raised troponin and unobstructed coronary arteries. *Eur Heart J*. 2007;28:1242–1249.
197. Pinamonti B, Alberti E, Cigalotto A, et al. Echocardiographic findings in myocarditis. *Am J Cardiol*. 1988;62:285–291.
198. Mendes LA, Dec GW, Picard MH, et al. Right ventricular dysfunction: an independent predictor of adverse outcome in patients with myocarditis. *Am Heart J*. 1994;128:301–307.
199. Di Bella G, Coglitore S, Zimbalatti C, et al. Strain Doppler echocardiography can identify longitudinal myocardial dysfunction derived from edema in acute myocarditis. *Int J Cardiol*. 2008;12:279– 280.
200. Smedema JP. Images in cardiovascular medicine: myocardial inflammation in viral peri-myocarditis detected by tissue Doppler echocardiography and magnetic resonance imaging. *Cardiovasc J Afr*. 2007;18:238–240.
201. Dastidar AG, Rodrigues JC, Ahmed N et al. The role of cardiac MRI in patients with troponin-positive chest pain and unobstructed coronary arteries. *Curr Cardiovasc Imaging Rep*. 2015;8(8):28.
202. Friedrich MG1, Sechtem U, Schulz- Menger J, et al. International Consensus Group on Cardiovascular Magnetic Resonance in Myocarditis. Cardiovascular magnetic resonance in myocarditis: A JACC White Paper. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(17):1475–1487.

203. Gagliardi MG, Bevilacqua M, Di Renzi P, et al. Usefulness of magnetic resonance imaging for diagnosis of acute myocarditis in infants and children, and comparison with endomyocardial biopsy. *Am J Cardiol.* 1991;68:1089–1.
204. Gagliardi MG, Polletta B, Di Renzi P. MRI for the diagnosis and follow-up of myocarditis. *Circulation.* 1999;99:458–459.
205. Wagner A, Schulz-Menger J, Dietz R, et al. Long-term follow-up of patients with acute myocarditis by magnetic resonance imaging. *Magma.* 2003;16(1):17–20.
206. Hung MY, Hung MJ, Cheng CW. Use of gallium 67 scintigraphy to differentiate acute myocarditis from acute myocardial infarction. *Tex Heart Inst J.* 2007;34(3):305–309.
207. Martin ME, Moya-Mur JL, Casanova M, et al. Role of noninvasive antimyosin imaging in infants and children with clinically suspected myocarditis. *J Nucl Med.* 2004 Mar;45(3):429–437.
208. Kühl U, Lauer B, Souvatzoglu M, et al. Antimyosin scintigraphy and immunohistologic analysis of endomyocardial biopsy in patients with clinically suspected myocarditis-evidence of myocardial cell damage and inflammation in the absence of histologic signs of myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:1371–1376.
209. Carrió I, Berná L, Ballester M, et al. Indium-111 antimyosin scintigraphy to assess myocardial damage in patients with suspected myocarditis and cardiac rejection. *J Nucl Med.* 1988;29:1893–1900.
210. Bergler-Klein J, Sochor H, Stanek G, et al. 111-monoclonal antimyosin antibody and magnetic resonance imaging in the diagnosis of acute Lyme myopericarditis. *Arch Intern Med.* 1993;153:2696–2700.
211. Vilain D, Collet JP, Sarda L, et al. Acute myocarditis presenting as acute myocardial infarction and sudden death with complete atrioventricular block: value of antimyosin scintigraphy. *J Nucl Cardiol.* 1999;6:547–548.
212. Skouri HN, Dec GW, Friedrich MG, et al. Noninvasive imaging in myocarditis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2085–2093.
213. Lapa C, Reiter T, Li X, et al. Imaging of myocardial inflammation with somatostatin receptor based PET/CT - A comparison to cardiac MRI. *Int J Cardiol.* 2015;194:44–49.
214. Erba PA, Sollini M, Lazzeri E, et al. FDG-PET in cardiac infections. *Semin Nucl Med.* 2013;43(5):377–395.
215. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, et al. Myocarditis: a histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol.* 1987;1(1):3–14.
216. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the

American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology; endorsed by the Heart Failure Society of America and the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2007;28(24):3076-3093.

217. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2013;128(16):e240-e327.

218. Schultz JC, Hilliard AA, Cooper LT Jr, et al. Diagnosis and treatment of viral myocarditis. *Mayo Clin Proc*. 2009;84:1001–1009.

219. Demello DE, Liapis H, Jureidini S, et al. Cardiac localization of eosinophil-granule major basic protein in acute necrotizing myocarditis. *N Engl J Med*. 1990;323:1542–1545.

220. Wojnicz R, Nowalany-Kozielska E, Wojciechowska C, et al. Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results. *Circulation*. 2001;104(1):39-45.

221. Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study. *Eur Heart J*. 2009;30(16):1995-2002.

222. Leone O, Veinot JP, Angelini A, et al. 2011 Consensus statement on endomyocardial biopsy from the Association for European Cardiovascular Pathology and the Society for Cardiovascular Pathology. *Cardiovasc Pathol*. 2012;21(4):245-274.

223. Baccouche H, Mahrholdt H, Meinhardt G, et al. Diagnostic synergy of non-invasive cardiovascular magnetic resonance and invasive endomyocardial biopsy in troponin-positive patients without coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2009;30(23):2869–2879.

224. Camm AJ, Lip GY, De Caterina R, Savelieva I, Atar D, Hohnloser SH, et al. 2012 focused update of the ESC guidelines for the management of atrial fibrillation: An update of the 2010 ESC guidelines for the management of atrial fibrillation—developed with the special contribution of the European Heart Rhythm Association. *Europace*. 2012;14:1385–413.

225. Cooper Jr LT, Berry GJ, Shabetai R. Idiopathic giant-cell myocarditis—natural history and treatment. Multicenter Giant Cell Myocarditis Study Group Investigators. *N Engl J Med*. 1997;336:1860–6.

226. Cooper Jr LT, Hare JM, Tazelaar HD, Edwards WD, Starling RC, Deng MC, et al. Giant Cell Myocarditis Treatment Trial Investigators. Usefulness of immunosuppression for giant cell myocarditis. *Am J Cardiol*. 2008;102:1535–9.

227. Frustaci A, Russo MA, Chimenti C. Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardio-myopathy: The TIMIC study. *Eur Heart J*. 2009;30:1995–2002.

228. McMurray J. J. V., Adamopoulos S., Anker S. D. et al., ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012: the task force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2012 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association (HFA) of the ESC, *European Heart Journal*, vol. 33, no. 14, pp. 1787–1847, 2012.
229. Yancy C. W., Jessup M., Bozkurt B. et al., 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines, *Circulation*, vol. 128, no. 16, pp. e240–e327, 2013.
230. Bahk T. J., Daniels M. D., Leon J. S., Wang K., and Engman D.M. Comparison of angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade for the prevention of experimental autoimmune myocarditis, *International Journal of Cardiology*, vol. 125, no. 1, pp. 85–93, 2008.
231. Saegusa S., Fei Y., Takahashi T. et al., Oral administration of candesartan improves the survival of mice with viral myocarditis through modification of cardiac adiponectin expression, *Cardiovascular Drugs and Therapy*, vol. 21, no. 3, pp. 155–160, 2007.
232. Yuan Z., Shioji K., Kihara Y., Takenaka H., Onozawa Y., and Kishimoto C., Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis: anti-inflammatory effects associated with antioxidant property, *American Journal of Physiology—Heart and Circulatory Physiology*, vol. 286, no. 1, pp. H83–H90, 2004.
233. Pauschinger M., Rutschow S., Chandrasekharan K. et al., Carvedilol improves left ventricular function in murine coxsackievirus-induced acute myocarditis: association with reduced myocardial interleukin-1 β and MMP-8 expression and a modulated immune response, *European Journal of Heart Failure*, vol. 7, no. 4, pp. 444–452, 2005.
234. Xiao J., Shimada M., Liu W., Hu D., and Matsumori A., Anti-inflammatory effects of eplerenone on viral myocarditis, *European Journal of Heart Failure*, vol. 11, no. 4, pp. 349–353, 2009.
235. Shao DD, Suresh R, Vakil V, Gomer RH, Pilling D. Pivotal advance: Th-1 cytokines inhibit, and Th-2 cytokines promote fibrocyte differentiation. *J Leukoc Biol* 2008;83:1323–33.
236. Schultheiss H., Khl U., and Cooper L.T., The management of myocarditis, *European Heart Journal*, vol. 32, no. 21, pp. 2616–2625, 2011.
237. Mason JW, O’Connell JB, Herskowitz A, et al. Myocarditis Treatment Trial Investigators. A clinical trial of immunosuppressive therapy for myocarditis. *N Engl J Med*. 1995; 333(5):269-275.
238. Kühl U, Lassner D, von Schlippenbach J, Poller W, Schultheiss H-P. Interferon-beta improves survival in enterovirus-associated cardiomyopathy [letter]. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(14):1295-1296.

239. McNamara DM, Holubkov R, Starling RC, et al. Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2001;103(18):2254-2259.
240. Kuhl U, Schultheiss HP. Myocarditis: Early biopsy allows for tailored regenerative treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2012;109:361–8.
241. Frustaci A, Chimenti C, Calabrese F, Pieroni M, Thiene G, Maseri A. Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: Virological and immunologic profile of responders versus nonresponders. *Circulation*. 2003;107: 857–63.
242. Richardson P, McKenna W, Bristow M, Maisch B, Mautner B, O’Connell J, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation*. 1996;93:841–2.
243. Cooper Jr LT, Hare JM, Tazelaar HD, Edwards WD, Starling RC, Deng MC, et al. Giant Cell Myocarditis Treatment Trial Investigators. Usefulness of immunosuppression for giant cell myocarditis. *Am J Cardiol*. 2008;102:1535–9.
244. Metzgeroth G, Walz C, Erben P, Popp H, Schmitt-Graeff A, Haferlach C, et al. Safety and efficacy of imatinib in chronic eosinophilic leukaemia and hypereosinophilic syndrome: A phase-II study. *Br J Haematol*. 2008;143:707–15.
245. Frustaci A., Russo M.A., and Chimenti C., Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study, *European Heart Journal*, vol. 30, no. 16, pp. 1995–2002, 2009.
246. Wojnicz R., Nowalany-Kozielska E., Wojciechowska C. et al., Randomized, placebo- controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy. Two year follow-up results, *Circulation*, vol. 104, no. 1, pp. 39–45, 2001.
247. Lu C., Qui F., Yan Y., Liu T., Li J., and Chen H., Immunosuppressive treatment for myocarditis: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Journal of Cardiovascular Medicine*, 2014.
248. Dennert R, Velthuis S, Schalla S, et al. Intravenous immunoglobulin therapy for patients with idiopathic cardiomyopathy and endomyocardial biopsy-proven high PVB19 viral load. *Antivir Ther*. 2010;15(2):193-201.
249. Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Maruoka S, Horie T. IL-4 and IL- 13 induce myofibroblastic phenotype of human lung fibroblasts through c-Jun NH2-terminal kinase–dependent pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107:1001–8.
250. Kubánek M, Sramko M, Berenová D, et al. Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in endomyocardial biopsy specimens in individuals with recent-onset dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail*. 2012;14(6):588-596.

251. Dennert R, van Paassen P, Wolffs P, et al. Differences in virus prevalence and load in the hearts of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy with and without immunemediated inflammatory diseases. *Clin Vaccine Immunol*. 2012; 19(8):1182-1187.
252. Moimas S, Zacchigna S, Merlo M, et al. Idiopathic dilated cardiomyopathy and persistent viral infection: lack of association in a controlled study using a quantitative assay. *Heart Lung Circ*. 2012;21(12):787-793.
253. Maisch B. and Pankuweit S., Current treatment options in (peri)myocarditis and inflammatory cardiomyopathy, *Herz*, vol. 37, no. 6, pp. 644–656, 2012.
254. Staudt A., Hummel A., Ruppert J. et al., Immunoabsorption in dilated cardiomyopathy: 6-month results from a randomized study, *American Heart Journal*, vol. 152, no. 4, pp. 712.e1–712.e6, 2006.
255. Felix S.B., Staudt A., and D'orffler W.V., Hemodynamic effects of immunoabsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study, *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 35, no. 6, pp. 1590–1598, 2000.
256. Kuhl U, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, Seeberg B, Lober C, Noutsias M, et al. Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction. *Circulation*. 2003;107:2793–8.
257. Bock CT, Klingel K, Kandolf R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N Engl J Med*. 2010;362:1248–9.
258. Schmidt-Lucke C, Spillmann F, Bock T, Kuhl U, Van Linthout S, Schultheiss HP, et al. Interferon beta modulates endothelial damage in patients with cardiac persistence of human parvovirus B19 infection. *J Infect Dis*. 2010;201:936–45.
259. Kuhl U, Lassner D, Wallaschek N, Gross UM, Krueger GR, Seeberg B, et al. Chromosomally integrated human herpesvirus 6 in heart failure: Prevalence and treatment. *Eur J Heart Fail*. 2015;17:9–19.
260. Moretti M, Buiatti A, Merlo M, et al. Usefulness of high-dose intravenous human immunoglobulins treatment for refractory recurrent pericarditis. *Am J Cardiol*. 2013;112(9):1493-1498.
261. Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T, Shibata A. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;57:250-262.
262. Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M. In vivo lymphocyte-mediated myocardial injuries demonstrated by adoptive transfer of experimental autoimmune myocarditis. *Circulation* 1992;85:1918-1926.
263. Okura Y, Yamamoto T, Goto S, Inomata T, Hirono S, Hanawa H, Feng L, Wilson CB, Kihara I, Izumi T, Shibata A, Aizawa Y, Seki S, Abo T. Characterization of

cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:491-502.

264. Hirono S, Islam MO, Nakazawa M, Yoshida Y, Kodama M, Shibata A, Izumi T, Imai S. Expression of inducible nitric oxide synthase in rat experimental autoimmune myocarditis with special reference to changes in cardiac hemodynamics. *Circ Res* 1997;80:11-20.

265. Shioji K, Kishimoto C, Nakayama Y, Sasayama S. Strain difference in rats with experimental giant cell myocarditis. *Jpn Circ J* 2000;64:283-286.

266. Kodama M, Hanawa H, Saeki M, Hosono H, Inomata T, Suzuki K, Shibata A. Rat dilated cardiomyopathy after autoimmune giant cell myocarditis. *Circ Res*. 1994 Aug;75(2):278-84.

267. Tanaka K, Honda M, Takabatake T. Redox regulation of MAPK pathways and cardiac hypertrophy in adult rat cardiac myocyte. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:676–85.

268. Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Zhang SS, Hanawa H, Itoh E, et al. Characteristics of giant cells and factors related to the formation of giant cells in myocarditis. *Circ Res* 1991;69:1042–50.

269. Ishikane S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Hayakawa K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kangawa K, Ikeda T. Allogeneic administration of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells attenuates acute myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Nov;49(5):753-61. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.07.019. Epub 2010 Aug 6.

270. Kodama M, Zhang S, Hanawa H, Shibata A. Immunohistochemical characterization of infiltrating mononuclear cells in the rat heart with experimental autoimmune giant cell myocarditis. *Clin Exp Immunol* 1992;90:330–5.

271. Hanawa H, Tsuchida M, Matsumoto Y, Watanabe H, Abo T, Sekikawa H, et al. Characterization of T cells infiltrating the heart in rats with experimental autoimmune myocarditis. Their similarity to extrathymic T cells in mice and the site of proliferation. *J Immunol* 1993;150:5682–95.

272. Palaniyandi SS, Watanabe K, Ma M, Tachikawa H, Kodama M, Aizawa Y. Inhibition of mast cells by interleukin-10 gene transfer contributes to protection against acute myocarditis in rats. *Eur J Immunol* 2004;34:3508–15.

273. Kodama M, Matsumoto Y, Fujiwara M, Masani F, Izumi T, Shibata A. A novel experimental model of giant cell myocarditis induced in rats by immunization with cardiac myosin fraction. *Clin Immunol Immunopathol* 1990;57:250–62.

274. Ohshima M, Yamahara K, Ishikane S, Harada K, Tsuda H, Otani K, Taguchi A, Miyazato M, Katsuragi S, Yoshimatsu J, Kodama M, Kangawa K, Ikeda T. Systemic transplantation of allogenic fetal membrane derived mesenchymal stem cells suppresses Th1 and Th17 T cell responses in experimental autoimmune myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*. 2012 Sep;53(3):420-8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.06.020. Epub 2012 Jul 13.

275. Okura Y, Takeda K, Honda S, Hanawa H, Watanabe H, Kodama M, et al. Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats. *Circ Res* 1998;82:1035–42.
276. Fuse K, Kodama M, Ito M, Okura Y, Kato K, Hanawa H, et al. Polarity of helper T cell subsets represents disease nature and clinical course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *Clin Exp Immunol* 2003;134:403–8.
277. Fuse K, Kodama M, Aizawa Y, Yamaura M, Tanabe Y, Takahashi K, et al. Th1/Th2 balance alteration in the clinical course of a patient with acute viral myocarditis. *Jpn Circ J* 2001;65:1082–4.
278. Cruz-Adalia A, Jimenez-Borreguero LJ, Ramirez-Huesca M, Chico-Calero I, Barreiro O, Lopez-Conesa E, et al. CD69 limits the severity of cardiomyopathy after autoimmune myocarditis. *Circulation* 2010;122:1396–404.
279. Valaperti A, Marty RR, Kania G, Germano D, Mauermann N, Dirnhofer S, et al. CD11b+ monocytes abrogate Th17 CD4+ T cell-mediated experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2008;180:2686–95.
280. Yuan J, Yu M, Li HH, Long Q, Liang W, Wen S, Wang M, Guo HP, Cheng X, Liao YH. Autophagy contributes to IL-17 induced plasma cell differentiation in experimental autoimmunemyocarditis. *Int Immunopharmacol*. 2014 Jan;18(1):98-105. doi: 10.1016/j.intimp.2013.11.008. Epub 2013 Nov 21.
281. Schmerler P, Jeuthe S, O h-Ici D, Wassilew K, Lauer D, Kaschina E, Kintscher U, Müller S, Muench F, Kuehne T, Berger F, Unger T, Steckelings UM, Paulis L, Messroghli D. Mortality and morbidity in different immunization protocols for experimental autoimmune myocarditis in rats. *Acta Physiol (Oxf)*. 2014 Apr;210(4):889-98. doi: 10.1111/apha.12227. Epub 2014 Feb 24.
282. Myers JM, Fairweather D, Huber SA, Cunningham MW. Autoimmune myocarditis, valvulitis, and cardiomyopathy. *Curr Protoc Immunol*. 2013;Chapter 15:Unit 15.14.1-51. doi: 10.1002/0471142735.im1514s101.
283. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell*. 2013 Jun 6;12(6):689-98. doi: 10.1016/j.stem.2013.05.008.
284. Moretti A., Caron L., Nakano A., Lam J.T., Bernshausen A., Chen Y., Qyang Y., Bu L., Sasaki M., Martin-Puig S., et al. (2006). Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. *Cell* 127, 1151–1165.
285. Wu S.M., Fujiwara Y., Cibulsky S.M., Clapham D.E., Lien C.L., Schultheiss T.M., and Orkin S.H. (2006). Developmental origin of a bipotential myocardial and smooth muscle cell precursor in the mammalian heart. *Cell* 127, 1137– 1150.
286. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P.

Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.

287. 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.

288. Malliaras K., Zhang Y., Seinfeld J., Galang G., Tseliou E., Cheng K., Sun B., Aminzadeh M., and Marban E. (2013). Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO Mol Med* 5, 191–209.

289. Mollova, M., Bersell, K., Walsh, S., Savla, J., Das, L.T., Park, S.Y., Silberstein, L.E., Dos Remedios, C.G., Graham, D., Colan, S., and Ku' hn, B. (2013). Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 1446–1451.

290. Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., Wu, T.D., Guerquin-Kern, J.L., Lechene, C.P., and Lee, R.T. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* 493, 433–436.

291. Oberpriller, J.O., and Oberpriller, J.C. (1974). Response of the adult newt ventricle to injury. *J. Exp. Zool.* 187, 249–253.

292. Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí', M., Raya, A., and Izpisu' a Belmonte, J.C. (2010). Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature* 464, 606–609.

293. Poss, K.D., Wilson, L.G., and Keating, M.T. (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298, 2188–2190.

294. Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078–1080.

295. Kouskoff, V., Lacaud, G., Schwantz, S., Fehling, H.J., and Keller, G. (2005). Sequential development of hematopoietic and cardiac mesoderm during embryonic stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 13170–13175.

296. Kattman, S.J., Huber, T.L., and Keller, G.M. (2006). Multipotent flk-1+ cardiovascular progenitor cells give rise to the cardiomyocyte, endothelial, and vascular smooth muscle lineages. *Dev. Cell* 11, 723–732.

297. Motoike, T., Markham, D.W., Rossant, J., and Sato, T.N. (2003). Evidence for novel fate of Flk1+ progenitor: contribution to muscle lineage. *Genesis* 35, 153–159.

298. Laube, F., Heister, M., Scholz, C., Borchardt, T., and Braun, T. (2006). Re-programming of newt cardiomyocytes is induced by tissue regeneration. *J. Cell Sci.* 119, 4719–4729.

299. Fransioli, J., Bailey, B., Gude, N.A., Cottage, C.T., Muraski, J.A., Emmanuel, G., Wu, W., Alvarez, R., Rubio, M., Ottolenghi, S., et al. (2008). Evolution of the c-kit-positive cell response to pathological challenge in the myocardium. *Stem Cells* 26, 1315–1324.
300. Oh, H., Bradfute, S.B., Gallardo, T.D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L.H., Behringer, R.R., Garry, D.J., et al. (2003). Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12313–12318
301. Huang, G.N., Thatcher, J.E., McAnally, J., Kong, Y., Qi, X., Tan, W., DiMaio, J.M., Amatrua, J.F., Gerard, R.D., Hill, J.A., et al. (2012). C/EBP transcription factors mediate epicardial activation during heart development and injury. *Science* 338, 1599–1603.
302. Zhou, B., Honor, L.B., Ma, Q., Oh, J.H., Lin, R.Z., Melero-Martin, J.M., von Gise, A., Zhou, P., Hu, T., He, L., et al. (2012). Thymosin beta 4 treatment after myocardial infarction does not reprogram epicardial cells into cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 52, 43–47.
303. Laflamme, M.A., Chen, K.Y., Naumova, A.V., Muskheli, V., Fugate, J.A., Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., et al. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* 25, 1015–1024.
304. Blin, G., Nury, D., Stefanovic, S., Neri, T., Guillevic, O., Brinon, B., Bellamy, V., Rucker-Martin, C., Barbry, P., Bel, A., et al. (2010). A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates. *J. Clin. Invest.* 120, 1125–1139.
305. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.
306. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861–872.
307. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.
308. Davis, R.P., Casini, S., van den Berg, C.W., Hoekstra, M., Remme, C.A., Dambrot, C., Salvatori, D., Oostwaard, D.W., Wilde, A.A., Bezzina, C.R., et al. (2012). Cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells recapitulate electrophysiological characteristics of an overlap syndrome of cardiac sodium channel disease. *Circulation* 125, 3079–3091.
309. Nelson, T.J., Martinez-Fernandez, A., Yamada, S., Perez-Terzic, C., Ikeda, Y., and Terzic, A. (2009). Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 120, 408–416.

310. Aasen, T., and Izpisua Belmonte, J.C. (2010). Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 5, 371–382.
311. Menasché P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, Vilquin JT, Marolleau JP, Seymour B, Larghero J, Lake S, Chatellier G, Solomon S, Desnos M, Hagège AA. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008 Mar 4;117(9):1189-200. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.734103. Epub 2008 Feb 19.
312. Ohnishi, S., Ohgushi, H., Kitamura, S., and Nagaya, N. (2007). Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Int. J. Hematol.* 86, 17–21.
313. Zhang S, Sun A, Xu D et al. Impact of timing on efficacy and safety of intracoronary autologous bone marrow stem cells transplantation in acute myocardial infarction: a pooled subgroup analysis of randomized controlled trials. *Clin Cardiol* 2009;32:458–66.
314. Martin-Rendon E, Brunskill SJ, Hyde CJ et al. Autologous bone marrow stem cells to treat acute myocardial infarction: a systematic review. *Eur Heart J* 2008;29:1807–18.
315. Clifford, D.M., Fisher, S.A., Brunskill, S.J., Doree, C., Mathur, A., Watt, S., and Martin-Rendon, E. (2012). Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2, CD006536.
316. Marbán E., and Malliaras K. (2012). Mixed results for bone marrow–derived cell therapy for ischemic heart disease. *JAMA* 308, 2405–2406.
317. 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.
318. Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R.W., Lecapitaine, N., et al. (2007). Human cardiac stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 14068– 14073.
319. Bolli, R., Chugh, A.R., D’Amario, D., Loughran, J.H., Stoddard, M.F., Ikram, S., Beache, G.M., Wagner, S.G., Leri, A., Hosoda, T., et al. (2011). Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet* 378, 1847–1857.
320. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, Giacomello A, Abraham MR, Marbán E. Regenerative potential of Cardiosphere-Derived Cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115(7):896-908.
321. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, Czer LS, Marbán L, Mendizabal A, Johnston PV, Russell SD, Schuleri KH, Lardo

AC, Gerstenblith G, Marbán E. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 2012 379, 895–904.

322. Govaert, J.A., Swijnenburg, R.J., Schrepfer, S., Xie, X., van der Bogt, K.E., Hoyt, G., Stein, W., Ransohoff, K.J., Robbins, R.C., and Wu, J.C. (2009). Poor functional recovery after transplantation of diabetic bone marrow stem cells in ischemic myocardium. *J. Heart Lung Transplant.* 28, 1158–1165, e1.

323. Loffredo, F.S., Steinhauser, M.L., Gannon, J., and Lee, R.T. (2011). Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell Stem Cell* 8, 389–398.

324. Li, T.S., Cheng, K., Malliaras, K., Smith, R.R., Zhang, Y., Sun, B., Matsushita, N., Blusztajn, A., Terrovitis, J., Kusuoka, H., et al. (2012). 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.* 59, 942–953.

325. Terrovitis, J.V., Smith, R.R., and Marbán, E. (2010). Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart. *Circ. Res.* 106, 479–494.

326. Dib, N., Khawaja, H., Varner, S., McCarthy, M., and Campbell, A. (2011). Cell therapy for cardiovascular disease: a comparison of methods of delivery. *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 4, 177–181.

327. 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 Aug;49(2):312-21.

328. Marbán E, Cheng K, Heart to Heart The Elusive Mechanism of Cell Therapy *Circulation.* 2010;121:1981-1984.

329. Lee ST, White AJ, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, Li TS, Terrovitis J, Yee K, Simsir S, Makkar R, Marbán E. 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.

330. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Jan;42(1):88-97. Epub 2006 Nov 13.

331. Cheng K, Malliaras K, Li TS, Sun B, Houde C, Galang G, Smith J, Matsushita N, Marbán E. 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):1121-35.

332. Al Kindi, A.; Ge, Y.; Shum-Tim, D.; Chiu, R. C. Cellular cardiomyoplasty: Routes of cell delivery and retention. *Front. Biosci.* 13:2421–2434; 2008.
333. Terrovitis J, Lautamäki R, Bonios M, Fox J, Engles JM, Yu J, Leppo MK, Pomper MG, Wahl RL, Seidel J, Tsui BM, Bengel FM, Abraham MR, Marbán E. 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 Oct 20;54(17):1619-26. doi: 10.1016/j.jacc.2009.04.097
334. Lipinski MJ, Biondi-Zoccai GG, Abbate A, Khianey R, Sheiban I, Bartunek J, Vanderheyden M, Kim HS, Kang HJ, Strauer BE, Vetrovec GW. Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Oct 30;50(18):1761-7. Epub 2007 Oct 15.
335. Marbán E¹. Breakthroughs in cell therapy for heart disease: focus on cardiosphere-derived cells. *Mayo Clin Proc.* 2014 Jun;89(6):850-8. doi: 10.1016/j.mayocp.2014.02.014.
336. Chimenti I, Smith RR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, et al. (2010) Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiospherederived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* 2010;106: 971–980.
337. Shintani Y, Fukushima S, Varela-Carver A, Lee J, Coppen SR, et al. (2009) Donor cell-type specific paracrine effects of cell transplantation for postinfarction heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 47: 288–295.
338. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:726–36.
339. Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther* 2010;21:1641–55.
340. English K, French A, Wood KJ. Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell Stem Cell* 2010;7:431–42.
341. "Research Animal Models". Charles River. Retrieved 5 August 2012.
342. Michler RE. Stem cell therapy for heart failure. *Cardiol Rev.* 2014 May-Jun;22(3):105-16. doi: 10.1097/CRD.000000000000018. Review.
343. 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
344. Duckers HJ, Houtgraaf J, Hehrlein C et al. Final results of a phase IIa, randomised, openlabel trial to evaluate the percutaneous intramyocardial transplantation of autologous skeletal myoblasts in congestive heart failure patients: the SEISMIC trial. *EuroIntervention* 2011;6:805–812.

345. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008;132:661–80.
346. Huber I, Itzhaki I, Caspi O et al. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *FASEB J* 2007;21:2551–63.
347. Freund C, Mummery CL. Prospects for pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in cardiac cell therapy and as disease models. *J Cell Biochem* 2009;107:592–9.
348. Gore A, Li Z, Fung HL et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:63–67.
349. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001;357:279–80.
350. Menasche P, Hagege AA, Vilquin JT et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1078–83.
351. Siminiak T, Kalawski R, Fiszer D et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for the treatment of postinfarction myocardial injury: phase I clinical study with 12 months of follow-up. *Am Heart J* 2004;148:531–37.
352. Hagege AA, Marolleau JP, Vilquin JT et al. Skeletal myoblast transplantation in ischemic heart failure: long-term follow-up of the first phase I cohort of patients. *Circulation* 2006;114(1 Suppl.):108–13.
353. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* (2004);428:664–8.
354. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL et al. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668–73.
355. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother* 1993;2:137–44.
356. Sussman MA, Murry CE. Bones of contention: marrow-derived cells in myocardial regeneration. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44:950–3.
357. Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G et al. Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 2000;87:728–30.
358. Rehman J, Li J, Orschell CM et al. Peripheral blood ‘endothelial progenitor cells’ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation* 2003;107:1164–9.

359. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–7.
360. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815–22.
361. Dimmeler S, Zeiher AM. Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions. *Cardiology* 2009;113:155–60.
362. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701–705.
363. Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62:e147–e239.
364. Poglajen G¹, Vrtovec B. Stem cell therapy for chronic heart failure. *Curr Opin Cardiol*. 2015 May;30(3):301-10. doi: 10.1097/HCO.0000000000000167.
365. Cho GS, Fernandez L, Kwon C. Regenerative medicine for the heart: perspectives on stem-cell therapy. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Nov 10;21(14):2018-31. doi: 10.1089/ars.2014.6063. Epub 2014 Sep 22. Review.
366. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, et al. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105:93–98.
367. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, et al. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 2002; 109:337–346.
368. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 2012; 308:2369–2379.
369. Karantalis V, DiFede DL, Gerstenblith G, et al. Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: the Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circ Res* 2014; 114:1302–1310.
370. Suncion VY, Ghersin E, Fishman JE, et al. Does transendocardial injection of mesenchymal stem cells improve myocardial function locally or globally?: an analysis from the Percutaneous Stem Cell Injection Delivery Effects on Neomyogenesis (POSEIDON) randomized trial. *Circ Res* 2014; 114:1292– 1301.
371. A. I. Caplan, “Mesenchymal stem cells,” *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 9, no. 5, pp. 641–650, 1991.

372. P. Erpicum, O. Detry, L. Weekers, C. Bonvoisin, C. Lechanteur, and A. Briquet, "Mesenchymal stromal cell therapy in conditions of renal ischaemia/reperfusion," *Nephrology Dialysis Transplantation*, vol. 29, pp. 1487–1493, 2014.
373. M. A. Puglisi, V. Tesori, W. Lattanzi et al., "Therapeutic implications of mesenchymal stem cells in liver injury," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2011, Article ID 860578, 8 pages, 2011.
374. Rowart P, Erpicum P, Detry O, Weekers L, Grégoire C, Lechanteur C, Briquet A, Beguin Y, Krzesinski JM, Jouret F.
Mesenchymal Stromal Cell Therapy in Ischemia/Reperfusion Injury. *J Immunol Res*. 2015;2015:602597. doi: 10.1155/2015/602597. Epub 2015 Jul 15. Review.
375. Le Blanc K and D Mougiakakos (2012). Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol* 12: 383–396.
376. Munir H, McGettrick HM. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease: Risks and Rewards. *Stem Cells Dev*. 2015 Sep 15;24(18):2091-100. doi: 10.1089/scd.2015.0008. Epub 2015 Jul 28.
377. Moon H, Park HE, Kang J, Lee H, Cheong C, Lim YT, Ihm SH, Seung KB, Jaffer FA, Narula J, Chang K, Hong KS. Noninvasive assessment of myocardial inflammation by cardiovascular magnetic resonance in a rat model of experimental autoimmune myocarditis. *Circulation*. 2012 May 29;125(21):2603-12. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.075283. Epub 2012 May 1.
378. Smith, S.C. Autoimmune myocarditis. *Curr Protoc Immunol* 2001, Chapter 15, Unit 15.14.
379. De Couto G, Liu W, Tseliou E, Sun B, Makkar N, Kanazawa H, Arditi M, Marbán E. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2015 Aug 3;125(8):3147-62.
380. Chakravarty T, Makkar R, Henry T, et al. TCT-820 multivessel intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere derived cells in dilated cardiomyopathy: long term outcomes of the Dilated Cardiomyopathy Intervention with Allogeneic Myocardially-Regenerative Cells (DYNAMIC Trial). *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(18):B332 (abstract).
381. <http://www.abstractsonline.com/pp8/#!/4412/presentation/52584>
382. Ishigami S, Ohtsuki S, Eitoku T, et al. Intracoronary Cardiac Progenitor Cells in Single Ventricle Physiology: The PERSEUS (Cardiac Progenitor Cell Infusion to Treat Univentricular Heart Disease) Randomized Phase 2 Trial. *Circ Res*. 2017;120(7):1162–1173.
383. Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, et al. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase 1 controlled trial. *Circ Res* 2017;116(4):653–664.

384. Weil BR, Suzuki G, Leiker MM, Fallavollita JA, Canty JM. Comparative Efficacy of Intracoronary Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and Cardiosphere-Derived Cells in Swine with Hibernating Myocardium. *Circ Res*. 2015 Sep 11;117(7):634-44.
385. Takehara N, Tutsumi Y, Tateishi K, et al. Controlled delivery of basic fibroblast growth factor promotes human cardiosphere derived cell engraftment to enhance cardiac repair for chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 52, 1858-65 (2008).
386. Li Q, Guo Y, Ou Q, Chen N, Wu WJ, Yuan F, O'Brien E, Wang T, Luo L, Hunt GN, Zhu X, Bolli R. Intracoronary administration of cardiac stem cells in mice: a new, improved technique for celltherapy in murine models. *Basic Res Cardiol*. 2011 Sep;106(5):849-64. doi: 10.1007/s00395-011-0180-1. Epub 2011 Apr 24.
387. Carmona MD, Cañadillas S, Romero M, Blanco A, Nogueras S, Herrera C. Intramyocardial bone marrow mononuclear cells versus bone marrow-derived and adipose mesenchymal cells in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Cytotherapy*. 2017 Aug;19(8):947-961. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.05.006. Epub 2017 Jun 30.
388. Okada H, Suzuki J, Futamatsu H, Maejima Y, Hirao K, Isobe M. Attenuation of autoimmune myocarditis in rats by mesenchymal stem cell transplantation through enhanced expression of hepatocyte growth factor. *Int Heart J*. 2007 Sep;48(5):649-61.
389. Tseliou E1, Kanazawa H, Dawkins J, Gallet R, Kreke M, Smith R, Middleton R, Valle J, Marbán L, Kar S, Makkar R, Marbán E. Widespread Myocardial Delivery of Heart-Derived Stem Cells by Nonocclusive Triple-Vessel Intracoronary Infusion in Porcine Ischemic Cardiomyopathy: Superior Attenuation of Adverse Remodeling Documented by Magnetic Resonance Imaging and Histology. *PLoS One*. 2016 Jan 19;11(1):e0144523. doi: 10.1371/journal.pone.0144523. eCollection 2016
390. Malliaras K, Makkar RR, Smith 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;63(2):110–122.
391. Cooper LT Jr. Giant cell myocarditis: diagnosis and treatment. *Herz*. 2000 May;25(3):291-8
392. Lauden L, Boukouaci W, Borlado LR, et al. Allogenicity of human cardiac stem/progenitor cells orchestrated by programmed death ligand 1. *Circ Res*. 112(3), 451-64 (2013).
393. Yuan Z, Shioji K, Kishimoto C. Immunohistological analyses of myocardial infiltrating cells in various animal models of myocarditis. *Exp Clin Cardiol*. 2003 Spring;8(1):13-6.
394. Afanasyeva M, Georgakopoulos D, Rose NR. Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction. *Autoimmun Rev*. 2004 Nov;3(7-8):476-86.

395. Bu DX et al. Impairment of the programmed cell death-1 pathway increases atherosclerotic lesion development and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:1100–1107.
396. Kim KS et al. CD28-B7-mediated T cell costimulation in chronic cardiac allograft rejection: differential role of B7-1 in initiation versus progression of graft arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 2001;158:977–986.
397. Tarrio ML et al.. PD-1 protects against inflammation and myocyte damage in T cell-mediated myocarditis. *J Immunol.* 2012;188:4876–4884.
398. Malliaras K, Ibrahim A, Tseliou E, Liu W, Sun B, Middleton RC, Seinfeld J, Wang L, Sharifi BG, Marbán E. Stimulation of endogenous cardioblasts by exogenous cell therapy after myocardial infarction. *EMBO Mol Med.* 2014 Jun;6(6):760-77. doi: 10.1002/emmm.201303626. Epub 2014 Apr 6.
399. 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.* 9(11), e113009 (2014).
400. 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.
401. Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, 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;61(10):1108–1119.
402. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, Palasis M, Wilensky RL. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2006 May;27(9):1114-22. Epub 2006 Mar 1.
403. Gullestad L., Aass H., Fjeld J. G. et al., Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure, *Circulation*, vol. 103, no. 2, pp. 220–225, 2001.
404. Gyöngyösi M, Wojakowski W, Lemarchand P et al. Meta-Analysis of Cell-based CaRdiac stUdiEs (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circ Res.* 2015 Apr 10;116(8):1346-60. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.304346. Epub 2015 Feb 19.