



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

**ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ**

**Γ' ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΗ ΚΑΡΔΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ
ΚΑΙ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ «Ν.Σ. ΧΡΗΣΤΕΑΣ»**

**«Ο ρόλος της παρακρινικής δράσης των καρδιακών
προγονικών κυττάρων στο οξύ έμφραγμα του
μυοκαρδίου και στη βλάβη από επαναιμάτωση»**

**ΣΤΥΛΙΑΝΗ ΒΑΚΡΟΥ
Ειδικευόμενη Ιατρός**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2019

☉ Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

ΜΝΥΜΙ ΑΠΟΛΛΩΝΑ ΙΗΤΡΟΝ, ΚΑΙ ΑΣΚΛΗΠΙΟΝ,
ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΠΑΝΑΚΕΙΑΝ, ΚΑΙ ΘΕΟΥΣ ΠΑΝ
ΤΑΣ ΤΕ ΚΑΙ ΠΑΣΑΣ, ΙΣΤΟΡΑΣ ΠΟΙΕΥΜΕΝΟΣ, ΕΠΙ
ΤΕΛΕΑ ΠΟΙΗΣΕΙΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ
ΟΡΚΟΝ ΤΟΝΔΕ ΚΑΙ ΞΥΓΓΡΑΦΗΝ ΤΗΝΔΕ' ΗΓΗΣΑΣΘ
ΑΙ ΜΕΝ ΤΟΝ ΔΙΔΑΞΑΝΤΑ ΜΕ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗ
Ν ΙΣΑ ΓΕΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΧΡΕΛΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΡΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
ΗΝ ΧΡΗΖΩΣΙ ΜΑΝΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΓΓΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
ΘΑΙ ΥΙΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ, ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
ΤΟΣ, ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ
ΔΙΑΙΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗ, ΕΙΡΪΕΙΝ. ☉ ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
ΦΗΓΗΣΟΜΑΙ ΞΥΜΒΟΥΛΙΗΝ ΤΟΙΗΝΔΕ' ΟΜΟΙΩΣ ΔΕ ΟΥ
ΔΕ ΓΥΝΑΙΚΙ ΠΕΣΣΟΝ ΦΘΟΡΙΟΝ ΔΩΣΩ. ☉ ΑΓΝΩΣ Δ
Ε ΚΑΙ ΟΣΙΩΣ ΔΙΑΤΗΡΗΣΩ ΒΙΟΝ ΤΟΝ ΕΜΟΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝ
ΗΝ ΤΗΝ ΕΜΗΝ. ☉ ΟΥ ΤΕΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
ΙΛΗΝΤΑΣ, ΕΚΧΩΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
ΗΪΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ☉ ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΩ,
ΕΣΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΟΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΜΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
ΟΣ ΕΛΝ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΗΣ, Τ
ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΛΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕ ΓΥ
ΝΑΙΚΕΙΛΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. ☉ Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΗ,
Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΗΤΗΣ ΚΑΤΑ Β
ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Δ ΜΗ ΧΡΗ ΠΟΤΕ ΕΚΛΑΛΕΕΣΘΑΙ
ΕΞΩ, ΣΙΓΗΣΟΜΑΙ, ΑΡΡΗΤΑ ΗΓΕΥΜΕΝΟΣ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΤΟ
ΙΑΥΤΑ. ☉ ΟΡΚΟΝ ΜΕΝ ΟΥΝ ΜΟΙ ΤΟΝΔΕ ΕΠΙΤΕΛΕ
Α ΠΟΙΕΟΝΤΙ, ΚΑΙ ΜΗ ΞΥΓΧΕΟΝΤΙ, ΕΙΗ ΕΠΑΥΡΑΣΘ
ΑΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΑΙ ΤΕΧΝΗΣ ΔΟΞΑΖΟΜΕΝΩ, ΠΑΡΑ Π
ΑΣΙΝ ΑΝΘΡΩΠΟΙΣ ΕΣ ΤΟΝ ΔΙΕΙ ΧΡΟΝΟΝ' ΠΑΡΑΒΑΙ
ΝΟΝΤΙ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΝΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕΛΝ.

☉

Στους γονείς και στα αδέρφια μου,

Στο μέντορά* μου, καθηγητή κ. Ιωάννη Νανά

** Ο Μέντωρ ήταν ένα πρόσωπο της Οδύσειας στο οποίο ο Οδυσσεύς εμπιστεύθηκε «τα του οίκου του» όταν έφευγε για τον Τρωικό Πόλεμο. Τη μορφή του Μέντορα έπαιρνε η θεά Αθηνά σε πολλές περιστάσεις, όπως για να συνοδεύσει τον Τηλέμαχο στην Πύλο και στη Σπάρτη σε αναζήτηση του πατέρα του, ή για να προστρέξει σε βοήθεια του Οδυσσέα κατά τη «μνηστηροφονία», δηλαδή την εξόντωση των μνηστήρων της Πηνελόπης.*

Στο ταξίδι, στις συγκυρίες, στην Ιθάκη...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	7
II. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	9
III. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
A. Επιδημιολογία των καρδιαγγειακών νοσημάτων.....	21
B. Αναγεννητική ιατρική.....	22
B.1. Ορισμός αναγεννητικής ικανότητας της καρδιάς.....	23
B.2. Τεκμηρίωση αναγεννητικής ικανότητας της καρδιάς στον άνθρωπο	
B.3. Είδη προγονικών κυττάρων.....	25
B.3.1. Σκελετικοί μυοβλάστες	
B.3.2. Κύτταρα από το μυελό των οστών	
B.3.3. Καρδιακά προγονικά κύτταρα.....	30
B.3.4. Πολυδύναμα κύτταρα	
B.3.5. Συμπέρασμα	
B.4. Μηχανισμοί μυοκαρδιακής αναγέννησης.....	36
B.4.1. Θεωρία καρδιομυοκυτταρικής αναγέννησης	
B.4.2. Θεωρία παρακρινικής δράσης.....	38
Γ. Οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.....	42
Γ.1. Ορισμός	
Γ.2. Βιοδείκτες μυοκαρδιακής βλάβης και εμφράγματος	
Γ.3. Κλινικά χαρακτηριστικά OEM και ταξινόμηση.....	47
Γ.4. ΗΚΓ σημεία OEM	
Γ.5. Επιδημιολογικά δεδομένα του OEM.....	52
Δ. Διαδερμική απεικόνιση στεφανιαίων αγγείων και αγγειοπλαστική – ιστορική αναδρομή.....	53
E. Το φαινόμενο μη επαναροής (no-reflow phenomenon).....	53
E.1. Ορισμός	
E.2. Παθογενετικοί μηχανισμοί.....	56
E.3. Διάγνωση.....	60
E.4. Προγνωστική αξία.....	61
E.5. Θεραπευτικές προσεγγίσεις.....	64

IV.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. Σκοπός και Υπόθεση.....	73
B. Υλικά και μέθοδοι.....	76
B.1. Ανάπτυξη και καλλιέργεια καρδιακών προγονικών κυττάρων	
B.2. Ανάπτυξη τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού.....	79
B.3. Πειραματόζωα	
B.4. Πρωτόκολλο αναισθησίας	
B.5 Χειρουργικές παρασκευές.....	80
B.6 Τυχαιοποίηση πειραματοζώων.....	82
B.7. Οξύ πειραματικό πρωτόκολλο και εκτίμηση φαινομένου μη επαναρροής.....	83
B.8 Ενδοστεφανιαία χορήγηση και υπολογισμός κυτταρικής εμφύτευσης.....	84
B.9. Χρόνιο πειραματικό πρωτόκολλο.....	88
B.9α Υπολογισμός έκτασης εμφράγματος στη 1 εβδομάδα	
B.9β Υπολογισμός καρδιακής λειτουργίας στον 1 μήνα.....	89
B.8. Στατιστική ανάλυση.....	90
Γ. Αποτελέσματα.....	90
Γ.1. Ανάπτυξη καρδιακών προγονικών κυττάρων.....	92
Γ.2. Παρασκευή τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού.....	93
Γ.3. Οξέα πειράματα.....	94
Γ.3.1. Θνητότητα.....	95
Γ.3.2. Οξύ πειραματικό πρωτόκολλο.....	97
Γ.3.2.1. Αποτελεσματικότητα ενδοστεφανιαίας χορήγησης.....	98
Γ.3.2.2. Έκταση εμφράγματος και περιοχής βλάβης της μικροκυκλοφορίας.....	99
Γ.4. Χρόνιο πειραματικό πρωτόκολλο	100
Γ.4.1 Θνητότητα.....	100
Γ.4.2. Αποτελέσματα στη 1 εβδομάδα.....	100
Γ.4.3. Αποτελέσματα στον 1 και 2 μήνες.....	103
Δ. Συζήτηση.....	106
Δ.1. Περιορισμοί.....	111
E. Συμπεράσματα.....	112
V. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	113
VI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Πειραματικής Χειρουργικής και Χειρουργικής Έρευνας «Ν.Σ. Χρηστέας» της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Αθηνών και στο Εργαστήριο Κυτταρικής και Μοριακής Καρδιολογίας της Γ΄ Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Είναι αποτέλεσμα συγκυριών και τόλμης να τις ακολουθήσω. Το αντικείμενο της παρούσας διατριβής ήταν ιδέα του αείμνηστου Επίκουρου καθηγητή Καρδιολογίας Ιωάννη Τερροβίτη, σε ένα θέμα πρωτόγνωρο για τα τότε ελληνικά δεδομένα, οπότε και ριψοκίνδυνο. Μια τέτοια πρόκληση όμως, που ωθούσε την εξερεύνηση ερευνητικών μονοπατιών για τα οποία αγνοούσα την ύπαρξή τους, με οδήγησε στην ενασχόλησή μου με την αναγεννητική ικανότητα της καρδιάς στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

Ξεκινήσαμε από μηδενική βάση οργάνωσης του εργαστηρίου, διαλέξαμε τον κυτταρικό πληθυσμό με τον οποίο θα ασχολούμασταν, εισάγαμε πειραματόζωα, φτιάξαμε τα καρδιακά προγονικά κύτταρα. Τυποποιήσαμε το χειρουργικό πρωτόκολλο, επιβεβαιώσαμε μεθοδολογικά ότι η ενδοστεφανιαία χορήγηση ήταν αποτελεσματική και ασφαλής κατά την επαναιμάτωση. Είχαν ήδη συγκεντρωθεί αρκετές πειραματικές μελέτες που προσπαθούσαν να ερμηνεύσουν τα ευεργετικά αποτελέσματα της χορήγησης προγονικών κυττάρων στο ισχαιμικό μυοκάρδιο. Η θεωρία της παρακρινικής δράσης ήταν η αφορμή για να επιλέξουμε να παρακάμψουμε τα κύτταρα, και να χρησιμοποιήσουμε στο πρωτόκολλο τους εκκριτικούς παράγοντές τους.

Η γοητεία στην έρευνα έγκυται ακριβώς στη δημιουργία μιας υπόθεσης (όπως η γοητεία που έχει ο σχεδιασμός ενός ταξιδιού), που περιμένει την επιβεβαίωση με την πειραματική τεκμηρίωση, τα δεδομένα.

Είχα την τύχη σε αυτό το ταξίδι να γνωρίσω επιστήμονες που με επηρέασαν ερευνητικά και προσωπικά. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά ευγνωμοσύνη στον καθηγητή κ. Ιωάννη Νανά. Για πολλούς λόγους, αλλά κυρίως για την γενναιοδωρία του στους νέους ιατρούς-επιστήμονες. Κάθε συνάντηση μαζί του -ειδικά όταν ήταν για προβλήματα- ήταν booster υποστήριξης και αισιοδοξίας, αλλά και γόνιμου προβληματισμού. Θα αποτελεί πάντα απόδειξη ότι αδύνατο είναι μόνο ότι δεν προσπαθήσαμε αρκετά...

Θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τους καθηγητές μου στο Johns Hopkins, όπου έκανα μεταδιδακτορική έρευνα, Dr. Roselle Abraham και Theodore Abraham, διότι με μύησαν στη βασική έρευνα, πίστεψαν στις δυνατότητές μου και χρωμάτισαν το χρόνο μου εκεί.

Τους καθηγητές της τριμελούς επιτροπής κ. Αντώνιο Μανώλη και κ. Βασίλειο Γοργούλη και τέλος τον αντικαταστάτη επιβλέπων καθηγητή κ. Σεραφείμ Νανά οι οποίοι δέχθηκαν να αναλάβουν την υποστήριξη της προκείμενης διδακτορικής διατριβής, για τις υποδείξεις, παρατηρήσεις και υποστήριξή τους.

Τους συνεργάτες που με βοήθησαν στα πειράματα, κκ. Σάκη Μπόνιο, Γιάννη Νανά, Χρήστο Καπέλιο, Μαρία Νανά, Εμμέλεια Λεβεντάκη-Νανά και Μιχάλη Μπόνιο, όπως επίσης και τον κ. Κώστα Μαλλιάρρα για τα σχόλια και τις διορθώσεις του στη συγγραφή της διατριβής. Ουσιαστική ήταν η υποστήριξη του προσωπικού του Πειραματικού Εργαστηρίου Χ. Χρηστέας, και της καθηγήτριας κα Δέσποινας Περρέας που πάντα ήταν πρόθυμη να μας βοηθήσει.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τη βαθιά μου αγάπη και ευχαριστία προς τους γονείς μου, Διονύση και Μαρία, τη Χαρούλα και τους (Γιώργο)², για την αγάπη τους, υποστήριξη, και πίστη σε εμένα. Χωρίς αυτούς όλα θα ήταν πιο μονότονα.

II. ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα στον Χολαργό στις 3 Μαΐου του 1984. Μετά την αποφοίτησή μου από το Αμερικανικό Κολλέγιο Ελλάδος, εισήλθα με εισαγωγικές εξετάσεις στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης το 2002, από την οποία αποφοίτησα με βαθμό «Λίαν καλώς» το 2008. Αποφάσισα να ασχοληθώ με την καρδιολογία μετά από την τυχαία έκθεσή μου σε πειραματικά ερευνητικά πρωτόκολλα σε χοίρους (μοντέλα ισχαιμίας-επαναιμάτωσης). Συνέπεια αυτού ήταν να διατελέσω επιστημονική συνεργάτης της Γ' Πανεπιστημιακής Καρδιολογικής Κλινικής υπό τη διεύθυνση του καθηγητή Ιωάννη Νανά από το 2009 έως 2011. Τότε ξεκίνησε και η εκπόνηση της εν λόγω διδακτορικής διατριβής, στο πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής και της χρήσης προγονικών κυττάρων, υπό την καθοδήγηση του αείμνηστου επίκουρου καθηγητή Ι. Τερροβίτη. Κατόπιν υποτροφίας από την Ελληνική Καρδιολογική Εταιρία, μετεκπαιδεύτηκα στο Johns Hopkins University στη Βαλτιμόρη των Ηνωμένων Πολιτειών από το 2011 έως το 2014, υπό την επίβλεψη των Dr Roselle Abraham και Dr Theodore Abraham. Το κύριο ερευνητικό πεδίο της έρευνάς μου εκεί ήταν η υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια, κυρίως σε επίπεδο βασικής-μεταφραστικής έρευνας πάνω στην παθοφυσιολογία των μιτοχονδρίων και τον μεταβολισμό. Παράλληλα απέκτησα τον τίτλο ECFMG, ώστε να έχω τη δυνατότητα κλινικής άσκησης στις ΗΠΑ. Αποφάσισα να αποκτήσω ειδικότητα στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα ασκήθηκα στην Παθολογία στην Α' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Πανεπιστημίου Αθηνών στο ΓΝΑ «Λαϊκό» και πλέον στην Καρδιολογία στο ίδιο νοσοκομείο.

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

- 2002: Αποφοίτηση από το Λύκειο του Αμερικανικού Κολλεγίου Ελλάδος, Pierce College
- 2002-2008: Ιατρική Σχολή Πανεπιστημίου Κρήτης («Λίαν Καλώς», 7.67/10)
- 2009-2011: Επιστημονικός συνεργάτης Γ' Καρδιολογικής Κλινικής Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (καθηγητής κ. Ιωάννης Νανάς)
- 2011-2014: Post-doctoral Research Fellow, Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, MD, USA
- 2014-2017: Επιστημονικός συνεργάτης Γ' Καρδιολογικής Κλινικής Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Καθηγητής κ. Ιωάννης Νανάς)
- 2014-2016: Ειδικευόμενη Παθολογίας στην Α Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, ΓΝΑ «Λαϊκό»
- 2017-σήμερα: Ειδικευόμενη Καρδιολογίας στην Καρδιολογική Κλινική του ΓΝΑ «Λαϊκό»

ΛΟΙΠΑ ΠΤΥΧΙΑ ΚΑΙ ΣΕΜΙΝΑΡΙΑ

- 2013: Summer Institute of Epidemiology and Biostatistics, Johns Hopkins University, Bloomberg School of Public Health (Courses: Statistical Reasoning in public health I and II, Comparative Effectiveness Research, Methods for clinical and translational research)
- 2014: απόκτηση πτυχίου ECFMG
- 2018: 2^ο HFA Clinical Trialists Summer School της Ευρωπαϊκής Εταιρίας Καρδιακής Ανεπάρκειας (Ιούνιος 2018, Ακρωτήρι Σούνιο)

ΥΠΟΤΡΟΦΙΕΣ

- 2008: Υποτροφία από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης για κλινική άσκηση (clinical elective) στην Οφθαλμολογία στο Boston University (Βοστώνη, ΗΠΑ)

- 2012: Υποτροφία ενός έτους από την Ελληνική Καρδιολογική Εταιρία για μεταδιδακτορική έρευνα στην Υπερτροφική μυοκαρδιοπάθεια στο Πανεπιστήμιο Johns Hopkins στη Βαλτιμόρη των Ηνωμένων Πολιτειών

ΔΙΑΚΡΙΣΕΙΣ

- Μέλος της ερευνητικής ομάδας που βραβέυθηκε με το Melvin Marcus Young Investigator Award, στο ετήσιο συνέδριο Scientific Sessions, της American Heart Association, 2013
- Βραβείο καλύτερης ελεύθερης ανακοίνωσης, Εταιρία Μελέτης και Έρευνας της Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2015
- Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης, Εταιρία Μελέτης και Έρευνας της Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2015.
- Φιναλίστ για βραβείο καλύτερου νέου ερευνητή βασικής έρευνας (Jay N. Cohn New Investigator award in Basic Science), Heart Failure Society of America, 2017.
- Βραβείο 2^{ης} καλύτερης ελεύθερης ανακοίνωσης, Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Καρδιολογικής Εταιρίας, 2017.

ΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΕΙΣ

- Χρηματοδότηση πειραματικού πρωτοκόλλου «Ο ρόλος της παρακρινικής δράσης των καρδιακών προγονικών κυττάρων στο οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και στη βλάβη από επαναιμάτωση» από την Ελληνική Καρδιολογική Εταιρία, 2012.
- ESC Grant για την παρακολούθηση του European Society of Cardiology Congress, Rome, Αύγουστος 2016
- HFSA Grant για την παρακολούθηση του Heart Failure Society of America Annual Meeting, Dallas, TX, USA, Σεπτέμβριος 2017
- HFA Grant για τη συμμετοχή στο 2^ο HFA Clinical Trialists Summer School, Ιούνιος 2018, Ακρωτήρι Σούνιο.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΑΡΘΡΩΝ

1. Skeletal muscle microcirculatory abnormalities are associated with exercise intolerance, ventilatory inefficiency, and impaired autonomic

control in heart failure. Manetos C, Dimopoulos S, Tzani G, **Vakrou S**, Tasoulis A, Kapelios C, Agapitou V, Ntalianis A, Terrovitis J, Nanas S. *J Heart Lung Transplant*. 2011;30(12):1403-8.

2. Bone mass loss in chronic heart failure is associated with secondary hyperparathyroidism and has prognostic significance. Terrovitis J, Zotos P, Kaldara E, Diakos N, Tseliou E, **Vakrou S**, Kapelios C, Chalazonitis A, Nanas S, Toumanidis S, Kontoyannis D, Karga E, Nanas J. *Eur J Heart Fail* 2012;14(3):326-32.

3. Hyaluronic acid-human blood hydrogels for stem cell transplantation. Chang CY, Chan AT, Armstrong PA, Luo HC, Higuchi T, Strehin IA, **Vakrou S**, Lin X, Brown SN, O'Rourke B, Abraham TP, Wahl RL, Steenbergen CJ, Elisseff JH, Abraham MR. *Biomaterials*. 2012 Nov;33(32):8026-33.

4. Cellular bioenergetics is an important determinant of the molecular imaging signal derived from luciferase and the sodium-iodide symporter. Chang C, Chan A, Lin X, Higuchi T, Terrovitis J, Afzal JM, Rittenbach A, Sun D, **Vakrou S**, Woldemichael K, O'Rourke B, Wahl R, Pomper M, Tsui B, Abraham MR. *Circ Res*. 2013 Feb 1;112(3):441-50.

5. Elevated left ventricular filling pressures can be estimated with accuracy by a new mathematical model. Terrovitis JV, Kapelios CJ, Sainis G, Ntalianis A, Kaldara E, Sousonis V, **Vakrou S**, Michelinakis N, Anagnostou D, Margari Z, Nanas JN. *J Heart Lung Transplant*. 2013;32(5):511-7.

6. Hypertrophic cardiomyopathy: a heart in need of an energy bar? **Vakrou S**, Abraham MR. *Front Physiol*. 2014 Aug 19;5:309

7. Age-related changes in familial hypertrophic cardiomyopathy phenotype in transgenic mice and humans. Luo HC, Pozios I, **Vakrou S**, Sorensen L, Abraham RM, Abraham T. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2014 Oct;34(5):634-9.

8. Afterload-induced left ventricular diastolic dysfunction during myocardial ischaemia and reperfusion. Diakos NA, Pozios I, Katsaros L, **Vakrou S**, Sventzouri S, Michelinakis N, Tseliou E, Bonios M, Malliaras K, Papalois A, Anastasiou-Nana M, Terrovitis JV. *Exp Physiol*. 2015 Mar;100(3):288-301.

9. Dabigatran etexilate as second line therapy in patients with a left ventricular device. Terrovitis JV, Ntalianis A, Kapelios CJ, **Vakrou S**, Diakos N, Katsaros L, Tsamatsoulis M, Kaldara E, Charitos C, Nanas JN. *Hellenic J Cardiol*. 2015;56(1):20-5.

10. High furosemide dose has detrimental effects on survival of patients with stable heart failure. Kapelios CJ, Kaldara E Ntalianis A, Sousonis V, Repasos E, Sfakianaki T, **Vakrou S**, Pantsios C, Nanas JN, Terrovitis JV. *Hellenic J Cardiol*. 2015;56(2):154-9.
11. Hyaluronic acid-serum hydrogels rapidly restore metabolism of encapsulated stem cells and promote engraftment. Chan AT, Karakas MF, **Vakrou S**, Afzal J, Rittenbach A, Lin X, Wahl RL, Pomper MG, Steenbergen CJ, Tsui BM, Elisseff JH, Abraham MR. *Biomaterials*. 2015 Dec;73:1-11.
12. Effect of elevated reperfusion pressure on “No reflow” area and infarct size in a porcine model of ischemia-reperfusion. Pantsios C, Kapelios C, **Vakrou S**, Diakos N, Pozios I, Kontogiannis C, Nanas JN, Malliaras K. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2016 Jul;21(4):405-11.
13. Innate heart regeneration: endogenous cellular sources and exogenous therapeutic amplification. Malliaras K, **Vakrou S**, Kapelios CJ, Nanas JN. *Expert Opin Biol Ther*. 2016 Nov;16(11):1341-1352.
14. Cardioprotective effects of intracoronary administration of 4-chlorodiazepam in small and large animal models of ischemia-reperfusion. Tsamatsoulis M, Kapelios CJ, Katsaros L, **Vakrou S**, Sousonis V, Sventzouri S, Michelinakis N, Perrea DN, Anastasiou-Nana M, Malliaras K. *Int J Cardiol*. 2016 Dec 1;224:90-95.
15. Exercise training improves characteristics of exercise oscillatory ventilation in chronic heart failure. Panagopoulou N, Karatzanos E, Dimopoulos S, Tasoulis A, Tachliabouris I, **Vakrou S**, Sideris A, Gratziou C, Nanas S. *Eur J Prev Cardiol*. 2017 May;24(8):825-832.
16. Diffuse interstitial fibrosis assessed by cardiac magnetic resonance is associated with dispersion of ventricular repolarization in patients with hypertrophic cardiomyopathy. Hurtado-de-Mendoza D, Corona-Villalobos CP, Pozios I, Gonzales J, Soleimanifard Y, Sivalokanathan S, Montoya-Cerrillo D, **Vakrou S**, Kamel I, Mormontoy-Laurel W, Dolores-Cerna K, Suarez J, Perez-Melo S, Bluemke DA, Abraham TP, Zimmerman SL, Abraham MR. *J Arrhythm*. 2017 Jun;33(3):201-207.
17. Loop diuretics for chronic heart failure: a foe in disguise of a friend? Kapelios CJ, Malliaras K, Kaldara E, **Vakrou S**, Nanas JN. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2018 Jan 1;4(1):54-63.
18. Pharmacologic inhibition of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger protects against ventricular arrhythmias in a porcine model of ischemia-

reperfusion. Sventzouri S, Nanas I, **Vakrou S**, Kapelios C, Sousonis V, Sfakianaki T, Papalois A, Manolis AS, Nanas JN, Malliaras K. *Hellenic J Cardiol*. 2017 Dec 30.

19. Cardiosphere-Derived Cells demonstrate metabolic flexibility that is influenced by adhesion status. Afzal J, Chan A, Karakas MF, Woldemichael K, **Vakrou S**, Guan Y, Rathmell J, Wahl R, Pomper M, Foster DB, Aon MA, Tsui B, O'Rourke B, Abraham MR. *JACC Basic Transl Sci*. 2017 Oct;2(5):543-560.

20. Allele-specific differences in Transcriptome, miRNome and mitochondrial function in two hypertrophic cardiomyopathy mouse models. **Vakrou S**, Fukunaga R, Foster DB, Sorensen L, Liu Y, Guan Y, Woldemichael K, Pineda-Reyes R, Liu T, Tardiff JC, Leinwand LA, Tocchetti CG, Abraham TP, O'Rourke B, Aon MA, Abraham MR. *JCI Insight*. 2018 Mar 22;3(6).

21. Salutary effects of the PULVAD, a novel implantable counterpulsation assist device on cardiac mechanoenergetics. Kontogiannis C, Aravantinos D, Nanas I, Kapelios CJ, Marinakis S, **Vakrou S**, Sarchosi S, Perrea DN, Mason JW, Nanas JN, Malliaras K. *ASAIO J*. 2018 Jun 5.

22. A novel simple diagnostic algorithm for rapid and accurate detection of anemia etiology in patients with advance heart failure. Kaldara E, Malliaras K, Barbarousi D, Kapelios CJ, **Vakrou S**, Tachliabouris I, Nanas JN. *J Card Fail*. 2018.

23. Low Left Atrial Strain Is Associated With Adverse Outcomes in Hypertrophic Cardiomyopathy Patients. Vasquez N, Ostrander BT, Lu DY, Ventoulis I, Haileselassie B, Goyal S, Greenland GV, **Vakrou S**, Olgin JE, Abraham TP, Abraham MR. *J Am Soc Echocardiogr*. 2019 May;32(5):593-603.e1.

24. Safety and efficacy of global intracoronary administration of cardiosphere-derived cells or conditioned medium immediately after coronary reperfusion in rats. **Vakrou S**, Nana MA, Nanas IA, Nana-Leventaki E, Bonios M, Kapelios C, Nanas J. *Hellenic J Cardiol*. 2019 Mar 21. pii: S1109-9666(18)30564-5. doi: 10.1016/jhj.2019.03.001

Περίληψεις ανακοινώσεων (Abstracts)

α. Σε διεθνή συνέδρια

Σχετική με το θέμα της διατριβής

“Intracoronary administration of cardiosphere derived stem cells during the acute phase of myocardial infarction results in high cell retention without worsening microvascular obstruction“. J. Terrovitis, **S. Vakrou**, C. Kapelios, M. Bonios, V. Sousonis, S. Sventzouri, G. Nanas, M. Michelinakis, A. Ntalianis, J. Nanas. *European Society of Cardiology Congress, Aug 2012.*

Λοιπές

1. Interventricular septum ischemia is critical for cardiogenic shock development during right ventricular infarction. D. Koudoumas, P. Glentis, E. Tseliou, L. Katsaros, I. Pozios, N. Diakos, **S. Vakrou**, E. Konstantakis, S. Drakos, J. Nanas. *Eur Heart J* 2010;31(Abtract Supplement):46
2. Intraaortic ballon pump counterpulsation augments the benefit of reperfusion on left ventricular mechanoenergetics – Experimental study. K. Malliaras, N. Diakos, I. Pozios, E. Tseliou, D. Koudoumas, L. Katsaros, M. Bonios, **S. Vakrou**, E. Konstantakis, J. Terrovitis, J. Nanas. *J Am Coll Cardiol* 2010;55(Supplement 10):A116.E1087.
3. An easily applicable in everyday clinical practice diagnostic algorithm for the detection of iron deficiency in heart failure. J Terrovitis, E. Kaldara, A. Ntalianis, C. Kapelios, S. Sventzouri, **S. Vakrou**, N. Michelinakis, G. Sainis. C. Matsouka, J. Nanas. *Eur Heart J*. 2011;32:918
4. A simple diagnostic and therapeutic algorithm for anemia in end stage heart failure patients. E. Kaldara, J. Terrovitis, Argyrios Ntalianis, C. Kapelios, **S. Vakrou**, S. Sventzouri, Z. Margari, D. Barbaroussi, S. Toumanidis, C. Matsouka, J. Nanas. *Circulation* 2011;124:A14653
5. A method for clinical estimation of left ventricular filling pressures in patients with chronic heart failure. C. Kapelios, J. Terrovitis, G. Sainis, V. Sousonis, N. Michelinakis, S. Sventzouri, **S. Vakrou**, A. Ntalianis, E. Kaldara, J. Nanas. *Eur J Heart Fail Suppl* (2012) 11 (Suppl 1):S240

6. The clinical course of patients with tachycardia induced cardiomyopathy is better compared to patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. N. Michelinakis, J. Terrovitis, V. Sousonis, C. Kapelios, E. Kaldara, A. Ntalianis, S. Sventzouri, **S. Vakrou**, Z. Margari, J. Nanas. *Eur J Heart Fail Suppl (2012) 11 (suppl 1): S128*
7. Left ventricular unloading improves dyssynchrony both during systole and diastole in an ischemia-reperfusion model. J. Terrovitis, I. Pozios, N. Diakos, L. Katsaros, K. Malliaras, E. Tseliou, N. Michelinakis, **S. Vakrou**, C. Kapelios, A. Papalois, A. Ntalianis, J. Nanas. *J Am Coll Cardiol 2012;59(Supplement 13):E1054*
8. Effects of intraaortic balloon pump counterpulsation on left ventricular systolic and diastolic function in a porcine model of acute ischemic heart failure; differences between ischemia and reperfusion. K. Malliaras, J. Terrovitis, A. Ntalianis, E. Charitos, N. Diakos, I. Pozios, E. Tseliou, L. Katsaros, **S. Vakrou**, J. Nanas. *Eur Heart J 2011;32(Abstract Supplement):780*.
9. Cellular bioenergetics is an important determinant of the molecular imaging signal derived from luciferase and sodium iodide symporter. Chan A, Chang C, Lin X, Higuchi T, Terrovitis J, Afzal JM, Yu J, Sun D, **Vakrou S**, Engles J, O'Rourke B, Wahl R, Pomper M, Tsui B, Abraham MR. Finalist, Melvin Judkins Young Investigator Award, *American Heart Association, Scientific Sessions, Nov 2012*
10. Bioadhesive and Biodegradable Hyaluronic Acid-Serum Hydrogel Promotes Cardiac Regeneration. A.T Chan, **S. Vakrou**, K. Woldemichael, J. Afzal, A. Rittenbach, X. Lin, S. Brown, R. Wahl, B. O'Rourke, T.P. Abraham, B.M. Tsui, C.J. Steenbergen, J.H. Elisseeff, M.R. Abraham. *American Heart Association, Scientific Sessions, Oct 2013*.
11. QTC dispersion on 12-lead electrocardiogram is inversely correlated with T1 relaxation times in patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. De Mendoza DH, Corona-Villalobos CP, **Vakrou S**, Zimmerman SL, Soleimanifard Y, Suarez J, Gonzales Cordova JD, Montoya Cerrilo D, Mormontoy Laurel W, Cerna K, Pozios I, Perez-Melo S, Bluemke D, Abraham TP, Abraham MR. *American College of Cardiology, March 2014*.
12. Late-onset right ventricular failure in patients on long-term mechanical support with continuous-flow LVADs. C. Kapelios, E.

- Kaldara, V. Sousonis, A. Ntalianis, **S. Vakrou**, J. Terrovitis, C. Charitos, J. Nanas. *ESC Heart Failure Congress, 2014*
13. Early and Late Cardioprotective Effects of Intracoronary Administration of 4-Chlorodiazepam in a Rat Model of Ischemia/Reperfusion. C. Kapelios, M. Nana, **S. Vakrou**, C. Kontogiannis, E. Leventaki, M. Anastasiou-Nana, D. Perrea, K. Malliaras. *ACC Annual Sessions, Chicago 2016*
 14. Intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere-derived cells attenuates myocardial inflammation and prevents depression of systolic function in rats with autoimmune myocarditis. E Leventaki, M Nana, N Poulianitis, CJ Kapelios, **S Vakrou**, D Rontogianni, D Perrea, J Nanas, K Malliaras. *European Society of Cardiology, Heart Failure meeting, 2016.*
 15. A combined cellular and surgical ventricular reconstruction therapeutic approach produces attenuation of remodeling in infarcted rats. M Bonios, M Nana, **S Vakrou**, CJ Kapelios, D Perrea, J Nanas, K Malliaras. *European Society of Cardiology, Heart Failure meeting, 2016*
 16. Allele specific differences in gene expression and mitochondrial function are present at the pre-hypertrophic stage of hypertrophic cardiomyopathy: results from two mouse models. **S.Vakrou**, R.Fukunaga, Y.Guan, M.Aon, L.Sorenson, K.Woldemichael, G.Tocchetti, R.Pineda, DB. Foster, TP.Abraham, B. O'Rourke, MR.Abraham. *Rapid Fire Abstract Oral Presentation, European Society of Cardiology Congress, Rome 2016.*
 17. Salutary effects of a novel implantable counterpulsation assist device on left ventricular mechanoenergetics in a porcine model of acute heart failure. K Malliaras, Y Nanas, C Kontogiannis, D Aravantinos, C Kapelios, S Marinakis, S Sarchosi, **S Vakrou**, D Perrea, J Nanas. *AHA Scientific Sessions 2016*
 18. Cardioprotective effects of Intracoronary administration of 4-Chlorodiazepam in small and large animal models of ischemia-reperfusion. C Kapelios, L Katsaros, M Tsamatsoulis, **S Vakrou**, V Sousonis, S Sventzouri, D Perra, J Nanas, K Malliaras. *AHA Scientific Sessions, 2016.*

19. Differences in miRNome, transcriptome and mitochondrial function in 2 mouse models of Hypertrophic Cardiomyopathy at prehypertrophic stage suggest need for precision medicine approach to treatment. **S Vakrou**, Ryuya Fukunaga, D. Brian Foster, Lars Sorensen, Yufan Guan, Miguel Aon, Brian O'Rourke, M. Roselle Abraham. *Poster Award, Heart Failure Society of America Congress, Dallas, 2017.*
20. Association of loop diuretics use and dose with outcomes in outpatients with heart failure: a systematic review and meta-analysis involving 48,628 patients. C Kapelios, M Bonou, K Malliaras, **S Vakrou**, E Athanasiadi, A Athanasiou, C Masoura, J Barbetseas. *European Heart Failure Congress, Athens 2019*

β. Σε ελληνικά συνέδρια

Σχετικές με το θέμα της διατριβής:

1. «Η ενδοστεφανιαία χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων στην οξεία φάση του εμφράγματος οδηγεί σε υψηλό ποσοστό εμφύτευσής τους χωρίς επιδείνωση της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας». **Σ. Βάκρου**, Χ. Καπέλιος, Μ. Μπόνιος, Β. Σουσώνης, Γ. Νανάς, Μ. Νανά, Σ. Σβεντζούρη, Α. Νταλιάνης, Τ. Σφακιανάκη, Ι. Νανάς, Ι. Τερροβίτης. 33^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, Αθήνα 2012. (Υποψήφια στις καλύτερες εργασίες του συνεδρίου)
2. «Η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης καρδιακών προγονικών κυττάρων κατά τη οξεία φάση του εμφράγματος του μυοκαρδίου». **Σ. Βάκρου**, Μ. Νανά, Ε. Λεβεντάκη-Νανά, Δ. Περρέα, Ι. Νανάς, Κ. Μαλλιάρης. 1^ο Βραβείο καλύτερης αναρτημένης ανακοίνωσης, Συνέδριο Μελέτης και Έρευνας της Καρδιακής Ανεπάρκειας, Αθήνα 2016
3. «Η χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων στην οξεία φάση του εμφράγματος δεν παρεμπόδιζε τη μικροκυκλοφορία, ενώ η παρακρινική τους δράση δεν είναι αρκετή να αντιρροπήσει τον καταρράκτη καρδιοτοξικών παραγόντων σε μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. **Σ. Βάκρου**, Μ. Νανά, Ε. Λεβεντάκη-Νανά, Χ.

Καπέλιος, Β. Αποστολόπουλος, Ι. Νανάς, Κ. Μαλλιάρης. 2^ο Βραβείο καλύτερης εργασίας του Πανελληνίου Καρδιολογικού Συνεδρίου, Αθήνα 2017.

ΕΙΣΗΓΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΔΙΑΛΕΞΕΙΣ ΚΑΤ'ΟΠΙΗ ΠΡΟΣΚΛΗΣΕΩΣ

1. “Energetics, redox and their impact on cardiac mechanics in Hypertrophic Cardiomyopathy –pursuing treatment targets”. Προσκεκλημένη ομιλήτρια στο εργαστήριο του καθηγητή D. Kass, στο Πανεπιστήμιο Johns Hopkins, στη Βαλτιμόρη, ΗΠΑ.
2. “Η παθοφυσιολογία της ανάστροφης αναδιαμόρφωσης”. Επιστημονική ημερίδα “Αποφόρτιση πίεσεως ή/και προγονικά κύτταρα και αναδιαμόρφωση της αριστεράς κοιλίας μετά από ΟΕΜ”, Αθήνα 2015

ΚΕΦΑΛΑΙΑ ΣΕ ΒΙΒΛΙΑ – ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

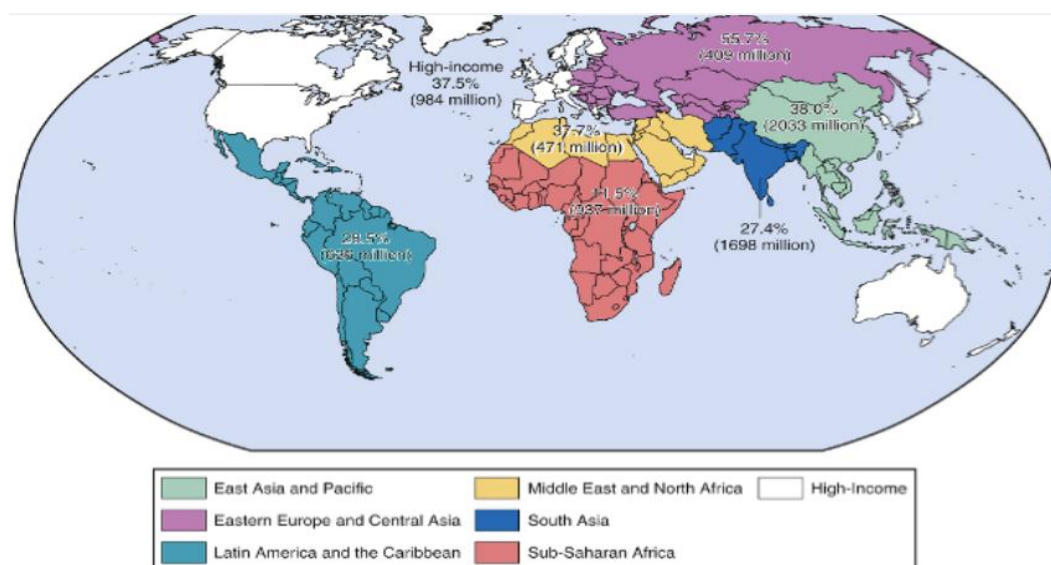
1. Θεραπευτικές εξελίξεις 2011, “Καρδιακή Ανεπάρκεια”. Ι. Τερροβίτης, Σ. Βάκρου, Χ. Καπέλιος, Σ. Σβεντζούρη, Λ. Κατσαρός, Ι. Νανάς. Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνος, σελίδες 67-78, 2011.
2. “Myocardial preservation – Translational research and clinical application”, chapter on “Gene therapy”. S. Vakrou, K. Malliaras. Editor: Dennis V Cokkinos. 2019, Springer, ISBN:978-3-319-98186-4
3. Καρδιολογικά Θέματα 2019, Διαλέξεις Ιπποκρατείου, «Η Υπέρταση στους Ογκολογικούς ασθενείς». Σ. Βάκρου, Δ. Παπαδόπουλος

III. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

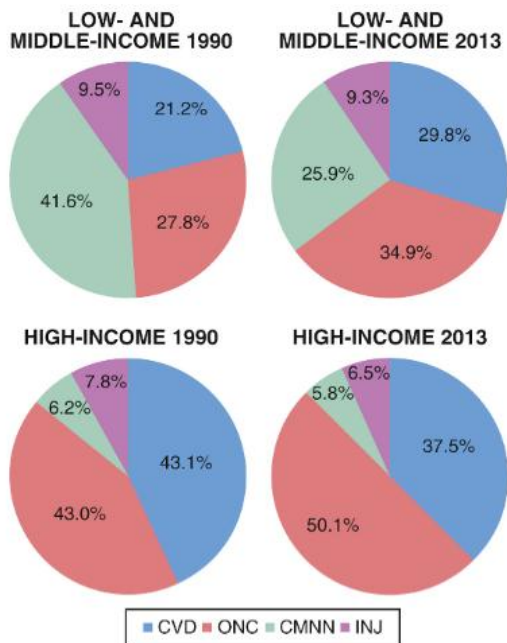
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. Επιδημιολογία Καρδιαγγειακών νοσημάτων

Την τελευταία δεκαετία τα καρδιαγγειακά νοσήματα (KAN) αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Το 2013 τα KAN υπολογίσθηκε ότι ήταν η αιτία για 17.3 εκατ. θανάτους και οδήγησαν σε 330 εκατομ. υπολογιζόμενα χρόνια ανικανότητας (disability-adjusted life-years, DALYs), αριθμός μεγαλύτερος τόσο σε απόλυτο αριθμό όσο και ποσοστιαία συγκριτικά με το 2010 (1). Ενώ αρχικά αποτελούσαν πρόβλημα κυρίως των ανεπτυγμένων χωρών, πλέον αφορούν σε αυξανόμενη συχνότητα χώρες με μέσο ή και χαμηλό κατά κεφαλήν εισόδημα. Σε αυτό αποδίδεται και η αύξηση από 26% σε 32% παγκοσμίως των θανάτων που οφείλονται σε KAN, ενώ σημειώνεται σημαντική διαφοροποίηση ανάλογα με τη γεωγραφική-οικονομική ταυτότητα (Εικόνες 1 και 2).



Εικόνα 1. Θάνατοι από καρδιαγγειακά νοσήματα, ως ποσοστά επί των ολικών θανάτων σε κάθε γεωγραφική περιοχή, 2013. ((From Global Burden of Disease Study 2013: Age-sex specific all-cause and cause-specific mortality, 1990–2013. Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation; 2014; and World Health Organization. Global Health Observatory Data Repository. Demographic and socioeconomic statistics: population data by country



Εικόνα 2. Αλλαγή προτύπου θνητότητας, από το 1990 έως 2013. CVD: καρδιαγγειακές νόσοι, ONC: άλλα μη μεταδοτικά νοσήματα, CMNN: μεταδοτικά νοσήματα, περιγεννητικά νοσήματα, νεογνικά νοσήματα, διαταραχές της θρέψης, INJ: τραύματα

(από: Global Burden of Disease Study 2013. Age-sex specific all-cause and cause-specific mortality, 1990–2013, Seattle: Institute for Health Metrics and Evaluation; 2014.)

B. Αναγεννητική ικανότητα της καρδιάς

Η μυοκαρδιακή βλάβη ως ακόλουθο εμφράγμα του μυοκαρδίου, συχνά οδηγεί σε καρδιακή ανεπάρκεια καθώς ένας μεγάλος αριθμός από καρδιομυοκύτταρα, κύτταρα του αγγειακού δικτύου και της εξωκυττάριας ουσίας βλάπτονται μη αναστρέψιμα. Ενώ τα ανθρώπινα καρδιομυοκύτταρα έχουν την ικανότητα αναγέννησης (2), ο ρυθμός τους δεν είναι σε θέση να αναπληρώσει το τεράστιο έλλειμμα τους, από το βλαπτικό ερέθισμα (3). Η περιορισμένη αυτή αναγεννητική ικανότητα θα μπορούσε κάποιος να πει ότι υποδηλώνεται και από το γεγονός ότι πρωτοπαθείς όγκοι της καρδιάς είναι εξαιρετικά σπάνιοι.

Οι υπάρχουσες θεραπείες δεν είναι σε θέση να επέμβουν σε αυτό το μηχανισμό, καθώς είτε είναι παρηγορητικές (φάρμακα) είτε ριζικές (αντικατάσταση της καρδιάς). Οι αναγεννητικές-κυτταρικές θεραπείες επηνοήθηκαν για να παρέμβουν ακριβώς σε αυτό το μηχανισμό: να επιταχυνθεί η δημιουργία νέου, λειτουργικού μυοκαρδιακού ιστού, με τη χορήγηση εξωγενώς προγονικών κυττάρων. Βασική τους υπόθεση - αρχικά τουλάχιστον- ήταν ότι θα ενσωματώνονταν στο ουλωτικό

μυοκάρδιο αντικαθιστώντας τα νεκρά κύτταρα ή θα ενεργοποιούσαν ενδογενείς επιδιορθωτικούς-αναγεννητικούς μηχανισμούς(4).

B1. Ορισμός μυοκαρδιακής αναγέννησης

Σε πρόσφατο consensus statement των ειδικών πάνω στο θέμα της αναγεννητικής ικανότητας της καρδιάς, ορίσθηκε για πρώτη φορά ως μυοκαρδιακή αναγέννηση η ικανότητα της καρδιάς να αντικαθιστά την απώλεια από καρδιομυοκύτταρα με νέα ("replace lost cardiomyocytes by new ones)(5).

B2. Τεκμηρίωση αναγεννητικής ικανότητας της καρδιάς στον άνθρωπο

Η αναγεννητική ικανότητα της καρδιάς στον άνθρωπο επιβεβαιώθηκε πειραματικά μόλις πριν από περίπου 10 χρόνια. Είχε προηγηθεί πειραματική τεκμηρίωση σε θηλαστικά και μη ζώα (zebrafish, μύες, επίμυες) αν και με αποτελέσματα ως προν τον βαθμό της αναγέννησης που κυμαινόνταν(6, 7), και ήδη είχε ξεκινήσει η δοκιμή διαφόρων ειδών προγονικών κυττάρων σε μικρές φάσης I κλινικές μελέτες(8, 9). Στην πολύ σημαντική εργασία τους οι Bergmann et al (2) υπολόγισαν την ηλικία των καρδιομυοκυττάρων σε ανθρώπινες καρδιές μετρώντας την ενσωμάτωση στο DNA τους του άνθρακα 14 [C-14], στοιχείο που απελευθερώθηκε στο περιβάλλον από τις πυρηνικές βόμβες κατά τη διάρκεια του Ψυχρού Πολέμου. Για αυτό το σκοπό συνέλεξαν νεκροτομικό υλικό από καρδιές ανθρώπων στη Σουηδία διάφορων χρονολογιών. Απέδειξαν για πρώτη φορά ότι τα ανθρώπινα καρδιομυοκύτταρα αναγεννόνται στον ενήλικα, συγκεκριμένα με ρυθμό 1% έως την ηλικία των 25 ετών και αργότερα με ρυθμό που μειώνεται στο 0.45% στην ηλικία των 75. Λιγότερο από το 50% των καρδιομυοκυττάρων αναγεννόνται κατά τη διάρκεια ζωής ενός ενήλικα. Ωστόσο με αυτή τους την εργασία υποστηρίχθηκε περαιτέρω η ιδέα της διέγερσης της αναγεννητικής

ικανότητας του μυοκαρδίου, ως θεραπευτική απάντηση στην απώλεια μυοκαρδιακών κυττάρων μετά από βλάβη.

Με γνώση (λόγω πειραματικής τεκμηρίωσης) της τελευταίας περίπου 20ετίας, σε διάφορα είδη (θηλαστικά και μη) οδήγησαν στα παρακάτω, κοινώς αποδεκτά, συμπεράσματα:

Πλέον είναι αποδεκτό ότι η φυσιολογική ανάπτυξη στα θηλαστικά

1. κατά την εμβρυική και νεογνική ηλικία συμπεριλαμβάνει την αύξηση (σε απόλυτο αριθμό) των καρδιομυοκυττάρων, ως αποτέλεσμα διαφοροποίησης των προγονικών κυττάρων και διαχωρισμό των σχετικά άωρων καρδιομυοκυττάρων(4).

2. Στα τρωκτικά η ανάπτυξη της καρδιάς συνεχίζεται και μετά τη γέννηση σε επίπεδο κυτταρικής υπερπλασίας (hyperplastic growth). Μυοκαρδιακή βλάβη σε ποντίκια μέχρι και 7 ημέρες μετά τη γέννηση, οδηγεί σε αντικατάσταση των νεκρών καρδιομυοκυττάρων με νέα, μέσω πολλαπλασιασμού(10, 11). Αυτό δεν έχει αποδειχθεί αν συμβαίνει στα αρχικά στάδια στα μεγαλύτερα θηλαστικά ή στον άνθρωπο.

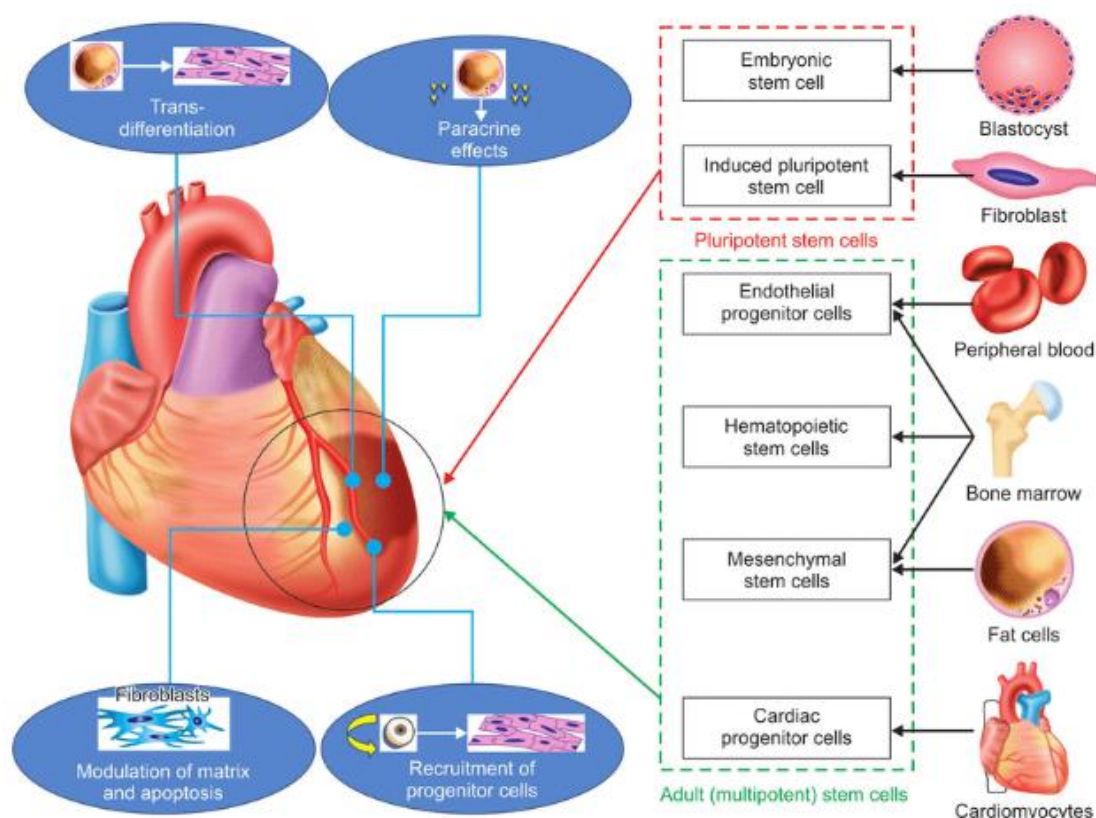
3. ο επικρατής μηχανισμός ανάπτυξης μετά τη γέννηση παραμένει η υπερτροφία (αύξηση σε μέγεθος) των καρδιομυοκυττάρων(12).

4. Στην υγιή, χωρίς βλάβη, ανθρώπινη καρδιά, ο συνολικός αριθμός των καρδιομυοκυττάρων παραμένει περίπου σταθερός, με ανακύκλωση υπολογιζόμενη από 0.5% έως 2% ανά έτος(2, 6, 10, 13). Ωστόσο, μετά από μυοκαρδιακή βλάβη στα ενήλικα θηλαστικά ο ρυθμός μυοκαρδιακής ανανέωσης μπορεί να είναι υψηλότερος. Δυστυχώς ο καθορισμός της πειραματικά είναι δύσκολος λόγω της συνυπάρχουσας φλεγμονής, πολλαπλασιασμού των στρωματικών και αγγειακών κυττάρων και της δημιουργίας ουλής.

Με σκοπό την προαγωγή της αναγέννησης της καρδιάς μετά από βλάβη, διάφορα είδη προγονικών κυττάρων -με κάποια από αυτά να διαθέτουν χαρακτηριστικά κλωνικότητας (stemness)- δοκιμάστηκαν αρχικά σε

πειραματικές μελέτες (κυρίως σε ποντίκια) και στη συνέχεια σε κλινικές μελέτες.

Β3. ΕΙΔΗ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ



Εικόνα 3. Προέλευση και είδη προγονικών κυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην αναγέννηση του μυοκαρδίου. Δύο βασικές πηγές προέλευσης: πολυδύναμα εμβρυικά βλαστοκύτταρα (αφορούν απόκτηση προγονικών κυττάρων από το στάδιο της βλαστοκύστης και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστοκύτταρα από ινοβλάστες) και πολυδύναμα προγονικά κύτταρα από ενήλικο ιστό (αφορούν τα προγονικά κύτταρα από περιφερικό αίμα, μυελό των οστών, λιπώδη ιστό και καρδιακό ιστό). [Leffer, Marban; Is Cardioprotection dead. Circulation 2017;136(1):98-109]

B3.1. Σκελετικοί μυοβλάστες

Αυτοί αποτελούν τον πρώτο κυτταρικό πληθυσμό που συμπεριλήφθηκε σε μία φάσης I κλινική μελέτη, το 2000 από την ερευνητική ομάδα του Menasche et al (14). Στη συγκεκριμένη χορηγήθηκαν ενδομυϊκά, αυτόλογα κύτταρα από βιοψίες σκελετικού μύος, κατά τη διάρκεια χειρουργείου αορτοστεφανιαίας παράκαμψης. Λόγω των ενθαρρυντικών αποτελεσμάτων, ακολούθησε η μελέτη MAGIC (15), η οποία ήταν τυχαιοποιημένη, διπλή τυφλή μελέτη, ομάδας ελέγχου-παρέμβασης, που συμπεριέλαβε ασθενείς με τελικού σταδίου καρδιακή ανεπάρκεια. Δε σημειώθηκε διαφορά στο πρωτεύον καταληκτικό σημείο (βελτίωση του κλάσματος εξώθησης) μεταξύ των ομάδων κατά την ενδιάμεση ανάλυση, με συνέπεια την πρόωρη διακοπή της μελέτης. Επιπλέον τέθηκαν ερωτήματα ως προς την ασφάλεια της χορήγησης του συγκεκριμένου τύπου κυττάρων, καθώς σημειώθηκαν επεισόδια αρρυθμιών στην ομάδα χορήγησης σκελετικών μυοβλαστών, τα οποία αποδόθηκαν στην απουσία ηλεκτρομηχανικής σύζευξης μεταξύ των εμφυτευμένων μυοβλαστών και των καρδιομυοκύτταρων. Αυτό είχε ως συνέπεια την εγκατάλειψη της περαιτέρω χρήσης των συγκεκριμένων κυττάρων. Ωστόσο οι ερευνητές των συγκεκριμένων μελετών πιστεύουν ότι ρόλο έπαιζε η τεχνική χορήγησης των κυττάρων (πολλαπλές μυοκαρδιακές ενέσεις που πιθανόν δημιουργούσαν συσσωματώματα μυοβλαστών που οδηγούσαν σε “διακοπές” αγωγιμότητας. Το τελευταίο υποστηρίζεται και από πρόσφατη μελέτη σε Ιάπωνες ασθενείς με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, στους οποίους χρησιμοποιήθηκαν μυοβλάστες σε επίθεμα, επικαρδιακά, χωρίς να διαπιστωθούν αρρυθμολογικά προβλήματα(16).

B3.2. Κύτταρα από το μυελό των οστών (Bone marrow-derived cells, BMCs)

Τα κύτταρα από το μυελό των οστών (BMCs) ήταν τα δεύτερα μη καρδιακής προέλευσης κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην

αναγεννητική θεραπεία της καρδιάς. Αυτά διακρίνονται περαιτέρω σε υποκατηγορίες: Α) χωρίς διάκριση, όλα τα κύτταρα από τον μυελό των οστών (unselected bone marrow-derived cells), Β) τα προγονικά αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (purified haematopoietic stem and progenitor cells) και Γ) τα μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs). Η εύκολη διαθεσιμότητα, η απουσία ανάγκης για περαιτέρω επεξεργασία των κυττάρων και το χαμηλό κόστος ήταν οι βασικοί λόγοι που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ δεν υπήρχε σαφής πειραματικά τεκμηριωμένη αποτελεσματικότητα της δράσης τους. Έτσι, πολύ σύντομα χρησιμοποιήθηκαν σε κλινικές μελέτες τόσο σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (από τους λίγους κυτταρικούς πληθυσμούς που χρησιμοποιήθηκαν) όσο και σε χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, χωρίς να τεκμηριωθεί επακριβώς ο μηχανισμός δράσης τους και η βιολογία τους. Αυτός ήταν και ένας από τους λόγους που τα αποτελέσματα των μελετών ήταν εξαιρετικά ετερογενή και μη πειστικά. Επιπλέον δεν υπάρχουν μελέτες που να συγκρίνουν τις διαφορετικές κατηγορίες των BMCs.

2α. Unselected bone marrow cells (uBMCs): Τα κύτταρα από το μυελό των οστών είναι εξαιρετικά ετερογενής πληθυσμός (προγονικά, στρωματικά και αιμοποιητικά κύτταρα, σε διάφορα στάδια ωρίμανσης) με διακριτούς φαινότυπους και λειτουργίες. Φαίνεται να αποτελούν τον λιγότερο ενδυνάμει κυτταρικό πληθυσμό με αναγεννητική δράση στο μυοκάρδιο. Μια πρώτη μικρή μελέτη δημοσιεύθηκε το 2001 (αμέσως μετά τη δημοσίευση της πρώτης εργασίας σε μύες στην οποία αποδεικνυόταν η αναγεννητική ικανότητα των BMCs μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου(17)), στην οποία ενδοστεφανιαία χορηγήθηκαν BMCs μονοκύτταρα σε ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου(18). Ακολούθησε η μελέτη από τους Hendrikx et al το 2006 (19), όπου σε ασθενείς που υποβάλλονταν σε CABG και ενδομυοκαρδιακή χορήγηση αυτόλογων BMCs σημειώθηκε βελτίωση της τμηματικής συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας σε προηγουμένως ουλωτικά χωρίς βιωσιμότητα τμήματα, χωρίς όμως

βελτίωση της συνολικής συστολικής απόδοσης ή του όγκου της αριστερής κοιλίας. Μεταγενέστερες μελέτες (FOCUS-CCTRN, TAC-HFT, TIME, LATE-TIME, SWISS-AMI) επίσης δεν έδειξαν όφελος(20, 21) (22, 23).

Πλέον τα unfractionated bone-marrow derived cells είναι γνωστό ότι δεν διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα όταν μεταμοσχεύονται στο μυοκάρδιο(24, 25). Τέλος, αμφισβητείται ακόμα και η εγκυρότητα των πρώτων εργασιών που το υποστήριζαν(17), με πιο πρόσφατο άρθρο στους NYT όπου κατηγορείται ο βασικός ερευνητής για πλαστά και ψεύτικα δεδομένα(26).

2β. Απομονωμένα αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα (purified haematopoietic stem and progenitor cells): BMCs συλλέγονται αφού έχει προηγηθεί διέγερση του μυελού των οστών με αυξητικό παράγοντα των κοκκιοκυττάρων (granulocyte colony-stimulating factor),. Έτσι εμπλουτίζονται σε αιμοποιητικά και προγονικά κύτταρα, τα οποία εκφράζουν CD34 και/ή CD133 δείκτες επιφανείας. Κύτταρα με αυτούς τους δείκτες επιφανείας έχει βρεθεί ότι έχουν σημαντική αγγειογεννητική ικανότητα, και η χορήγησή τους στην ανθεκτική στηθάγχη φαίνεται να έχει θετικά αποτελέσματα(27). Η δοκιμή τους ωστόσο στην καρδιακή ανεπάρκεια δε φάνηκε να έχει ευεργετικό αποτέλεσμα (IMPACT-CABG)(28), παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα στη μικροτερη φάσης I μελέτη που είχε προηγηθεί (29).

2γ. Μεσεγχυματικά κύτταρα (mesenchymal stem cells, MSCs): αυτός ο υποπληθυσμός των BMCs φαίνεται να έχει τη μεγαλύτερη ικανότητα για αναγέννηση της καρδιάς. Είναι άμεσα διαθέσιμα, διατηρούν την βιοενεργότητά τους μετά την απόψυξη και διαθέτουν ισχυρή παρακρινική ικανότητα (αγγειογεννητική, αντιφλεγμονώδης και ανοσοτροποποιητική)(30), που φαίνεται να αποτελεί και το μηχανισμό δράσης τους(31, 32). Αποτελούν τον κυτταρικό πληθυσμό που έχει χρησιμοποιηθεί στις περισσότερες κλινικές μελέτες για πολλές διαφορετικές ασθένειες. Και σε αυτή την κατηγορία ποικίλλουν οι

πληθυσμοί MSCs που έχουν χρησιμοποιηθεί καθώς και η δοσολογία/οδός χορήγησης μεταξύ των μελετών. Τα μη τροποποιημένα MSCs(33), τα τροποποιημένα MSCs (34-36), τα εμπλουτισμένα με μακροφάγα MSCs (37, 38) και τα επιλεγμένα βάση αντιγονικότητας (39) είναι κάποια από αυτά. Λόγω του πλήθους των μελετών με BMCs, η πιο πρόσφατη μετα-ανάλυση από την Cochrane δίνει κάποια συμπεράσματα ως προς την αποτελεσματικότητα αυτού του κυτταρικού πληθυσμού (40). Συγκεκριμένα 38 μελέτες, με συνολικά 1,907 ασθενείς έχουν λάβει θεραπεία με BMCs. Από αυτές 15 αφορούσαν ασθενείς με χρόνια ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια, 17 με συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια και 7 ασθενείς με στηθάγχη. Από τη μετα-ανάλυση προκύπτει ότι 1. η χορήγηση BMCs είναι ασφαλής, 2. τα BMCs μείωσαν σημαντικά τη θνητότητα βραχυπρόθεσμα (<12 μήνες) και μακροπρόθεσμα (>12 μήνες) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο χρειάζεται ιδιαίτερη προσοχή η ερμηνεία αυτή. Για τη βραχυπρόθεσμη θνητότητα, ο σχετικός κίνδυνος ήταν 0.48 για την ομάδα των BMCs, όμως αυτή η μείωση δεν σημειωνόταν αν αποκλειόντουσαν από την ανάλυση μη τυχαιοποιημένες μη τυφλές μελέτες (40). Παρομοίως, η μακροπρόθεσμη θνητότητα ήταν μειωμένη στην ομάδα των BMCs συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (4.8% έναντι 15.4% αντίστοιχα, RR 0.38), αλλά δε διέφερε στην υποανάλυση (στην οποία είχαν αποκλεισθεί οι μη τυχαιοποιημένες μελέτες). 3. Τα BMCs δε μείωσαν την επίπτωση του συμπλόκου των ανεπιθύμητων ενεργειών (θνητότητα, έμφραγμα, νοσηλεία για καρδιακή ανεπάρκεια). 4. Η κυτταρική θεραπεία βελτίωνε βραχυπρόθεσμα το ΚΕΑΚ όπως μετράται με τη μαγνητική τομογραφία, ενώ μακροπρόθεσμα η ερμηνεία των αποτελεσμάτων πάλι αλλάζει ανάλογα με τη στατιστική μεθοδολογία. Πλέον μελέτες φάσης III είναι υπό εξέλιξη.

B3.3. Κύτταρα καρδιακής προέλευσης (cardiac-derived cells) - Καρδιακά προγονικά κύτταρα (Cardiac progenitor cells, CPCs)

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν κύτταρα που απομονώνονται από μυοκαρδιακές βιοψίες. Πρόκειται για: α) τα c-Kit⁺ κύτταρα (KIT⁺ Cardiac Stem Cells), β) τα κύτταρα προερχόμενα από καρδιόσφαιρες (cardiosphere-derived cells, CDCs), τα οποία και χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διδακτορική διατριβή και θα αναφερθούμε εκτενώς και γ) τα Sca1⁺ κύτταρα, τα οποία όμως δεν υπάρχουν στον άνθρωπο. Κοινό τους χαρακτηριστικό είναι ότι εκφράζουν καρδιομυοκυτταρικές πρωτεΐνες (στην επιφάνεια των κυττάρων) όταν καλλιεργούνται *in vitro* υπό συγκεκριμένες συνθήκες, αλλά και *in vivo* (41, 42). Η χρήση αυτών των κυττάρων βασίστηκε σε σημαντικό όγκο βασικής έρευνας, από την οποία προέκυψε το εύρημα ότι στις καρδιές των θηλαστικών ανευρίσκονται προγονικά κύτταρα, των οποίων η ικανότητα για επιδιόρθωση του ιστού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία. Τα κύτταρα αυτά βρίσκονται σε περίσσεια κατά την εμβρυική περίοδο, αλλά μειώνονται ταχέως με την ηλικία (43). Η υπόθεση πίσω από την ανάπτυξη αυτών των κυττάρων ήταν ότι τα προγονικά κύτταρα από την καρδιά θα ήταν πιο αποτελεσματικά στην βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας συγκριτικά με κύτταρα που φαινοτυπικά δεν μοιάζουν τόσο πολύ με αυτά που σκοπός είναι αν αντικαταστήσουν ή “σώσουν”. Ωστόσο μόνο σε πολύ μικρό βαθμό φαίνεται να μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό νέων καρδιομυοκυττάρων(44, 45).

3α. Όσον αφορά τα Kit⁺ cells, που δοκιμάσθηκαν στη μελέτη SCIPPIO, φαίνεται ότι έχουν αναγεννητική ικανότητα κυρίως για κύτταρα του αγγειακού δικτύου και όχι για καρδιομυοκύτταρα(46). Η μελέτη όσο και τα c-Kit⁺ κύτταρα είναι υπό επιστημονική αμφισβήτηση. Συγκεκριμένα, έχουν αποσυρθεί οι δημοσιεύσεις των συγκεκριμένων ερευνητών από τα περιοδικά (47).

3β. Κύτταρα προερχόμενα από καρδιόσφαιρες (CDCs): η δημιουργία τους ξεκίνησε το 2004 από την ερευνητική ομάδα του E. Marban και το 2007 δημοσιεύθηκε το πλήρες πρωτόκολλο που τα χαρακτήριζε ως τύπο προγονικών κυττάρων προερχόμενων από το ενήλικο μυοκάρδιο(48). Ο τρόπος παραγωγής τους περιγράφεται με λεπτομέρεια στη μεθοδολογία της διδακτορικής διατριβής. Αδρά μυοκαρδιακές βιοψίες καλλιεργούνται σε ειδικό θρεπτικό υλικό, επιτρέποντας έτσι την ανάπτυξη προγονικών-στρωματικών κυττάρων τα οποία συλλέγονται και μέσω του ενδιάμεσου σταδίου των καρδιοσφαιρών, οδηγούν στην ανάπτυξη του τελικού κυτταρικού προϊόντος, τα καρδιακά προγονικά κύτταρα απο καρδιόσφαιρες (Cardiosphere-derived cells, CDCs). Τα CDCs εκφράζουν CD105, ενώ δεν εκφράζουν CD45 ή άλλους δείκτες επιφανείας αιματοποιητικών κυττάρων. Είναι πολυδύναμα και έχουν κλωνικότητα (49). Μετά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ποντίκια και αρουραίους, δοκιμάστηκαν στην κλινική μελέτη φάσης I/II, CADUCEUS (50), στην οποία η χορήγηση αυτόλογων CDCs στην ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια ήταν ασφαλής και αποτελεσματική, καθώς μείωσε την μάζα του ουλωτικού μυοκαρδίου. Έτσι έθεσε τη βάση της δυνατότητας για αναγέννηση του μυοκαρδίου. Ακολούθησαν πολλές πειραματικές μελέτες που τεκμηρίωσαν το μηχανισμό δράσης των CDCs, ο οποίος ήταν κυρίως μέσω διέγερσης παρακρινικών μηχανισμών, καθώς η επιβίωση των CDCs, όπως και των περισσοτέρων προγονικών κυττάρων, δεν ξεπερνά τις 3 εβδομάδες, και επειδή δεν υπάρχει απόδειξη ότι τα ίδια τα κύτταρα διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα. Συγκεκριμένα στη μελέτη των Li et al (51) συγκρίθηκε το παρακρινικό προφίλ των CDCs και άλλων 3 τύπων προγονικών κυττάρων μη καρδιακής προέλευσης (BM-MNCs, MSCs από μυελό των οστών, MSCs από λιπώδη ιστό). Βρέθηκε ότι τα CDCs υπερερούσαν λειτουργικά, και είχαν πιο “ισορροπημένο” προφίλ έκκρισης παρακρινικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, εκκρίναν σε μεγαλύτερο βαθμό αυξητικούς παράγοντες όπως αγγειοποιητίνη, bFGF,

HGF, IGF-1, SDF-1 και VEGF *in vitro*. Επιπλέον η σύγκρισή τους *in vivo* έδειξε ότι τα CDCs υπερτερούσαν ως προς την ικανότητα τους για εμφύτευση στο μυοκάρδιο και προστασία του ισχαιμικού μυοκαρδίου (μείωση απόπτωσης των καρδιομυοκυττάρων και remodelling). Αργότερες πειραματικές μελέτες, έδειξαν ότι τα εξωσώματα από τα CDCs (νανοσωματίδια-κυστίδια που εκκρίνουν τα κύτταρα και περιέχουν πεπτίδια, miRNAs, λιπίδια, DNA) μειώνουν την έκταση της ίνωσης και την ανάστροφο αναδιαμόρφωση και επομένως δρουν ευεργετικά στην καρδιακή λειτουργία (βελτίωση στο κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας)(52). Τέλος τα CDCs δοκιμάστηκαν - με ενθαρρυντικά αποτελέσματα από τις κλινικές μελέτες- και σε νοσολογικές οντότητες πέραν της στεφανιαίας νόσου, όπως στην καρδιομυοπάθεια από τη μυασθένεια Duchenne και στο σύνδρομο της υποπλαστικής αριστερής κοιλίας (53, 54).

B3.4. Πολυδύναμα Κύτταρα (εμβρυικής προέλευσης -embryonic stem cells και επαγόμενα πολυδύναμα -induced pluripotent stem cells)

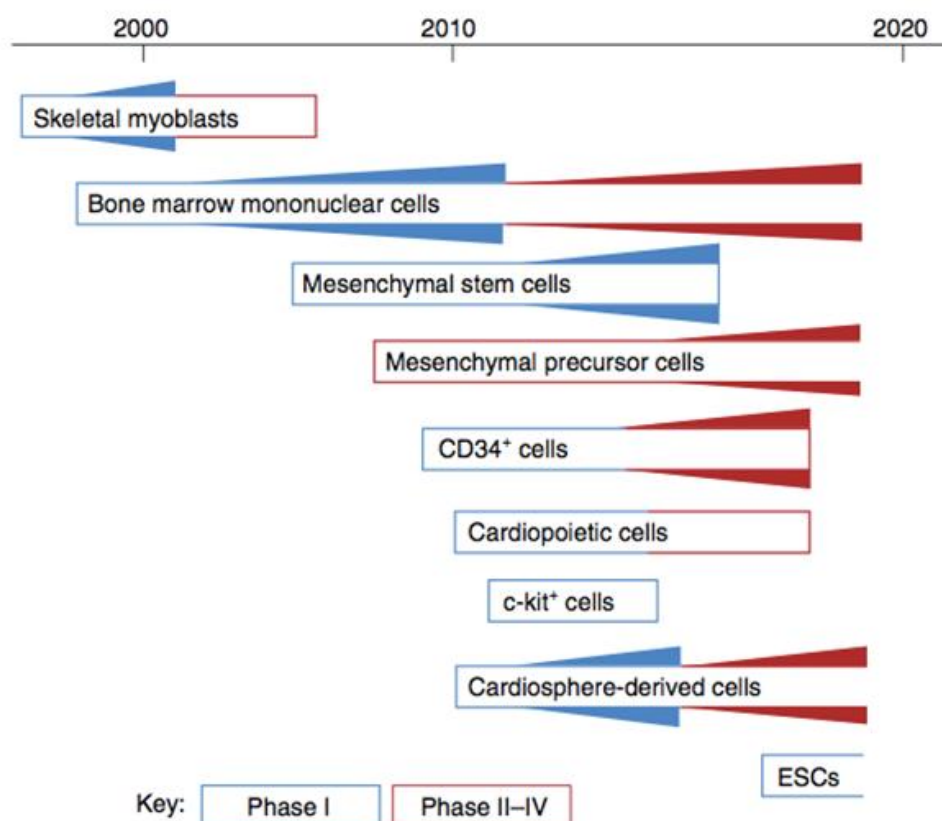
Πρόκειται για κυτταρικό πληθυσμό που μπορεί να πολλαπλασιάζεται “για πάντα” σε αδιαφοροποίητη κατάσταση, αλλά έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε οποιοδήποτε κύτταρο υπό τα κατάλληλα ερεθίσματα/ συνθήκες καλλιέργειας. Τα πολυδύναμα κύτταρα διαφοροποιούνται σε άωρα καρδιομυοκύτταρα *in vitro*, σε ποσοστό >80% (55, 56). Είναι σημαντικό να τονίσουμε ότι η χορήγηση αδιαφοροποίητων πολυδύναμων κυτάρων *in vivo* σε ανοσοκατεσταλμένους οργανισμούς οδηγεί στο σχηματισμό τερατωμάτων (57). Σε πειραματόζωα έχουν βρεθεί καρδιομυοκύτταρα που έχουν διαφοροποιηθεί από εμβρυικά βλαστοκύτταρα (ESCs). Αυτή η τεχνική εξασφαλίζει άμεση κυτταρική διαθεσιμότητα, τιτλοποίηση- παραγωγή κυττάρων και τη δυνατότητα ελέγχου κατά το στάδιο της

διαφοροποίησης και συνεπώς χορήγηση του κυττάρου κατά το επιθυμητό στάδιο καρδιομυογενικής δέσμευσης (cardiomyogenic commitment). Διάφορες προ-κλινικές μελέτες έχουν πλέον αποδείξει την αποτελεσματικότητα της χορήγησης αυτών των κυττάρων, όπως και των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων (induced-pluripotent stem cells - iPSCs)(58). Έχει αποδειχθεί πειραματικά η πολυδυναμικότητα των ESCs, δηλαδή η δυνατότητά τους να διαφοροποιούνται προς τη δημιουργία πρώιμων προγονικών καρδιαγγειακών κυττάρων, μέσω της έκφρασης των πρωτεϊνών ISL1 (insulin gene enhancer protein, δείκτης κυτταρικής δέσμευσης για ωρίμανση ως προς την καρδιαγγειακή κατεύθυνση) και SSEA1 (stage-specific embryonic antigen 1, γνωστή και ως FUT4, δείκτης απώλειας της πολυδυναμικότητας)(59). Τα καρδιομυοκύτταρα από πολυδύναμα κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να συζεύγνυνται ηλεκτρικά με τα κύτταρα του δέκτη, να συστέλλονται συγχρονισμένα, ωστόσο έχει αναφερθεί το ενδεχόμενο να προάγουν προαρρυθμικά φαινόμενα (60, 61). Θεωρείται ότι επιφέρουν το αναγεννητικό τους όφελος είτε άμεσα μέσω δημιουργίας δύναμης συστολής αλλά και έμμεσα μέσω παρακρινικής δράσης. Η ερευνητική ομάδα του P. Menache έχει δοκιμάσει την εφαρμογή τους στον άνθρωπο. Συγκεκριμένα αναφέρουν την επιτυχή ασφαλή και αποτελεσματική εφαρμογή συνδιασμού βιοϋλικού με ESCs σε ασθενή με καρδιακή ανεπάρκεια ο οποίος υπεβλήθη σε αορτοστεφανιαία παράκαμψη (62).

B.3.5 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Δυστυχώς η σύγκριση μεταξύ των διάφορων κλινικών μελετών δεν είναι εύκολη καθώς στις προδιαγραφές τους ποίκιλλε το προφίλ ασθενούς, ο τύπος και ο αριθμός των κυττάρων, η οδός χορήγησης, η χρονική στιγμή (μετά από οξύ έμφραγμα ή σε χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια -ισχαιμική ή μη), ακόμη και ο ίδιος ο σχεδιασμός της μελέτης, πχ τα καταληκτικά

σημεία (Εικόνα 4). Όσον αφορά το σχεδιασμό το μελετών, ειδικά στην αρχή, πολλές ήταν ανοικτού τύπου, μη τυφλά τυχαιοποιημένες, σε συνδιασμό με άλλες παρεμβάσεις (πχ CABG) που “νόθευαν” το πραγματικό αποτέλεσμα, χωρίς επαρκή στατιστική δύναμη (μικρός αριθμός ασθενών) και με καταληκτικά σημεία μη στοχευμένα.



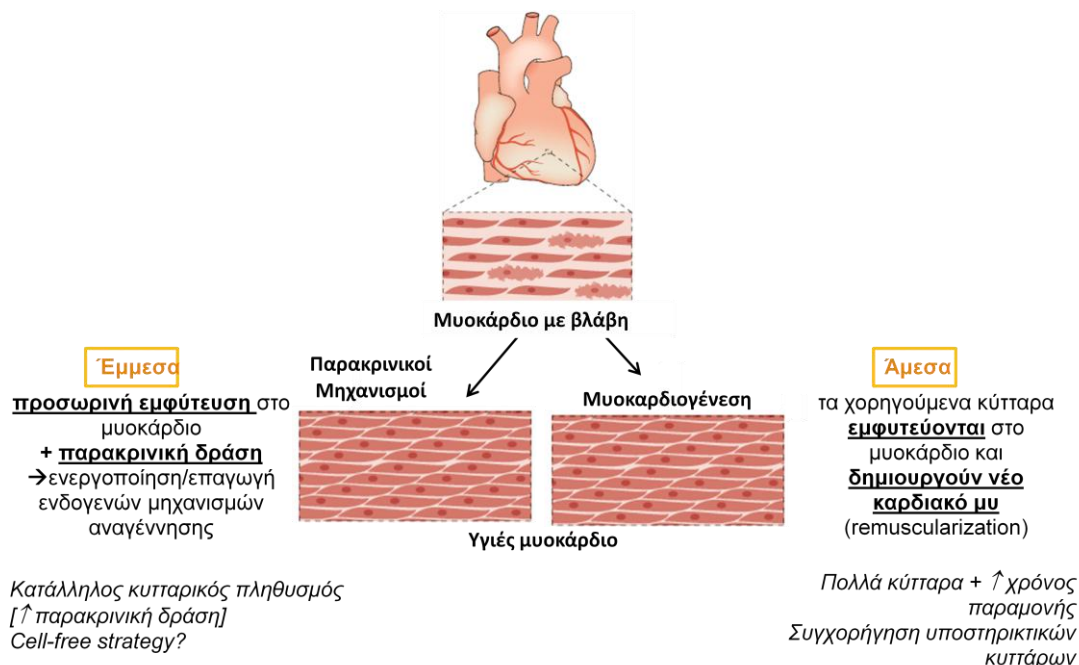
Εικόνα 4. Κλινικές δοκιμές των διαφόρων τύπων κυττάρων στο μυοκάρδιο. Οι κυτταρικοί τύποι που είναι ενεργά υπό δοκιμή φαίνονται στα παραλληλόγραμμα με το ανοικτό άκρο στα δεξιά. Οι κυτταρικοί τύποι στα κλειστά παραλληλόγραμμα αποτελούν πληθυσμούς που πλέον δε χρησιμοποιούνται στην κλινική έρευνα. Το εμβαδό των τριγώνων είναι σε αδρές γραμμές ανάλογο του αριθμού των μελετών που έχουν διεξαχθεί ανά χρονική στιγμή. Μελέτες φάσης I απεικονίζονται με μπλε χρώμα, μελέτες φάσης II ή III με κόκκινο χρώμα. ESCs, εμβρυικά βλαστοκύτταρα. [E. Marban, *A mechanistic roadmap for the clinical application of cardiac cell therapies*, *Nature Biomedical engineering*, 2018]

Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, οι ειδικοί στο consensus statement τους (5), κατέληξαν ότι:

1. Με βάση τις περισσότερες μελέτες, φαίνεται ότι η χορήγηση προγονικών κυττάρων επιφέρει θεραπευτικός όφελος στο μυοκάρδιο που έχει υποστεί βλάβη.
2. Οι κυτταρικές θεραπείες μπορεί να επηρεάζουν την ενδογενή μυοκαρδιακή αναγέννηση ή άμεσα να δίνουν γένεση σε καρδιομυοκύτταρα.
3. Ο βαθμός που επιφέρεται η αναγέννηση εξαρτάται από τον τύπο των χορηγούμενων κυττάρων, το ποσοστό επιτυχούς εμφύτευσής τους και το χρόνο επιβίωσής του.
4. Ο βαθμός της εμφύτευσης και της διαφοροποίησης των χορηγούμενων κυττάρων σε καρδιομυοκύτταρα δεν είναι ανάλογος με το λειτουργικό όφελος, γεγονός που υποδηλώνει ότι και άλλοι μηχανισμοί εμπλέκονται στο αναγεννητικό αποτέλεσμα (63).
5. Οι μηχανισμοί που επιφέρεται το όφελος από την αναγεννητική θεραπεία ακόμα παραμένουν ασαφείς. Εμπλέκουν όμως την παρακρινική δράση, η οποία συμπεριλαμβάνει τη δράση των εξωσωμάτων στα υπάρχοντα καρδιομυοκύτταρα (64, 65) και στις πρωτεΐνες (post-translational modifications)(66).
6. Η μεταμόσχευση καρδιομυοκυττάρων προερχόμενων από πολυδύναμα προγονικά κύτταρα μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία νέου μυοκαρδιακού ιστού, ο οποίος συσπάται σύγχρονα με τον προϋπάρχοντα μυοκαρδιακό ιστό, με συνέπεια τη δημιουργία δύναμης συστολής.

B.4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΥΟΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΕΠΙΔΙΟΡΘΩΣΗΣ

Δύο τρόποι μυοκαρδιακής επιδιόρθωσης μετά από ισχαιμική βλάβη έχουν προταθεί:



Εικόνα 5. Δύο μηχανισμοί μυοκαρδιακής αναγέννησης έχουν προταθεί μέσω της χορήγησης προγονικών κυττάρων: α) Η εξωγενής αναγέννηση που αναφέρεται στη δημιουργία νέου καρδιακού μύος από τα χορηγούμενα προγονικά κύτταρα (remuscularization) και β) η έμμεση αναγέννηση μέσω ενεργοποίησης των ενδογενών μηχανισμών αναγέννησης (παρακρινική δράση).

B.4.1. Δημιουργία νέου καρδιακού μύος εξωγενώς από χορηγούμενα προγονικά κύτταρα (remuscularization)

Προϋποθέτει ότι τα χορηγούμενα προγονικά κύτταρα εμφυτεύονται μόνιμα στον ιστό (homing, engraftment) και δημιουργούν νέο που αντικαθιστά το μυοκάρδιο που έχει υποστεί βλάβη. Σε αυτή την περίπτωση για να έχει πιθανότητες επιτυχίας ένα κλινικό πρωτόκολλο θα πρέπει να εξασφαλίζει:

α. μεγάλη παραγωγή κυττάρων με στόχο την καρδιακή αναγέννηση (cardiac committed cells). Από τους κυτταρικούς πληθυσμούς που

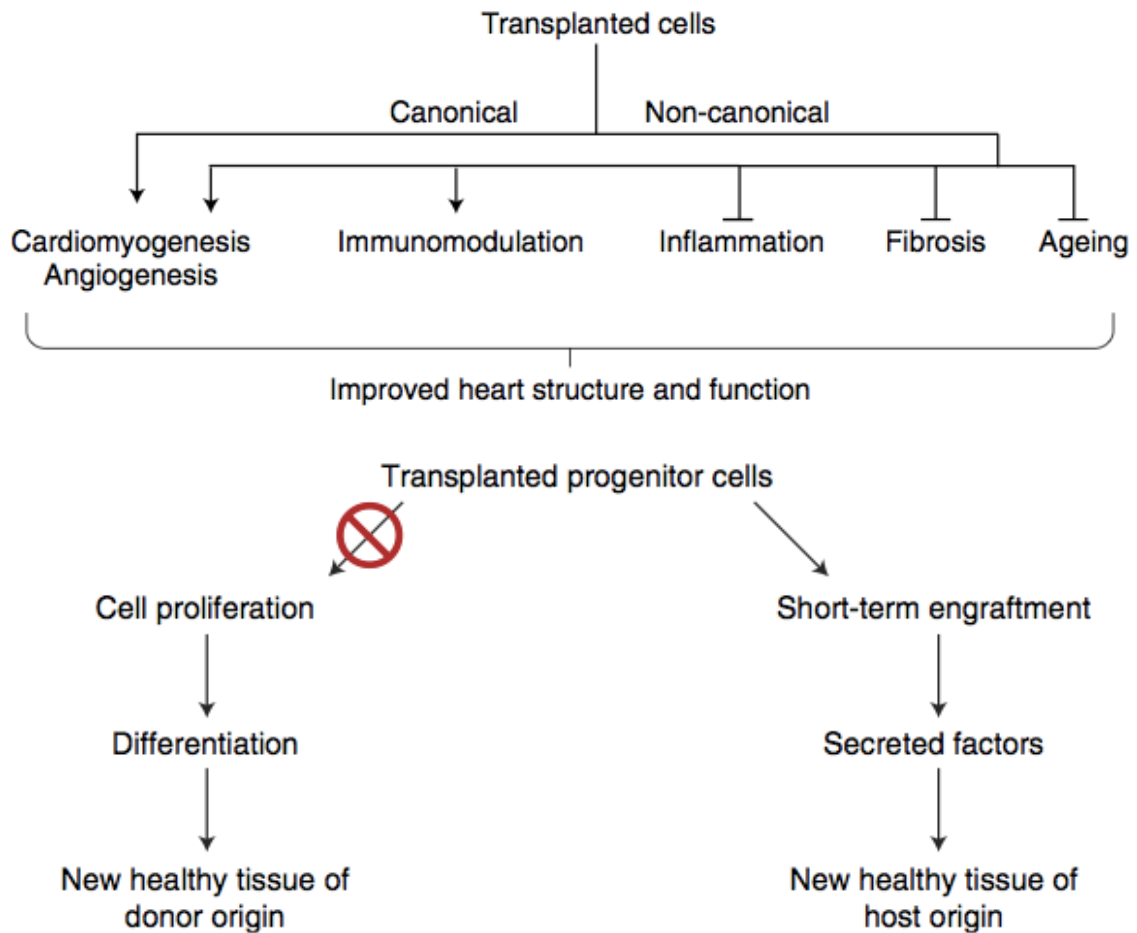
αναφέραμε, πλέον έχει αποδειχθεί ότι οι σκελετικοί μυοβλάστες και τα BMCs δεν μπορούν να διαφοροποιηθούν προς ώριμα καρδιομυοκύτταρα (24, 67). Επιπλέον τα καρδιακά προγονικά κύτταρα (Kit+ CSCs και CDCs) αφενώς είναι σε μικρό μόνο αριθμό στο μυοκάρδιο(68), αφετέρου έχει δειχθεί ότι μόνο παροδικά εμφυτεύονται στο μυοκάρδιο και δρουν κυρίως παρακρινικά(69). Συνεπώς τα καρδιακά προγονικά ή πιο ώριμα καρδιομυοκύτταρα προερχόμενα από πολυδύναμα κύτταρα (iPSCs και ESCs) είναι οι πιο καλοί υποψήφιοι. Δημοσίευση που αφορούσε τη χορήγηση καρδιομυοκυττάρων προερχόμενων ESCs σε μακάκους μετά από βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, έδειξε ότι τα κύτταρα αυτά μπορούσαν να παράγουν νέο μυοκαρδιακό ιστό(60).

β. στρατηγικές που αυξάνουν την επιβίωση των χορηγούμενων κυττάρων. Πρόκειται για ένα σημαντικό μειονέκτημα των μέχρι τώρα προσπαθειών για καρδιακή αναγέννηση, καθώς έχει φανεί ότι ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων πεθαίνει τις πρώτες ώρες ή μέρες από την χορήγησή τους(70). Πειραματικά έχει αυξηθεί η κυτταρική επιβίωση μέσω γενετικής μετατροπής (genetic engineering)(71), ex vivo προ-θεραπείας των κυττάρων με μελατονίνη(72) ή ιστική ισχαιμική προ-εκγύμναση του μυοκαρδίου (όπου επάγεται η έκφραση mir-210 το οποίο δρα αντιαποπτωτικά στα χορηγούμενα κύτταρα)(73). Δυστυχώς η κλινική εφαρμογή αυτών των τεχνικών έχει δυσκολίες. Η χορήγηση των κυττάρων με βιοϊλικά, κυρίως τεχνολογίας υδρογέλης με βάση το υαλουρονικό, έχει επίσης δείξει ότι αυξάνει την επιβίωση των κυττάρων(74, 75).

γ. συγχορήγηση υποστηρικτικών κυττάρων (ενδοθηλιακών και στρωματικών κυττάρων)(76)

δ. στρατηγικές που να μεγιστοποιούν την ηλεκτρομηχανική σύζευξη των μεταμοσχευμένων κυττάρων με τα ενδογενή καρδιομυοκύτταρα. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό, καθώς ανομοιογένεια στη σύζευξη οδηγεί σε

διαταραχές μετάδοσης του δυναμικού ενέργειας μεταξύ graft-host ιστών που μπορούν να δράσουν προ-αρρυθμικά(77).



Εικόνα 6. Οι βιολογικές διαδικασίες που τροποποιούνται από την κυτταρική θεραπεία. Τα κύτταρα μπορούν άμεσα να δημιουργήσουν νέο μυοκαρδιακό ιστό και αιμοφόρα αγγείο (κανονική οδός) ή έμμεσα (non-canonical), καθώς μπορούν να διεγείρουν ή να καταστείλουν βιολογικές διαδικασίες. (E. Marban, A mechanistic roadmap for the clinical application of cardiac cell therapies, Nature Biomedical engineering, 2018)

B.4.2. Ενεργοποίηση ενδογενών μηχανισμών αναγέννησης (paracrine theory)

Τα χορηγούμενα προγονικά κύτταρα εμφυτεύονται παροδικά στον καρδιακό ιστό, ωστόσο απελευθερώνουν μόρια τα οποία ενεργοποιούν ενδογενείς μηχανισμούς επιδιόρθωσης. Η θεωρία αυτή ξεκίνησε να

αναπτύσσεται από την παρατήρηση σε διάφορες μελέτες ότι ενώ υπήρχε βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας, ο αριθμός των προγονικών κυττάρων που ανιχνευόταν στο μυοκάρδιο ήταν εξαιρετικά χαμηλός. Έτσι λοιπόν προέκυψε η υπόθεση ότι τα εξωγενώς χορηγούμενα κύτταρα επιφέρουν το λειτουργικό όφελος μέσω διέγερσης ενδογενών παρακρινικών μηχανισμών οι οποίοι ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο, την οξειδοασική ισοροπία του κυττάρου (redox regulators), τους αυξητικούς παράγοντες που δρουν σε δείκτες επιφανείας των κυττάρων ή επεμβαίνουν στη διακυτταρική μεταφορά νουκλεϊκών οξέων διακυτταρικά(5, 78, 79). Τα προγονικά κύτταρα εκκρίνουν προαγγειακούς παράγοντες οι οποίοι ευοδώνουν τη νεοαγγείωση που δρα υποστηρικτικά στον ισχαιμικό ιστό, αλλά επιπλέον εκκρίνουν παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στα μοριακά μονοπάτια της ίνωσης, φλεγμονής, κυτταρικής απόπτωσης, ακόμα και στην επιστράτευση/ενεργοποίηση των ενδογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων. Σε αυτόν τον μηχανισμό λοιπόν, είναι εξαιρετικά σημαντικό τα κύτταρα που χορηγούνται να έχουν:

i) Αυξημένη παρακρινική ικανότητα. Θεωρητικά όλα τα κύτταρα εκκρίνουν βιομόρια με τη δυνατότητα σηματοδότησης και βιολογικής δράσης. Βάση διαφόρων μελετών έχει αποδειχθεί ότι τα MSCs και τα CDCs είναι τα κύτταρα με τη μεγαλύτερη παρακρινική δράση(30). Σε μια συγκριτική μελέτη στην οποία χρησιμοποιήθηκαν και συγκρίθηκαν CDCs (cardiosphere-derived cells), BMCs (bone marrow-derived cells) και ATDC (adipose tissue-derived cells), φάνηκε ότι τα CDCs υπερτερούσαν ως προς την παραγωγή αυξητικών παραγόντων(51). Η in vivo σύγκριση της αποτελεσματικότητας για βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας σε hibernating μυοκάρδιο μεταξύ CDCs, MSCs και control ομάδος, έδειξε παρόμοια αποτελεσματικότητα μεταξύ CDCs και MSCs ως προς την ικανότητα να αναστρέφουν την ανάστροφο αναδιαμόρφωση και να ενισχύουν την απόδοση της καρδιακής λειτουργίας, υποστηρίζοντας κοινό

μηχανισμό μέσω του οποίου επιφέρουν την καρδιακή επιδιόρθωση(80). Το γεγονός ότι σε διάφορες μελέτες έχει δειχθεί ότι το θεραπευτικό όφελος από τη χορήγηση των προγονικών κυττάρων παραμένει ενώ πλέον δεν ανιχνεύονται μεταμοσχευμένα κύτταρα στο μυοκάρδιο, υποστηρίζει περαιτέρω τον παρακρινικό μηχανισμό δράσης. Ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα της παρακρινικής θεωρείας και μηχανισμού δράσης είναι ότι “παρακάμπτεται” η ανάγκη για χρήση αυτόλογων κυττάρων. Στη μελέτη του Malliaras et al συγκρίθηκε η χορήγηση αυτόλογων και αλλογενών κυττάρων σε μοντέλο ισχαιμικής καρδιακής ανεπάρκειας σε επίμυες(81). Και στις 2 ομάδες παρατηρήθηκε παρόμοια βελτίωση στην καρδιακή συστολική απόδοση και ιστική επιδιόρθωση κυρίως μέσω ενδογενούς αναγέννησης (επανένταξη των καρδιομυοκυττάρων στον κυτταρικό κύκλο, επιστράτευση c-kit+ κυττάρων και προώθηση αγγειογένεσης). Αργότερα συγκρίθηκαν και μεσεγχυματικά στρωματικά κύτταρα (αλλογενή και αυτόλογα), τα οποία επίσης είχαν το ίδιο θεραπευτικό αποτέλεσμα(82). Και στις 2 αυτές μελέτες τα αλλογενή κύτταρα είχαν μικρότερο χρόνο επιβίωσης/εμφύτευσης στο μυοκαρδίο συγκριτικά με τα αυτόλογα, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η θεραπευτική τους δυνατότητα, γεγονός που δίνει το πλεονέκτημα της χρήσης των προγονικών κυττάρων ως “off-the shelf” προϊόντος. Πράγματι, στις μελέτες POSEIDON και ALLSTAR, αλλογενή MSCs και CDCs αντίστοιχα χορηγήθηκαν σε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια. Στην POSEIDON τα αλλογενή MSCs είχαν παρόμοια κλινικά αποτελέσματα με τα αυτόλογα MSCs (βελτίωση ποιότητας ζωής, λειτουργικής ικανότητας, ανάστροφης αναδιαμόρφωσης)(83). Ωστόσο, η μελέτη ALLSTAR διεκόπη πρόωρα λόγω απουσίας διαφοράς μεταξύ ομάδας placebo και αλλογενών CDCs.

ii) να εμφυτεύονται σε μεγάλο ποσοστό τουλάχιστον παροδικά. Είναι σημαντικό τα χορηγούμενα κύτταρα να εμφυτεύονται σε όσο γίνεται μεγαλύτερο ποσοστό ειδικά αρχικά, ώστε να είναι μέγιστη η

απελευθέρωση παρακρινικών ουσιών και σε χρονικό διάστημα επαρκές για να επιτύχουν βιολογικό αποτέλεσμα. Στη μελέτη του Virtove et al(84), χορηγήθηκαν σημασμένα με Tc-99m CD34+ προγονικά κύτταρα ενδοστεφανιαίως και ενδομυοκαρδιακά (ίδιος αριθμός κυττάρων) και ανιχνεύθηκαν με nuclear single-photon emission CT απεικόνιση μετά από 18 ώρες. Στην ενδομυοκαρδιακή χορήγηση το ποσοστό εμφύτευσης ήταν κατά ~15.2% μεγαλύτερο και εκεί απέδωσαν τη διαφορά στα καταληκτικά σημεία της μελέτης που σημειώθηκαν στους 6 μήνες (κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας, δοκιμασία βάρδισης 6 λεπτών, επίπεδα NT-proBNP). Πλέον είναι γνωστό ότι η ενδομυοκαρδιακή χορήγηση επιφέρει το μεγαλύτερο ποσοστό εμφύτευσης, συγκριτικά με την ενδοστεφανιαία ή την ανάστροφο ενδοστεφανιαία μέσω των στεφανιαίων φλεβών (85). Στην τελευταία μέθοδο, τα κύτταρα έχει δειχθεί ότι εξωθούνται μέσω του φλεβικού δικτύου προς τους πνεύμονες (86, 87). Πέρα από την οδό χορήγησης, η βελτίωση των καθετήρων και η καλύτερη ρύθμιση της ροής χορήγησης των κυττάρων έχουν αυξήσει σημαντικά τα ποσοστά εμφύτευσης (88, 89). Σημαντική επίσης αναμένεται να είναι και η συνεισφορά από την ενσωμάτωση και χορήγηση των κυττάρων σε βιοϋλικά (είτε ενέσιμων είτε εφαρμοζόμενων ως επίθεμα -patch), τα οποία δημιουργούν συνθήκες πιο ευνοϊκές για την επιβίωση, πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση των χορηγούμενων κυττάρων (75).

iii) δυνατότητα να χρησιμοποιούνται οι εκκριτικές ουσίες των κυττάρων μόνες (cell-free strategies) ή σε συνδυασμό. Πρόκειται για το “επόμενο βήμα” της κυτταρικής θεραπείας, που η παρακρινική θεωρία μπορεί να υποστηρίξει. Αυτός είναι και ένας από τους σκοπούς της συγκεκριμένης διδακτορικής διατριβής. Μέχρι στιγμής έχουν πραγματοποιηθεί κάποιες πειραματικές μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει μόνο τους παράγοντες που εκκρίνονται από τα κύτταρα και τα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά. Οι δοκιμές αυτές αφορούν τα ESCs-καρδιακά προγονικά

κύτταρα και τα MSCs (90, 91). Μοναδικό πλεονέκτημα της “cell-free” τεχνικής είναι η απλοποίηση της βιολογικής θεραπείας, καθώς οι εξωκυττάρια ουσίες θα συνθέτουν πιο εύκολα εμπορικό προϊόν. Δηλαδή προϊόν που μπορεί να παραχθεί σε μεγάλη ποσότητα, να είναι άμεσα διαθέσιμο, να υπάρχει δυνατότητα τυποποίησης της σύστασης του και τελικώς να μειθεί το κόστος θεραπείας.

Συμπερασματικά, η προσπάθεια αναγέννησης του μυοκαρδίου, είτε μέσω απ'ευθείας δημιουργίας νέου μυός (musculogenesis) είτε μέσω ενεργοποίησης επιδιόρθωσης του κατεστραμμένου μυός είναι η μοναδική θεραπευτική πρόταση που μπορεί να αναστρέψει την κυτταρική βλάβη και να διακόψει τη φυσική πορεία της καρδιακής νόσου. Μέχρι στιγμής έχουν δοκιμασθεί διάφοροι τύποι κυττάρων, ίσως με λιγότερα θεαματικά αποτελέσματα απ'ότι στην αρχή φιλοδοξούσαν οι ερευνητές αλλά και οι ασθενείς. Ωστόσο η εξέλιξη της τεχνολογίας και η χρήση των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστοκυττάρων και ο συνδιασμός της κυτταρικής θεραπείας με το “disease modeling”, δηλαδή τη γονιδιακή θεραπεία ή τη χρήση miRNAs και CRISPR-Cas9 για gene editing, σίγουρα θα μας απασχολήσουν στο μέλλον.

Γ. ΟΞΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

Ο όρος οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε στις αρχές του 19ου αιώνα, κατόπιν παρατήρησης σε νεκροτομικό υλικό ότι υπήρχε συσχέτιση μεταξύ θρομβωτικής απόφραξης μιας στεφανιαίας αρτηρίας και εμφράγματος του μυοκαρδίου. Ο πρώτος κλινικός ορισμός που συνέδεε το σχηματισμό θρόμβου με την κλινική εικόνα περιγράφηκε στις αρχές του 20ου αιώνα. Όσο περίεργο και αν μοιάζει, ο επίσημος ορισμός του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε μορφή παγκόσμιας

συμφωνίας συντάχθηκε περί το 1950-1970 από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας και συμπεριέλαβε ηλεκτροκαρδιογραφικά κριτήρια. Μόλις το 2007 δημοσιεύθηκε το πρώτο παγκόσμιο συναινετικό κείμενο από την Ευρωπαϊκή Καρδιολογική Εταιρία (ESC), το Αμερικανικό Κολλέγιο Καρδιολογίας (ACC) και το Global Task Force.

Γ.1. Ορισμός

Πρόσφατα δημοσιεύθηκε ο τέταρτος ορισμός εμφράγματος του μυοκαρδίου (92).

Σύμφωνα με αυτόν, ορίζεται ως “μυοκαρδική βλάβη” η ανίχνευση τιμής τροπονίνης (cTn) πάνω από το 99ο τεταρτημόριο αναφοράς και χαρακτηρίζεται ως οξεία όταν υπάρχει αύξηση και πτώση στην τιμή της cTn. Ο όρος “οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου” θα πρέπει να χρησιμοποιείται όταν υπάρχει οξεία μυοκαρδιακή βλάβη, με κλινικά ευρήματα συμβατά με μυοκαρδιακή ισχαιμία. Δηλαδή να ανιχνεύεται αύξηση ή/και πτώση των τιμών cTN και τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω: συμπτώματα μυοκαρδιακής ισχαιμίας, νέες αλλοιώσεις στο ΗΚΓ, ανεύρεση q κυμάτων στο ΗΚΓ, απεικονιστική ένδειξη απώλειας καρδιομυοκυττάρων ή τμηματική διαταραχή κινητικότητας και τέλος την ανεύρεση κατά τη στεφανιογραφία (ή τη νεκροτομή) θρόμβου εντός των στεφανιαίων. Μη ισχαιμικής αιτιολογίας μυοκαρδιακή βλάβη μπορεί να προκληθεί δευτερογενώς από πολλές κλινικές καταστάσεις, όπως περιγράφονται στον πίνακα 1.

Παθολογοανατομικός ορισμός του OEM

Ως OEM ορίζεται ο θάνατος μυοκαρδιακών κυττάρων λόγω παρατεταμένης ισχαιμίας(92). Η μείωση του γλυκογόνου εντός των κυττάρων, η χάλαση των μυοϊνιδίων και του σαρκολείμματος και η αλλαγή στη μορφολογία των μιτοχονδρίων είναι οι πρώτες μικροσκοπικές αλλοιώσεις και παρατηρούνται από τα πρώτα 10-15 λεπτά μετά την

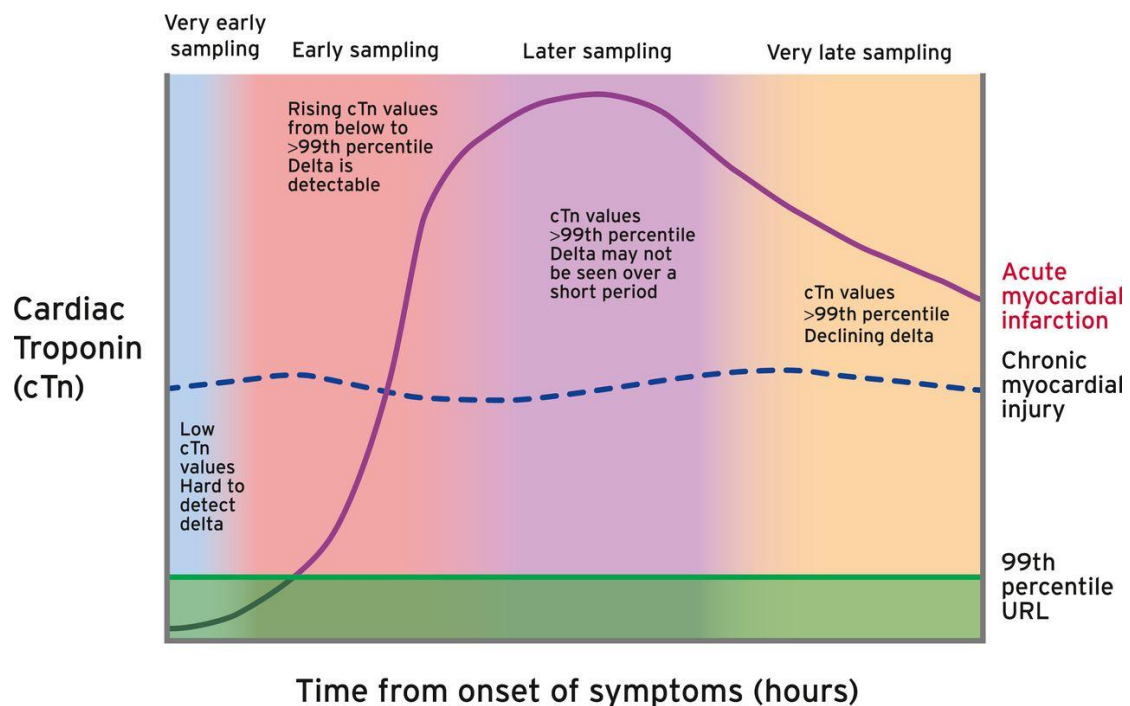
έναρξη της ισχαιμίας(93). Η νέκρωση επέρχεται από το ενδοκάρδιο προς το επικάρδιο εντός ωρών. Για ολική νέκρωση των μυοκαρδιακών κυττάρων απαιτούνται 2 έως 4 ώρες ή και περισσότερο, αν συνυπάρχει παράπλευρη κυκλοφορία, μειωμένες μυοκαρδιακές απαιτήσεις σε οξυγόνο, διαλείπουσα απόφραξη/επαναιμάτωση του στεφανιαίου αγγείου το οποίο προκαλεί μυοκαρδιακή προγύμναση (preconditioning)(94). Στην ουσία, μόνο η έγκαιρη επαναιμάτωση, όταν ενδύκνεται, μειώνει την ισχαιμική βλάβη στο μυοκάρδιο (95). Ολόκληρη η διαδικασία που οδηγεί στην επούλωση του εμφράγματος διαρκεί 5-6 εβδομάδες, ενώ η επαναιμάτωση μπορεί να μεταβάλει τη μικροσκοπική και μακροσκοπική εικόνα.

Γ.2. Βιοδείκτες μυοκαρδιακής βλάβης και εμφράγματος

Η καρδιακή τροπονίνη I (cTnI) και T (cTnT) αποτελούν ανατομικά συστατικά της συσταλτής συσκευής των μυοκαρδιακών κυττάρων και ειδικά η cTnI αυξάνει μόνο σε βλάβη καρδιακού ιστού. Έχουν την ένδειξη να χρησιμοποιούνται στην καθημερινή κλινική πράξη για την ανίχνευση μυοκαρδιακής βλάβης, ιδίως με την υψηλής ευαισθησίας (hs)-cTn δοκιμασία . Όπως αναφέραμε και παραπάνω, μυοκαρδιακή βλάβη υπάρχει όταν ανιχνεύονται επίπεδα cTn στο αίμα μεγαλύτερα από το 99^ο άνω εκατοστημόριο των τιμών αναφοράς(96). Η βλάβη μπορεί να είναι οξεία (όπως πχ στο OEM), στην οποία ανιχνεύεται δυναμική μεταβολή στην τιμή cTn (μέγιστη και ελάχιστη) ή χρόνια, όταν ανιχνεύεται μονίμως αυξημένη τιμή cTn. Με τις νέες δοκιμασίες υψηλής ευαισθησίας, η διάγνωση του εμφράγματος μπορεί να πραγματοποιηθεί εντός 3 ωρών από την έναρξη των συμπτωμάτων (δείγμα 0 και 3 ώρες) και σε κάποιες περιπτώσεις εντός 6 ωρών (97).

Η αύξηση των βιοδεικτών αυτών στο αίμα αντανακλούν μυοκαρδιακή βλάβη, δεν υποδεικνύουν όμως τον υποκείμενο μηχανισμό (98). Αιτίες μεταξύ άλλων είναι: η φυσιολογική κυτταρική ανακύκλωση (turnover), η

απόπτωση, η κυτταρική απελευθέρωση των προϊόντων αποδόμησης της cTn, η αυξημένη διαπερατότητα του κυτταρικού τοιχώματος, ο σχηματισμός και απελευθέρωση μεμβρανικών κυστιδίων και φυσικά η μυοκυτταρική νέκρωση (99). Ανεξάρτητα από τους εμπλεκόμενους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς, η μυοκαρδιακή νέκρωση που αποδίδεται σε ισχαιμία ορίζεται ως OEM.



Εικόνα 7. Απεικόνιση κινητικής της καρδιακής Τροπονίνης (cTn) στους ασθενείς μετά από μυοκαρδιακή βλάβη, συμπεριλαμβανομένου του OEM. Η χρονική στιγμή κατά την οποία απελευθερώνεται ο βιοδείκτης στην αιματική κυκλοφορία εξαρτάται από την αιματική ροή και την χρονική απόσταση από την εκδήλωση των συμπτωμάτων με τη λήψη του δείγματος. Μεταβολές στην τιμή της cTn μεταξύ διαδοχικών μετρήσεων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαχωρίσουν οξείες από χρονίες μυοκαρδιακές βλάβες. (URL= upper reference limit) [Thygesen K et al. Fourth universal definition of myocardial infarction. Eur Hear J 2018]

Πίνακας 1. Αίτια αύξησης καρδιακής τροπονίνης λόγω μυοκαρδιακής βλάβης.

A. Μυοκαρδιακή βλάβη σχετιζόμενη με οξεία μυοκαρδιακή ισχαιμία Ρήξη αθηρωαματικής πλάκας με σχηματισμό θρόμβου
B. Μυοκαρδιακή βλάβη σχετιζόμενη με οξεία μυοκαρδιακή ισχαιμία λόγω μη συζευγμένης παροχής/ανάγκης σε οξυγόνο Μειωμένη μυοκαρδιακή διάχυση, πχ. <ul style="list-style-type: none">• Σπασμός στεφανιαίου αγγείου, μικροαγγειακή δυσλειτουργία• Εμβολισμός στεφανιαίου αγγείου• Διαχωρισμός στεφανιαίου αγγείου• Εμμένουσα βραδυκαρδία• Υπόταση ή σοκ• Αναπνευστική ανεπάρκεια• Σοβαρή αναιμία Αυξημένη μυοκαρδιακή ανάγκη για οξυγόνο <ul style="list-style-type: none">• Εμμένουσα ταχυκαρδία• Σοβαρή υπέρταση με ή χωρίς υπερτροφία αριστερής κοιλίας
Γ. Άλλες αιτίες μυοκαρδιακής βλάβης Καρδιακές καταστάσεις, πχ <ul style="list-style-type: none">• Καρδιακή ανεπάρκεια• Μυοκαρδίτιδα• Μυοκαρδιοπάθεια (οποιασδήποτε αιτίας)• Σύνδρομο Takotsubo• Επέμβαση επαναγγείωσης• Κατάλυση δεματίου• Απινιδώσεις• Μυοκαρδιακή θλάση Συστηματικές καταστάσεις, πχ <ul style="list-style-type: none">• Σήψη, λοιμώξεις• Χρόνια νεφρική νόσος• Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, υπαραχνοειδής αιμορραγία• Πνευμονική εμβολή, πνευμονική υπέρταση• Διθητικές νόσοι (πχ. Αμυλοείδωση, σαρκοείδωση)• Χημειοθεραπευτικοί παράγοντες• Βαρέως πάσχοντες• Εντατική άσκηση

Η αυξημένη τιμή τροπονίνης, με ή χωρίς δυναμικό πρότυπο και με απουσία κλινικών ενδείξεων ισχαιμίας, θα πρέπει να κατευθύνει προς άλλες διαγνώσεις που σχετίζονται με μυοκαρδιακή βλάβη, όπως η

μυοκαρδίτιδα, ο αορτικός διαχωρισμός, η πνευμονική εμβολή ή η καρδιακή ανεπάρκεια. Μη ισχαιμικές χρόνιες νοσολογικές καταστάσεις που μπορεί να συνοδεύονται από αύξηση της καρδιακής τροπονίνης απεικονίζονται στον πίνακα 1.

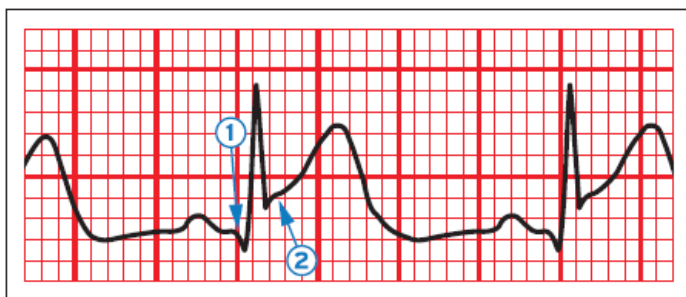
Γ.3. Κλινικά χαρακτηριστικά του OEM και ταξινόμηση

Η έναρξη της μυοκαρδιακής ισχαιμίας είναι το πρωταρχικό βήμα για την ανάπτυξη του OEM και είναι το αποτέλεσμα της μη σύζευξης παροχής και αναγκών σε οξυγόνο. Στην κλινική πράξη συνήθως διαγιγνώσκεται από το ιστορικό του ασθενούς και από το ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ). Συμπτώματα ισχαιμίας αποτελούν διάφοροι συνδυασμοί δυσφορίας εντοπιζόμενης στο θώρακα, τα άνω άκρα, την κάτω γνάθο ή το επιγάστριο, στην άσκηση ή την ηρεμία, ή ισοδύναμα ισχαιμίας όπως η δύσπνοια και η κόπωση. Συχνά, η δυσφορία αυτή είναι διάχυτη - δε σχετίζεται με τη θέση του σώματος ή την κίνηση της πάσχουσας περιοχής- και μπορεί να συνοδεύεται από ναυτία, συγκοπή ή εφίδρωση. Συνήθως διαρκεί >20 λεπτά. Ωστόσο, αυτά τα συμπτώματα δεν είναι ειδικά για το OEM και μπορούν να αποδοθούν εσφαλμένα σε γαστρεντερικές, νευρολογικές, πνευμονολογικές ή μυοσκελετικές διαταραχές. Επιπλέον το OEM μπορεί να εκδηλωθεί με άτυπα συμπτώματα -όπως το αίσθημα παλμών ή η καρδιακή ανακοπή- ή ακόμα και χωρίς συμπτώματα, όπως συμβαίνει συνηθέστερα στις γυναίκες, τους ηλικιωμένους, τους σακχαροδιαβητικούς ή τους μετεγχειρητικούς ή βαρέως πάσχοντες ασθενείς.

Αν επιβεβαιώνεται μυοκαρδιακή ισχαιμία κλινικά ή ηλεκτροκαρδιογραφικά και συνοδεύεται με αύξηση ή/και πτώση της cTn, τότε η διάγνωση του OEM είναι κατάλληλη (92).

Για την άμεση εφαρμογή θεραπευτικών στρατηγικών, όπως η θεραπεία επαναιμάτωσης, είναι συνήθης πρακτική να διαχωρίζονται οι ασθενείς με

ΟΕΜ σε i) αυτούς που εμφανίζουν νέα ανάσπαση του ST διαστήματος σε δύο διαδοχικές απαγωγές ή νέα εμφάνιση δεξιού ή αριστερού αποκλεισμού του δεματίου του His (LBBB, RBBB) με ισχαιμικές διαταραχές αναπόλωσης, όπως η ανάσπαση του ST (ST Elevation Myocardial Infarction, STEMI) και ii) σε αυτούς που δεν εμφανίζουν ανάσπαση του ST διαστήματος κατά την παρουσίαση (Non ST Elevation Myocardial Infarction, NSTEMI) (92). Ασθενείς οι οποίοι είναι ύποπτοι για οξύ στεφανιαίο σύνδρομο, οι οποίοι όμως αποκλείονται από τη διάγνωση του ΟΕΜ λόγω φυσιολογικών μυοκαρδιακών ενζύμων, μπορεί να έχουν ασταθή στηθάγχη. Όλοι οι ασθενείς με STEMI, NSTEMI ή ασταθή στηθάγχη εντάσσονται στην κατηγορία των Οξέων Στεφανιαίων Συνδρόμων (ΟΣΣ). Επιπλέον αυτών, το ΟΕΜ μπορεί να ταξινομηθεί σε διαφόρους τύπους βάσει των παθολογοανατομικών, κλινικών και προγνωστικών διαφορών, καθώς και των διαφορών στη θεραπευτική προσέγγιση, όπως περιγράφονται στον Πίνακα 2 (92).



Εικόνα 8: Παράδειγμα ΗΚΓ με ανάσπαση του ST-διαστήματος. Η έναρξη του Q κύματος αναδεικνύεται από το βέλος 1. Το βέλος 2 εντοπίζει το J σημείο το οποίο σηματοδοτεί και την έναρξη του ST διαστήματος. Η υψομετρική διαφορά των δύο αποτελεί το ύψος της ανάσπασης.

Πίνακας 2. Κλινική ταξινόμηση οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου

Έμφραγμα μυοκαρδίου Τύπου 1
<p>Προκαλείται από αθηροθρομβωτική στεφανιαία νόσο και συχνά προηγείται ρήξη αθηρωματικής πλάκας που οδηγεί σε σχηματισμό ενδαυλικού θρόμβου.</p> <p>Διάγνωση: Ανίχνευση αύξησης και/ή πτώσης της cTn με τουλάχιστον μία τιμή πάνω από το 99ο ποσοστιαίο άνωτερο φυσιολογικό όριο και τουλάχιστον ένα από: συμπτώματα οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας, νέες αλλαγές στο ΗΚΓ, παθολογικά Q κύματα στο ΗΚΓ, απεικόνιση που αποδεικνύει καινούρια απώλεια ζωντανού μυοκαρδίου ή τμηματική διαταραχή κινητικότητας τοιχώματος μυοκαρδίου συμβατό με ισχαιμική αιτιολογία και τέλος απεικόνιση θρόμβου στη στεφανιογραφία ή στη νεκροτομή.</p>
Έμφραγμα μυοκαρδίου Τύπου 2
<p>Μυοκαρδιακή βλάβη με νέκρωση λόγω μη σύζευξης παροχής και/ή αναγκών σε οξυγόνο, π.χ. ενδοθηλιακή στεφανιαία δυσλειτουργία, σπασμός στεφανιαίας αρτηρίας, τάχυ-/ βράδυ-αρρυθμίες, αναιμία, αναπνευστική ανεπάρκεια κ.α.</p> <p>Διάγνωση: Ανίχνευση αύξησης και/ή πτώσης της cTn με τουλάχιστον μία τιμή πάνω από το 99ο ποσοστιαίο άνωτερο φυσιολογικό όριο και ενδείξεις μη σύζευξης παροχής και αναγκών σε οξυγόνο που δε σχετίζεται με θρόμβωση στεφανιαίας αρτηρίας και ενός από: συμπτώματα οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας, νέες αλλαγές στο ΗΚΓ, παθολογικά Q κύματα στο ΗΚΓ, απεικόνιση που αποδεικνύει καινούρια απώλεια ζωντανού μυοκαρδίου ή τμηματική διαταραχή κινητικότητας τοιχώματος μυοκαρδίου συμβατό με ισχαιμική αιτιολογία</p>
Έμφραγμα του μυοκαρδίου Τύπου 3
<p>Καρδιακός θάνατος που προηγούνται συμπτώματα τυπικά μυοκαρδιακής ισχαιμίας, συμπεριλαμβανομένων ισχαιμικών ΗΚΓφικών μεταβολών ή κοιλιακής μαρμαρυγής. Σε αυτή την περίπτωση είτε δεν είναι δυνατή η λήψη μυοκαρδιακών ενζύμων, είτε ο θάνατος επέρχεται πριν την άνοδο των καρδιακών βιοδεικτών, είτε το έμφραγμα διαπιστώνεται στη νεκροτομή.</p>
Έμφραγμα του μυοκαρδίου Τύπου 4Α
<p>σχετίζεται με Διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση.</p> <p>Διάγνωση: αύξηση της cTn >5 φορές της 99^{ης} εκατοστιαίας ανώτερης φυσιολογικής τιμής ή αύξηση της καρδιακής τροπονίνης >20% εάν οι αρχικές τιμές είναι αυξημένες και είναι σταθερές ή πτωτικές. Επιπρόσθετα, απαιτείται 1 από τα παρακάτω: νέες ισχαιμικές ΗΚΓφικές ή νέα παθολογικά Q κύματα στο ΗΚΓ, απεικόνιση που αποδεικνύει καινούρια απώλεια ζωντανού μυοκαρδίου ή τμηματική διαταραχή κινητικότητας τοιχώματος μυοκαρδίου συμβατό με ισχαιμική αιτιολογία και τέλος αγγειογραφικά να απεικονίζεται περιορισμός ροής που σχετίζεται με την παρέμβαση όπως πχ διαχωρισμός αγγείου, απόφραξη μείζονος επικαρδιακού αγγείου ή παράπλευρου κλάδου, περιφερικός εμβολισμός.</p>
Έμφραγμα του μυοκαρδίου Τύπου 4Β
<p>Σχετίζεται με θρόμβωση της ενδοπροθέσεως και ανιχνεύεται με στεφανιογραφία ή αυτοψία, ενώ χρησιμοποιούνται για τη διάγνωση τα ίδια κριτήρια με τον τύπου 1 OEM. Ανάλογα με το χρόνο εμφάνισης από τη στιγμή της εμφύτευσης του stent κατηγοριοποιούνται σε: 1. Οξεία θρόμβωση, 0-24 ώρες, 2. Υποξεία, >24 ώρες έως 30 ημέρες, 3. Όψιμη, >30 ημέρες έως 1 χρόνο και 4. Πολύ όψιμη, >1 έτος.</p>
Έμφραγμα του μυοκαρδίου Τύπου 4C

Σχετίζεται με επαναστένωση εντός του stent λόγω εστιακής ή διάχυτης βλάβης ή λόγω σύμπλοκης βλάβης που έχει διαγνωστικά κριτήρια όμοια με του τύπου 1 OEM.
Έμφραγμα του μυοκαρδίου Τύπου 5
Σχετίζεται με αορτοστεφανιαία παράκαμψη και ορίζεται ως αύξηση της τιμής της cTn >10 φορές της 99 ^{ης} εκατοστιαίας ανώτερης φυσιολογικής τιμής σε ασθενείς με φυσιολογικές αρχικές τιμές. Επιπλέον, απαιτείται 1 από τα παρακάτω: νέα παθολογικά Q κύματα στο ΗΚΓ, αγγειογραφική απεικόνιση που αποδεικνύει απόφραξη εντός του μοσχεύματος ή απόφραξη γηγενούς στεφανιαίας αρτηρίας και απεικονιστική ένδειξη καινούριας απώλειας ζωντανού μυοκαρδίου ή τμηματικής διαταραχής κινητικότητας τοιχώματος μυοκαρδίου συμβατό με ισχαιμική αιτιολογία.

Γ.4. Ηλεκτροκαρδιογραφικά σημεία OEM

Το ΗΚΓ είναι αναπόσπαστο κομμάτι της διαγνωστικής προσέγγισης του υποψιαζόμενου εμφράγματος και θα πρέπει να πραγματοποιείται εντός 10 λεπτών από την πρώτη ιατρική επαφή (100). Κατά την οξεία ισχαιμία το ΗΚΓ μπορεί να παρουσιάζει δυναμικές μεταβολές, για αυτό το λόγο απαιτείται επανάληψη του ΗΚΓ κατά διαστήματα (εντός 15-30 λεπτών), ιδίως όταν το αρχικό ΗΚΓ είναι φυσιολογικό ενώ είναι ύποπτη η κλινική εικόνα (101). Οξείες ή εξελισσόμενες μεταβολές του ST διαστήματος και των κυμάτων T και Q, όταν είναι παρούσες, πιθανώς επιτρέπουν στον γιατρό να προσδιορίσει το χρόνο του επεισοδίου, να εντοπίσει την υπεύθυνη για το OEM στεφανιαία αρτηρία, να υπολογίσει το μέγεθος του μυοκαρδίου υπό κίνδυνο καθώς και την πρόγνωση, και να καθορίσει τη θεραπευτική στρατηγική. Πιο εκσεσημασμένη ανάσπαση του ST διαστήματος ή αναστροφή του κύματος T σε πολλαπλές απαγωγές σχετίζεται με μεγαλύτερο βαθμό μυοκαρδιακής ισχαιμίας και δυσμενέστερη πρόγνωση. Άλλα ηλεκτροκαρδιογραφικά ευρήματα που σχετίζονται με οξεία μυοκαρδιακή ισχαιμία περιλαμβάνουν τις αρρυθμίες, τις ενδοκοιλιακές και κολποκοιλιακές διαταραχές αγωγής και τη βραδεία πρόοδο των κυμάτων R στις προκάρδιες απαγωγές. Μόνο το ΗΚΓ δεν είναι επαρκές για να θέσει τη διάγνωση οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας, καθώς διαταραχές του ST διαστήματος μπορούν να παρατηρηθούν και σε

άλλες καταστάσεις, όπως οξεία περικαρδίτιδα, υπερτροφία αριστερής κοιλίας, αποκλεισμό του αριστερού σκέλους (LBBB), σύνδρομο Brugada, σύνδρομο Takotsubo και πειπτώσεις πρώιμης αναπόλωσης (102). Μερικές από τις πιο πρώιμες αλλοιώσεις της ισχαιμίας στο ΗΚΓ είναι οι αλλαγές στα κύματα T ή στο ST διάστημα, όπως πχ η εμφάνιση υπεροξέων T κυμάτων σε τουλάχιστον 2 συνεχείς απαγωγές, οι οποίες μπορεί να προηγούνται της ανάσπασης του ST διαστήματος. Η εμφάνιση νέων κυμάτων Q είναι ενδεικτική μυοκαρδιακής νέκρωσης χρονικής έναρξης προ λεπτών/ωρών. Παροδικά κύματα Q μπορεί να παρατηρηθούν κατά τη διάρκεια ενός επεισοδίου οξείας ισχαιμίας ή (σπανίως) κατά τη διάρκεια ενός OEM με επιτυχή επαναιμάτωση.

Στον πίνακα 3 περιγράφονται τα ΗΚΓ χαρακτηριστικά του ST διαστήματος και T κύματος κατά την οξεία μυοκαρδιακή ισχαιμία, η οποία μπορεί ή όχι να οδηγήσει σε OEM (92). Το σημείο J (η μετάβαση από το τέλος του QRS και της έναρξης του ST διαστήματος) χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της μετατόπισης τους ST διαστήματος.

Πίνακας 3. ΗΚΓ χαρακτηριστικά οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας (απουσία αποκλεισμού σκέλους δεματίου ή υπερτροφίας αριστερής κοιλίας)

Ανάσπαση του ST διαστήματος
Νέα ανάσπαση του ST διαστήματος στο σημείο J σε δυο διαδοχικές απαγωγές με όριο: ≥ 1 mm σε όλες τις απαγωγές πλην των V2-V3 όπου η ανάσπαση πρέπει να είναι ≥ 2 mm στους άρρενες ≥ 40 ετών και ≥ 2.5 mm σε άρρενες < 40 ετών ή ≥ 1.5 mm στις γυναίκες.
Κατάσπαση του ST διαστήματος και μεταβολές του κύματος T
Νέα οριζόντια ή με κατιούσα φορά κατάσπαση του ST διαστήματος ≥ 0.5 mm σε δύο διαδοχικές απαγωγές και/ή αναστροφή του κύματος T > 1 mm σε δύο διαδοχικές απαγωγές με προεξάρχοντα κύματα R ή δείκτη R/S > 1 .

Στη διαφοροδιάγνωση των ΗΚΓ ευρημάτων στο OEM θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται και άλλες παθολογικές καταστάσεις, όπως η πνευμονική εμβολή, οι ενδοκρανιακές βλάβες, οι ηλεκτρολυτικές

διαταραχές, η υποθερμία, και η μυοπερικαρδίτιδα, καθώς μπορεί να σημειώνουν παρόμοια ΗΚΓ ευρήματα.

Γ.5. Επιδημιολογικά δεδομένα του OEM

Παρά τις εξελίξεις στη διάγνωση και τη διαχείριση, το OEM (STEMI) παραμένει σημαντικό πρόβλημα της δημόσιας υγείας των αναπτυγμένων χωρών, με αυξανόμενη συχνότητα, ιδίως στις αναπτυσσόμενες χώρες (103). Στην Ευρώπη η θνητότητα από ισχαιμική καρδιακή νόσο έχει πτωτική τάση τις τελευταίες 3 δεκαετίες (104). Πλέον είναι η αιτία στην Ευρώπη για περίπου 1.8 εκατομμύρια θανάτους ετησίως (20% των θανάτων), με μεγάλη διακύμανση ανά χώρα (105). Η σχετική επίπτωση του STEMI και NSTEMI είναι μειούμενη και αυξανόμενη αντίστοιχα(106). Στη πιο εμπειριστατωμένη ευρωπαϊκή καταγραφή, που είναι της Σουηδίας, η επίπτωση του STEMI το 2015 υπολογίσθηκε σε 58 περιπτώσεις ανά 100.000 ανά έτος, ενώ σε άλλες ευρωπαϊκές καταγραφές ποικίλλει από 43 έως 144 περιπτώσεις ανά 100.000 ανά έτος (107).

Η θνητότητα στο OEM επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως η προχωρημένη ηλικία, η κατάταξη κατά Killip, η καθυστέρηση μέχρι την έναρξη θεραπείας, η έλλειψη οργανωμένων κέντρων διαχείρισης του OEM, η στρατηγική αντιμετώπισης, το ιστορικό προηγούμενου εμφράγματος, ο σακχαρώδης διαβήτης, η νεφρική ανεπάρκεια, η έκταση της στεφανιαίας νόσου και τέλος η συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας (LVEF)(108). Παρά την γρήγορη επαναιμάτωση, η θνητότητα από OEM ενδονοσοκομειακά κυμαίνεται σε ευρωπαϊκές καταγραφές μεταξύ 4-12%, ενώ η θνητότητα στον 1 χρόνο περίπου στο 10% (109, 110).

Δ. ΔΙΑΔΕΡΜΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΣΤΕΦΑΝΙΑΙΩΝ ΑΡΤΗΡΙΩΝ ΚΑΙ ΑΓΓΕΙΟΠΛΑΣΤΙΚΗ - ιστορική εξέλιξη

Η πρώτη διαδερμική απεικόνιση της καρδιάς πραγματοποιήθηκε το 1929 από τον Werner Frossmann, όταν «τυχαία» προώθησε ένα πλαστικό εύκαμπτο καθετήρα στη βασιλική φλέβα του άνω άκρου του και στη συνέχεια υπεβλήθη ο ίδιος σε ακτινοσκόπηση για να επιβεβαιωθεί η θέση του εντός των δεξιών κοιλοτήτων της καρδιάς. Το 1941 οι Andre Cournand και Dickinson Richards έκαναν πιο συστηματικές αιμοδυναμικές μετρήσεις της καρδιάς, καθώς ανέπτυξαν τους καρδιακούς καθετήρες. Το 1956 το βραβείο νόμπελ της Φυσιολογίας / Ιατρικής απονεμήθηκε στους παραπάνω 3 ερευνητές «για την ανακάλυψή τους σχετικά με τον καρδιακό καθετηριασμό και τις παθολογικές αλλαγές στο κυκλοφορικό σύστημα». Παράλληλα, εξελίξεις στο χώρο της ακτινολογίας από τους Charles Dotter και Melvin Judkins (οι οποίοι ανέπτυξαν τους καθετήρες αγγειοπλαστικής για τα περιφερικά αγγεία), συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της πρώτης στεφανιαίας αγγειοπλαστικής στον άνθρωπο το 1977 από τον Andreas Gruentzig. Πλέον, η αγγειοπλαστική αποτελεί καθ'ήμέραν πράξη και η έγκαιρη επαναιμάτωση θεωρείται η ενδεδειγμένη θεραπεία στο οξύ εμφραγμα του μυοκαρδίου (108).

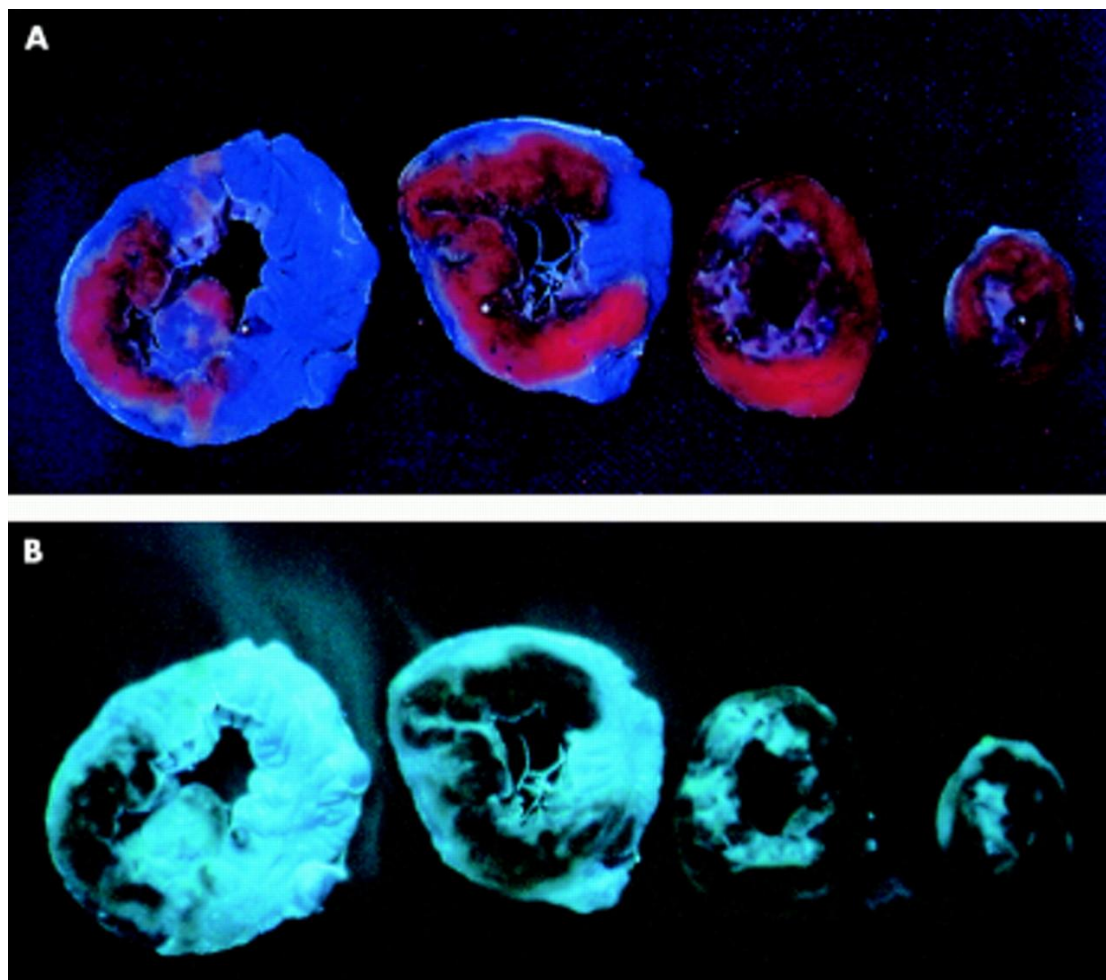
E. ΤΟ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟ ΜΗ ΕΠΑΝΑΡΡΟΗΣ (no-reflow phenomenon)

E.1. Ορισμός

Η έγκαιρη διάνοιξη της αποφραγμένης στεφανιαίας αρτηρίας αποτελεί την ενδεδειγμένη και πλέον αποτελεσματική θεραπεία στο OEM (111). Ως «φαινόμενο μη επαναρροής» (no-reflow phenomenon) ορίζεται η απουσία πλήρους επαναιμάτωσης της ισχαιμύσας περιοχής, παρά την αποκατάσταση ροής στα επικαρδιακά αγγεία (112).

Το φαινόμενο μη επαναρροής αρχικά περιγράφηκε σε πειράματα ισχαιμίας αγγείων του εγκεφάλου, στα οποία βρέθηκε ότι η παρατεταμένη ισχαιμία οδηγούσε σε σημαντικές αλλαγές της μικροκυκλοφορίας οι οποίες αλληλεπιδρούσαν με τη φυσιολογική ροή στα κύτταρα του εγκεφάλου. Στη συνέχεια αυτό επιβεβαιώθηκε και σε άλλα όργανα, όπως το δέρμα, τους σκελετικούς μύες και τους νεφρούς. Στην καρδιά η σχέση του φαινομένου μη επαναρροής με βλάβη της μικροκυκλοφορίας περιγράφηκε ολοκληρωμένα πρώτη φορά από τον Robert Kloner το 1974 (112). Στο κλασικό του, πλέον, πείραμα, μελέτησε σε σκύλους την επίδραση της παροδικής (διάρκειας 40 και 90 λεπτών) και μόνιμης ισχαιμίας του μυοκαρδίου στην εμφάνιση του φαινομένου μη επαναρροής. Υποβολή του μυοκαρδίου σε ισχαιμία διάρκειας 40 λεπτών, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει μη αναστρέψιμη βλάβη των μυοκαρδιακών κυττάρων, δε φάνηκε να συνοδεύεται από αντίστοιχη διαταραχή του προτύπου αιματικής ροής. Αντιθέτως, η παροδική ισχαιμία 90 λεπτών συνοδευόταν από πτωχή ή και ελλειπή αιματική ροή προς μεγάλα τμήματα του προηγουμένως ισχαιμικού μυοκαρδιακού ιστού, ιδιαίτερα στις υπενδοκάρδιες στοιβάδες. Οι διαταραχές των μυοκαρδιακών κυττάρων ήταν εξίσου σημαντικές και στους δύο διαφορετικούς χρόνους ισχαιμίας, όμως οι ιστολογικές αλλοιώσεις των τριχοειδών ήταν σημαντικά εντονότερες στην περίπτωση της παρατεταμένης ισχαιμίας (90 λεπτά), και μάλιστα οι διαταραχές αυτές συνέπιπταν χωρικά με τα τμήματα του μυοκαρδιακού μύος που εμφάνιζαν εντονότερη διαταραχή της αιμάτωσης. Συγκεκριμένα, μετά από έκθεση του μυοκαρδιακού ιστού σε θειοφλαβίνη S, απεικονιζόντουσαν περιοχές στις τομές της καρδιάς οι οποίες δε φθόριζαν υπό το υπεριώδες φως (Εικόνα 9). Όταν αυτές εξετάστηκαν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, βρέθηκαν αλλοιώσεις συμβατές με βλάβη της μικροκυκλοφορίας, όπως εστιακό οίδημα του ενδοθηλίου με φυσαλίδες εντός του, οι οποίες προέκβαλαν στον αυλό των τριχοειδών ή των αρτηριολίων παρεμποδίζοντας την αιματική ροή. Ενίοτε

καρδιομυοκύτταρα με οίδημα παρέμπόδιζαν/απόφρασσαν επίσης την κυκλοφορία. Άλλες αλλοιώσεις ήταν η λύση της συνέχειας του ενδοθηλίου, εναποθέσεις ινικής και μικροαγγειακή αιμορραγία.



Εικόνα 9. Ανατομικό no reflow, όπως φαίνεται σε πείραμα ισχαιμίας – επαναιμάτωσης σε κονίκλους. Οι χρώσεις Monastral blue (A) και thioflavin S (B, φωτογραφία κάτω από υπεριώδες φως, Minolta Y48 barrier filter) εγχύονταν στον αριστερό κόλπο μετά από 120 λεπτά ισχαιμίας (μέσω απολίνωσης της στεφανιαίας αρτηρίας) και 120 λεπτά επαναιμάτωσης. Και οι 2 χρώσεις αφήνουν κάποιο τμήμα της αριστερής κοιλίας χωρίς χρώση, το οποίο και αποτελεί την περιοχή καθόλου ή μερικής διήθησης (No reflow or low reflow). [T Reffelmann and R Kloner. Heart 2002;87:162-16]

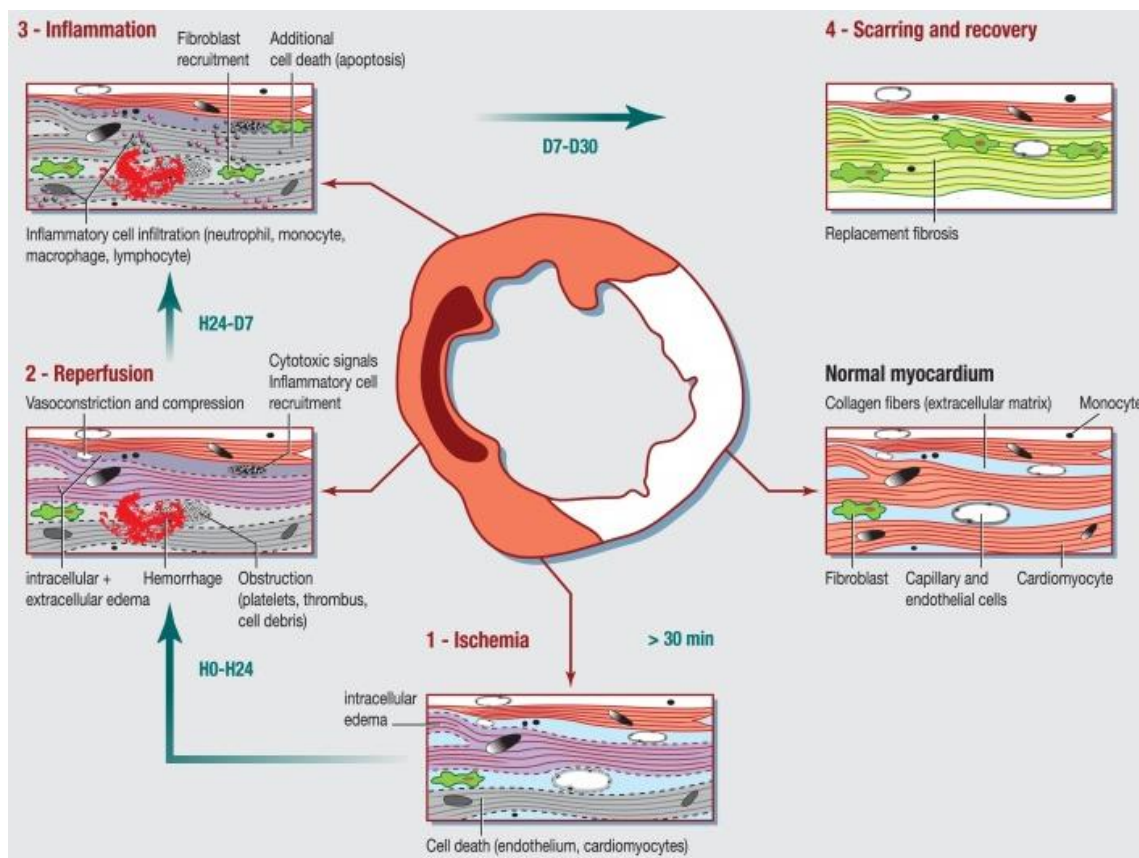
E.2. Παθογενετικοί μηχανισμοί

Ένα σύνολο υποκείμενων μηχανισμών έχει βρεθεί να συμμετέχει στην ανάπτυξη του φαινομένου μη επαναροής. Η σημασία του καθενός τροποποιείται με το χρόνο, πχ αμέσως μετά τη διάνοιξη του αγγείου συγκριτικά με αργότερα αφού έχει ξεκινήσει η επαναιμάτωση (Εικόνα 10 και 11). Το no reflow εκτείνεται κυρίως υπενδοκαρδιακά, όπως η μυοκαρδιακή νέκρωση που συμβαίνει μετά από ισχαιμία(113), και η έκταση του είναι ανάλογη με την χρονική διάρκεια της ισχαιμίας(114). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το no reflow είναι περισσότερο μια διαδικασία που εξελίσσεται παρά ένα στιγμιαίο γεγονός που συμβαίνει στην επαναιμάτωση(115). Ενώ το ίδιο δεν προκαλεί άμεσα νέκρωση των κυττάρων, παρεμβαίνει στη διαδικασία της “επούλωσης”, καθώς περιορίζει την αιματική ροή μέσα και γύρω από τη νεκρωτική περιοχή, μειώνοντας με αυτόν τον τρόπο την απομάκρυνση νεκρωτικού υλικού, αλλά και τη διάχυση κυτταροκινών και άλλων κυτταρικών εκκρίσεων(116). Σε πειραματικές μελέτες φάνηκε ότι όσο πιο εκτεταμένο ήταν το no reflow, τόσο πιο εκτεταμένη ήταν η ανάστροφος αναδιαμόρφωση στο μυοκάρδιο, οι πρώιμες επιπλοκές μετά από έμφραγμα, οι νοσηλείες για καρδιακή ανεπάρκεια και η θνητότητα (117, 118). Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην παθοφυσιολογία του φαινομένου στα πειραματόζωα, όπου προκαλείται ισχαιμία και επαναιμάτωση, φαίνεται να διαφέρει σε μερικά σημεία από εκείνους στην κλινική πράξη, όπου μετά από διάγνωση εμφράγματος ακολουθεί επαναιμάτωση με αγγειοπλαστική.

Θα αναφερθούμε στους σημαντικότερους μηχανισμούς που εμπλέκονται στον άνθρωπο.

1. Περιφερικός εμβολισμός των στεφανιαίων: αυτό είναι ίσως ο κυριότερος μηχανισμός καθώς κατά τη διάρκεια του οξέως στεφανιαίου συνδρόμου και της αγγειοπλαστικής θρόμβοι από τα επικαρδιακά στεφανιαία αγγεία ή από ρηχθείσες αθηρωσκληρωτικές πλάκες

προκαλλούν έμβολα διαφόρων μεγεθών (119). Από πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι η απόφραξη >50% του αυλού των στεφανιαίων τριχοειδών συνεπάγεται μη αναστρέψιμη ελάττωση της στεφανιαίας ροής (120).



Εικόνα 10. Η παθοφυσιολογία του φαινομένου no reflow. Το no reflow ή η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας/βλάβη από επαναιμάτωση είναι δυναμικό και σύμπλοκο φαινόμενο, το οποίο ξεκινά με την θανατηφόρο ισχαιμία και τελειώνει με την αντικατάσταση του νεκρωτικού ιστού από ινώδη ιστό. Η 1^η φάση αφορά την παρατεταμένη ισχαιμία (>30 λεπτά) η οποία οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Η 2^η φάση έχει ως αιτία την απότομη επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Τις επόμενες 24 ώρες, ένας καταρράκτης καταστροφικών φαινομένων λαμβάνει χώρα, όπως το ενδο- και εξωκυττάριο οίδημα, η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας από αθηροθρομβωτικό και νεκρωτικό υλικό, η αγγειοσύσπαση ως αποτέλεσμα της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και τα διάφορα κυτταροτοξικά σηματοδοτικά μόρια που εκκρίνονται από τα κύτταρα. Μετά τις 24 ώρες, η φλεγμονώδης αντίδραση στον ισχαιμικό/νεκρωτικό ιστό αλλά και στο γειτονικό μη ισχαιμικό ιστό, επιφέρει περαιτέρω βλάβη στον μυοκαρδιακό ιστό. [C Bouleti et al. Archives of Cardiovascular Disease 2015;108:661-674]

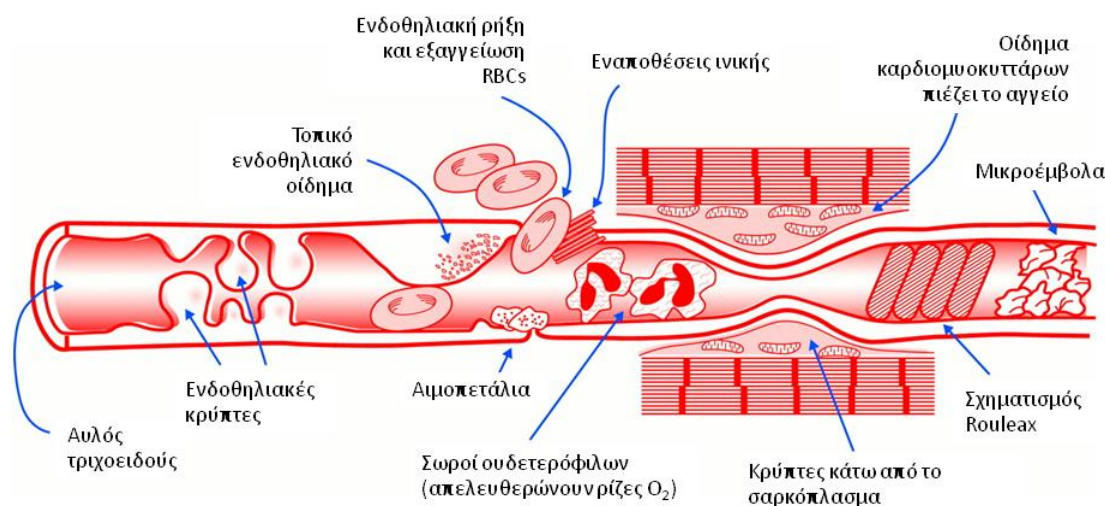
Ο περιφερικός μικρο-εμβολισμός των αρτηριολίων αυξάνει τις περιφερικές αντιστάσεις, προκαλεί μικρο-έμφρακτα και αυξάνει συνεπώς τη μυοκαρδιακή νέκρωση(121).

2. Η βλάβη από ισχαιμία: η παρατεταμένη ισχαιμία (αιματική ροή στον μυοκαρδιακό ιστό <40ml/min ανά 100 g ιστού) προκαλεί μορφολογικές αλλοιώσεις στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία εμφανίζουν μεμβρανικές προσεκβολές ή σωματίδια συνδεδεμένα με τη μεμβράνη, τα οποία συχνά γεμίζουν τα τριχοειδή ή και αποφράσσουν πλήρως. Τελικώς τα ενδοθηλιακά κύτταρα νεκρώνονται, οδηγώντας σε καταστροφή των στενών συνάψεων που υπάρχουν μεταξύ τους, και συνεπώς σε εξαγγείωση υγρού και κυττάρων του αίματος μεταξύ των χιτώνων των αρτηριών. Οι μορφολογικές αυτές αλλοιώσεις συνοδεύονται από ελάττωση της περιοχικής αιματικής ροής, ενώ το διάμεσο οίδημα που αναπτύσσεται μπορεί να συντελεί στην περαιτέρω συμπίεση της μικροκυκλοφορίας. Επιπλέον επηρεάζεται η παραγωγή του νιτρικού οξέως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η αγγειοδιασταλτική ικανότητα των αγγείων (114, 121, 122).

3. Βλάβη από επαναιμάτωση: η βλάβη της ισχαιμίας, επιδεινώνεται με την επαναιμάτωση. Η βλάβη από επαναιμάτωση προκαλείται από την απότομη αποκατάσταση της κυκλοφορίας (παροχή >100 ml/min ανά 100 g ιστού) και επιταχύνει το ενδοκυττάριο και ιστικό οίδημα, τη βλάβη του ενδοθηλίου και τη φλεγμονή. Μεγάλος αριθμός ουδετεροφίλων και αιμοπεταλίων διηθούν τη μικροκυκλοφορία ενεργοποιούνται, προσκολλώνται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κύτταρων και μεταφέρονται στους περιβάλλοντες ιστούς (121, 123).

4. Τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα απελευθερώνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, τα

οποία μπορούν να προκαλέσουν άμεσα κυτταρική βλάβη, ενώ επίσης σχηματίζουν συσσωματώματα με τα αιμοπετάλια, αποφράσσοντας τα τριχοειδή αναστέλλοντας κατά συνέπεια την αιματική ροή (124, 125).



Εικόνα 11. Αλλοιώσεις σε επίπεδο μικροκυκλοφορίας που συμμετέχουν στο no reflow φαινόμενο. [Reffellmann T and Kloner R. Heart 2002;87:162-168]

Επιπλέον, αγγειοσυσπαστικοί παράγοντες που απελευθερώνονται από τα ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, τα αιμοπετάλια και τα κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα συνεισφέρουν στην εμμένουσα αγγειοσυστολή της μικροκυκλοφορίας (126). Σε μοριακό επίπεδο, η επαναιμάτωση επάγει την έκφραση του παράγοντα νέκρωσης όγκου τύπου α (tumor necrosis factor- TNFα), ο οποίος μπορεί να βλάψει την εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο στεφανιαία εφεδρεία (127). Ρόλο στη βλάβη ισχαιμίας-επαναιμάτωσης παίζει και η ιντερλευκίνη-β, καθώς σε γενετικά τροποποιημένα ζώα που δεν την εκφράζουν (knock-out animals) εμφανίζεται ελάττωση της επαγόμενης από την ισχαιμία φλεγμονής (128). Τέλος, εντός λίγων λεπτών από την επαναιμάτωση, η ισορροπία μεταξύ οξειδίου και υπεροξειδίου του αζώτου διαταράσσεται υπέρ του υπεροξειδίου, λόγω της παραγωγής οξειδάσης της ξανθίνης από τα

ουδετερόφιλα, τα ενδοθηλιακά και μυοκαρδιακά κύτταρα, γεγονός που οδηγεί σε επίταση της φλεγμονώδους καταστάσεως (129).

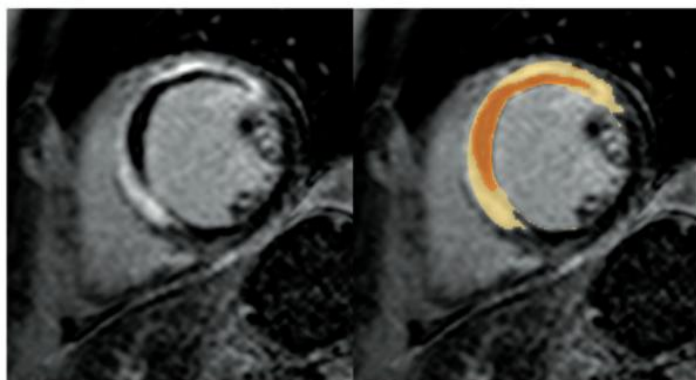
Η επαναιμάτωση μπορεί επίσης να προκαλέσει μη αναστρέψιμη βλάβη στα καρδιομυοκύτταρα. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας παρατηρείται αύξηση της ενδοκυττάριας συγκέντρωσης νατρίου. Η επακόλουθη ανταλλαγή ιόντων ασβεστίου με το νάτριο μέσω του αντιμεταφορέα $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ του σαρκειλήμματος προκαλεί υπερφόρτωση ασβεστίου, η οποία οδηγεί σε υπερσυσταλτικότητα και επάγει την διάνοιξη των διαπερατών πόρων των μιτοχονδρίων (mitochondrial permeability transition pore- m-PTP), που ενισχύει με τη σειρά της την ενδοκυττάρια υπερφόρτωση ασβεστίου.

5. Προδιάθεση της στεφανιαίας κυκλοφορίας για βλάβη: στους ανθρώπους, το φαινόμενο μη επαναροής που σχετίζεται με ανάσπαση του διαστήματος ST μπορεί να εμφανιστεί κατά τη διάρκεια εκλεκτικών παρεμβάσεων, ενώ μπορεί να απουσιάζει κατά τη διάρκεια αγγειοπλαστικής που εκτελείται αρκετές ώρες μετά τη στεφανιαία απόφραξη. Η προδιάθεση μπορεί να είναι γενετική ή επίκτητη. Συγκεκριμένα, ο σακχαρώδης διαβήτης έχει συσχετισθεί με διαταραγμένη τριχοειδική επαναιμάτωση μετά από αγγειοπλαστική, ενώ σε ζωικό μοντέλο η υπερχοληστερολαιμία φάνηκε να επιδεινώνει τη βλάβη από επαναιμάτωση ενισχύοντας το οξειδωτικό στρες (130, 131). Τέλος, η ισχαιμική προγύμναση φαίνεται να έχει ευεργετική επίδραση στη λειτουργία της μικροκυκλοφορίας (132).

E.3. Διάγνωση

Κλινικά στον άνθρωπο η διάγνωση του no reflow γίνεται με ηλεκτροκαρδιογραφικά (εμμένουσα ανάσπαση) και απεικονιστικά μέσα, όπως η υπερηχοκαρδιογραφία με τη χρήση σκιαγραφικού και η μαγνητική τομογραφία καρδιάς με τη χρήση γαδολινίου. Η κατ'έξοχην μέθοδος απεικόνισης και ποσοτικοποίησης του no reflow είναι η μαγνητική

τομογραφία καρδιάς. Το no reflow είναι οι περιοχές εκείνες του μυοκαρδίου οι οποίες δεν προσλαμβάνουν το σκιαγραφικό (έλλειψη late enhancement)(133) (εικόνα 12).



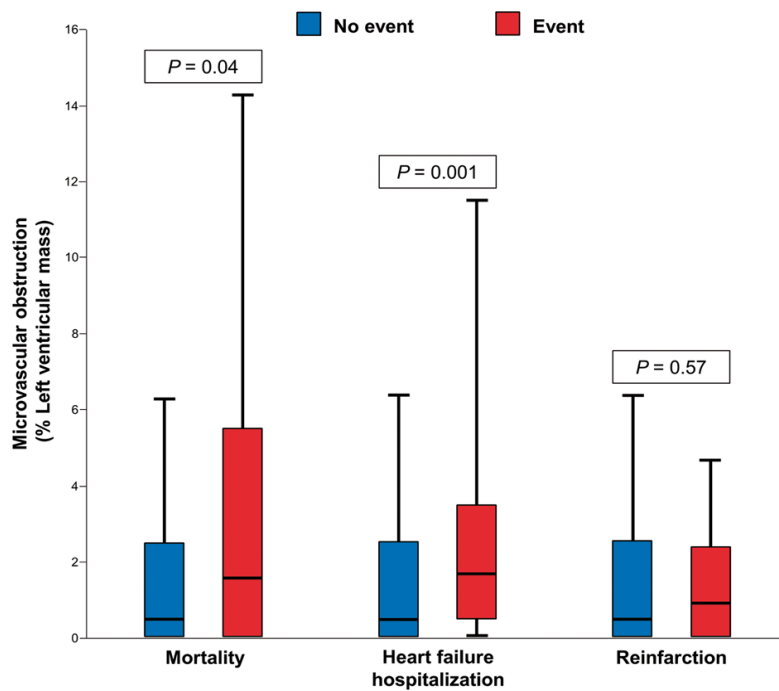
Εικόνα 12. Μαγνητική τομογραφία καρδιάς με γαδολίνιο. Απεικονίζεται η απόφραξη της μικροκυκλοφορίας και το μέγεθος του εμφράγματος. Η περιοχή που δεν προσλαμβάνει σκιαγραφικό (πορτοκαλί χρώμα), αντιστοιχεί στην περιοχή βλάβης της μικροκυκλοφορίας η οποία βρίσκεται εντός της περιοχής αυξημένου σήματος -περιοχή εμφράκτου (κίτρινο χρώμα). [de Waha et al. Eur Heart J. 2017 Dec 14;38(47):3502-3510]

E.4. Προγνωστική Αξία

Σε διάφορες μελέτες έχει φανεί ότι η βαρύτητα της απόφραξης της μικροκυκλοφορίας ή του no reflow, όπως αυτή καταδειχνεται με τις διάφορες απεικονιστικές τεχνικές, συσχετίζεται με χειρότερη κλινική έκβαση, συμπεριλαμβανομένης της αυξημένη θνητότητας και της ανάστροφης αναδιαμόρφωσης του μυοκαρδίου (118, 133-135). Στις περισσότερες από αυτές, η παρουσία του no reflow ήταν προγνωστικός παράγοντας για χειρότερη κλινική έκβαση ανεξάρτητα από την έκταση του εμφράγματος. Στην πιο πρόσφατη μελέτη από τους de Waha et al (133) οι ερευνητές ανέλυσαν δεδομένα από 7 τυχαίοποιημένες μελέτες που είχαν σχέση με πρωτογενή αγγειοπλαστική μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Σκοπός τους ήταν να εξετάσουν τη σχέση μεταξύ

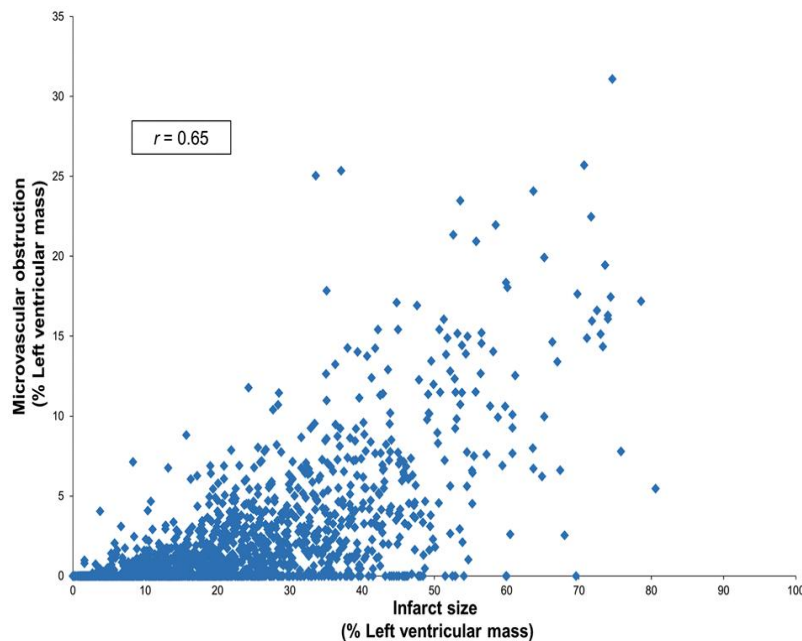
απόφραξης της μικροκυκλοφορίας (όπως αυτή εκτιμάται 7 ημέρες μετά την επαναϊμάτωση με μαγνητική τομογραφία καρδιάς) και ολικής θνητότητας, νοσηλείας για καρδιακή ανεπάρκεια και νέο έμφραγμα εντός έτους.

Συνολικά 1688 ασθενείς με STEMI συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη (2004-2011). Σε ποσοστό 57% ανιχνεύθηκε περιοχή με απόφραξη της μικροκυκλοφορίας. Ήταν πιο συχνό στους ασθενείς με πρόσθιο έμφραγμα. Η έκταση του no reflow ήταν ανεξάρτητη από το φύλο, την ηλικία, την παρουσία υπέρτασης ή δυσλιπιδαιμίας, αλλά ήταν ελαφρώς πιο αυξημένη στους διαβητικούς. Αποδείχθηκε ισχυρή ανεξάρτητη συσχέτιση μεταξύ της έκτασης της απόφραξης της μικροκυκλοφορίας και την ολικής θνητότητας, και της νοσηλείας για καρδιακή ανεπάρκεια στον 1 χρόνο. (ολική θνητότητα: 1.59% vs 0.46%, $p=0.04$, νοσηλεία για καρδιακή ανεπάρκεια: 1.67% vs 0.45%, $p=0.001$). Δεν υπήρχε διαφορά ως προς την πιθανότητα επαναστένωσης (0,93% vs 0.46%, $p=0.57$). Η δυσμενέστερη πρόγνωση των ασθενών αυτών πιθανώς οφείλεται στη χειρότερη επούλωση, που οδηγεί σε αύξηση της έκτασης του εμφράκτου, τμηματική και ολική διάταση της αριστερής κοιλίας και έκκεντρη υπερτροφία των λοιπών φυσιολογικών τοιχωμάτων (116). Ως αποτέλεσμα η ανίχνευση, η πρόληψη και η θεραπεία του no reflow πιθανόν να επηρεάζουν την έκβαση μακροχρόνια των ασθενών που υποβάλλονται σε πρωτογενή αγγειοπλαστική.



Εικόνα 13.A. Η βλάβη της μικροκυκλοφορίας σε ασθενείς με ή χωρίς ανεπιθύμητα συμβάματα κατά την παρακολούθηση ενός έτους. Οι κάθετες γραμμές εκτείνονται από το 1ο έως το 90 εκατοστιαίο διάστημα. Η γραμμή εντός των παραλληλόγραμμων είναι η μέση τιμή και το άνω και κάτω όριο τους αντιστοιχεί στο 1ο και 3 τεταρτημόριο.

Η μέση απόφραξη της μικροκυκλοφορίας (ως ποσοστό της μάζας της αριστερής κοιλίας) ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς με σύμβαμα συγκριτικά με τους ασθενείς που δεν παρουσίασαν σύμβαμα (ολική θνητότητα: 1.59% vs 0.46%, $p=0.04$, νοσηλεία για καρδιακή ανεπάρκεια: 1.67% vs 0.45%, $p=0.001$, επαναστένωση: 0,93% vs 0.46%, $p=0.57$). [de Waha et al. Eur Heart J. 2017 Dec 14;38(47):3502-3510]



Εικόνα 13.B. X-Y scatterplot που δείχνει τη σχέση μεταξύ μεγέθους εμφράγματος και απόφραξης της μικροκυκλοφορίας. [de Waha et al. Eur Heart J. 2017 Dec 14;38(47):3502-3510]

E.5. Θεραπευτικές προσεγγίσεις

Είναι επόμενο θεραπευτικό στόχο να αποτελεί κάθε παράμετρος της παθοφυσιολογίας τους φαινομένου no reflow. Έχουν δοκιμασθεί διάφορες φαρμακευτικές ουσίες στο αιμοδυναμικό εργαστήριο για την αντιμετώπισή του, με τα κυριότερα να παρατίθενται παρακάτω (136):

Αντιμετώπιση του περιφερικού εμβολισμού των στεφανιαίων

αγγείων: Η απευθείας τοποθέτηση στεφανιαίας ενδοπροθέσεως (direct stenting), αποφεύγοντας κατά τον τρόπο αυτό την επαγόμενη από τη διαστολή του μπαλονιού της αγγειοπλαστικής κατακερμάτιση του θρόμβου και παγιδεύοντας τον αθηρωματικό θρόμβο κάτω από το δίκτυ της ενδοπροθέσεως, έχει προταθεί ως μια πιθανή τεχνική για την ελάττωση του περιφερικού εμβολισμού (137). Άλλη προσέγγιση είναι η χρήση συσκευών θρομβοαναρρόφησης ή φίλτρων, με τα αποτελέσματα των κλινικών δοκιμών όμως να είναι αντικρουόμενα: δύο μελέτες απέτυχαν να καταδείξουν βελτιωμένη ροή μετά την επαναιμάτωση με τη χρήση αυτών των συσκευών (138, 139). Στη μεγάλη τυχαίοποιημένη μελέτη REMEDIA, χρησιμοποιήθηκε ένας απλός καθετήρας αναρροφήσεως και οδήγησε σε καλύτερους δείκτες μυοκαρδιακής αιμάτωσης συγκριτικά με την τυπική αγγειοπλαστική, χωρίς όμως να συνοδεύεται από παρεμπόδιση της ανάστροφου αναδιαμόρφωσης (140, 141).

Αντιμετώπιση της βλάβης από ισχαιμία

Στρατηγικές που στοχεύουν στην μείωση των χρόνων ισχαιμίας διερευνώνται ευρέως και πιθανόν να οδηγήσουν στην ελάττωση της εμφάνισης του φαινομένου μη επαναρροής. Κατά παρόμοιο τρόπο, τα φάρμακα που ελαττώνουν τις μυοκαρδιακές ανάγκες σε οξυγόνο και κατά συνέπεια τη βαρύτητα της ισχαιμίας μπορεί να βελτιώνουν την κλινική έκβαση μέσω της βελτίωσης της μυοκαρδιακής αιμάτωσης. Η ευεργετική

επίδραση φαρμάκων που λειτουργούν με αυτόν το μηχανισμό, όπως η καρβεδιλόλη (142) και η βαλσαρτάνη (143), έχει καταδειχθεί στο παρελθόν. Στην πιο πρόσφατη μελέτη METOCARD-CINC, οι ασθενείς που έλαβαν ενδοφλεβίως μετοπρολόλη πριν την επαναιμάτωση, είχαν μικρότερη έκταση εμφράγματος και υψηλότερο κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας βραχυπρόθεσμα (144). Στους 6 μήνες, είχαν καλύτερη λειτουργικότητα αριστερής κοιλία, λιγότερες ενδείξεις για εμφύτευση απινιδιστή και εισαγωγές για καρδιακή ανεπάρκεια (145).

Αντιμετώπιση της βλάβης από επαναιμάτωση

Οι υψηλού κινδύνου ασθενείς για την εμφάνιση του φαινομένου no reflow μέσω του μηχανισμού της βλάβης από επαναιμάτωση έχει δοκιμασθεί να αντιμετωπιστούν θεραπευτικά με ανταγωνιστές Ib/IIIa. Σκοπός τους είναι να παρέμβουν στην αλληλεπίδραση των ενδοθηλιακών κυττάρων με τα αιμοπετάλια και τα ουδετερόφιλα. Μεταξύ των ανταγωνιστών Ib/IIIa, η αμπσιξιμάμπη έχει φανεί να βελτιώνει τη μυοκαρδιακή αιμάτωση όταν χορηγείται στη έναρξη της επαναιμάτωσης και για διάρκεια 12 ωρών (146), με την ενδοστεφανιαία έγχυση να υπερτερεί της ενδοφλέβιας (147). Επιπλέον στην πιο πρόσφατη μελέτη INFUSE-AMI στους ασθενείς που χορηγήθηκε αμπσιξιμάμπη υπήρξε σημαντική μείωση στην έκταση του εμφράγματος 30 ημέρες μετά (148). Η ενδοφλέβια χορήγηση τιροφιμπάνης έχει επίσης καταδειχθεί να ασκεί προστατευτική δράση έναντι του εικονικού φαρμάκου, όπως αξιολογήθηκε από το βαθμό λύσης της ανάσπασης του διαστήματος ST σε περιπτώσεις πρωτογενούς αγγειοπλαστικής(149). Η ενδοφλέβια επιτιμιπατίδη αποδείχθηκε επίσης αποτελεσματική στην πρόληψη του φαινομένου μη επαναροής στη μελέτη PROTECT-TIMI-30 (150). Με τις παραπάνω μελέτες υποδηλώνεται η προστατευτική δράση του συνόλου των φαρμάκων της κατηγορίας των αναστολέων Ib/IIIa.

Η αδενοσίνη είναι ένα ενδογενές νουκλεοσίδιο που ελαττώνει το φορτίο ασβεστίου και τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, ανταγωνίζεται τα ουδετερόφιλα και τα αιμοπετάλια και διαμεσολαβεί την αγγειοδιαστολή (151). Σε μία πρώτη μικρή τυχαιοποιημένη μελέτη, η ενδοστεφανιαία χορήγηση 4 mg αδενοσίνης πριν την επαναγγείωση οδήγησε σε μικρότερη συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου μη επαναρροής σε σχέση με την ομάδα ελέγχου (152). Στη μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη AMISTAD II, η ενδοφλέβια έγχυση αδενοσίνης (για 3 ώρες) δε μείωσε τα κλινικά συμβάματα στους 6 μήνες παρακολούθησης (εμφάνιση καρδιακής ανεπάρκεια, νοσηλείας για καρδιακή ανεπάρκεια ή θάνατο οποιασδήποτε αιτίας). Ωστόσο φάνηκε να υπάρχει μείωση στην έκταση του εμφράγματος στους ασθενείς που έλαβαν μεγαλύτερη δόση φαρμάκου (70μg/kg/min έναντι 50 μg/kg/min). Ωστόσο σε νεότερες μελέτες, η χορήγηση υψηλής δόσης αδενοσίνης δε μείωσε την έκταση του εμφράγματος ή της βλάβης της μικροκυκλοφορίας (153, 154). Έτσι, δεν είναι αποδεδειγμένη η θέση της στην θεραπεία του φαινομένου no reflow. Το νιτροπρωσσικό νάτριο είναι α) δότης νιτρικού οξέος με ισχυρές αγγειοδιασταλτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των αρτηριολίων αντίστασης και της μικροκυκλοφορίας, β) συμμετέχει στην αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων και γ) διαθέτει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες. Υπάρχουν δεδομένα ότι το νιτροπρωσσικό νάτριο είναι επωφελές στην αντιμετώπιση, αλλά όχι και στην πρόληψη του φαινομένου μη επαναρροής. Σε μικρές καταγραφικές μελέτες η ενδοστεφανιαία έγχυση νιτροπρωσσικού ναρίου φάνηκε να επιφέρει μια βελτίωση της στεφανιαίας ροής στο τέλος της αγγειοπλαστικής παρέμβασης(155-158). Σε ότι αφορά την πρόληψη, σε μια μελέτη 98 ασθενών με διατοιχωματικό OEM οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε αναλογία 1:1 στον να λάβουν ενδοστεφανιαία, περιφερικά της βλάβης, είτε 60 μg νιτροπρωσσικού είτε εικονικό φάρμακο προ της επιτέλεσης αγγειοπλαστικής (159). Δεν υπήρχε διαφορά στη στεφανιαία ροή ή τη

λύση της ανάσπασης του διαστήματος ST μεταξύ των δύο ομάδων. Ωστόσο, το σύνθετο κλινικό καταληκτικό σημείο της επαναγγείωσης της ένοχης βλάβης, του νέου OEM ή του θανάτου επήλθε μόνο στο 6,3% των ασθενών που έλαβαν νιτροπρωσσικό εν συγκρίσει με το 20% των ασθενών που έλαβαν το εικονικό φάρμακο. Επειδή δεν είχε ορισθεί στο σχεδιασμό της μελέτης ως πρωτογενές τελικό σημείο, τα αποτελέσματά της θεωρήθηκαν αρνητικά ως προς την αξία της χορήγησης νιτροπρωσσικού για την πρόληψη του φαινομένου.

Η νικορανδίλη είναι ένα υβριδικό φάρμακο που διανοίγει τους ευαίσθητους στην τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) διαύλους καλίου και έχει φανεί να ελαττώνει την έκταση του εμφράγματος και την επίπτωση των αρρυθμιών μετά από απολίνωση και επαναιμάτωση των στεφανιαίων αγγείων σε πειραματικά πρωτόκολλα (160). Τυχαίοποιημένη μελέτη έδειξε ότι η ενδοφλέβια έγχυση νικορανδίνης για 24 ώρες μετά την αγγειοπλαστική συνοδεύεται από καλύτερα αγγειογραφικά, λειτουργικά και κλινικά αποτελέσματα σε σύγκριση με το εικονικό φάρμακο (161).

Η βεραπαμίλη είναι αναστολέας των διαύλων ασβεστίου και έχει δοκιμασθεί σε διάφορες μικρές μελέτες. Σε μικρή, τυχαίοποιημένη μελέτη σαράντα ασθενών με διατοιχωματικό OEM, η ενδοστεφανιαία χορήγηση βεραπαμίλης συνδυάστηκε με καλύτερη μικρο-αγγειακή κυκλοφορική λειτουργία σε σχέση με το εικονικό φάρμακο, όπως αξιολογήθηκε με υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη αντίθεσης (162). Δεδομένα από μετα-ανάλυση 7 μελετών, με 539 ασθενείς συνολικά υποστηρίζουν την ενδοστεφανιαία χορήγηση βεραπαμίλης για την πρόληψη του φαινομένου no reflow, καθώς φάνηκε να βελτιώνει τη ροή στη μικροκυκλοφορία και να μειώνει τις διαταραχές κινητικότητας των τοιχωμάτων της αριστερής κοιλίας (163).

Η νικαρδιπίνη έχει επίσης φανεί να ασκεί ευεργετική επίδραση, καθότι η χορήγησή της σε μια αναδρομική μελέτη 72 ασθενών, που εμφάνισαν

φαινόμενο μη επαναροής, οδήγησε σε αποκατάσταση πλήρους ροής του στεφανιαίου αγγείου στο 99% των περιπτώσεων (164). Αυτό υποδηλώνει ότι οι θετικές δράσεις διαμεσολαβούνται από το σύνολο των φαρμάκων της κατηγορίας των αναστολέων των διαύλων ασβεστίου και όχι μόνο στη βεραπαμίλη.

Τέλος, η κυκλοσπορίνη Α είναι ισχυρός αναστολέας των διαπερατών πόρων των μιτοχονδρίων, η διάνοιξη των οποίων συνεπάγεται την καταστροφή του οργανιδίου. Τα μιτοχόνδρια φαίνεται να παίζουν κεντρικό ρόλο στους μηχανισμούς που εμπλέκονται στην βλάβη από επαναιμάτωση και το φαινόμενο μη επαναροής. Στη μελέτη των Piot et al, η bolus χορήγηση κυκλοσπορίνης Α πριν την επαναγγείωση σε ασθενείς με STEMI, μείωσε σημαντικά το μέγεθος του εμφράγματος, ωστόσο δε μελετήθηκε η επίδρασή της στο no reflow (165). Δυστυχώς, στη μεγάλη μελέτη CIRCUS που ακολούθησε, η bolus ενδοστεφανιαία χορήγηση κυκλοσπορίνης δεν οδήγησε σε καλύτερη κλινική έκβαση και δεν παρεμπόδισε την ανάστροφο αναδιαμόρφωση, όπως αυτά εκτιμήθηκαν 1 χρόνο μετά (166).

Αντιμετώπιση της προδιάθεσης της στεφανιαίας κυκλοφορίας για βλάβη.

Παρότι η γενετικά καθοριζόμενη ευαισθησία της μικροκυκλοφορίας προς εμφάνιση βλάβης είναι δύσκολο να τροποποιηθεί, η επίκτητη ευαισθησία μπορεί να αντιμετωπιστεί. Χαρακτηριστικά, η επίτευξη της ευγλυκαιμίας μπορεί να αποτελέσει θεραπευτικό στόχο καθότι φάνηκε πως η ελάττωση της τιμής σακχάρου αίματος προ της αγγειοπλαστικής συσχετίζεται με τον περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος [159]. Επιπρόσθετα, οι στατίνες έχουν επίσης αναδειχθεί ως υποψήφιοι θεραπευτικοί παράγοντες για την ελάττωση της έκτασης της βλάβης της μικροκυκλοφορίας, καθώς η χρόνια υπολιπιδαιμική θεραπεία με στατίνες, ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι υπερλιπιδαιμίας, σχετίζεται με

χαμηλότερη επίπτωση του φαινομένου μη επαναρροής και με πληρέστερη λειτουργική ανάνηψη (167). Η επίτευξη ισχαιμικής προγύμνασης (preconditioning) με τη χρήση φαρμακευτικών ουριών ή παρεμβάσεων μπορεί επίσης να περιορίζουν την έκταση του φαινομένου μη επαναρροής (168, 169). Επίσης η μεθισχαιμική εκγύμναση (postconditioning), είναι μια τεχνική που έχει δοκιμασθεί. Αρχικές μελέτες στις οποίες εφαρμόστηκαν επεισόδια ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, αμέσως μετά την επαναγγείωση, έδειξαν μείωση στην έκταση του εμφράγματος από 36% έως 50% και του no reflow (170, 171). Ωστόσο μεγαλύτερες τυχαίοποιημένες μελέτες δεν επιβεβαίωσαν σημαντικό κλινικό όφελος από αυτή την παρέμβαση (172, 173). Σε μεγαλύτερη μετα-αναλύση που συμπεριλήφθηκαν 11 μελέτες με 1313 συνολικά ασθενείς, φάνηκε ότι το postconditioning μειώνει την έκταση του εμφράγματος, όμως το συμπέρασμα ήταν επισφαλές λόγω της μεγάλης ετερογένειας των μελετών και του μικρού δείγματος (174).

Παρά την πληθώρα των μελετών και την εντατική έρευνα τις τελευταίες δεκαετίες, είναι γεγονός πως ο πιο αποτελεσματικός τρόπος πρόληψης του no reflow φαινομένου παραμένει η έγκαιρη επαναιμάτωση. Όπως συμβαίνει συχνά με τις πειραματικές μελέτες, η κλινική πραγματικότητα στον ανθρώπινο οργανισμό είναι πιο σύνθετη, με αποτέλεσμα τα θετικά αποτελέσματά τους συχνά να μην επιβεβαιώνονται κλινικά.

Στον παρακάτω πίνακα συνοψίζονται οι σημαντικότερες κλινικές μελέτες με στόχο την ευρύτερη καρδιοπροστασία, οι οποίες όμως δεν είχαν το επιθυμητό αποτέλεσμα (δηλαδή δε μειώθηκε η έκταση του no reflow, του εμφράγματος ή δε βελτιώθηκε η λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας) (79).

Πίνακας 4. Σημαντικότερες κλινικές μελέτες με χρήση φαρμακευτικών σκευασμάτων με στόχο την καρδιοπροστασία που απέτυχαν.

Φαρμακευτική ουσία	Μελέτη	Αποτέλεσμα
Υαλουρονιδάση	Prethrombolytic era	Χωρίς επίδραση στο ME
Αναστολέας διαύλων ασβεστίου	SPRINT II Goldbourt et al (1993)	Αυξημένη θνητότητα
Δισμουτάση του υπεροξειδίου (απενεργοποίηση ελεύθερων ριζών)	Flaherty et al (1994)	Χωρίς βελτίωση στη λειτουργία της αριστερής κοιλίας
Τριμεταζιδίνη (αντιοξειδωτικό)	ESPRIM ESPRIM Group (1994)	Χωρίς επίδραση στη θνητότητα ή στην κλινική έκβαση
Φλουοζόλη	TAMI-9 Wall et al (1994)	Χωρίς μείωση του ME ή βελτίωση λειτουργία της ΑΚ
Rheoth RX-polaxamer 188	EMIP-FR EMIP FR Group (2000)	Χωρίς επίδραση στη θνητότητα, σοκ ή επαναστένωση
Anti-CD 18 μονοκλωνικό αντίσωμα (Αναστολέας των λευκοκυττάρων)	FESTIVAL Rusnak et al (2001)	Χωρίς μείωση του ME
Αναστολέας της αντλίας Na ⁺ /H ⁺	ESCAMI Zeymer et al (2001) CASTEMI Bar et al (2006)	Χωρίς επίδραση στο ME, την κλινική έκβαση ή στη λειτουργία της ΑΚ
Αναστολείς του συμπληρώματος	COMPLY trial Mahaffey et al (2003) APEX trial; Armstrong and Granger (2007)	Χωρίς μείωση στο ME ή στη θνητότητα
Μαγνήσιο	Magnesium in Coronaries Trial Investigators (2002)	Χωρίς επίδραση στη θνητότητα, την καρδιακή ανεπάρκεια ή την κοιλιακή ταχυκαρδία
Nicorandil	Kitakaze et al (2007)	Χωρίς επίδραση στη θνητότητα ή το ME
Ψυχρή διήθηση (cold perfusion)	CHILL-MI Erlinge et al (2014)	Χωρίς επίδραση στο ME ή στο KEAK
Νιτρικό Νάτριο (NaNO ₃)	NIAMI Siddiqi et al (2014)	Χωρίς μείωση στο ME ή στο KEAK
Αναστολέας των πόρων διαπερατότητας της μεμβράνης των μιτοχονδρίων (MPTP)	MITOCARE Atar et al (2014)	Χωρίς επίδραση στο ME ή στο KEAK
Κυκλοσπορίνη	CIRCUS Chung et al (2015)	Χωρίς επίδραση στη θνητότητα ή στην καρδιακή

		ανεπάρκεια
ΜΕ, Μέγεθος Εμφράγματος; ΑΚ, Αριστερή κοιλία; ΚΕΑΚ, Κλάσμα Εξώθησης Αριστερής Κοιλίας.		

IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΣΚΟΠΟΣ

Η μυοκαρδιακή αναγέννηση από προγονικά κύτταρα έχει χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία της ισχαιμικής μυοκαρδιοπάθειας. Διάφορα είδη προγονικών κυττάρων έχουν δοκιμαστεί, μεταξύ αυτών τα προγονικά κύτταρα προερχόμενων απ'ευθείας από την καρδιά (cardiac derived cells -CDCs). Τα προγονικά κύτταρα συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του ισχαιμικού ιστού με πολλαπλούς μηχανισμούς: μυοκαρδιογένεση, αγγειογένεση, παρακρινική δράση, αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας ουσίας, επιστράτευση αυτόχθονων προγονικών κυττάρων και επανεισαγωγή σε μιτωτική φάση διαφοροποιημένων καρδιακών κυττάρων(175).

Παράλληλα, σε πειραματικά πρωτόκολλα έχει αποδειχθεί η ευεργετική δράση αυξητικών παραγόντων, κυτταροκινών και άλλων πρωτεϊνών που παράγονται από τα προγονικά κύτταρα [σε μέγιστη συγκέντρωση τις πρώτες 48 ώρες] με στόχο τα αυτόχθονα μυοκαρδιακά κύτταρα(91). Οι παράγοντες αυτοί δρουν μέσω: 1. χυμικής επαγωγής κυτταροπροστατευτικών και αναγεννητικών μηχανισμών, 2. αύξησης της αντοχής των υπάρχοντων κυττάρων στην ισχαιμία και ενίσχυση της επιβίωσής τους και 3. αγγειογένεσης. Επιπλέον έχει δοκιμαστεί η χορήγηση τροποποιημένου (από τα κύτταρα) καλλιεργητικού μέσου μετεμφραγματικά, με ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Επίσης ο συνδυασμός χορήγησης τροποποιημένου καλλιεργητικού μέσου και προγονικών κυττάρων φάνηκε να υπερτερεί της απλής έγχυσης κυττάρων αφού βελτίωσε το αγγειακό δίκτυο, μείωσε την απόπτωση των καρδιακών κυττάρων και συνεπώς αύξησε τη βιώσιμη περιοχή εντός του εμφράγματος(69).

Η πτωχή επιβίωση και παροδική εμφύτευση των προγονικών κυττάρων στην καρδιά και η ενδεχόμενη αρρυθμιογόνος δράση τους είναι προβλήματα των κυτταρικών θεραπειών τα οποία μια προσέγγιση

βασισμένη στις παρακρινικές ιδιότητες των κυττάρων δίνει τη δυνατότητα να παρακαμφθούν (176).

Η άμεση διάνειξη του θρομβωμένου αγγείου είναι πλέον η ενδεδειγμένη θεραπεία στο OEM. Το φαινόμενο μη επαναροής, που αντιστοιχεί σε βλάβη της μικροκυκλοφορίας που προκαλείται στα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης ενώ το επικαρδιακό αγγείο είναι ανοιχτό, αποτελεί σημαντική «παράπλευρη απώλεια» κάθε θεραπευτικής παρέμβασης επαναιμάτωσης. Φλεγμονώδεις κυτταροκίνες και ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το επαναιματούμενο μυοκάρδιο (βλάβη επαναιμάτωσης), αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, οίδημα της περιοχής, απόφραξη των τριχοειδών, αγγειόσπασμος και σχηματισμός περιφερικών θρόμβων συμμετέχουν στην παθοφυσιολογία του φαινομένου(177). Το φαινόμενο μη επαναροής επιδεινώνει τη συστολική δυσλειτουργία και την αναδιαμόρφωση της υπο κίνδυνο μυοκαρδιακής περιοχής και συνεπώς σχετίζεται με χειρότερη κλινική πορεία και πρόγνωση.

Δεν έχει μελετηθεί αν οι κυτταρικές θεραπείες, εφαρμοζόμενες στην οξεία φάση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, παίζουν ρόλο στην έκταση του φαινομένου μη επαναροής. Επιπλέον, δεν έχει μελετηθεί η παρακρινική δράση των προγονικών κυττάρων στην οξεία φάση του εμφράγματος και στο φαινόμενο μη επαναροής. Η χορήγηση της αναγεννητικής θεραπείας τη στιγμή της πρωτογενούς αγγειοπλαστικής έχει οφέλη: ουσιαστικά, καθώς τα χορηγούμενα κύτταρα θα έχουν τη δυνατότητα να ασκήσουν καρδιοπροστατευτική δράση και τεχνικά, καθώς αποφεύγεται η ανάγκη δεύτερου καθετηριασμού. Το ενδεχόμενο η χορήγηση των εκκρινικών παραγόντων να είναι εξίσου αποτελεσματική, έχει το σημαντικό πλεονέκτημα της άμεσης διαθεσιμότητας του «έτοιμου προϊόντος» (off-the-shelf).

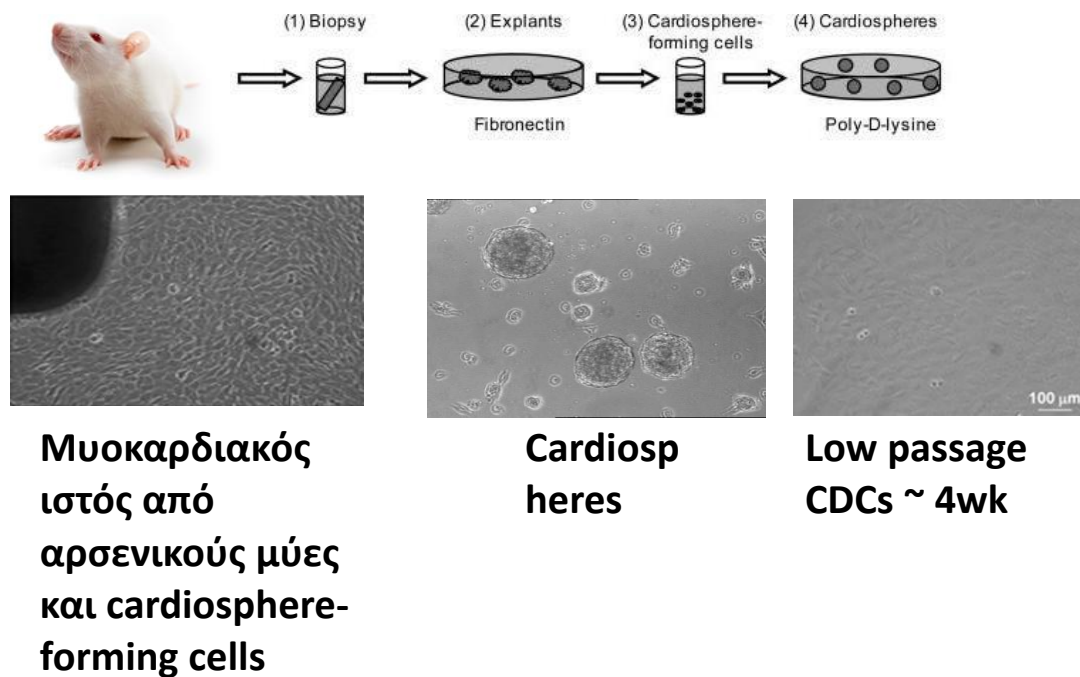
Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια της σφαιρικής ενδοστεφανιαίας χορήγησης καρδιακών προγονικών κυττάρων ή των παρακρινικών

παραγόντων τους στο OEM, στην αρχή της επαναιμάτωσης. Συγκεκριμένα θα μελετηθεί η επίδραση των κυττάρων και των παραγόντων που εκκρίνουν στο φαινόμενο της μη επαναρροής, οξέως και χρονίως και στην έκταση του εμφράγματος, χρησιμοποιώντας μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης σε επίμυες. Επιπλέον, θα εξετασθεί το ενδεχόμενο της καρδιοπροστατευτικής δράσης των παρακρινικών παραγόντων μακροχρόνια.

Υπόθεσή μας είναι ότι η ολική ενδοστεφανιαία χορήγηση είναι ασφαλής και αποτελεσματική κατά την οξεία φάση του εμφράγματος. Επιπλέον υποθέτουμε ότι η χορήγηση τροποποιημένου (εμπλουτισμένου) καλλιεργητικού υλικού θα έχει καρδιοπροστατευτική δράση βραχυπρόθεσμα (μειώνοντας τη βλάβη από επαναιμάτωση) και μακροπρόθεσμα (βελτιώνοντας τη συστολική απόδοση της αριστερής κοιλίας) μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου.

B. Υλικά – Μέθοδος

Το παρόν πειραματικό πρωτόκολλο σχεδιάστηκε για τη χρήση επίμυων Wistar και Wistar Kyoto. Αδρά αποτελείται από 2 μέρη: α) την ανάπτυξη και καλλιέργεια καρδιακών προγονικών κυττάρων (εικόνα 14) και β) το χειρουργικό πειραματικό μοντέλο, οξύ και χρόνιο (εικόνα 17). Ακολούθως θα αναλύσουμε λεπτομερώς τα επιμέρους βήματα.



Εικόνα 14: Ανάπτυξη και καλλιέργεια καρδιακών προγονικών κυττάρων. Μυοκαρδιακές βιοψίες από αρσενικούς Wistar Kyoto επίμυες συλλέχθηκαν. Στη συνέχεια με χρήση κατάλληλων θρεπτικών υλικών αναπτύχθηκαν προγονικά κύτταρα, τα «cardiosphere-forming cells» τα οποία μέσω του ενδιάμεσου σταδίου των καρδιοσφαιρών οδήγησαν στην ανάπτυξη των καρδιακών προγονικών κυττάρων.

1. Ανάπτυξη και Καλλιέργεια καρδιακών προγονικών κυττάρων (cardiosphere derived cells, CDCs)

Μυοκαρδιακές βιοψίες από αρσενικούς Wistar Kyoto επίμυες (με πανομοιότυπο γονιδίωμα-syngeneic) απομονώθηκαν και επεξεργάστηκαν σύμφωνα με τυποποιημένη μέθοδο(49), ώστε μέσω του ενδιάμεσου σταδίου των καρδιοσφαιρών να αναπτυχθούν και συλλεχθούν καρδιακά προγονικά κύτταρα. Στη συνέχεια, τα καρδιακά προγονικά κύτταρα (CDCs) χρησιμοποιήθηκαν για έγχυση στους επίμυες in vivo, και για τη δημιουργία του τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού in vitro.

Συγκεκριμένα, 2 αρσενικοί αρουραίοι Wistar Kyoto (Jackson Laboratory) ηλικίας περίπου 8-9 εβδομάδων θυσιάσθηκαν, αφού προηγήθηκε συστηματικός ηπαρινισμός (1000 IU μέσω της κάτω κοίλης φλέβας) για την αποφυγή σχηματισμού θρόμβων, και στη συνέχεια συλλέχθηκε η καρδιά τους και πλύθηκε σε φυσιολογικό ορό (PBS). Ακολούθησε η μεταφορά τους μέσα σε φυσιολογικό ορό (PBS) σε αποστειρωμένο κλίβανο (Hood) μέσα στον οποίο με αποστειρωμένα εργαλεία τεμαχίσθηκαν σε κύβους $\leq 1 \text{ mm}^3$. Τα ιστοτεμαχίδια αφαιήθηκαν για μερική διάσπαση του κολλαγόνου σε διάλυμα κολλαγενάσης (1 mg/ml, GIBCO) και θρυψίνης (0.05% GIBCO). Στη συνέχεια, ξεβγάλθηκαν με καλλιεργητικό μέσο βιοψιών [Iscove's Modified Dulbecco's Medium (GIBCO), fetal bovine serum (20%, Hyclone, Logan, UT), 100 U/ml πενικιλίνη G (GIBCO), 100 U/ml στρεπτομυκίνη (GIBCO), 2 mmol/L L-γλουταμίνη (Invitrogen) και 0.1 mmol/L 2-μερκαπτοαιθανόλη (GIBCO)] και τοποθετήθηκαν σε δισκία petri επιστρωμένα με φιμπρονεκτίνη (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma). Εγχύθηκε 10 ml καλλιεργητικού υλικού βιοψιών σε κάθε δίσκο petri και τοποθετήθηκαν σε επωαστή (37 C, CO₂). Μετά από ~10-14 ημέρες, διαυγή ατρακτοειδή κύτταρα (stroma-like cells) έκαναν την εμφάνισή τους γύρω από τα ιστοτεμαχίδια. Όταν έφταναν σε μεγάλο

αριθμό συλλέγονταν. Αυτό μπορούσε να γίνει έως 4 φορές για κάθε δίσκο petri (Generation 1, 2, 3, 4 αντίστοιχα).

Για να γίνει αυτό, αφαιρούνταν το καλλιεργητικό υλικό, εν συνεχεία ξεπλενότουσαν τα δισκία με PBS και διάλυμα θρυψίνης 0.05% προστίθετο για 3 περίπου λεπτά. Η θρυψίνη εξουδετερωνόταν με την προσθήκη καλλιεργητικού υλικού. Το διάλυμα μεταφερόταν σε κονικά σωληνάρια των 50 ml τα οποία φυγοκεντρώντουσαν για 3 λεπτά στις 3000 rcf στροφές. Αφού αφαιρούνταν το υπερκείμενο διάλυμα, το ίζημα αποτελούσε τα προγονικά κύτταρα, ανασυστηνόταν σε 1 ml καλλιεργητικού υλικού και γινόταν μέτρηση του αριθμού των κυττάρων, σε κυτταρόμετρο. Εν συνεχεία 2×10^4 κύτταρα/ml μεταφερόντουσαν σε δισκία επιστρωμένα με poly-D-lysine, με τελικό όγκο καλλιεργητικού υλικού 1 ml. Μετά από ~1 εβδομάδα, στο κέντρο κάθε δισκίου, παρατηρούνταν να «επιπλέουν» μεγάλα συσσωματώματα κυττάρων, οι λεγόμενες «καρδιόσφαιρες». Αυτές συλλέγονταν και μεταφερόντουσαν σε φλάσκες (T15), με την προσθήκη κατάλληλης ποσότητας καλλιεργητικού υλικού. Από τις καρδιόσφαιρες αναπτύσσονταν τα κύτταρα προερχόμενα από τις καρδιόσφαιρες (Cardiosphere-Derived-Cells, CDCs). Όταν γέμιζε η φλάσκα από κύτταρα, αυτά πάλι έπειτα από θρυψινισμό, μεταφέρονταν σε μεγαλύτερη φλάσκα (T75) [CDCs passage 1] και ούτω καθεξής. Αυτό γινόταν έως 4 passages. Τα κύτταρα είτε χρησιμοποιούντουσαν στα πειράματα μεταξύ passage 3-4 είτε καταψύχονταν όταν ήταν έως passage 3 (θα περιγραφεί παρακάτω) για μελλοντική χρήση.

Φύλαξη κυττάρων: κύτταρα που δεν ήταν δυνατό να χρησιμοποιηθούν άμεσα, φυλάσσονταν σε ειδικούς για αυτό το σκοπό καταψύκτες, σε θερμοκρασία -80C. Για να γίνει αυτό τα κύτταρα μετά από θρυψινισμό και αποκόλληση από τη φλάσκα, φυγοκεντρώντουσαν για 3 λεπτά σε 1000 rcf. Στη συνέχεια γινόταν καταμέτρηση και ανασύσταση σε 100,000 CDCs/ml. Μεταφερόντουσαν σε cryovials (1 και 2 ml) τα οποία τοποθετούνταν σε ειδικά σκεύη που περιείχαν ισοπροπυλική αλκοόλη, τα

οποία επιτύγχαναν σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας, περίπου -1 C/λεπτό («Mr Frosty», Nalgene, Thermo Scientific).

2. Δημιουργία τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού

Καρδιακά προγονικά κύτταρα passage 4, επώαστηκαν για 24ώρες σε νορμοξικό περιβάλλον παρουσία καλλιεργητικού υλικού χωρίς εμβρυικό βόιο ορό και αντιβιοτικά (IMDM με L-γλουταμίνη 2mM), ώστε να παραχθεί το «τροποποιημένο καλλιεργητικό μέσο». Στη συνέχεια μετά από υπερδιήθηση με χρήση ειδικών spin columns (EMD Millipore Amicon Ultra-15 centrifugal filter units), συμπυκνώθηκε κατά 80-100 φορές, μοιράστηκε σε ποσότητα ανάλογη της χορηγούμενης δόσης (~200 μ L) και αποθηκεύθηκε στους -80C έως τη χρήση του. Συγκεκριμένα για κάθε 15 ml καλλιεργητικού υλικού, υπερδιήθημα ~300 μ L συλλεγόταν.

3. Πειραματόζωα

Στο παρόν πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκαν αρσενικοί Wistar Kyoto (Jackson Laboratory) επίμυες βάρους ~250 γραμμαρίων για την ανάπτυξη καρδιακών προγονικών κυττάρων. Στο οξύ και χρόνιο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί Wistar Kyoto (Jackson Laboratory) και θηλυκοί Wistar (Ινστιτούτο Pasteur) επίμυες βάρους 250-300 γραμμαρίων. Οι Wistar Kyoto χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα χορήγησης κυττάρων, καθώς πρόκειται για γενετικά ταυτόσημα (syngeneic) ζώα, με ίδια μόρια ιστοσυμβατότητας, οπότε χωρίς κίνδυνο ανοσολογικής διέγερσης προς τα μεταμοσχευμένα προγονικά κύτταρα. Στις ομάδες ελέγχου και τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού, χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί Wistar. Όλα τα πειραματόζωα δέχτηκαν φροντίδα σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες για τη φροντίδα και τη χρήση των ζώων εργαστηρίου από το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας των Ηνωμένων Πολιτειών.

Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από τη Διεύθυνση Αγροτικής και Κτηνιατρικής Επιτροπής της Περιφέρειας Αττικής.

4.Πρωτόκολλο Αναισθησίας

Η εισαγωγή στην αναισθησία πραγματοποιούνταν με τοποθέτηση του πειραματοζώου σε αεροστεγή κλωβό και χορήγηση διαλύματος ισοφλουρανίου 4% εντός αυτού για διάστημα 5 λεπτών. Το πειραματόζωο εν συνεχεία διασωληνώνονταν με τη χρήση φλεβοκαθετήρα 22G και τοποθετούνταν σε ύπτια θέση. Η αναισθησία διατηρούνταν με συνεχή ενδοτραχειακή χορήγηση διαλύματος ισοφλουρανίου 2% με τη βοήθεια αναπνευστήρα για μικρά ζώα (Harvard Apparatus, Inspira) καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος. (Εικόνα)

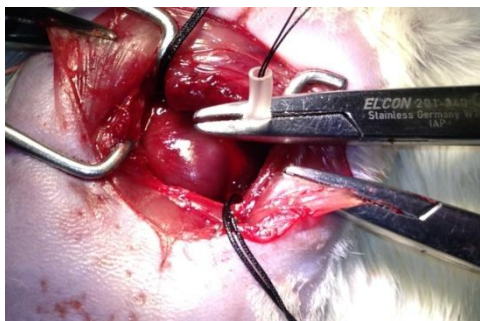


Εικόνα 15: Διασωλήνωση τραχείας πειραματοζώου

5. Χειρουργικές Παρασκευές

Το πειραματόζωο ακινητοποιούνταν με τη χρήση ταινίας στα άκρα και αποτριχονώταν η πρόσθια θωρακική χώρα με τη βοήθεια ειδικής κρέμας (Veet) (Εικόνα 3). Καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος η θερμοκρασία του ζώου διατηρούνταν στα φυσιολογικά επίπεδα (περίπου 37°C) με σύστημα διορθικής θερμομέτρησης-θερμαινόμενης πλάκας. Ακολουθούσε

διάνοιξη του δέρματος μήκους περίπου 4 εκατοστών στη μέση γραμμή με τη χρήση νυστεριού 22. Γινόταν παρασκευή των αριστερών θωρακικών μυών και αριστερή πλάγια θωρακοτομή στο ύψος του 2^{ου} ή 3^{ου} μεσοπλευρίου διαστήματος. Τοποθετείτο στερνοδιαστολέας με τη βοήθεια του οποίου διανοιγόταν ο θωρακικός κλωβός και διευκολυνόταν η πρόσβαση στην καρδιά (χειρουργικό πεδίο). Κατά σειρά αφαιρούνταν ο θύμος αδένας και διανοιγόταν το περικάρδιο. Παρασκευαζόταν η πνευμονική αρτηρία, η ανιούσα αορτή και η κάτω κοίλη φλέβα και τοποθετείτο απολίνωση Silk 2.0 γύρω από την αορτή και την κάτω κοίλη φλέβα. Γινόταν συστηματικός ηπαρινισμός με έγχυση διαλύματος 50μL ηπαρίνης 15% (100 U/kg) εντός της αριστερής κοιλίας της καρδιάς. Μετά από περίπου 1-2 λεπτά ακολουθούσε παροδικός αποκλεισμός στη μεσότητα της προσθίας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας της καρδιάς με τη χρήση ράμματος Prolene 6.0 (πρόκληση εμφράγματος) (Εικόνα 16). Η ισχαιμία είχε διάρκεια 45 λεπτά.



Εικόνα 16. Πρόκληση εμφράγματος του μυοκαρδίου στο πειραματόζωο. Τοποθετείται απολίνωση γύρω από την αορτή και την κάτω κοίλη φλέβα. Στη συνέχεια προκαλείται έμφραγμα με παροδικό αποκλεισμό στη μεσότητα της προσθίας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας. Το περιγεγραμμένο τμήμα, που έχει διαφορετικό χρώμα, αντιστοιχεί στο ισχαιμούν μυοκάρδιο.

Μετά το πέρας του χρόνου ισχαιμίας και πριν την επαναιμάτωση του μυοκαρδίου γινόταν παροδικός αποκλεισμός της ροής του αίματος στην κάτω κοίλη φλέβα και την ανιούσα αορτή, διάρκειας 20 δευτερολέπτων και ενδοκοιλοτική χορήγηση διαλύματος 200μL, ανάλογα με την ομάδα τυχαιοποίησης. Αμέσως μετά την έγχυση, και ενώ η ροή στην κάτω κοίλη φλέβα και την ανιούσα αορτή παρέμενε αποκλεισμένη γινόταν άρση της

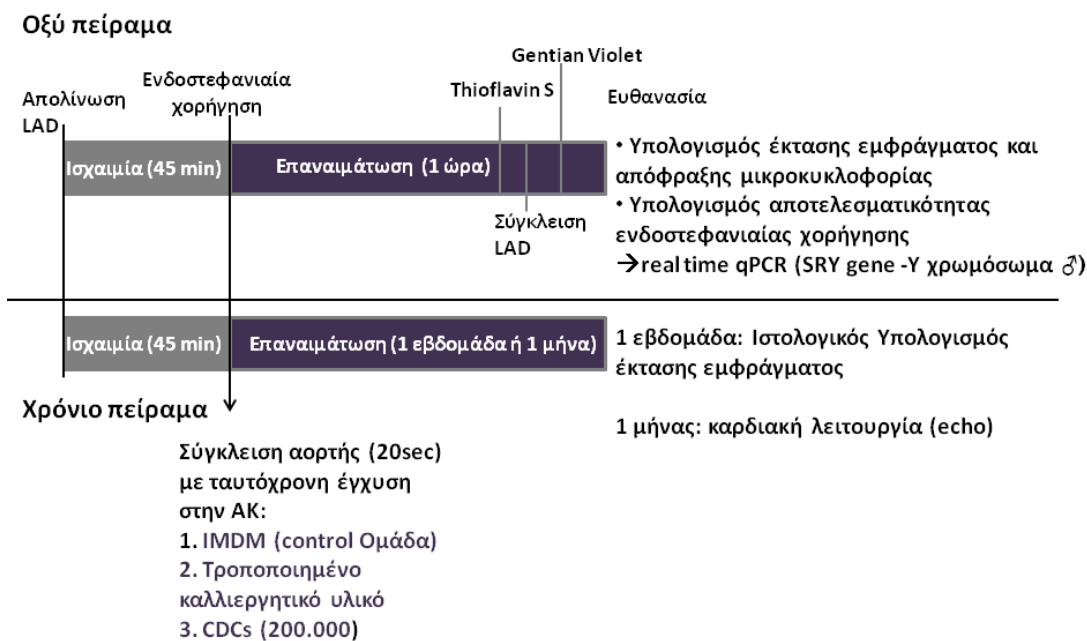
απολίνωσης της προσθίας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας και μαλάξεις της καρδιάς για την προώθηση του χορηγηθέντος διαλύματος προς τη στεφανιαία κυκλοφορία.

6. Τυχαιοποίηση πειραματοζώων

Τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες:

- Ομάδα I: ομάδα ελέγχου (control), δηλαδή χορήγηση διαλύματος αποτελούμενο από 176 μL IMDM (Iscube's Modified Dubecco's Medium, βασικός διαλύτης του καλλιεργητικού υλικού), 20 μL διαλύματος νιτρογλυκερίνης και 4 μL ηπαρίνης (διαλύματος 100 U/kg).
- Ομάδα II: ομάδα καρδιακών προγονικών κυττάρων (CDCs), δηλαδή χορήγηση διαλύματος αποτελούμενο από 176 μL με 200.000 CDCs σε IMDM, 20 μL διαλύματος νιτρογλυκερίνης και 4 μL ηπαρίνης (διαλύματος 100 U/kg).

Ομάδα III: ομάδα τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού, δηλαδή χορήγηση διαλύματος αποτελούμενο από 176 μL τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού, 20 μL διαλύματος νιτρογλυκερίνης και 4 μL ηπαρίνης (διαλύματος 100 U/kg).

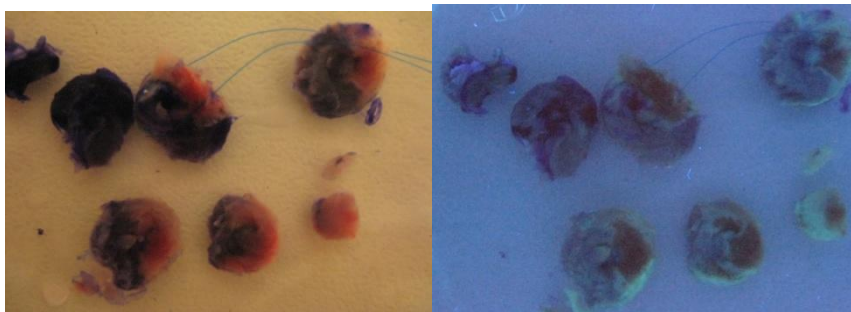


Εικόνα 17. Σχεδιασμός πρωτοκόλλου

7. Οξύ πειραματικό πρωτόκολλο και εκτίμηση φαινομένου μη επαναρροής

Η επαναιμάτωση διαρκούσε μία ώρα. Ακολουθούσε έγχυση μέσω καθετηριασμού της κάτω κοίλης φλέβας διαλύματος 1% θειοφλαβίνης (500μL) ενδοφλεβίως για τον υπολογισμό της έκτασης του φαινομένου μη επαναρροής (Εικόνα 18) και μετά από απολίνωση της προσθίας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας (υπολογισμός έκτασης υπό κινδύνου περιοχής) έγχυση ενδοκοιλιακά μέσω ενέσεως στην κορυφή της αριστερής κοιλίας διαλύματος 1% ιώδους της γεντιανής (500μL) για τον υπολογισμό της υπό κίνδυνο περιοχής. Το ζώο υποβαλόταν σε ευθανασία και αφαιρούνταν η καρδιά. Στη συνέχεια απομονωνόταν μόνο η αριστερή κοιλία η οποία τεμαχιζόταν με μικροτόμο εγκαρσίως (στο βραχύ άξονα) ανά 2 χιλιοστά. Στη συνέχεια, τα μυοκαρδιακά ιστοτεμάχια ζυγίζονταν με τη βοήθεια ηλεκτρικού ζυγού ακριβείας φωτογραφίζονταν υπό το φυσιολογικό φως και υπό λαμπτήρα υπεριώδους ακτονοβολίας, ώστε να προσδιοριστεί η έκταση της υπό κίνδυνο περιοχής και του φαινομένου μη

επαναρροής, αντίστοιχα. Ο υπολογισμός της μάζας της υπό κινδύνου περιοχής ως ποσοστό της ολικής μάζας της αριστερής κοιλίας και του φαινομένου μη επαναρροής ως ποσοστό της μάζας της αριστερής κοιλίας πραγματοποιείται με την επεξεργασία (πλανημέτρηση) ψηφιακών φωτογραφιών με το πρόγραμμα Image J το οποίο έχει αναπτυχθεί από το National Institute of Health των ΗΠΑ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/download.htm>) (Εικόνα 18).



Εικόνα 18. Μακροσκοπική εικόνα του υπολογισμού της έκτασης του εμφράγματος και της έκτασης της περιοχής της βλάβης της μικροκυκλοφορίας. Α. Το σκούρο μπλε χρώμα των παρασκευασμάτων αντιστοιχεί σε φυσιολογικό μυοκαρδιακό ιστό που δεν αιματωνόταν από το αποκλεισθέν αγγείο. Το ανοιχτό και σκούρο κόκκινο χρώμα αντιστοιχεί στην υπό κίνδυνο περιοχή. Β. Το περιγεγραμμένο σκούρας απόχρωσης τμήμα της υπό κίνδυνο περιοχής αντιστοιχεί σε κομμάτι του μυοκαρδίου, προς το οποίο δεν αποκαταστάθηκε φυσιολογική αιματική ροή και άρα δε βιάστηκε από τη θειοφλαβίνη, παρά την άρση του αποκλεισμού του αγγείου (περιοχή βλάβης της μικροκυκλοφορίας).

8. Ενδοστεφανιαία χορήγηση και Υπολογισμός κυτταρικής εμφύτευσης

Για την ομάδα II των πειραματοζώων, στην οποία χορηγήθηκαν καρδιακά προγονικά κύτταρα, στο τέλος του οξέως πειράματος, τα τεμαχίδια από τις καρδιές καταψύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της κυτταρικής εμφύτευσης. Να σημειωθεί ξανά ότι χορηγήθηκαν CDCs από αρσενικούς αρουραίους σε θηλυκούς δέκτες.

Απομόνωση DNA: Ο ιστός από την αριστερή κοιλία ομογενοποιούνταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο του χρησιμοποιούμενου αντιδραστηρίου για την απομόνωση του DNA (DNeasy Blood and Tissue kit, Qiagen). Συγκεκριμένα, ο ιστός αποψυχόταν και στη συνέχεια ζυγίζόταν και τεμαχίζόταν με ψαλίδι σε μικρότερα κομμάτια. Στη συνέχεια προστίθετο διάλυμα ATL σε αναλογία 180 μ L ανά 25 mg ιστού σε κονικά φιαλίδια των 50 ml. Η ομογενοποίηση γινόταν με ειδικό ομογενοποιητή για ιστό (rotor-stator homogenizer). 20 μ L πρωτεΐνάσης K προστίθετο στο μίγμα. Αυτό γινόταν για όλα τα δείγματα/καρδιές από τα πειραματόζωα. Τα φιαλίδια με το μίγμα τοποθετούνταν σε υδατόλουτρο στους 56 C και αναμειγνύονταν σε συσκευή vortex ανά τακτά διαστήματα. Μετά από περίπου 4 ώρες το μίγμα είχε λυθεί και δεν ήταν ορατά τεμαχίδια ιστού. Για να αφαιρεθεί πρόσμιξη RNA στο δείγμα, 4 μ L RNase A (100 mg/ml) προστίθεντο και μετά από 2 λεπτά επώασης αναμειγνύονταν για 15 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια 200 μ L buffer AL προστίθεντο στο μίγμα, ακολουθούσε πάλι ανάδευση, μετά προσθήκη άλλων 200 μ L αιθανόλης (96-100%) και ανάδευση. Το μίγμα στη συνέχεια αναμειγνυόταν με πιπέτα και τοποθετούνταν στην DNeasy Mini spin column η οποία ήταν προσκολλημένη σε σωληνάριο συλλογής χωρητικότητας 2 ml (όλα από την εταιρία). Ακολουθούσε φυγοκέντρηση $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό. Αφαιρούνταν το σωληνάριο συλλογής και η DNeasy Mini spin column τοποθετούνταν σε νέο σωληνάριο συλλογής. 500 μ L Buffer AW1 προστίθεντο και ακολουθούσε πάλι φυγοκέντρηση $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό. Αφαιρούνταν το σωληνάριο συλλογής και η DNeasy Mini spin column τοποθετούνταν σε νέο σωληνάριο συλλογής. 500 μ L Buffer AW2 προστίθεντο και ακολουθούσε πάλι φυγοκέντρηση στις 20,000 $\times g$ για 3 λεπτά. Αφαιρούνταν το σωληνάριο συλλογής και η DNeasy Mini spin column τοποθετούνταν σε νέο σωληνάριο συλλογής τύπου eppendorf (1.5 ml χωρητικότητας). 200 μ L Buffer AE προστίθεντο στη spin column και ακολουθούσε επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθούσε η τελευταία φυγοκέντρωση στις $\geq 6000 \times g$ για 1 λεπτό. Το τελευταίο βήμα επαναλαμβανόταν, καθώς έτσι αυξανόταν η ποσότητα DNA που απομονωνόταν. Το διάλυμα που συλλεγόταν στο τέλος, αποτελούσε το απομονωμένο DNA.

Ποσοτικοποίηση DNA: Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το αντιδραστήριο Quant-iT dsDNA Broad-Range Assay kit (Invitrogen). Τα αντιδραστήρια για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης και στη συνέχεια ο υπολογισμός της συγκέντρωσης DNA με το φλουορόμετρο Qubit (Invitrogen) περιλαμβάνονταν σε αυτό. Συγκεκριμένα, για σύνολο 15 αντιδράσεων, 15 μL Quant-iT αντιδραστηρίου αναμειγνυόταν με 2985 μL Quant-iT buffer, ώστε να αποτελέσουν το Quant-iT working solution (δηλαδή αραιώση Quant-iT reagent : Quant-iT buffer, 1:200). Στη συνέχεια 190 μL working solution προστίθεντο σε 10 μL Standard A και Standard B (παρέχονταν στο kit), για να επιτευχθεί τελικός όγκος διαλύματος 200 μL . Σε 0.5 ml PCR tubes, σε 5 μL από κάθε δείγμα (απομονωμένο DNA από πειραματόζωα) προστίθεντο 195 μL working solution. Τα διαλύματα αναδευόντουσαν για λίγα δευτερόλεπτα και στη συνέχεια αφήνονταν για επώαση για 2 λεπτά. Γινόταν δημιουργία πρότυπης καμπύλης στο Qubit φλουορόμετρο χρησιμοποιώντας τα Standard A και Standard B διαλύματα αντίστοιχα. Στη συνέχεια τοποθετούνταν ένα-ένα τα δείγματα στην ειδική σχισμή του Qubit προς καθορισμό της συγκέντρωσης DNA. Αυτόματα το φλουορόμετρο υπολόγιζε τη συγκέντρωση DNA σε ng/ml.

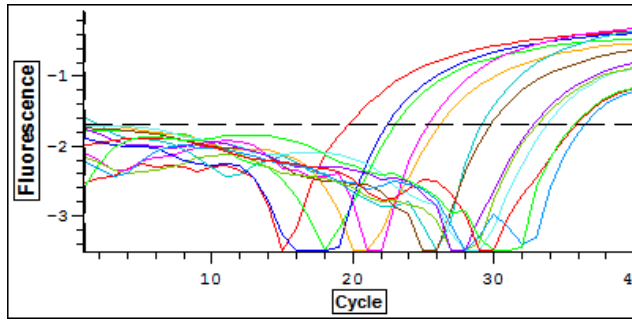
Ποσοτική αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qRT-PCR):

Στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου χρησιμοποιήσαμε το αντιδραστήριο Taqman (Applied Biosystems), με στόχο το γονίδιο SRY που βρίσκεται στο Y χρωμόσωμα (οπότε αφορά τα χορηγούμενα CDCs που προέρχονται από αρσενικούς αρουραίους σε θηλυκούς δέκτες). Οι υποκινητές κατασκευάστηκαν ειδικά για τις παρακάτω αλληλουχίες: Forward primer: 5'5'-GCA GAG AGG CAC AAG TTG

GC-3', reverse primer: 5'-TCC CAG CTG CTT GCT GAT C-3', TaqMan probe: 6FAM CAA CAG AAT CCC AGC ATG CAG AAT TCA G TAMRA. Ο δείκτης (probe) TAMRA ανιχνευόταν στο τέλος της αντίδρασης. Αυτή η μέθοδος PCR έχει το πλεονέκτημα να είναι εξαιρετικά ακριβής και έτσι μπορεί να γίνει ποσοτικοποίηση του αριθμού των γονιδίων που ανιχνεύονται. Δημιουργήθηκε πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιώντας πολλαπλές λογαριθμικές αραιώσεις DNA απομονωμένου από αρσενικό Wistar Kyoto αρουραίο (εικόνα 14). Όλα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στην πρότυπη καμπύλη αραιωνόντουσαν με 50 ng DNA από θηλυκό Wistar Kyoto αρουραίο ώστε να βελτιστοποιηθεί η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Επίσης DNA από θηλυκό Wistar Kyoto αποτελούσε και το negative control δείγμα για τον έλεγχο της ορθότητας της αντίδρασης (contamination). Οι υπολογισμοί των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν έγινε βάση του πρωτοκόλου Taqman One-Step RT-PCR Master Mix (Applied Biosystems). Ο αριθμός των αντιγράφων του SRY γονιδίου σε κάθε σημείο της πρότυπης καμπύλης υπολογίζεται με βάση την ποσότητα του DNA σε κάθε δείγμα και την ολική μάζα του γονιδιώματος του αρουραίου ανά διπλοειδικό κύτταρο.

(<http://www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html>)

Όλα τα δείγματα δοκιμάζονταν σε τριπλέτες. Ο ολικός αριθμός των αντιγράφων του SRY γονιδίου υπολογιζόταν στην ολική ποσότητα του DNA που αντιστοιχούσε σε 12.5 mg μυοκαρδιακού ιστού (αυτή ήταν η ποσότητα ιστού από την οποία απομονώθηκε το DNA) και στη συνέχεια αναγόταν στην ολική μάζα της καρδιάς (η καρδιά των πειραματοζώων πάντα ζυγίζονταν πριν την ομογενοποίηση), λαμβάνοντας υπόψιν ότι υπήρχε 1 αντίγραφο του γονιδίου SRY ανά CDC που είχε χορηγηθεί.



Εικόνα 19. Δημιουργία πρότυπης καμπύλης για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των κυττάρων στην αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

9. Χρόνιο πειραματικό πρωτόκολλο

Μετά την πραγματοποίηση της ενδοκοιλιακής έγχυσης αφαιρούνταν οι απολινώσεις από την αορτή, την κάτω κοίλη και την πρόσθια κατιούσα στεφανιαία αρτηρία, γινόταν καθαρισμός και αεροστεγής σύγκλειση της θωρακικής κοιλότητας με ράμμα Silk 2.0. Εν συνεχεία ολοκληρωνόταν η συρραφή του δέρματος με ράμμα Silk 2.0 και χορήγηση αναλγησίας με υποδόρια ένεση διαλύματος μελοξικάμης 1 mg/kg σωματικού βάρους. Διακόπτονταν η χορήγηση της αναισθησίας, το ζώο συνέρχεται, αποσωληνωνόταν και επέστρεφε στο κλουβί του.

9α. Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη

Ένα μήνα και δύο μήνες μετά την παρέμβαση, το ζώο μεταφέρονταν εκ νέου στο πειραματικό χειρουργείο, διασωληνωνόταν εκ νέου και τοποθετείτο εκ νέου σε ύπτια θέση με τοποθέτηση τριών αυτοκόλλητων καρδιογραφήματος. Πραγματοποιείτο διαθωρακικός υπέρηχος καρδιάς με τη χρήση παιδιατρικής υπερηχοβόλου κεφαλής 11,5 MHz (10S-RS, GE Healthcare Technologies). Κατά την υπερηχογραφική μελέτη λαμβάνονταν τομές κατά τον επιμήκη και βραχύ άξονα της καρδιάς προς υπολογισμό των ακόλουθων παραμέτρων:

- α) τελοδιαστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας
- β) τελοδιαστολικός όγκος αριστερής κοιλίας

- γ) τελοσυστολική διάμετρος αριστερής κοιλίας
- δ) τελοσυστολικός όγκος αριστερής κοιλίας
- ε) κλασματική βράχυνση αριστερής κοιλίας και
- στ) κλάσμα εξωθήσεως αριστερής κοιλίας

Μετά την ολοκλήρωση της υπερηχογραφικής μελέτης το πειραματόζωο αποσωληνωνόταν και επέστρεφε εκ νέου στο χώρο φύλαξης του. Η υπερηχογραφική μελέτη επαναλαμβάνονταν την 30^η και 60^η μετεγχειρητική μέρα.

9β. Παθολογοανατομική μελέτη

Ένα σύνολο πειραματοζώων που είχαν υποβληθεί στο χρόνιο πειραματικό πρωτόκολλο, υποβαλόταν σε διασωλήνωση και ευθανασία με τη χορήγηση διαλύματος χλωριούχου Καλίου (KCl 10%, ώστε να γίνει σύλληψη της καρδιάς στη διαστολή) μία εβδομάδα μετά την πρόκληση της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης. Η καρδιά αφού ξεπλενόταν σε διάλυμα ηπαρινισμένου φυσιολογικού ορού, τοποθετούνταν για σταθεροποίηση σε διάλυμα φορμόλης 10% και ακολουθούσε κατάλληλη προετοιμασία για ιστολογική μελέτη.

Συγκεκριμένα, οι καρδιές μετά από τουλάχιστον 1 εβδομάδα στο διάλυμα σταθεροποίησης, τέμνονταν με τον μικροτόμο ανά 2 mm, όπως και στην περίπτωση του οξέως χειρουργικού πρωτοκόλλου (για την πλανημέτρηση). Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε ιστοπαγίδες κατά σειρά, με την επιφάνεια εγγύτερα της βάσης της καρδιάς προς τα πάνω. Με αυτόν τον τρόπο εξασφαλιζόταν η ύπαρξη ιστολογικών τομών περιπού ανά 200 μm. Σε συνεργασία με το Εργαστήριο Παθολογοανατομίας του ΓΝΑ «Ευαγγελισμός», τα ιστοτεμαχία ακολουθούσαν επεξεργασία για παραγωγή κύβων παραφίνης, επίστρωση σε πλακίδιο για ιστολογική εξέταση και χρώση με διάλυμα Αιματοξυλίνης-Ιωσίνης ή τριχρωμία Masson's (για την εκτίμηση της ίνωσης-ύπαρξη κολλαγόνου). Τα χρωσμένα πλακάκια (τελική μορφή) φωτογραφήθηκαν σε ειδικό

παθολογοανατομικό scanner (διαθέσιμο στο Εργαστήριο Μικροσκοπίας του Ιδρύματος Ιατρικών Ερευνών) και ακολούθησε υπολογισμός της έκτασης της ίνωσης με το πρόγραμμα Image J. Η ίνωση υπολογίστηκε ως ποσοστό της συνολικής έκτασης του μυοκαρδίου.



Εικόνα 20.

Αντιπροσωπευτική μικροσκοπική απεικόνιση της έκτασης της ίνωσης. Χρώση με τριχρωμία Masson. Τα 5 ιστοτεμαχίδια αντιστοιχούν σε τομές της καρδιάς κατά το βραχύ άξονα από την κορυφή έως περιφερικότερα της απολίνωσης. Με μωβ χρώμα απεικονίζεται η περιοχή της ίνωσης.

11. Στατιστική Ανάλυση

Η σύγκριση μεταξύ των χαρακτηριστικών των πειραματικών ομάδων έγινε με τη δοκιμασία unpaired student's t-test. Δηλαδή η ομάδα παρέμβασης συγκρίθηκε με την ομάδα ελέγχου (τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού ή καρδιακών προγονικών κυττάρων με την ομάδα ελέγχου). Για το χρόνιο πειραματικό πρωτόκολλο, συγκεκριμένα για τις συγκρίσεις μεταξύ της ίδιας ομάδας πειραματοζώων, χρησιμοποιήθηκε το paired student's t-test. Όλες οι αναλύσεις των εικόνων ως προς τον προσδιορισμό της έκτασης του φαινομένου μη επαναρροής, της υπό κίνδυνο περιοχής, της έκτασης του εμφράγματος, της έκτασης της ίνωσης και οι υπερηχογραφικές μελέτες-αναλύσεις, έγιναν χωρίς να είναι γνωστή η ταυτότητα του πειραματοζώου (blinded), δηλαδή η ομάδα τυχαιοποίησής του.

Γ. Αποτελέσματα

1. Ανάπτυξη καρδιακών προγονικών κυττάρων

Ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράψαμε προηγουμένως: Εντός 2 εβδομάδων από την ημέρα των βιοψιών, συλλέχθηκαν καρδιακά προγονικά κύτταρα (harvest 1), τα οποία αφού μετρήθηκαν (συνήθως 100.000 έως 500.000 κύτταρα συλλεγόντουσαν από κάθε δισκίο petri), μεταφέρθηκαν σε δίσκους με 12 wells (~10.000 κύτταρα ανά well). Στις βιοψίες τοποθετούνταν ξανά θρεπτικό υλικό και καρδιακά προγονικά κύτταρα συλλέχθηκαν συνολικά περίπου άλλες 3 φορές (harvest 2, harvest 3, harvest 4 αντίστοιχα). Έπειτα από 5-7 ημέρες από την ημέρα που τα καρδιακά προγονικά κύτταρα μεταφέρονταν στα wells, ξεκίνησαν να σχηματίζονται καρδιόσφαιρες, οι οποίες περίπου στις 10 ημέρες, οπότε και σταμάτησαν να αυξάνουν σε μέγεθος, συλλέχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε flasks T25 μεγέθους (Harvest 1, Passage 1 κύτταρα). Ακολούθησε σταδιακή ανάπτυξη κυττάρων προερχόμενων από καρδιόσφαιρες και αραίωση των κυττάρων όταν η μονοστιβάδα της κυτταροκαλλιέργειας κάλυπτε $\geq 80\%$ της επιφάνειας του flask, με θρυψινισμό και μεταφορά τους σε flasks T75 (harvest 1, passage 2) και τελικά T125 (harvest 1, passage 3). Αδρά θα λέγαμε ότι τα κύτταρα από 1 γεμάτο (confluent) flask μοιραζόντουσαν σε 3 flasks μεγαλύτερου μεγέθους. Τα βήματα αυτά επαναλήφθηκαν για όλα τα harvests. Τα CDCs που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα ήταν harvest 1, 2, ή 3 και passage 2-4. Ανάλογα με τον αριθμό των CDCs, αυτά που περίσσευαν καταψύχονταν με τον τρόπο που προαναφέραμε στις μεθόδους και φυλασσονταν στους -80°C . Όταν κρινόταν απαραίτητο, 2-3 erpendorf σωληνάρια που περιείχαν από 1.000.000 CDCs το καθένα ξεπαγωνόντουσαν γρήγορα σε ζεστό υδατόλουτρο, ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 1000 rcf για 3 λεπτά, το

υπερκείμενο διάλυμα πετούνταν, ενώ το ίζημα (=CDCs) ανασυστηνόταν σε 1 ml θρεπτικού υλικού και τοποθετούνταν σε flask T25 με συμπλήρωση 6 ml θρεπτικού υλικού. Τα κύτταρα αυτά διατηρούσαν τον αριθμό harvest που είχαν, αλλά αυξανόταν κατά 1 το passage τους.

Να σημειωθεί ότι η αλλαγή θρεπτικού υλικού στις βιοψίες γινόταν κάθε 3 ημέρες και στα T25, T75, T125 παρ'ημέρα. Η όλη διαδικασία γινόταν μέσα σε κλωβό ασφαλείας (hood). Συγκεκριμένα, αναρροφόταν το θρεπτικό υλικό που υπήρχε μέσα στα flasks (ή petri δισκία) και στη συνέχεια τοποθετούνταν PBS (διάλυμα ισότονο του εξωκυττάριου υγρού, σαν «φυσιολογικός ορός») ώστε να απομακρυνθούν εκκρίματα/μεταβολίτες από την κυτταροκαλλιέργεια. Στη συνέχεια τοποθετούνταν ξανά φρέσκο θρεπτικό υλικό, σε ποσότητα ανάλογα του δισκίου (από 6 έως 12 ml). Συγκεκριμένα στις καρδιόσφαιρες δεν αφαιρούνταν το θρεπτικό υλικό για αλλαγή, αλλά προστίθετο ανά 3 ημέρες 1-1.5ml φρέσκου θρεπτικού υλικού. Όλα τα υγρά που ερχόντουσαν σε επαφή με την κυτταροκαλλιέργεια ήταν στους 37C.

Στην εικόνα 14 διακρίνονται τα διάφορα στάδια κυτταροκαλλιέργειας.

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, η ανωτέρω διαδικασία πραγματοποιήθηκε με βιοψίες από 2 διαφορετικούς Wistar Kyoto μύες. Μια φορά για τη διενέργεια των οξέων πειραμάτων και μια δεύτερη φορά για τη διενέργεια των χρονίων πειραμάτων. Ο λόγος ήταν ότι μεταξύ των οξέων και χρονίων πειραμάτων, βλάβη στον καταψύκτη φύλαξης των κυττάρων είχε ως συνέπεια το θάνατο των φυλασσόμενων κυττάρων, οπότε η διαδικασία έπρεπε να επαναληφθεί.

2. Παρασκευή τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού

Σε flasks T125 confluent με CDCs (harvest 2, passage 3) τοποθετήθηκε θρεπτικό υλικό (~13ml ανά flask) χωρίς βόιο ορό. Η κυτταροκαλλιέργεια έμεινε σε επώαση για 48 ώρες, οπότε το θρεπτικό υλικό που πλέον

περιείχε και εκκρίσεις από τα CDCs συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε όπως περιγράφεται στις μεθόδους. Αυτό επαναλήφθηκε 2 φορές, για τα οξέα και χρόνια πειράματα αντίστοιχα. Χρησιμοποιήσαμε θρεπτικό υλικό από 6 flasks T125. Κάθε στήλη συμπύκνωσης είχε χωρητικότητα 13 ml, από τα οποία τελικώς προέκυπτε συμπυκνωμένο διάλυμα όγκου περίπου 300 μl. Ανά 200 μl το τροποποιημένο media αποθηκευόταν σε erpendorfs τα οποία φυλάσσονταν στους -80C.

3. Οξέα πειράματα

3.1 Θνητότητα

Τριάντα οκτώ αρουραίοι (20 Wistar και 18 Wistar Kyoto) χρησιμοποιήθηκαν στο σκέλος του οξέος πειράματος. Οκτώ πειραματόζωα κατέληξαν πριν την τυχαιοποίηση κατά τις παρασκευές (χειρουργική παρασκευή αορτής και κάτω κοίλης φλέβας, αιμορραγία) ή κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας (καρδιογενής καταπληξία). Έξι Wistar Kyoto αρουραίοι δεν τυχαιοποιήθηκαν, αλλά εντάχθηκαν στην ομάδα των κυττάρων, ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια την ενδοστεφανιαίας χορήγησης με PCR. Τέσσερις ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο στην ομάδα των κυττάρων και συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση της εμφύτευσης των κυττάρων. Εν συνεχεία, είκοσι τέσσερα πειραματόζωα (15 Wistar και 9 Wistar Kyoto), τυχαιοποιήθηκαν: α) οκτώ στην ομάδα ελέγχου, από τους οποίους οι δύο κατέληξαν κατά την επαναιμάτωση και ένας ενώ ολοκλήρωσε το πρωτόκολλο, δεν μπορούσαν να αξιολογηθούν οι μετρήσεις (αστοχία στις χρώσεις). Β) επτά στην ομάδα τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού, από τους οποίους ένας κατέληξε κατά την επαναιμάτωση, και ένας ολοκλήρωσε το πρωτόκολλο, δεν μπορούσαν να αξιολογηθούν οι μετρήσεις (αστοχία στις χρώσεις). Γ) εννιά (Wistar Kyoto) στην ομάδα των κυττάρων, από τους οποίους ο ένας κατέληξε κατά την επαναιμάτωση, και δύο ενώ ολοκλήρωσαν το

πρωτόκολλο, δεν μπορούσαν να αξιολογηθούν οι μετρήσεις (αστοχία στις χρώσεις). Οι δέκα από τους Wistar αρουραίους (5 ομάδα ελέγχου και 5 από την ομάδα του τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού) ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο και συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Έξι Wistar Kyoto αρουραίοι από την ομάδα των κυττάρων ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο και συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση. Δηλαδή πρόκειται για ολική θνητότητα, για την οποία κυρίως ευθυνόντουσαν είτε οι τεχνικά δύσκολες παρασκευές είτε η ίδια η πρόκληση εμφράγματος (θάνατος από καρδιογενή καταπληξία).

3.2 Οξύ πειραματικό πρωτόκολλο

Θα περιγράψουμε τη χειρουργική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα οξέα πειράματα, ανεξαρτήτως ομάδος τυχαιοποίησης.

Το πειραματόζωο ζύγιζε 250-300 γραμμάρια. Έγινε εισαγωγή στην αναισθησία και διασωλήνωση της τραχείας με τη χρήση φλεβοκαθετήρα 22G. Η διατήρηση της αναισθησίας έγινε με συνεχή ενδοτραχειακή χορήγηση διαλύματος ισοφλουρανίου 2% με τη βοήθεια αναπνευστήρα. Στη συνέχεια έγινε αποτρίχωση της πρόσθιας θωρακικής χώρας και αριστερή πλάγια θωρακοτομή στο ύψος του δευτέρου μεσοπλευρίου διαστήματος. Τοποθετήθηκε στερνοδιαστολέας, αφαιρέθηκε ο θύμος αδένας και διανοίχθηκε το περικάρδιο. Παρασκευάστηκε η πνευμονική αρτηρία, η ανιούσα αορτή και η κάτω κοίλη φλέβα και τοποθετήθηκε απολίνωση Silk 2.0 γύρω από την αορτή και την κάτω κοίλη φλέβα. Έγινε ενδοκοιλιακή έγχυση διαλύματος 50μL ηπαρίνης 15% (100U/kg) και αποκλεισμός στη μεσότητα της πρόσθιας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας της καρδιάς με τη χρήση ράμματος Prolene 6.0 διάρκειας 45 λεπτών. Προ της επανααιμάτωσης του μυοκαρδίου τα πειραματόζωα τυχαιοποιούνταν (με εξαίρεση τα πρώτα πειράματα, στα οποία όπως προαναφέραμε χορηγήθηκαν κύτταρα ώστε να εκτιμηθεί η

αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης). Ακολουθούσε παροδικός αποκλεισμός της ροής του αίματος στην κάτω κοίλη φλέβα και την ανιούσα αορτή και χορήγηση ενδοκοιλοτικά 200μL διαλύματος εικονικού φαρμάκου ή τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού ή καρδιακών προγονικών κυττάρων (CDCs) ανάλογα με την ομάδα τυχαίποησης. Έγινε άρση της απολίνωσης της προσθίας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας και μαλάξεις της καρδιάς διάρκειας 20 δευτερολέπτων για την προώθηση του χορηγηθέντος διαλύματος προς τη στεφανιαία κυκλοφορία. Εν συνεχεία έγινε άρση του αποκλεισμού της ανιούσας αορτής και της κάτω κοίλης φλέβας. Μετά από μία ώρα επαναιμάτωσης έγινε έγχυση μέσω καθετηριασμού της κάτω κοίλης φλέβας διαλύματος 1% θειοφλαβίνης (500μL) και μετά από απολίνωση της προσθίας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας έγινε έγχυση ενδοκοιλοτικά διαλύματος 1% ιώδους της γεντιανής (500μL). Το πειραματόζωο θανατώθηκε και η καρδιά αφαιρέθηκε. Απομονώθηκε η αριστερή κοιλία, η οποία τεμαχίστηκε σε εγκάρσιες τομές πάχους 2 χιλιοστών. Τα ιστοτεμάχια ζυγίστηκαν και φωτογραφίστηκαν υπό το φυσιολογικό φως και υπό λαμπτήρα υπεριώδους ακτονοβολίας. Υπολογίστηκε η μάζα της υπό κινδύνου περιοχής ως ποσοστό επί της μάζας της αριστερής κοιλίας και η μάζα του φαινομένου μη επαναρροής ως ποσοστό της μάζας της αριστερής κοιλίας. Στην ομάδα των πειραματοζώων που εξ'αρχής εντάχθηκαν στην ομάδα των κυττάρων για τον υπολογισμό της κυτταρικής εμφύτευσης, δεν ακολουθήθηκε πρωτόκολλο χρώσεων, αλλά μετά τη 1 ώρα επαναιμάτωσης η καρδιά αφαιρέθηκε, ζυγίστηκε τεμαχίστηκε και καταψύχθηκε, ώστε με την ολοκλήρωση της συλλογής να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση DNA και την PCR.

3.2.1. Αποτελεσματικότητα ενδοστεφανιαίας χορήγησης

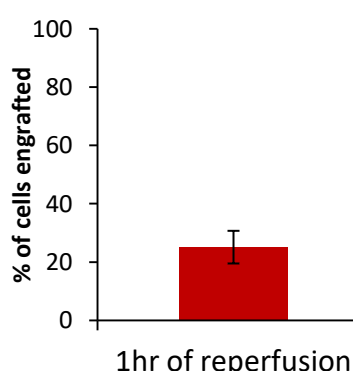
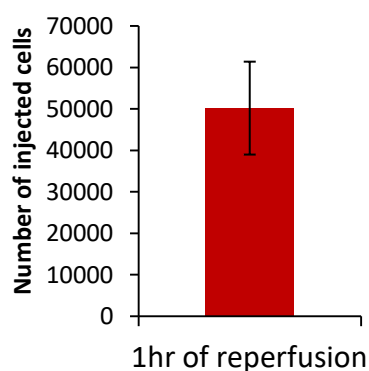
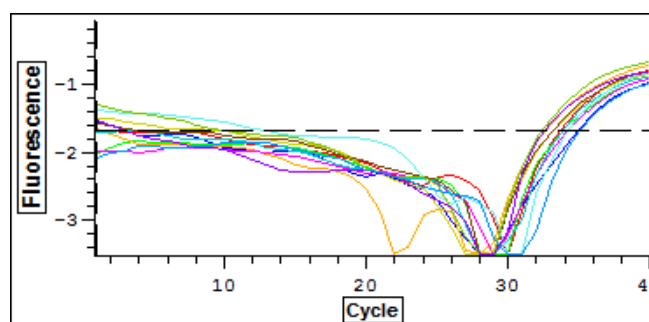
Όπως αναφέραμε στη μεθοδολογία, για την αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης έγινε ποσοτικοποίηση των κυττάρων που χορηγήθηκαν στο μυοκάρδιο στο τέλος του οξέως πειράματος, δηλαδή μετά από 1 ώρα επαναιμάτωσης. Ακολουθήθηκε το χειρουργικό πρωτόκολλο που μόλις περιγράφηκε και στο τέλος του πρωτοκόλλου οι καρδιές από τέσσερα πειραματόζωα συλλέχθηκαν και εντάχθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα. Επιπλέον, απαραίτητα ήταν η συλλογή ιστού από έναν άρρενα Wistar Kyoto αρουραίο και έναν θηλυκό Wistar Kyoto αρουραίο.

Ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που περιγράφεται λεπτομερώς στις μεθόδους. Συνολικά απομονώθηκε DNA από 6 δείγματα. Το DNA από τον αρσενικό Wistar Kyoto αρουραίο χρειάστηκε για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης στην RT-qPCR. Το DNA από τον θηλυκό Wistar Kyoto αρουραίο χρειάστηκε ώστε να γίνονται οι αραιώσεις του αρσενικού DNA στη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Με αυτόν τον τρόπο προσομοιώθηκε καλύτερα η κατάσταση στον ιστό του πειραματόζωου όπου αρσενικό DNA (των κυττάρων) ήταν «αραιωμένο» στο DNA του θηλυκού πειραματόζωου (μυοκάρδιο). Στον πίνακα 5 αναγράφεται λεπτομερώς η συγκέντρωση DNA, τα αντίγραφα κυττάρων (CDCs) και το ποσοστό κυτταρικής εμφύτευσης ανά πειραματόζωο. Συγκεκριμένα η μέση τιμή αντιγράφων στα 4 δείγματα ανήλθε σε 50.204 αντίγραφα (που αντιστοιχεί σε ίσο αριθμό CDCs καθώς το γονίδιο SRY του χρωμοσώματος Y είναι ένα ανά κύτταρο), που αντιστοιχεί σε ποσοστό 25% (πίνακας 5, Εικόνα 21).

Πίνακας 5. Σύγκέντρωση DNA και αποτελέσματα εμφύτευσης CDCs σε κάθε δείγμα από μυοκαρδιακό ιστό.

Πειραματόζωο	Συγκέντρωση DNA (ng/ml)	Αντίγραφα CDCs ανά πειραματόζωο	Ποσοστό εμφύτευσης CDCs (%)*
1	135,2	45.704	22,85
2	54,4	49.454	24,73
3	132,4	39.746	19,87
4	80,8	65.913	32,96
Μέσος όρος		50.204	25
T. A		11.209	5,7

(*) το ποσοστό εμφύτευσης CDCs υπολογίστηκε με εκτίμηση του αριθμού κυτταρικών αντιγράφων συγκριτικά με την αρχική χορήγηση 200.000 CDCs (=200.000 αντίγραφα).



Εικόνα 21: Αποτελέσματα κυτταρικής εμφύτευσης στη μία ώρα από την επαναϊμάτωση. Στην πάνω εικόνα αποτυπώνονται τα αντίγραφα του SRY γονιδίου που ανιχνεύθηκαν στο τέλος της PCR. Συνολικά 200.000 CDCs χορηγήθηκαν ενδοστεφανιαία στην αρχή της επαναϊμάτωσης. Αφού έγινε αντιστοιχία των αντιγράφων σε αριθμό κυττάρων, προέκυψε ότι περίπου 50.000 κύτταρα εμφυτεύθηκαν στο μυοκάρδιο στη μία ώρα μετά την επαναϊμάτωση, που αντιστοιχεί σε ποσοστό ~25% επί του συνόλου.

3.2.2 Έκταση εμφράγματος και περιοχής βλάβης της μικροκυκλοφορίας

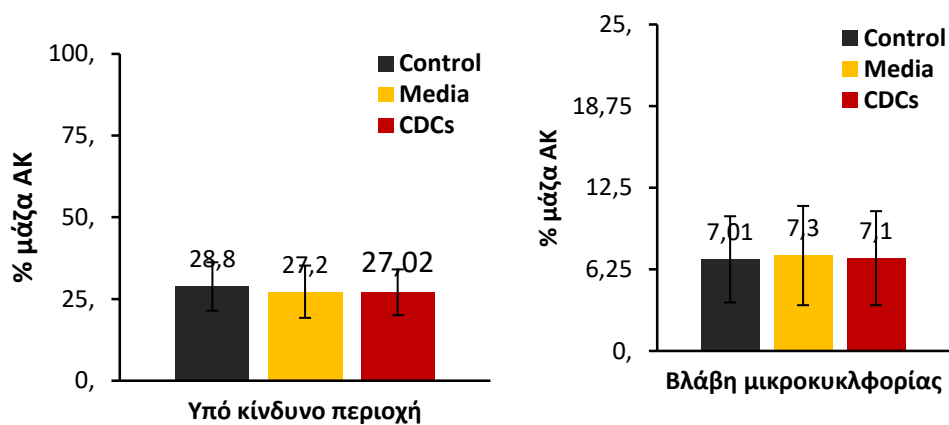
Τα αποτελέσματα της πλανημέτρησης ανά πειραματόζωο αναγράφονται στον Πίνακα 6 και στο σύνολό τους στην Εικόνα 22. Η υπό κίνδυνο περιοχή της αριστερής κοιλίας, εκφραζόμενη ως ποσοστό της μάζας αυτής, δε διέφερε μεταξύ των τριών ομάδων ($28,78 \pm 7,37\%$ έναντι $27,23 \pm 6,95\%$ έναντι $27,02 \pm 6,76$ για ομάδα ελέγχου έναντι ομάδα media έναντι ομάδα CDCs, αντίστοιχα; $p>0.05$). Η έκταση του φαινομένου μη επαναρροής, εκφραζόμενη ως ποσοστό της μάζας της αριστερής κοιλίας ήταν επίσης παρόμοια μεταξύ των ομάδων ($7,018 \pm 3,31\%$ έναντι $7,33 \pm 3,76\%$ έναντι $7,09 \pm 3,61\%$, για ομάδα ελέγχου έναντι ομάδα media έναντι ομάδα CDCs, αντίστοιχα; $p>0.05$) [Πίνακας 6, Εικόνα 17]. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η ενδοστεφανιαία χορήγηση των CDCs στην οξεία φάση του εμφράγματος είναι ασφαλής και δεν επιδεινώνει την απόφραξη της μικροκυκλοφορίας, σε συμφωνία με αποτελέσματα άλλων ερευνητών(178). Επιπλέον , σε αυτό το μοντέλο οξέως πειράματος δεν φάνηκε τα CDCs ή η χορήγηση CM να έχουν καρδιοπροστατευτική δράση, καθώς η έκταση του no reflow ήταν παρόμοια με την ομάδα ελέγχου.

Πίνακας 6. Αποτελέσματα πλανημέτρησης στα πειραματόζωα των 3 ομάδων θεραπείας

ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑ-ΤΟΖΩΟΥ	ΕΚΤΑΣΗ ΥΠΟ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΠΕΡΙΟΧΗΣ (%)*			ΕΚΤΑΣΗ ΦΑΙΝΟΜΕΝΟΥ ΜΗ ΕΠΑΝΑΡΡΟΗΣ (%)*		
	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟ Υ	ΟΜΑΔΑ MEDIA	ΟΜΑΔΑ CDCs	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟ Υ	ΟΜΑΔΑ MEDIA	ΟΜΑΔΑ CDCs
1	38,25	30,68	21,23	10,27	6,15	4,41
2	27,28	15,85	33,54	2,61	3,28	10,08

3	24,3	34,46	35,2	5,15	13,5	12,05
4	20,01	27,31	21,67	6,83	6,64	4,95
5	34,07	27,89	20,21	10,23	7,07	2,8
6			30,28			8,22
Μ. ΟΡΟΣ* ²	28,78	27,23	27,02	7,018	7,33	7,09
Τ.Α* ³	7,37	6,95	6,76	3,31	3,76	3,61

(*¹) τα ποσοστά είναι επί της μάζας της αριστερής κοιλίας. (*²) Μ. ΟΡΟΣ, μέσος όρος; (*³) Τ.Α, τυπική απόκλιση;



Εικόνα 22. Συγκριτική απεικόνιση της έκτασης της υπο κινδύνου περιοχής και της περιοχής βλάβης της μικροκυκλοφορίας στις τρεις ομάδες θεραπείας ως ποσοστό της μάζας του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας (ΑΚ). Δε σημειώθηκε διαφορά μεταξύ των ομάδων.

4. Χρόνιο πειραματικό πρωτόκολλο

4.1 Θνητότητα

Σαράντα πέντε αρουραίοι (37 Wistar και 8 Wistar Kyoto) χρησιμοποιήθηκαν στο σκέλος του χρονίου πειράματος. Πέντε πειραματόζωα κατέληξαν πριν την τυχαιοποίηση κατά τις παρασκευές (χειρουργική παρασκευή αορτής και κάτω κοίλης φλέβας, αιμορραγία) ή κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας (καρδιογενής καταπληξία). Δεκαεπτά πειραματόζωα εντάχθηκαν στην ομάδα ελέγχου. Επτά κατέληξαν είτε κατά την επαναιμάτωση (3) είτε τις πρώτες ημέρες μετά την παρέμβαση (4). Δεκάξι πειραματόζωα (Wistar) εντάχθηκαν στην ομάδα CM, από τα οποία έξι κατέληξαν είτε κατά την επαναιμάτωση (3) είτε τις πρώτες ημέρες μετά την παρέμβαση (3). Επτά Wistar Kyoto εντάχθηκαν στην ομάδα CDCs, από τα οποία δύο κατέληξαν τις πρώτες ημέρες μετά την παρέμβαση. Τελικώς 5 πειραματόζωα από κάθε ένα από τις 3 ομάδες χρησιμοποιήθηκαν στα χρόνια πειράματα της 1 εβδομάδος. Πέντε πειραματόζωα από την ομάδα ελέγχου και πέντε από την ομάδα CM παρακολουθήθηκαν υπερηχοκαρδιογραφικά για ένα και δύο μήνες.

4.2 Χρόνιο πειραματικό πρωτόκολλο στη 1 εβδομάδα

Ακολουθήθηκε το χειρουργικό πρωτόκολλο που περιγράφεται.

Το πειραματόζωο ζύγιζε 250-300 γραμμάρια. Έγινε εισαγωγή στην αναισθησία και διασωλήνωση της τραχείας με τη χρήση φλεβοκαθετήρα 22G. Η διατήρηση της αναισθησίας έγινε με συνεχή ενδοτραχειακή χορήγηση διαλύματος ισοφλουρανίου 2% με τη βοήθεια αναπνευστήρα. Στη συνέχεια έγινε αποτρίχωση της πρόσθιας θωρακικής χώρας και αριστερή πλάγια θωρακοτομή στο ύψος του δευτέρου μεσοπλευρίου διαστήματος. Τοποθετήθηκε στερνοδιαστολέας, αφαιρέθηκε ο θύμος αδένας και διανοίχθηκε το περικάρδιο. Παρασκευάστηκε η πνευμονική αρτηρία, η ανιούσα αορτή και η κάτω κοίλη φλέβα και τοποθετήθηκε

απολίνωση Silk 2.0 γύρω από την αορτή και την κάτω κοίλη φλέβα. Έγινε ενδοκοιλιακή έγχυση διαλύματος 50μL ηπαρίνης 15% (100U/kg) και αποκλεισμός στη μεσότητα της πρόσθιας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας της καρδιάς με τη χρήση ράμματος Prolene 6.0 διάρκειας 45 λεπτών. Προ της επαναιμάτωσης του μυοκαρδίου τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν στις 3 ομάδες. Ακολούθησε παροδικός αποκλεισμός της ροής του αίματος στην κάτω κοίλη φλέβα και την ανιούσα αορτή και χορήγηση ενδοκοιλιακά 200μL διαλύματος εικονικού φαρμάκου ή τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού ή καρδιακών προγονικών κυττάρων (CDCs) ανάλογα με την ομάδα τυχαιοποίησης. Έγινε άρση της απολίνωσης της προσθίας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας και μαλάξεις της καρδιάς διάρκειας 20 δευτερολέπτων για την προώθηση του χορηγηθέντος διαλύματος προς τη στεφανιαία κυκλοφορία. Εν συνεχεία έγινε άρση του αποκλεισμού της ανιούσας αορτής και της κάτω κοίλης φλέβας. Εφόσον το πειραματόζωο ήταν σταθερό αιμοδυναμικά, ακολούθησε σύγκλιση του θωρακικού κλωβού με ράμμα Silk 2.0 και στη συνέχεια συραφή του δέρματος με το ίδιο ράμμα. Αναλγησία με μιλοξικάμη χορηγούνταν υποδορίως και το πειραματόζωο ανέμιπτε. Στη συνέχεια μεταφερόταν στο χώρο φύλαξης. Στη μία εβδομάδα τα πειραματόζωα διασωληνώνονταν εκ νέου και ακολουθούσε διάνοιξη του θωρακικού κλωβού με ψαλίδι, χορήγηση διαλείματος KCl περιεκτικότητας 10%, ώστε να γίνει σύλληψη της καρδιάς στη φάση της διαστολής και αφαίρεση της καρδιάς. Αφού ξεπλενόταν με φυσιολογικό ορό (για να απομακρυνθεί το αίμα) τοποθετούνταν σε δοχείο με διάλυμα φορμόλης περιεκτικότητας 10%. Για να είναι πιο αντιπροσωπευτική η εκτίμηση της έκτασης του εμφράγματος, η καρδιά τεμνόταν ανά 2mm και τα ιστοτεμαχίδια τοποθετούνταν με την εγγύτερη πλευρά τους ως προς την απολίνωση της πρόκλησης του εμφράγματος προς τα κάτω. Τοποθετήθηκαν ανά πέντε στην ίδια ιστοπαγίδα. Συνήθως τα 4 τεμαχίδια ήταν περιφερικότερα της απολίνωσης και το 5^ο ήταν κεντρικότερα της

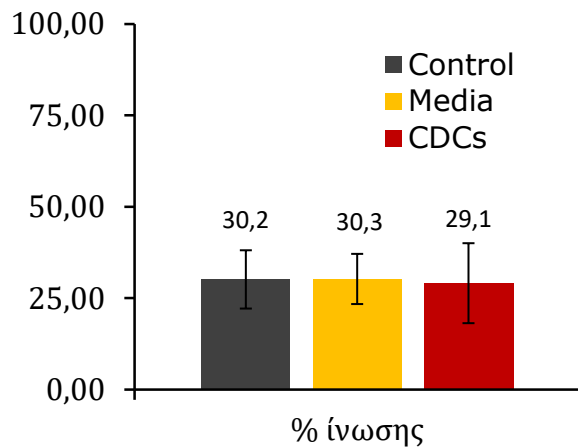
απολίνωσης. Δημιουργήθηκαν κύβοι παραφίνης και στη συνέχεια έγιναν χρώσεις με Αιματοξυλίνη/Ηωσίνη και τριχρωμία Masson. Παρατίθεται αντιπροσωπευτική εικόνα, όπως είναι ορατή με το οπτικό μικροσκόπιο. Υπολογίσθηκε η έκταση της ίνωσης.

Συνολικά η έκταση της ίνωσης (ουλής) υπολογίσθηκε σε $30,14 \pm 7,97\%$ επί του συνόλου της έκτασης της αριστερής κοιλίας στην ομάδα ελέγχου, σε $35,03 \pm 14,47\%$ στην ομάδα τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού και σε $29,11 \pm 10,94\%$ στην ομάδα χορήγησης CDCs (Εικόνα 23). Το αποτέλεσμα αυτό δε διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των ομάδων ($p>0.05$). Στον πίνακα 7 που ακολουθεί περιγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα ανά πειραματόζωο.

Πίνακας 7. Παθολογοανατομική έκταση ίνωσης στη 1 εβδομάδα

Πειραματόζωο	Ομάδα ελέγχου (%)	Ομάδα media (%)	Ομάδα CDCs (%)
1	23,11	26,20	45,09
2	40,45	33,09	17,83
3	22,06	30,35	35,17
4	29,24	21,80	22,91
5	35,84	39,87	24,54
Μ. Όρος	30,14	30,26	29,11
Τ. Απόκλειση	7,97	6,9	10,94

(%) ίνωσης ως επιφάνεια επί του συνόλου της τομής της καρδιάς κατά το βραχύ άξονα



Εικόνα 23. Η έκταση της ίνωσης στη 1 εβδομάδα, εκφραζόμενη ως % επιφανείας επί του συνόλου της τομής της καρδιάς κατά το βραχύ άξονα

4.3 Χρόνιο πείραμα στον 1 και 2 μήνες

Υπερηχοκαρδιογραφική μελέτη

Οι υπερηχογραφικές μετρήσεις στη μελέτη του 1 μήνα για κάθε πειραματόζωο στις δύο ομάδες θεραπείας απεικονίζονται στον πίνακα 8 και τα αποτελέσματα στο σύνολό τους περιγράφονται στην Εικόνα 24.

Πίνακας 8. Αποτελέσματα υπερηχοκαρδιογραφικής μελέτης στον 1 μήνα

ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΟΥ	ΤΕΛΟΔΙΑΣΤΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (μl)		ΤΕΛΟΣΥΣΤΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (ml)		ΚΛΑΣΜΑ ΕΞΩΘΗΣΕΩΣ (%)	
	Control	CM	Control	CM	Control	CM
1	80	140	20	40	74,8	73
2	100	130	30	30	74,6	77,2
3	230	130	20	70	90,8	46,2
4	220	200	50	50	78,9	76,2
5	200	190	70	50	64,8	71

Οι τελοδιαστολικοί (ΤΔΟ) και τελοσυστολικοί όγκοι (ΤΣΟ) ήταν συγκρίσιμοι μεταξύ των δύο ομάδων στον 1 μήνα μετά το OEM (ΤΔΟ: ομάδα CM: 158 ± 34 μl έναντι ομάδα ελέγχου: 166 ± 71 μl, $p=0,82$ - ΤΣΟ: ομάδα CM: 48 ± 15 μl έναντι ομάδα ελέγχου: 38 ± 22 μl, $p=0,42$). Επιπλέον η συσπαστικότητα της αριστερής κοιλίας, όπως αυτή μετράται με το κλάσμα εξώθησης δε διέφερε μεταξύ των δύο ομάδων (ομάδα CM: $68,7 \pm 12,9\%$ έναντι ομάδας ελέγχου: $76,8 \pm 9,4\%$, $p=0,29$).

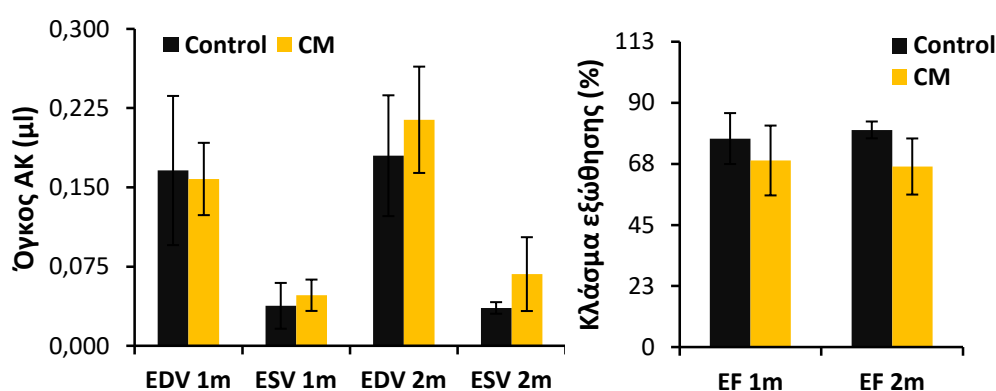
Οι υπερηχογραφικές μετρήσεις στη μελέτη των 2 μηνών για κάθε ζώο στις δύο ομάδες θεραπείας απεικονίζονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Αποτελέσματα υπερηχοκαρδιογραφικής μελέτης στους 2 μήνες

ΑΡΙΘΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟ - ΖΩΟΥ	ΤΕΛΟΔΙΑΣΤΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (μl)		ΤΕΛΟΣΥΣΤΟΛΙΚΟΣ ΟΓΚΟΣ (ml)		ΚΛΑΣΜΑ ΕΞΩΘΗΣΕΩΣ (%)	
	Control	CM	Control	CM	Control	CM
1	110	180	30	50	77,24	70,6
2	180	170	30	50	82,1	54,8
3	180	290	40	130	--	--
4	250	240	40	60	83,2	--
5	180	190	40	50	77,4	74,2

Στους 2 μήνες μετά το OEM, δε σημειώθηκε διαφορά μεταξύ των μετρήσεων τελοδιαστολικού όγκου αριστεράς κοιλίας και τελοσυστολικού όγκου αριστερής κοιλίας (ΤΔΟ: ομάδα CM: 214 ± 50 μl έναντι ομάδας ελέγχου: 180 ± 57 μl, ΤΣΟ: ομάδα CM: 68 ± 35 μl έναντι

ομάδας ελέγχου: $36 \pm 5 \mu\text{l}$, $p > 0,05$). Επιπλέον, δε σημειώθηκε διαφορά ως προς το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας ανάμεσα στις 2 ομάδες (ομάδα CM: $79,96 \pm 3,1\%$ έναντι ομάδας ελέγχου: $66,5 \pm 10,3\%$, $p > 0,05$). Επίσης σύγκριση μεταξύ των πειραματοζώων της ίδιας ομάδας στον 1 και 2 μήνες δεν ανέδειξε σημαντική μεταβολή. Τα αποτελέσματα του χρόνιου πειράματος υποδηλώνουν ότι η χορήγηση CM δεν είχε καρδιοπροστατευτική δράση όταν χορηγήθηκε στην αρχή της επαναϊμάτωσης.



Εικόνα 24: Οι τελοδιαστολικοί (EDV) και τελοσυστολικοί όγκοι (ESV) της αριστερής κοιλίας, καθώς και το κλάσμα εξώθησης (EF) δε διέφερε μεταξύ των ομάδων στον 1 και 2 μήνες ($p > 0,05$). 1m= 1 μήνας, 2m= 2 μήνες, CM= conditioned media.

Δ. Συζήτηση

Η καρδιακή αναγέννηση είναι στο επίκεντρο για σχεδόν 20 χρόνια. Διάφορες μέθοδοι χορήγησης των προγονικών κυττάρων στην καρδιά, διαφορετική χρονική στιγμή χορήγησης και αριθμός κυττάρων έχουν δοκιμασθεί (4). Στη μελέτη μας, εξετάσαμε τη χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων στην οξεία φάση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, στην αρχή της επαναιμάτωσης. Χρησιμοποιήσαμε τη μέθοδο της καθολικής ενδοστεφανιαίας χορήγησης, δηλαδή σε όλο το μυοκάρδιο και όχι μόνο στην ένοχη για το έμφραγμα αρτηρία. Δείξαμε ότι είναι ασφαλής και οδηγεί σε υψηλό ποσοστό κυτταρικής εμφύτευσης, χωρίς να επιδεινώνει τη βλάβη της μικροκυκλοφορίας (πέραν από αυτή που προκαλείται ως αποτέλεσμα της βλάβης από επαναιμάτωση). Η μέθοδος αυτή ενδοστεφανιαίας χορήγησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για οποιαδήποτε ενδοστεφανιαία χορήγηση, σε πειραματικό μοντέλο. Πράγματι έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία από την ερευνητική μας ομάδα και σε άλλα πρωτόκολλα (179, 180). Στη μελέτη μας η χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων ή τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού κατά την επαναιμάτωση δεν είχε καρδιοπροστατευτική δράση οξέως ή μακροχρονίως.

Παρά την πρόωμη επαναιμάτωση, η οποία αποτελεί τη θεραπεία επιλογής του οξέως εμφράγματος του μυοκαρδίου, στο 36% των ασθενών θα παρουσιασθεί καρδιακή ανεπάρκεια (181) και συνεπώς θα έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο για θάνατο (182). Στη μελέτη των ερευνητών Ganame et al σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε επαναιμάτωση, φάνηκε ότι το μέγεθος του εμφράγματος, όπως αυτό προσδιοριζόταν στη μαγνητική τομογραφία καρδιάς, προέβλεπε τη μακροχρόνια ανάστροφο αναδιαμορφωση (183). Ως αποτέλεσμα, οι αναγεννητικές θεραπείες που στοχεύουν είτε στη δημιουργία νέου καρδιακού μυός (regeneration, αναγέννηση) ή στην προστασία των υπάρχοντων καρδιομυοκυττάρων

από την απόπτωση (cardioprotection, καρδιοπροστασία), μπορούν να παρέμβουν ακριβώς σε αυτό τον μετισταμικό φαύλο κύκλο.

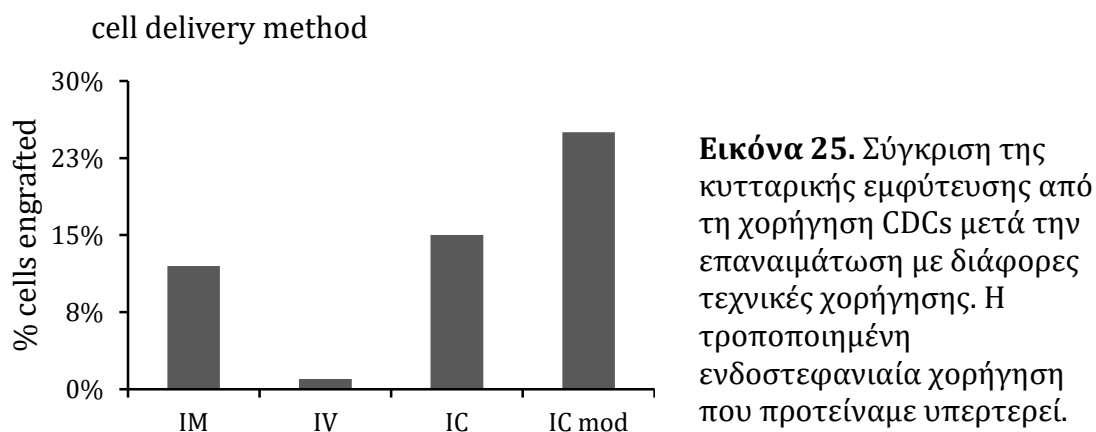
Μέχρι πρόσφατα, διάφορες κλινικές μελέτες έχουν διεξαχθεί και έχουν αποδείξει την ασφάλειά τους. Πολυάριθμες πειραματικές μελέτες, οι οποίες έχουν χρησιμοποιήσει προγονικά κύτταρα διαφορετικής προέλευσης (από το μυελό των οστών, τον ίδιο τον καρδιακό μυ, το περιφερικό αίμα, τα επαγόμενα πολυδύναμα κύτταρα, εμβυικά βλαστοκύτταρα) έχουν δείξει ότι τα προγονικά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να παρέμβουν στην ισχαιμική βλάβη μέσω παρακρινικής διέγερσης των ενδογενών μονοπατιών αναγέννησης και καρδιοπροστασίας (79).

Στη μελέτη μας, θέλαμε να εξετάσουμε την ασφάλεια της χορήγησης καρδιακών προγονικών κυττάρων (CDCs) ή τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού στην αρχή της επαναιμάτωσης. Η εκλεκτική ενδοστεφανιαία χορήγηση σε πειραματικό μοντέλου αρουραίου είναι τεχνικά αδύνατη. Γι'αυτό σχεδιάσαμε έναν έμμεσο τρόπο, μέσω έγχυσης στην αριστερή κοιλία, με ταυτόχρονη παροδική σύγκλειση της αορτής (μετά την έκφυση των στεφανιαίων αρτηριών) και της κάτω κοίλης φλέβας. Με τη σύγκλειση της αορτής εξασφαλίσαμε ότι το χορηγούμενο υγρό θα διαχυόταν μέσω των στεφανιαίων σε όλο το μυοκάρδιο (καθολική ενδοστεφανιαία χορήγηση). Με τη σύγκλειση της κάτω κοίλης φλέβας μειωνόταν το προφόρτιο της καρδιάς, το οποίο ήταν σημαντικό κατά τη διάρκεια που η καρδιά συστελόταν σε με κλειστή την αορτή. Με τον ακριβή υπολογισμό των κυττάρων που εμφυτεύθηκαν αποδείξαμε ότι η τεχνική μας ήταν αποτελεσματική ($25 \pm 5.7\%$ κυτταρική εμφύτευση μετά την επαναιμάτωση). Στη μελέτη του Bonios et al, δοκίμασαν διάφορους τρόπους χορήγησης CDCs (ενδομυοκαρδιακή, ενδοφλέβια και ενδοστεφανιαία) μία ώρα μετά την επαναιμάτωση σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και συνέκριναν το ποσοστό κυτταρικής εμφύτευσης (87). Η ενδοστεφανιαία χορήγηση ήταν η πιο αποτελεσματική. Στα δικά μας

πειράματα, η ενδοστεφανιαία χορήγηση οδήγησε σε μεγαλύτερο ποσοστό κυτταρικής εμφύτευσης (Εικόνα 25). Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην ταυτόχρονη σύγκλιση της αορτής και της κάτω κοίλης φλέβας, καθώς και στη συγχορήγηση με τα κύτταρα νιτρογλυκερίνης και ηπαρίνης, τα οποία προκαλούν αγγειοδιαστολή και αναστέλουν τη συσσώρευση και συγκόλληση των κυττάρων, βοηθώντας έτσι την καλύτερη διάχυσή τους στο μυοκάρδιο, χωρίς να αποφράσσουν τη μικροκυκλοφορία (184, 185). Αυτό υποστηρίζεται και από τα αποτελέσματα του no reflow, που δε διέφερε στην ομάδα των CDCs συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Ωστόσο σε μία πρόσφατη μελέτη από τους Bibli et al παρουσιάζονται πειραματικά δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν ότι η χορήγηση νιτρογλυκερίνης πριν την επαναιμάτωση μειώνει την έκταση του εμφράγματος (186). Αυτή η δράση αποδόθηκε στη διατήρηση της λειτουργίας των eNOS και της eNOS-εξαρτώμενης S-νιτροσυλίωσης της κυκλοφιλίνης D τα οποία τελικώς αναστέλουν τη νέκρωση του καρδιομυοκυττάρου. Στη μελέτη μας η δόση της χορηγούμενης νιτρογλυκερίνης ήταν αρκετά μικρότερη από τη δόση της μελέτης των Bibli et al, ωστόσο δεν μπορεί να αποκλεισθεί το ενδεχόμενο να επηρεάστηκε η έκταση του εμφράγματος ίσα σε όλες τις ομάδες των πειραματοζώων.

Η βλάβη από την επαναιμάτωση, που οδηγεί στο φαινόμενο no reflow, συμβαίνει τα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης, ενώ η στεφανιαία αρτηρία είναι βαθιά (115, 177). Η παθοφυσιολογία της όπως αναπτύξαμε στο γενικό μέρος της διατριβής είναι πολυπαραγοντική, και συμπεριλαμβάνει τη μηχανική απόφραξη των μικρών αγγείων λόγω ιστικού οιδήματος, τη δημιουργία μικροθρόμβων οι οποίοι αποφράσσουν τα μικρά αγγεία και την απελευθέρωση ελεύθερων ριζών οξυγόνου και φλεγμονοδών κυττοκινών από τον επαναιματωμένο ιστό (187, 188). Τα CDCs όπως εξηγήσαμε, είναι κυτταρικός πληθυσμός που έχει μελετηθεί

εκτενώς και έχει αποδοθεί η καρδιοπροστατευτική τους δράση στους παρακρινικούς παράγοντες που εκκρίνουν, όπως αυξητικοί παράγοντες,



(IM= ενδομυϊκά, IV= ενδοφλέβια, IC=ενδοστεφανιαία, IC mod=τροποποιημένη ενδοστεφανιαία χορήγηση). [Διάγραμμα βασισμένο στη δημοσίευση Bonios et al. J Nucl Cardiol. 2011;18(3):443-50]

εξωσώματα και miRNAs (189). Τα οφέλη της χορήγησής τους επιβεβαιώθηκαν και στην κλινική μελέτη φάσης I/II CADUCEUS, στην οποία η χορήγηση CDCs, ένα μήνα μετά το έμφραγμα, μείωσε την έκταση του εμφράγματος όπως αυτό εκτιμήθηκε με μαγνητική τομογραφία καρδιάς (50). Τα αποτελέσματα αυτά δεν αναπαράχθηκαν στη μελέτη φάσης II/III ALLSTAR, όπου αλλογενή CDCs χορηγήθηκαν 1 μήνα μετά από OEM στο οποίο είχε προηγηθεί επαναϊμάτωση (190). Έτσι η μελέτη διακόπηκε πρόωρα στον ένα χρόνο (191). Το αντικρουόμενο αυτό αποτέλεσμα αποδόθηκε κατά μέρος από τους ερευνητές στη μικρή έκταση των εμφραγμάτων (λόγω έγκαιρης επαναϊμάτωσης). Στη μελέτη των Kanazawa et al σε χοίρους, η χορήγηση CDCs 30 λεπτά μετά την επαναϊμάτωση μείωσε την έκταση του εμφράγματος και του no reflow φαινομένου όπως αυτό εκτιμήθηκε παρόμοια με τη δική μας μέθοδο (178). Στη μελέτη μας η χορήγηση CDCs στην αρχή της επαναϊμάτωσης δε μείωσε την έκταση του no reflow, αλλά ούτε στη μία εβδομάδα υπήρχε διαφορά ως προς την έκταση του εμφράγματος. Μία εξήγηση για αυτό θα

μπορούσε να είναι ο μικρός αριθμός των CDCs (200.000), ο οποίος δεν ήταν αρκετός για να ασκήσει βιολογικό αποτέλεσμα. Επιπλέον, ενδεχομένως το οξειδωτικό στρες τα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης να επιφέρει βλάβη στα CDCs και έτσι να χάνουν την αποτελεσματικότητά τους.

Επειδή στόχος μας ήταν να εκτιμήσουμε την καρδιοπροστασία από τη χορήγηση παρακρινικών παραγόντων (αλλά και λόγω των αρνητικών αποτελεσμάτων στο οξύ πείραμα και στη μία εβδομάδα), αποφασίσαμε να μην εντάξουμε την ομάδα των CDCs στα χρόνια πειράματα που εκτιμούσαμε την καρδιακή λειτουργία. Οι ερευνητές Timmers et al ανέφεραν σε δημοσίευσή τους ότι η χορήγηση καλλιεργητικού υλικού από μεσεγχυματικά προγονικά κύτταρα σε χοίρους που είχαν υποβληθεί σε έμφραγμα του μυοκαρδίου, οδήγησε σε διατήρηση της καρδιακής λειτουργίας και μείωση της έκτασης τους εμφράγματος όταν εκτιμήθηκε 3 εβδομάδες αργότερα (91). Στη μελέτη μας η χορήγηση τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού (CM) δεν οδήγησε σε βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας, παρότι τα CDCs υπερτερούν στην έκκριση παρακρινικών παραγόντων συγκριτικά με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς, όπως δείχθηκε στη μελέτη των Li et al(51). Μια εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι στο πρωτόκολλό μας χορηγήθηκε μόνο μια φορά CM, που πιθανόν δεν ήταν αρκετή για να επιφέρει μακροχρόνιο αποτέλεσμα. Οι Timmers et al στο πρωτόκολλό τους χορηγούσαν το καλλιεργητικό υλικό για 7 ημέρες (1 δόση ημερισίως) μετά το έμφραγμα. Μια άλλη αιτία που μακροχρονίως δε φάνηκε όφελος από τη χορήγηση CM θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι οι αρουραίοι που τελικά επιβίωσαν και ολοκλήρωσαν το πρωτόκολλο είχαν διατηρημένο κλάσμα εξώθησης (μεταξύ 65-80%) στον ένα και δύο μήνες μετά το έμφραγμα. Επομένως δεν υπήρχε «περιθώριο για βελτίωση» από τη χορήγηση του CM. Τέλος, ρόλο θα μπορούσε να παίξει το γεγονός ότι ακολουθήθηκε πρωτόκολο πρώιμης επαναιμάτωσης (μετά

από 45 λεπτά ισχαιμίας), χρονικό διάστημα πιθανόν σύντομο ώστε η ισχαιμία να επιφέρει σημαντική μυοκαρδιακή βλάβη.

Όσον αφορά λοιπόν την υπόθεση της καρδιοπροστασίας, στο συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολο δεν επιβεβαιώνεται η δράση τους στο OEM. Σε πολλές εργασίες, expert opinions και reviews, αναφερόταν πόσο δελεαστικό είναι το ενδεχόμενο χορήγησης μόνο των παρακρινικών παραγόντων από τα κύτταρα. Θέλαμε λοιπόν να δοκιμάσουμε τη χορήγηση μόνο παρακρινικών παραγόντων. Στο πεδίο της έρευνας στην αναγέννηση της καρδιάς υπάρχει πληθώρα από αντικρουόμενες μελέτες, με θετικά ή ουδέτερα αποτελέσματα, ειδικά σε κλινικό επίπεδο. Ενδεχομένως η μελέτη μας να εμπίπτει σε αυτή την κατηγορία. Μάλιστα στη βιβλιογραφία υπάρχουν ακόμα και μετα-αναλύσεις οι οποίες έχουν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Στην μετα-ανάλυση των Gyongyosi et al, και των ACCRUE ερευνητών, ασχολήθηκαν ακριβώς με αυτό το φαινόμενο, εξηγώντας πώς η διαφορετική μεθοδολογία της ανάλυσης των δεδομένων μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα (192). Το πεδίο της αναγεννητικής ιατρικής στην καρδιολογία έχει σημειώσει σημαντική πρόοδο την τελευταία 20ετία. Σημαντική γνώση έχει πλέον αποκομισθεί (και από τα λάθη), οι προσπάθειες εντείνονται ώστε να καθορισθεί ο μηχανισμός που επιφέρεται ευεργετικό αποτέλεσμα, η τεχνολογία και το πεδίο της μοριακής βιολογίας εξελίσσεται, οπότε η πιθανότητα για καλύτερα αποτελέσματα στο μέλλον είναι υπαρκτή.

Δ.1 Περιορισμοί

Αναγνωρίζουμε ότι η παρούσα μελέτη έχει περιορισμούς. Ένα σημαντικό μειονέκτημα κατά τη γνώμη μας είναι ότι δε δοκιμάσθηκαν διαφορετικοί αριθμοί κυττάρων. Συνεπώς δεν μπορούμε να γνωρίζουμε τη μέγιστη δόση που θα είχε θεραπευτικό αποτέλεσμα και δε θα δημιουργούσε απόφραξη στη μικροκυκλοφορία. Παράλλειψη επιπλέον αποτελεί το

γεγονός ότι δεν έγινε ανάλυση της σύστασης του τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού (όσον αφορά τους αυξητικούς παράγοντες, πρωτεΐνες και εξωσωματά). Τέλος, ενδεχομένως τα εμφράγματα που προκλήθηκαν να μην ήταν αρκετά μεγάλα (αυτό φαίνεται κυρίως από το διατηρημένο κλάσμα εξώθησης υπερηχοκαρδιογραφικά), ώστε να φανεί το θεραπευτικό όφελος από την παρέμβαση. Ένας αυξανόμενος αριθμός μελετών υποστηρίζει την εξαρτώμενη από το φύλο απόκριση στην βλάβη της ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και την καρδιοπροστατευτική δράση των οιστρογόνων στην καρδιακή λειτουργία (193). Στη μελέτη μας, προκειμένου να γίνει η ποσοτικοποίηση των CDCs χρησιμοποιήσαμε μόνο θηλυκούς αρουραίους για συνέπεια. Ενδεχομένως και αυτός να ήταν ένας παράγοντας για την μη σημαντικά επηρεασμένη καρδιακή λειτουργία στους 1 και 2 μήνες.

Ε. Συμπέρασμα

Η καθολική ενδοστεφανιαία χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων στην οξεία φάση του εμφράγματος σε αρουραίους είναι ασφαλής και δεν επιβαρύνει τη βλάβη της μικροκυκλοφορίας. Το προτεινόμενο μοντέλο ενδοστεφανιαίας χορήγησης συνοδεύεται από υψηλό ποσοστό κυτταρικής εμφύτευσης, ένα μειονέκτημα άλλων τεχνικών χορήγησης κυττάρων, και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πειραματικά μοντέλα για την ενδοστεφανιαία χορήγηση ποικίλων ουσιών. Στη μελέτη μας η χορήγηση τροποποιημένου καλλιεργητικού υλικού (παρακρινικών παραγόντων) από τα καρδιακά προγονικά κύτταρα (CDCs) σε μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης, δε φάνηκε να έχει καρδιοπροστατευτική επίδραση.

ΣΤ. Περίληψη

Σε πειραματικές και κλινικές μελέτες, η χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων από καρδιόσφαιρες (CDCs) οδήγησε σε μείωση της έκτασης του εμφράγματος μετά από οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή εξετάσαμε την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της καθολικής ενδοστεφανιαίας χορήγησης CDCs ή των παρακρινικών παρακρινικών παραγόντων τους (συμπυκνωμένο καλλιεργητικό υλικό από τα CDCs, CM), στην αρχή της επαναιμάτωσης, σε μοντέλο ισχαιμίας επαναιμάτωσης σε επίμυες.

Μέθοδοι: CDCs αναπτύχθηκαν από μυοκαρδιακές βιοψίες αρσενικών επίμυων Wistar Kyoto. Τροποποιημένο καλλιεργητικό υλικό παρασκευάστηκε από τη συμπύκνωση του καλλιεργητικού μέσου που είχαν εκτεθεί στα CDCs για 24 ώρες. Θηλυκοί Wistar Kyoto επίμυες υπεβλήθησαν σε ισχαιμία (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου) για 45 λεπτά, ακολουθούμενη από επαναιμάτωση για 1 ώρα. Τα πειραματόζωα τυχαιοποιήθηκαν σε 3 ομάδες ανάλογα με το χορηγούμενο σκεύασμα κατά την ολική ενδοστεφανιαία χορήγηση (OEX) στην αρχή της επαναιμάτωσης: ομάδα CDCs, ομάδα CM και ομάδα vehicle (control). Η κυτταρική εμφύτευση εκτιμήθηκε με qPCR με στόχο το ειδικό για το άρρεν φύλο SRY γονίδιο. Η έκταση της υπό κινδύνου περιοχής (AR) και της περιοχής no reflow (NR) υπολογίσθηκε ιστοπαθολογικά. Η καρδιακή λειτουργία εκτιμήθηκε υπερηχοκαρδιογραφικά στον 1 και 2 μήνες μετά το έμφραγμα.

Αποτελέσματα: Η κυτταρική εμφύτευση μέσω της OEX υπολογίσθηκε σε 25.1% \pm 5.1. Η έκταση της μυοκαρδιακής AR και της NR περιοχής (υπολογιζόμενη 1 ώρα μετά την επαναιμάτωση) ήταν παρόμοια μεταξύ των 3 ομάδων [AR: 28.8% \pm 7.4 της συνολικής μάζας της αριστερής κοιλίας στην control vs 27.2% \pm 8 στην CM vs 27% \pm 7 στην CDCs. NR: 7.0% \pm 3.3 στην control vs 7.3% \pm 3.8 στην CM vs 7.1% \pm 3.6 στην CDCs]. Στη μία εβδομάδα μετά το έμφραγμα ο παθολογοανατομικός υπολογισμός της

έκτασης της περιοχής του εμφράγματος δε διέφερε μεταξύ των ομάδων. Επιπλέον, στον 1 και 2 μήνες μετά το έμφραγμα, η καρδιακή συστολική απόδοση και οι όγκοι της αριστερής κοιλίας ήταν παρόμοιοι μεταξύ της ομάδος control και CM.

Συμπέρασμα: Η ολική ενδοστεφανιαία χορήγηση CDCs στην οξεία φάση του εμφράγματος, στην αρχή της επαναιμάτωσης, δεν παρεμποδίζει τη μικροκυκλοφορία και συνοδεύεται από υψηλά ποσοστά κυτταρικής εμφύτευσης. Η χορήγηση CM στην οξεία φάση του εμφράγματος δεν είχε μακροχρονίως καρδιοπροστατευτική δράση.

Z. Abstract

Cardiosphere-derived cells (CDCs) have been shown to reduce infarct size after myocardial infarction. In the present study we investigated the safety and efficacy of global intracoronary administration of CDCs or CDC-conditioned medium (CM) immediately after reperfusion in a rat model of ischemia-reperfusion.

Methods: CDCs were grown from myocardial biopsies obtained from male Wistar Kyoto rats (WKY). Female WKY rats underwent myocardial ischemia for 45 minutes, followed by reperfusion for 1 hour. Low passage CDCs and concentrated media (CM) from the CDC culture were administered intracoronary immediately after the onset of reperfusion. Cell retention was quantified by PCR, while area at risk and no reflow area were measured by histopathology. Cardiac function was evaluated by echocardiography at 1 and 2 months post-MI.

Results: Cell retention at 1hr after cell administration was $25.1\% \pm 5.1\%$. The myocardial AR and NR (measured at 1 hour post-reperfusion) were similar between groups [AR: $28.8\% \pm 7.4$ of LV mass in control vs $27.2\% \pm 8$ in CM vs $27 \pm 7\%$ in CDCs group. NR: $7.02\% \pm 3.31$ in control vs $7.33\% \pm 3.76$ in CM vs $7.09\% \pm 3.61$ in CDCs]. One week after MI, the infarct size area, estimated by pathology, did not differ between the 3 groups. One and 2 months post-MI, systolic function and LV volumes did not differ between control and CM groups.

Conclusion: Intracoronary administration of CDCs during the acute phase of MI, at the beginning of reperfusion, does not aggravate microvascular obstruction and results in high cell retention. Delivery of CM in the acute phase of MI did not confer long-term cardiac functional benefits.

H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Braunwald's Heart Disease. A textbook of Cardiovascular Medicine. 11th ed. Zipes L, Bonow, Mann, Tomaselli, editor: Elsevier; 2018 2018.
2. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabe-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (New York, NY)*. 2009;324(5923):98-102.
3. Psaltis PJ, Schwarz N, Toledo-Flores D, Nicholls SJ. Cellular Therapy for Heart Failure. *Current cardiology reviews*. 2016;12(3):195-215.
4. Menasche P. Cell therapy trials for heart regeneration - lessons learned and future directions. *Nature reviews Cardiology*. 2018;15(11):659-71.
5. Eschenhagen T, Bolli R, Braun T, Field LJ, Fleischmann BK, Frisen J, et al. Cardiomyocyte Regeneration: A Consensus Statement. *Circulation*. 2017;136(7):680-6.
6. Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, MacGillivray C, Gannon J, Molkentin JD, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nature medicine*. 2007;13(8):970-4.
7. Soonpaa MH, Field LJ. Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circulation research*. 1998;83(1):15-26.
8. Passier R, van Laake LW, Mummery CL. Stem-cell-based therapy and lessons from the heart. *Nature*. 2008;453(7193):322-9.
9. Laflamme MA, Murry CE. Regenerating the heart. *Nature biotechnology*. 2005;23(7):845-56.
10. Soonpaa MH, Field LJ. Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts. *The American journal of physiology*. 1997;272(1 Pt 2):H220-6.
11. Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, Hill JA, Richardson JA, Olson EN, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6020):1078-80.
12. Heineke J, Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(8):589-600.
13. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, Salehpour M, Alkass K, Bernard S, et al. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell*. 2015;161(7):1566-75.

14. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* (London, England). 2001;357(9252):279-80.
15. Menasche P, Alfieri O, Janssens S, McKenna W, Reichenspurner H, Trinquart L, et al. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation*. 2008;117(9):1189-200.
16. Sawa Y, Yoshikawa Y, Toda K, Fukushima S, Yamazaki K, Ono M, et al. Safety and Efficacy of Autologous Skeletal Myoblast Sheets (TCD-51073) for the Treatment of Severe Chronic Heart Failure Due to Ischemic Heart Disease. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2015;79(5):991-9.
17. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-5.
18. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, Gattermann N, Hernandez A, Sorg RV, et al. [Intracoronary, human autologous stem cell transplantation for myocardial regeneration following myocardial infarction]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* (1946). 2001;126(34-35):932-8.
19. Hendrikx M, Hensen K, Clijsters C, Jongen H, Koninckx R, Bijmens E, et al. Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation*. 2006;114(1 Suppl):I101-7.
20. Ang KL, Chin D, Leyva F, Foley P, Kubal C, Chalil S, et al. Randomized, controlled trial of intramuscular or intracoronary injection of autologous bone marrow cells into scarred myocardium during CABG versus CABG alone. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. 2008;5(10):663-70.
21. Patila T, Lehtinen M, Vento A, Schildt J, Sinisalo J, Laine M, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in ischemic heart failure: a prospective, controlled, randomized, double-blind study of cell transplantation combined with coronary bypass. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2014;33(6):567-74.
22. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3

weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *Jama*. 2011;306(19):2110-9.

23. Surder D, Schwitter J, Moccetti T, Astori G, Rufibach K, Plein S, et al. Cell-based therapy for myocardial repair in patients with acute myocardial infarction: rationale and study design of the SWISS multicenter Intracoronary Stem cells Study in Acute Myocardial Infarction (SWISS-AMI). *American heart journal*. 2010;160(1):58-64.

24. Murry CE, Soonpaa MH, Reinecke H, Nakajima H, Nakajima HO, Rubart M, et al. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*. 2004;428(6983):664-8.

25. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Sawen P, Roll W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nature medicine*. 2004;10(5):494-501.

26. Kolata G. Harvard calls for retraction of dozens of studies by noted cardiac researcher.

27. Povsic TJ, Henry TD, Traverse JH, Fortuin FD, Schaer GL, Kereiakes DJ, et al. The RENEW Trial: Efficacy and Safety of Intramyocardial Autologous CD34(+) Cell Administration in Patients With Refractory Angina. *JACC Cardiovascular interventions*. 2016;9(15):1576-85.

28. Noiseux N, Mansour S, Weisel R, Stevens LM, Der Sarkissian S, Tsang K, et al. The IMPACT-CABG trial: A multicenter, randomized clinical trial of CD133(+) stem cell therapy during coronary artery bypass grafting for ischemic cardiomyopathy. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2016;152(6):1582-8.e2.

29. Stamm C, Kleine HD, Choi YH, Dunkelmann S, Lauffs JA, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2007;133(3):717-25.

30. Spees JL, Lee RH, Gregory CA. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem cell research & therapy*. 2016;7(1):125.

31. Quijada P, Toko H, Fischer KM, Bailey B, Reilly P, Hunt KD, et al. Preservation of myocardial structure is enhanced by pim-1 engineering of bone marrow cells. *Circulation research*. 2012;111(1):77-86.

32. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. *Circulation research*. 2015;116(8):1413-30.

33. Mathiasen AB, Qayyum AA, Jorgensen E, Helqvist S, Fischer-Nielsen A, Kofoed KF, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *European heart journal*. 2015;36(27):1744-53.
34. Bartunek J, Behfar A, Dolatabadi D, Vanderheyden M, Ostojic M, Dens J, et al. Cardiopoietic stem cell therapy in heart failure: the C-CURE (Cardiopoietic stem Cell therapy in heart failURE) multicenter randomized trial with lineage-specified biologics. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;61(23):2329-38.
35. Bartunek J, Terzic A, Davison BA, Filippatos GS, Radovanovic S, Beleslin B, et al. Cardiopoietic cell therapy for advanced ischaemic heart failure: results at 39 weeks of the prospective, randomized, double blind, sham-controlled CHART-1 clinical trial. *European heart journal*. 2017;38(9):648-60.
36. Butler J, Epstein SE, Greene SJ, Quyyumi AA, Sikora S, Kim RJ, et al. Intravenous Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for Nonischemic Cardiomyopathy: Safety and Efficacy Results of a Phase II-A Randomized Trial. *Circulation research*. 2017;120(2):332-40.
37. Patel AN, Henry TD, Quyyumi AA, Schaer GL, Anderson RD, Toma C, et al. Ixmyelocel-T for patients with ischaemic heart failure: a prospective randomised double-blind trial. *Lancet (London, England)*. 2016;387(10036):2412-21.
38. Povsic TJ, Zeiher AM. IxCELL-DCM: rejuvenation for cardiac regenerative therapy? *Lancet (London, England)*. 2016;387(10036):2362-3.
39. Perin EC, Borow KM, Silva GV, DeMaria AN, Marroquin OC, Huang PP, et al. A Phase II Dose-Escalation Study of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Patients With Ischemic or Nonischemic Heart Failure. *Circulation research*. 2015;117(6):576-84.
40. Fisher SA, Doree C, Mathur A, Taggart DP, Martin-Rendon E. Cochrane Corner: stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure. *Heart (British Cardiac Society)*. 2018;104(1):8-10.
41. Zaruba MM, Soonpaa M, Reuter S, Field LJ. Cardiomyogenic potential of C-kit(+)-expressing cells derived from neonatal and adult mouse hearts. *Circulation*. 2010;121(18):1992-2000.
42. Jestly SA, Steffey MA, Lee FK, Breitbach M, Hesse M, Reining S, et al. c-kit+ precursors support postinfarction myogenesis in the neonatal, but not adult, heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(33):13380-5.

43. Mishra R, Vijayan K, Colletti EJ, Harrington DA, Matthiesen TS, Simpson D, et al. Characterization and functionality of cardiac progenitor cells in congenital heart patients. *Circulation*. 2011;123(4):364-73.
44. Keith MC, Bolli R. "String theory" of c-kit(pos) cardiac cells: a new paradigm regarding the nature of these cells that may reconcile apparently discrepant results. *Circulation research*. 2015;116(7):1216-30.
45. Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, Galang G, Tseliou E, Cheng K, et al. Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart. *EMBO molecular medicine*. 2013;5(2):191-209.
46. van Berlo JH, Kanisicak O, Maillet M, Vagnozzi RJ, Karch J, Lin SC, et al. c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart. *Nature*. 2014;509(7500):337-41.
47. <https://www.nytimes.com/2018/10/15/health/piero-anversa-fraud-retractions.html>. The New York Times. 2018.
48. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115(7):896-908.
49. Davis DR, Zhang Y, Smith RR, Cheng K, Terrovitis J, Malliaras K, et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue. *PloS one*. 2009;4(9):e7195.
50. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9819):895-904.
51. Li TS, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B, et al. Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells. *Journal of the American College of Cardiology*. 2012;59(10):942-53.
52. Gallet R, Dawkins J, Valle J, Simsolo E, de Couto G, Middleton R, et al. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction. *European heart journal*. 2017;38(3):201-11.

53. Taylor M, Jefferies J, Byrne B, Lima J, Ambale-Venkatesh B, Ostrovaneh MR, et al. Cardiac and skeletal muscle effects in the randomized HOPE-Duchenne trial. *Neurology*. 2019;92(8):e866-e78.
54. Tarui S, Ishigami S, Ousaka D, Kasahara S, Ohtsuki S, Sano S, et al. Transcoronary infusion of cardiac progenitor cells in hypoplastic left heart syndrome: Three-year follow-up of the Transcoronary Infusion of Cardiac Progenitor Cells in Patients With Single-Ventricle Physiology (TICAP) trial. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2015;150(5):1198-207, 208.e1-2.
55. Burridge PW, Keller G, Gold JD, Wu JC. Production of de novo cardiomyocytes: human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Cell stem cell*. 2012;10(1):16-28.
56. Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circulation research*. 2012;111(3):344-58.
57. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21(7):1345-57.
58. Lundy SD, Gantz JA, Pagan CM, Filice D, Laflamme MA. Pluripotent stem cell derived cardiomyocytes for cardiac repair. *Current treatment options in cardiovascular medicine*. 2014;16(7):319.
59. Bellamy V, Vanneaux V, Bel A, Nemetalla H, Emmanuelle Boitard S, Farouz Y, et al. Long-term functional benefits of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors embedded into a fibrin scaffold. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2015;34(9):1198-207.
60. Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*. 2014;510(7504):273-7.
61. Shiba Y, Gomibuchi T, Seto T, Wada Y, Ichimura H, Tanaka Y, et al. Allogeneic transplantation of iPS cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature*. 2016;538(7625):388-91.
62. Menasche P, Vanneaux V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, et al. Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *European heart journal*. 2015;36(30):2011-7.

63. Loffredo FS, Steinhauser ML, Gannon J, Lee RT. Bone marrow-derived cell therapy stimulates endogenous cardiomyocyte progenitors and promotes cardiac repair. *Cell stem cell*. 2011;8(4):389-98.
64. Khan M, Nickoloff E, Abramova T, Johnson J, Verma SK, Krishnamurthy P, et al. Embryonic stem cell-derived exosomes promote endogenous repair mechanisms and enhance cardiac function following myocardial infarction. *Circulation research*. 2015;117(1):52-64.
65. Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circulation research*. 2014;114(2):333-44.
66. Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cunado M, Zhao M, Maruyama S, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature*. 2015;525(7570):479-85.
67. Minami E, Reinecke H, Murry CE. Skeletal muscle meets cardiac muscle. Friends or foes? *Journal of the American College of Cardiology*. 2003;41(7):1084-6.
68. Emmert MY, Wolint P, Jakab A, Sheehy SP, Pasqualini FS, Nguyen TDL, et al. Safety and efficacy of cardiopoietic stem cells in the treatment of post-infarction left-ventricular dysfunction - From cardioprotection to functional repair in a translational pig infarction model. *Biomaterials*. 2017;122:48-62.
69. Chimenti I, Smith RR, Li TS, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circulation research*. 2010;106(5):971-80.
70. Terrovitis J, Lautamaki R, Bonios M, Fox J, Engles JM, Yu J, et al. Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(17):1619-26.
71. Aonuma T, Takehara N, Maruyama K, Kabara M, Matsuki M, Yamauchi A, et al. Apoptosis-Resistant Cardiac Progenitor Cells Modified With Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease/Redox Factor 1 Gene Overexpression Regulate Cardiac Repair After Myocardial Infarction. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(8):1067-78.
72. Zhu P, Liu J, Shi J, Zhou Q, Liu J, Zhang X, et al. Melatonin protects ADSCs from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2015;19(9):2232-43.

73. Kim HW, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Ischemic preconditioning augments survival of stem cells via miR-210 expression by targeting caspase-8-associated protein 2. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(48):33161-8.
74. Chang CY, Chan AT, Armstrong PA, Luo HC, Higuchi T, Strehin IA, et al. Hyaluronic acid-human blood hydrogels for stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2012;33(32):8026-33.
75. Chan AT, Karakas MF, Vakrou S, Afzal J, Rittenbach A, Lin X, et al. Hyaluronic acid-serum hydrogels rapidly restore metabolism of encapsulated stem cells and promote engraftment. *Biomaterials*. 2015;73:1-11.
76. Iseoka H, Miyagawa S, Fukushima S, Saito A, Masuda S, Yajima S, et al. Pivotal Role of Non-cardiomyocytes in Electromechanical and Therapeutic Potential of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Cardiac Tissue. *Tissue engineering Part A*. 2018;24(3-4):287-300.
77. Chen HS, Kim C, Mercola M. Electrophysiological challenges of cell-based myocardial repair. *Circulation*. 2009;120(24):2496-508.
78. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell stem cell*. 2013;12(6):689-98.
79. Lefer DJ, Marban E. Is Cardioprotection Dead? *Circulation*. 2017;136(1):98-109.
80. Weil BR, Suzuki G, Leiker MM, Fallavollita JA, Canty JM, Jr. Comparative Efficacy of Intracoronary Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and Cardiosphere-Derived Cells in Swine with Hibernating Myocardium. *Circulation research*. 2015;117(7):634-44.
81. Malliaras K, Li TS, Luthringer D, Terrovitis J, Cheng K, Chakravarty T, et al. Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells. *Circulation*. 2012;125(1):100-12.
82. Tano N, Kaneko M, Ichihara Y, Ikebe C, Coppen SR, Shiraishi M, et al. Allogeneic Mesenchymal Stromal Cells Transplanted Onto the Heart Surface Achieve Therapeutic Myocardial Repair Despite Immunologic Responses in Rats. *Journal of the American Heart Association*. 2016;5(2).
83. Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, 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(22):2369-79.

84. Vrtovec B, Poglajen G, Lezaic L, Sever M, Socan A, Domanovic D, et al. Comparison of transendocardial and intracoronary CD34+ cell transplantation in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2013;128(11 Suppl 1):S42-9.
85. Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, Zhang P, Rogers P, Price ET, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I150-6.
86. van den Akker F, Feyen DA, van den Hoogen P, van Laake LW, van Eeuwijk EC, Hoefer I, et al. Intramyocardial stem cell injection: go(ne) with the flow. *European heart journal*. 2017;38(3):184-6.
87. Bonios M, Terrovitis J, Chang CY, Engles JM, Higuchi T, Lautamaki R, et al. Myocardial substrate and route of administration determine acute cardiac retention and lung bio-distribution of cardiosphere-derived cells. *Journal of nuclear cardiology : official publication of the American Society of Nuclear Cardiology*. 2011;18(3):443-50.
88. Behfar A, Latere JP, Bartunek J, Homsy C, Daro D, Crespo-Diaz RJ, et al. Optimized delivery system achieves enhanced endomyocardial stem cell retention. *Circulation Cardiovascular interventions*. 2013;6(6):710-8.
89. Amer MH, Rose FR, White LJ, Shakesheff KM. A Detailed Assessment of Varying Ejection Rate on Delivery Efficiency of Mesenchymal Stem Cells Using Narrow-Bore Needles. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(3):366-78.
90. Kervadec A, Bellamy V, El Harane N, Arakelian L, Vanneaux V, Cacciapuoti I, et al. Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2016;35(6):795-807.
91. Timmers L, Lim SK, Hoefer IE, Arslan F, Lai RC, van Oorschot AA, et al. Human mesenchymal stem cell-conditioned medium improves cardiac function following myocardial infarction. *Stem cell research*. 2011;6(3):206-14.
92. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Chaitman BR, Bax JJ, Morrow DA, et al. Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *European heart journal*. 2018.
93. Jennings RB, Ganote CE. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circulation research*. 1974;35 Suppl 3:156-72.

94. Reimer KA, Jennings RB, Tatum AH. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *The American journal of cardiology*. 1983;52(2):72a-81a.
95. Ibanez B, Heusch G, Ovize M, Van de Werf F. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*. 2015;65(14):1454-71.
96. Thygesen K, Mair J, Giannitsis E, Mueller C, Lindahl B, Blankenberg S, et al. How to use high-sensitivity cardiac troponins in acute cardiac care. *European heart journal*. 2012;33(18):2252-7.
97. Bjurman C, Larsson M, Johanson P, Petzold M, Lindahl B, Fu MLX, et al. Small changes in troponin T levels are common in patients with non-ST-segment elevation myocardial infarction and are linked to higher mortality. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013;62(14):1231-8.
98. Jaffe AS, Babuin L, Apple FS. Biomarkers in acute cardiac disease: the present and the future. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(1):1-11.
99. White HD. Pathobiology of troponin elevations: do elevations occur with myocardial ischemia as well as necrosis? *Journal of the American College of Cardiology*. 2011;57(24):2406-8.
100. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2016;37(3):267-315.
101. Scirica BM, Morrow DA, Budaj A, Dalby AJ, Mohanavelu S, Qin J, et al. Ischemia detected on continuous electrocardiography after acute coronary syndrome: observations from the MERLIN-TIMI 36 (Metabolic Efficiency With Ranolazine for Less Ischemia in Non-ST-Elevation Acute Coronary Syndrome-Thrombolysis In Myocardial Infarction 36) trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;53(16):1411-21.
102. Wang K, Asinger RW, Marriott HJ. ST-segment elevation in conditions other than acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2003;349(22):2128-35.

103. Roth GA, Huffman MD, Moran AE, Feigin V, Mensah GA, Naghavi M, et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013. *Circulation*. 2015;132(17):1667-78.
104. Hartley A, Marshall DC, Saliccioli JD, Sikkil MB, Maruthappu M, Shalhoub J. Trends in Mortality From Ischemic Heart Disease and Cerebrovascular Disease in Europe: 1980 to 2009. *Circulation*. 2016;133(20):1916-26.
105. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *European heart journal*. 2016;37(42):3232-45.
106. McManus DD, Gore J, Yarzebski J, Spencer F, Lessard D, Goldberg RJ. Recent trends in the incidence, treatment, and outcomes of patients with STEMI and NSTEMI. *The American journal of medicine*. 2011;124(1):40-7.
107. Widimsky P, Wijns W, Fajadet J, de Belder M, Knot J, Aaberge L, et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries. *European heart journal*. 2010;31(8):943-57.
108. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European heart journal*. 2018;39(2):119-77.
109. Pedersen F, Butrymovich V, Kelbaek H, Wachtell K, Helqvist S, Kastrup J, et al. Short- and long-term cause of death in patients treated with primary PCI for STEMI. *Journal of the American College of Cardiology*. 2014;64(20):2101-8.
110. Kristensen SD, Laut KG, Fajadet J, Kaifoszova Z, Kala P, Di Mario C, et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction 2010/2011: current status in 37 ESC countries. *European heart journal*. 2014;35(29):1957-70.
111. Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet (London, England)*. 2003;361(9351):13-20.
112. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *The Journal of clinical investigation*. 1974;54(6):1496-508.

113. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation*. 1977;56(5):786-94.
114. Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, Becker LC. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation*. 1989;80(6):1846-61.
115. Rezkalla SH, Kloner RA. No-reflow phenomenon. *Circulation*. 2002;105(5):656-62.
116. Kloner RA. The importance of no-reflow/microvascular obstruction in the STEMI patient. *European heart journal*. 2017;38(47):3511-3.
117. Reffelmann T, Hale SL, Dow JS, Kloner RA. No-reflow phenomenon persists long-term after ischemia/reperfusion in the rat and predicts infarct expansion. *Circulation*. 2003;108(23):2911-7.
118. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *Journal of the American College of Cardiology*. 2009;54(4):281-92.
119. Skyschally A, Leineweber K, Gres P, Haude M, Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization. *Basic research in cardiology*. 2006;101(5):373-82.
120. Hori M, Inoue M, Kitakaze M, Koretsune Y, Iwai K, Tamai J, et al. Role of adenosine in hyperemic response of coronary blood flow in microembolization. *The American journal of physiology*. 1986;250(3 Pt 2):H509-18.
121. Bouleti C, Mewton N, Germain S. The no-reflow phenomenon: State of the art. *Archives of cardiovascular diseases*. 2015;108(12):661-74.
122. Trantum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, Krieger WJ, D'Alnoncourt CN, Durrer D. Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circulation research*. 1981;49(2):364-81.
123. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*. 2007;357(11):1121-35.
124. Engler RL, Schmid-Schonbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *The American journal of pathology*. 1983;111(1):98-111.
125. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *American heart journal*. 1999;138(2 Pt 2):S69-75.
126. Ito BR, Schmid-Schonbein G, Engler RL. Effects of leukocyte activation on myocardial vascular resistance. *Blood cells*. 1990;16(1):145-63; discussion 63-6.

127. Lefer AM, Tsao P, Aoki N, Palladino MA, Jr. Mediation of cardioprotection by transforming growth factor-beta. *Science (New York, NY)*. 1990;249(4964):61-4.
128. Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, et al. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury. *Critical care medicine*. 2006;34(9):2447-55.
129. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *The Journal of pathology*. 2000;190(3):255-66.
130. Collet JP, Montalescot G. The acute reperfusion management of STEMI in patients with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes & vascular disease research*. 2005;2(3):136-43.
131. Golino P, Maroko PR, Carew TE. The effect of acute hypercholesterolemia on myocardial infarct size and the no-reflow phenomenon during coronary occlusion-reperfusion. *Circulation*. 1987;75(1):292-8.
132. Rezkalla SH, Kloner RA. Ischemic preconditioning and preinfarction angina in the clinical arena. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. 2004;1(2):96-102.
133. de Waha S, Patel MR, Granger CB, Ohman EM, Maehara A, Eitel I, et al. Relationship between microvascular obstruction and adverse events following primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction: an individual patient data pooled analysis from seven randomized trials. *European heart journal*. 2017;38(47):3502-10.
134. Bolognese L, Carrabba N, Parodi G, Santoro GM, Buonamici P, Cerisano G, et al. Impact of microvascular dysfunction on left ventricular remodeling and long-term clinical outcome after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109(9):1121-6.
135. Galiuto L, Garramone B, Scara A, Rebuffi AG, Crea F, La Torre G, et al. The extent of microvascular damage during myocardial contrast echocardiography is superior to other known indexes of post-infarct reperfusion in predicting left ventricular remodeling: results of the multicenter AMICI study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;51(5):552-9.
136. Rezkalla SH, Stankowski RV, Hanna J, Kloner RA. Management of No-Reflow Phenomenon in the Catheterization Laboratory. *JACC Cardiovascular interventions*. 2017;10(3):215-23.
137. Loubeyre C, Morice MC, Lefevre T, Piechaud JF, Louvard Y, Dumas P. A randomized comparison of direct stenting with conventional stent implantation in

selected patients with acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2002;39(1):15-21.

138. Ali A, Cox D, Dib N, Brodie B, Berman D, Gupta N, et al. Rheolytic thrombectomy with percutaneous coronary intervention for infarct size reduction in acute myocardial infarction: 30-day results from a multicenter randomized study. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(2):244-52.

139. Dangas G, Stone GW, Weinberg MD, Webb J, Cox DA, Brodie BR, et al. Contemporary outcomes of rescue percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: comparison with primary angioplasty and the role of distal protection devices (EMERALD trial). *American heart journal*. 2008;155(6):1090-6.

140. Burzotta F, Trani C, Romagnoli E, Mazzari MA, Rebuffi AG, De Vita M, et al. Manual thrombus-aspiration improves myocardial reperfusion: the randomized evaluation of the effect of mechanical reduction of distal embolization by thrombus-aspiration in primary and rescue angioplasty (REMEDIA) trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46(2):371-6.

141. Galiuto L, Garramone B, Burzotta F, Lombardo A, Barchetta S, Rebuffi AG, et al. Thrombus aspiration reduces microvascular obstruction after primary coronary intervention: a myocardial contrast echocardiography substudy of the REMEDIA Trial. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48(7):1355-60.

142. Zhao J, Yang Y, you S, Cui C, Gao R. Carvedilol preserves endothelial junctions and reduces myocardial no-reflow after acute myocardial infarction and reperfusion. *International journal of cardiology*. 2007;115(3):334-41.

143. Zhao JL, Yang YJ, You SJ, Jing ZC, Wu YJ, Cheng JL, et al. Pretreatment with fosinopril or valsartan reduces myocardial no-reflow after acute myocardial infarction and reperfusion. *Coronary artery disease*. 2006;17(5):463-9.

144. Ibanez B, Macaya C, Sanchez-Brunete V, Pizarro G, Fernandez-Friera L, Mateos A, et al. Effect of early metoprolol on infarct size in ST-segment-elevation myocardial infarction patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: the Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute Myocardial Infarction (METOCARD-CNIC) trial. *Circulation*. 2013;128(14):1495-503.

145. Pizarro G, Fernandez-Friera L, Fuster V, Fernandez-Jimenez R, Garcia-Ruiz JM, Garcia-Alvarez A, et al. Long-term benefit of early pre-reperfusion metoprolol administration in patients with acute myocardial infarction: results from the METOCARD-CNIC trial (Effect of Metoprolol in Cardioprotection During an Acute

Myocardial Infarction). Journal of the American College of Cardiology. 2014;63(22):2356-62.

146. Petronio AS, De Carlo M, Ciabatti N, Amoroso G, Limbruno U, Palagi C, et al. Left ventricular remodeling after primary coronary angioplasty in patients treated with abciximab or intracoronary adenosine. American heart journal. 2005;150(5):1015.

147. Thiele H, Schindler K, Friedenberger J, Eitel I, Furnau G, Grebe E, et al. Intracoronary compared with intravenous bolus abciximab application in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: the randomized Leipzig immediate percutaneous coronary intervention abciximab IV versus IC in ST-elevation myocardial infarction trial. Circulation. 2008;118(1):49-57.

148. Stone GW, Maehara A, Witzenbichler B, Godlewski J, Parise H, Dambrink JH, et al. Intracoronary abciximab and aspiration thrombectomy in patients with large anterior myocardial infarction: the INFUSE-AMI randomized trial. Jama. 2012;307(17):1817-26.

149. Van't Hof AW, Ten Berg J, Heestermans T, Dill T, Funck RC, van Werkum W, et al. Prehospital initiation of tirofiban in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary angioplasty (On-TIME 2): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. Lancet (London, England). 2008;372(9638):537-46.

150. Gibson CM, Morrow DA, Murphy SA, Palabrica TM, Jennings LK, Stone PH, et al. A randomized trial to evaluate the relative protection against post-percutaneous coronary intervention microvascular dysfunction, ischemia, and inflammation among antiplatelet and antithrombotic agents: the PROTECT-TIMI-30 trial. Journal of the American College of Cardiology. 2006;47(12):2364-73.

151. Marzilli M, Orsini E, Marraccini P, Testa R. Beneficial effects of intracoronary adenosine as an adjunct to primary angioplasty in acute myocardial infarction. Circulation. 2000;101(18):2154-9.

152. Stoel MG, Marques KM, de Cock CC, Bronzwaer JG, von Birgelen C, Zijlstra F. High dose adenosine for suboptimal myocardial reperfusion after primary PCI: A randomized placebo-controlled pilot study. Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions. 2008;71(3):283-9.

153. Desmet W, Bogaert J, Dubois C, Sinnaeve P, Adriaenssens T, Pappas C, et al. High-dose intracoronary adenosine for myocardial salvage in patients with acute

ST-segment elevation myocardial infarction. *European heart journal*. 2011;32(7):867-77.

154. Garcia-Dorado D, Garcia-del-Blanco B, Otaegui I, Rodriguez-Palomares J, Pineda V, Gimeno F, et al. Intracoronary injection of adenosine before reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: a randomized controlled clinical trial. *International journal of cardiology*. 2014;177(3):935-41.

155. Hillegass WB, Dean NA, Liao L, Rhinehart RG, Myers PR. Treatment of no-reflow and impaired flow with the nitric oxide donor nitroprusside following percutaneous coronary interventions: initial human clinical experience. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37(5):1335-43.

156. Pasceri V, Pristipino C, Pelliccia F, Granatelli A, Speciale G, Roncella A, et al. Effects of the nitric oxide donor nitroprusside on no-reflow phenomenon during coronary interventions for acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. 2005;95(11):1358-61.

157. Wang HJ, Lo PH, Lin JJ, Lee H, Hung JS. Treatment of slow/no-reflow phenomenon with intracoronary nitroprusside injection in primary coronary intervention for acute myocardial infarction. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*. 2004;63(2):171-6.

158. Airoldi F, Briguori C, Cianflone D, Cosgrave J, Stankovic G, Godino C, et al. Frequency of slow coronary flow following successful stent implantation and effect of Nitroprusside. *The American journal of cardiology*. 2007;99(7):916-20.

159. Amit G, Cafri C, Yaroslavtsev S, Fuchs S, Paltiel O, Abu-Ful A, et al. Intracoronary nitroprusside for the prevention of the no-reflow phenomenon after primary percutaneous coronary intervention in acute myocardial infarction. A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *American heart journal*. 2006;152(5):887.e9-14.

160. Ohno Y, Minatoguchi S, Uno Y, Kariya T, Arai M, Yamashita K, et al. Nicorandil reduces myocardial infarct size by opening the K(ATP) channel in rabbits. *International journal of cardiology*. 1997;62(3):181-90.

161. Ito H, Taniyama Y, Iwakura K, Nishikawa N, Masuyama T, Kuzuya T, et al. Intravenous nicorandil can preserve microvascular integrity and myocardial viability in patients with reperfused anterior wall myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 1999;33(3):654-60.

162. Taniyama Y, Ito H, Iwakura K, Masuyama T, Hori M, Takiuchi S, et al. Beneficial effect of intracoronary verapamil on microvascular and myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 1997;30(5):1193-9.
163. Su Q, Li L, Liu Y. Short-term effect of verapamil on coronary no-reflow associated with percutaneous coronary intervention in patients with acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clinical cardiology*. 2013;36(8):E11-6.
164. Huang RI, Patel P, Walinsky P, Fischman DL, Ogilby JD, Awar M, et al. Efficacy of intracoronary nicardipine in the treatment of no-reflow during percutaneous coronary intervention. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*. 2006;68(5):671-6.
165. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *The New England journal of medicine*. 2008;359(5):473-81.
166. Cung TT, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, et al. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *The New England journal of medicine*. 2015;373(11):1021-31.
167. Iwakura K, Ito H, Kawano S, Okamura A, Kurotobi T, Date M, et al. Chronic pre-treatment of statins is associated with the reduction of the no-reflow phenomenon in the patients with reperfused acute myocardial infarction. *European heart journal*. 2006;27(5):534-9.
168. Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, et al. Effect of remote ischaemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2007;370(9587):575-9.
169. Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Penta de Peppo A, et al. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K⁺ channel blocker. *Circulation*. 1994;90(2):700-5.
170. Staat P, Rioufol G, Piot C, Cottin Y, Cung TT, L'Huillier I, et al. Postconditioning the human heart. *Circulation*. 2005;112(14):2143-8.

171. Mewton N, Thibault H, Roubille F, Lairez O, Rioufol G, Sportouch C, et al. Postconditioning attenuates no-reflow in STEMI patients. *Basic research in cardiology*. 2013;108(6):383.
172. Freixa X, Bellera N, Ortiz-Perez JT, Jimenez M, Pare C, Bosch X, et al. Ischaemic postconditioning revisited: lack of effects on infarct size following primary percutaneous coronary intervention. *European heart journal*. 2012;33(1):103-12.
173. Hahn JY, Song YB, Kim EK, Yu CW, Bae JW, Chung WY, et al. Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention: the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (POST) randomized trial. *Circulation*. 2013;128(17):1889-96.
174. Touboul C, Angoulvant D, Mewton N, Ivanes F, Muntean D, Prunier F, et al. Ischaemic postconditioning reduces infarct size: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of cardiovascular diseases*. 2015;108(1):39-49.
175. Marban E, Cheng K. Heart to heart: The elusive mechanism of cell therapy. *Circulation*. 2010;121(18):1981-4.
176. Terrovitis JV, Smith RR, Marban E. Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart. *Circulation research*. 2010;106(3):479-94.
177. Reffelmann T, Kloner RA. The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion. *Basic research in cardiology*. 2006;101(5):359-72.
178. Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras K, Yee K, Dawkins JF, De Couto G, et al. Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *Circulation Heart failure*. 2015;8(2):322-32.
179. Tsamatsoulis M, Kapelios CJ, Katsaros L, Vakrou S, Sousonis V, Sventzouri S, et al. Cardioprotective effects of intracoronary administration of 4-chlorodiazepam in small and large animal models of ischemia-reperfusion. *International journal of cardiology*. 2016;224:90-5.
180. Nana-Leventaki E, Nana M, Poulianitis N, Sampaziotis D, Perrea D, Sanoudou D, et al. Cardiosphere-Derived Cells Attenuate Inflammation, Preserve Systolic Function, and Prevent Adverse Remodeling in Rat Hearts With Experimental Autoimmune Myocarditis. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2018:1074248418784287.

181. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart (British Cardiac Society)*. 2007;93(9):1137-46.
182. Kelly DJ, Gershlick T, Witzembichler B, Guagliumi G, Fahy M, Dangas G, et al. Incidence and predictors of heart failure following percutaneous coronary intervention in ST-segment elevation myocardial infarction: the HORIZONS-AMI trial. *American heart journal*. 2011;162(4):663-70.
183. Ganame J, Messalli G, Masci PG, Dymarkowski S, Abbasi K, Van de Werf F, et al. Time course of infarct healing and left ventricular remodelling in patients with reperfused ST segment elevation myocardial infarction using comprehensive magnetic resonance imaging. *European radiology*. 2011;21(4):693-701.
184. Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, Cappola TP, Pauly DF, Greenberg B, et al. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *Journal of cardiac failure*. 2009;15(3):171-81.
185. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 2011;124(3):304-13.
186. Bibli SI, Papapetropoulos A, Iliodromitis EK, Daiber A, Randriamboavonjy V, Steven S, et al. Nitroglycerine limits infarct size through S-nitrosation of cyclophilin D: a novel mechanism for an old drug. *Cardiovascular research*. 2019;115(3):625-36.
187. Sventzouri S, Nanas I, Vakrou S, Kapelios C, Sousonis V, Sfakianaki T, et al. Pharmacologic inhibition of the mitochondrial Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger protects against ventricular arrhythmias in a porcine model of ischemia-reperfusion. *Hellenic journal of cardiology : HJC = Hellenike kardiologike epitheorese*. 2017.
188. Jaffe R, Charron T, Puley G, Dick A, Strauss BH. Microvascular obstruction and the no-reflow phenomenon after percutaneous coronary intervention. *Circulation*. 2008;117(24):3152-6.
189. Marbán E. A mechanistic roadmap for the clinical application of cardiac cell therapies. *Nature Biomedical Engineering*. 2018;2(6):353-61.
190. Chakravarty T, Makkar RR, Ascheim DD, Traverse JH, Schatz R, DeMaria A, et al. ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial: Rationale and Design. *Cell transplantation*. 2017;26(2):205-14.

191. <https://www.prnewswire.com/news-releases/capricor-therapeutics-provides-update-on-allstar-trial-300456715.html>.
192. Gyongyosi M, Wojakowski W, Navarese EP, Moya LA. Meta-Analyses of Human Cell-Based Cardiac Regeneration Therapies: Controversies in Meta-Analyses Results on Cardiac Cell-Based Regenerative Studies. *Circulation research*. 2016;118(8):1254-63.
193. Zhai P, Eurell TE, Cotthaus R, Jeffery EH, Bahr JM, Gross DR. Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2000;279(6):H2766-75.