



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρική Σχολή

Γ' Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική

Διευθυντής: Καθηγητής Ε. Βαβουρανάκης

**ΕΝΔΟΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΛΛΟΓΕΝΩΝ
ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΚΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ Γ. ΣΟΥΣΩΝΗ

ΙΑΤΡΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020



Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρική Σχολή

Γ' Πανεπιστημιακή Καρδιολογική Κλινική

Διευθυντής: Καθηγητής Ε. Βαβουρανάκης

**ΕΝΔΟΣΤΕΦΑΝΙΑΙΑ ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΑΛΛΟΓΕΝΩΝ
ΚΑΡΔΙΑΚΩΝ ΠΡΟΓΟΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΕΚΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΜΦΡΑΓΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ**

ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ Γ. ΣΟΥΣΩΝΗ

ΙΑΤΡΟΥ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΑΘΗΝΑ 2020

Στοιχεία Διδακτορικής Διατριβής

Ημερομηνία αίτησης για ορισμό Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 11/11/2011

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 18/07/2012

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ιωάννης Τερροβίτης, Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
(επιβλέπων)

Ιωάννης Νανάς, Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Ευστάθιος Ηλιοδρομίτης, Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Μαρία Αναστασίου – Νανά, Καθηγήτρια Καρδιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
(επιβλέπουσα - σε αντικατάσταση του εκλιπόντος Ιωάννη Τερροβίτη)

Δέσποινα Σανούδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακογονιδιωματικής, Ιατρική
Σχολή ΕΚΠΑ (επιβλέπουσα - σε αντικατάσταση της αφυπηρητήσασας Μαρίας
Αναστασίου – Νανά)

Θεόδωρος Παπαϊωάννου, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοϊατρικής Τεχνολογίας, Ιατρική
Σχολή ΕΚΠΑ (σε αντικατάσταση του αφυπηρητήσαντος Ιωάννη Νανά)

Ημερομηνία ορισμού θέματος Διδακτορικής Διατριβής: 28/06/2013

Ημερομηνία κατάθεσης Διδακτορικής Διατριβής: 17/01/2020

Πρόεδρος Ιατρικής Σχολής

Πέτρος Σφηκάκης, Καθηγητής Παθολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Δέσποινα Σανούδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακογονιδιωματικής, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
2. Ευστάθιος Ηλιοδρομίτης, Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
3. Θεόδωρος Παπαϊωάννου, Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοϊατρικής Τεχνολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
4. Σεραφείμ Νανάς, Καθηγητής Παθολογίας – Εντατικής Θεραπείας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
5. Αριστείδης Ηλιόπουλος, Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
6. Ιωάννης Παρίσης: Καθηγητής Καρδιολογίας, Ιατρική Σχολή ΕΚΠΑ
7. Γεράσιμος Σιάσος: Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Καρδιολογίας

Η Διδακτορική Διατριβή έγινε ομόφωνα αποδεκτή με βαθμό «**ΑΡΙΣΤΑ**».



Ο ΟΡΚΟΣ ΤΟΥ ΙΠΠΟΚΡΑΤΟΥΣ

Ο 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
 ΜΙΣΑ ΤΕ ΝΕΤΗΣΙΝ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΒΙΟΥ ΚΟΙΝΩΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΧΡΕΩΝ ΧΡΗΖΟΝΤΙ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣΘΑΙ, Κ
 ΑΙ ΓΕΝΟΣ ΤΟ ΕΞ ΕΥΤΕΟΥ ΑΔΕΛΦΟΙΣ ΙΣΟΝ ΕΠΙΚΡΙΝ
 ΕΕΙΝ ΑΡΡΕΣΙ, ΚΑΙ ΔΙΔΑΞΕΙΝ ΤΗΝ ΤΕΧΝΗΝ ΤΑΥΤΗΝ,
 ΗΝ ΧΡΗΖΟΥΣΙ ΜΑΘΘΑΝΕΙΝ, ΑΝΕΥ ΜΙΣΘΟΥ ΚΑΙ ΞΥ
 ΓΓΡΑΦΗΣ, ΠΑΡΑΤΤΕΛΙΗΣ ΤΕ ΚΑΙ ΑΚΡΟΗΣΙΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ
 ΛΟΙΠΗΣ ΑΠΑΣΗΣ ΜΑΘΗΣΙΟΣ ΜΕΤΑΔΟΣΙΝ ΠΟΙΗΣΑΣ
 ΘΑΙ ΜΟΙΣΙ ΤΕ ΕΜΟΙΣΙ ΚΑΙ ΤΟΙΣΙ ΤΟΥ ΕΜΕ ΔΙΔΑΞΑΝ
 ΤΟΣ ΚΑΙ ΜΑΘΗΤΑΙΣΙ ΣΥΓΓΕΓΡΑΜΜΕΝΟΙΣΙ ΤΕ ΚΑΙ ΛΟ
 ΚΙΣΜΕΝΟΙΣ ΝΟΜΩ, ΙΗΤΡΙΚΩ, ΑΛΛΩ, ΔΕ ΟΥΔΕΜΙ.
 ΔΙΑΤΗΜΑΣΙ ΤΕ ΧΡΗΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟ
 ΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΔΥΝΑΜΙΝ ΚΑΙ ΚΡΙΣΙΝ ΕΜΗΝ, ΕΠΙ ΔΗΛΗ
 ΣΕΙ ΔΕ ΚΑΙ ΑΔΙΚΗΝ, ΕΙΡΞΕΙΝ. ΟΥ ΔΩΣΩ ΔΕ ΟΥΔΕ
 ΦΑΡΜΑΚΟΝ ΟΥΔΕΝΙ ΑΙΤΗΘΕΙΣ ΘΑΝΑΣΙΜΟΝ, ΟΥΔΕΥ
 ΦΗΤΗΣΟΜΑΙ 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 ΤΕ ΜΕΛ ΔΕ ΟΥΔΕ ΜΗΝ ΛΙΘ
 ΙΑΝΤΑΣ, ΕΚΧΛΗΡΗΣΩ ΔΕ ΕΡΓΑΤΗΣΙΝ ΑΝΔΡΑΣΙ ΠΡ
 ΕΞΙΟΣ ΤΗΣΔΕ. ΕΣ ΟΙΚΙΑΣ ΔΕ ΟΚΟΣΑΣ ΑΝ ΕΣΙΩ
 ΕΞΕΛΕΥΣΟΜΑΙ ΕΠ' ΩΦΕΛΕΙΗ, ΚΑΜΝΟΝΤΩΝ, ΕΚΤ
 ΟΣ ΕΣΩ ΠΑΣΗΣ ΑΔΙΚΗΣ ΕΚΟΥΣΙΗΣ ΚΑΙ ΦΘΟΡΙΗΣ, Τ
 ΗΣ ΤΕ ΑΛΛΗΣ ΚΑΙ ΑΦΡΟΔΙΣΙΩΝ ΕΡΓΩΝ ΕΠΙ ΤΕΣΥ
 ΝΑΙΚΕΙΩΝ ΣΩΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΑΝΔΡΩΝ, ΕΛΕΥΘΕΡ
 ΩΝ ΤΕ ΚΑΙ ΔΟΥΛΩΝ. Α Δ' ΑΝ ΕΝ ΘΕΡΑΠΕΙΑ,
 Η ΙΔΩ, Η ΑΚΟΥΣΩ, Η ΚΑΙ ΑΝΕΥ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ ΚΑΤΑ Β
 ΙΟΝ ΑΝΘΡΩΠΩΝ, Α 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
 ΤΩΝ ΔΕ ΚΑΙ ΕΠΙΟΡΚΟΥΝΤΙ, ΤΑΜΑΝΤΙΑ ΤΟΥΤΕ ΩΝ.



*Στους γονείς μου, Γιώργο και Σωτηρία
Στη Μαρία*

*Στη μνήμη του δασκάλου μου,
Ιωάννη Τερροβίτη*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	4
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	6
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	17
Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου	18
Φαινόμενο μη επαναροής και βλάβη από επαναιμάτωση	20
Από το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου στην καρδιακή ανεπάρκεια. Αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας	22
Μυοκαρδιακή αναγέννηση	23
Καρδιακά προγονικά κύτταρα	24
<i>Sca-1⁺ προγονικά κύτταρα</i>	24
<i>c-kit⁺ προγονικά κύτταρα</i>	24
<i>islet-1⁺ προγονικά κύτταρα</i>	25
<i>SSEA-1⁺ προγονικά κύτταρα</i>	25
<i>MDR1⁺ προγονικά κύτταρα</i>	26
Καρδιακά κύτταρα πλευρικού πληθυσμού	27
Προγονικά κύτταρα προερχόμενα από το επικάρδιο	27
Προγονικά κύτταρα από καρδιάσφαιρες	27
Καρδιακά προγονικά κύτταρα και κυτταρική θεραπεία μετά από OEM	29
Κυτταρική θεραπεία με CDCs – πειραματικά μοντέλα	30
Κυτταρική θεραπεία με CDCs – κλινικές μελέτες	32
Μηχανισμοί δράσης	33
Προκλήσεις κυτταρικής θεραπείας με CDCs	35
<i>Κυτταρική κατακράτηση στο μυοκάρδιο του λήπτη</i>	35

Χρήση αλλογενών κυττάρων	36
Ιδανική χρονική στιγμή χορήγησης	37
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	39
Σκοπός	40
Μέθοδοι	40
1) Πρωτόκολλο αναισθησίας	40
2) Απομόνωση και καλλιέργεια CDCs	41
3) Χειρουργικές παρασκευές	43
4) Πρωτόκολλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης και χορήγησης CDCs	47
5) Αιμοδυναμικές μετρήσεις	51
6) Υπολογισμός της έκτασης του φαινομένου μη επαναρροής	51
7) Υπολογισμός της κατακράτησης CDCs	52
8) Υπολογισμός της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου	53
9) Στατιστική ανάλυση	54
Αποτελέσματα	55
A) Προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας	55
1. Θνητότητα και συμβάματα	55
2. Αιμοδυναμικές μετρήσεις	59
3. Μορφομετρικές μετρήσεις	62
4. Κυτταρική κατακράτηση	68
B) Πειράματα αποτελεσματικότητας	70
1. Θνητότητα και συμβάματα	70
2. Αιμοδυναμικές μετρήσεις	71
3. Μορφομετρικές μετρήσεις	71

Συζήτηση	74
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	79
SUMMARY	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	83

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τη χρονική περίοδο 2013 - 2019 υπό την αιγίδα της Γ' Καρδιολογικής Κλινικής του Πανεπιστημίου Αθηνών.

Αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον εκλιπόντα επιβλέποντά μου κύριο Ιωάννη Τερροβίτη, Επίκουρο Καθηγητή Καρδιολογίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στην υλοποίηση του παρόντος έργου. Η επιστημονική αρτιότητα και το σπάνιο ήθος του καθοδήγησαν την εκπόνηση αυτής της διατριβής και, επιπλέον, διαδραμάτισαν κεντρικό ρόλο στην ιατρική μου εκπαίδευση.

Ευχαριστώ επίσης ιδιαίτερα την κυρία Μαρία Αναστασίου – Νανά, Καθηγήτρια Καρδιολογίας, για την πολύτιμη και έμπρακτη συμβολή της στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, ως επιβλέπουσα.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω θερμότατα την κυρία Δέσποινα Σανούδου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Φαρμακογονιδιωματικής, για την ανάληψη της θέσης της επιβλέπουσας και τις εποικοδομητικές επισημάνσεις που αποτέλεσαν πολύτιμη βοήθεια κατά τη συγγραφή της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον κύριο Ιωάννη Νανά, Καθηγητή Καρδιολογίας, ο οποίος καλλιέργησε την πειραματική μου σκέψη και με μύησε στην πειραματική έρευνα. Η καθοδήγησή του, ως μέλος της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, υπήρξε καθοριστική τόσο στην ολοκλήρωση του παρόντος έργου, όσο και στη γενικότερη επιστημονική μου εκπαίδευση.

Ευχαριστώ ακόμη θερμά τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, κύριο Ευστάθιο Ηλιοδρομίτη, Καθηγητή Καρδιολογίας και κύριο Θεόδωρο Παπαϊωάννου, Αναπληρωτή Καθηγητή Βιοϊατρικής Τεχνολογίας για τις υποδείξεις και τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον συνάδελφό μου κύριο Κωνσταντίνο Μαλλιάρια ο οποίος, με την εκτεταμένη εμπειρία και τη βαθιά επιστημονική του γνώση στον τομέα της κυτταρικής θεραπείας, βοήθησε τα μέγιστα στον πειραματικό σχεδιασμό και την αξιολόγηση των ερευνητικών δεδομένων. Η ολοκλήρωση του παρόντος έργου δεν θα ήταν δυνατή χωρίς τη συμβολή του.

Ομοίως, ολόθερμες ευχαριστίες οφείλω να απευθύνω προς τον επεμβατικό καρδιολόγο, κύριο Αργύριο Νταλιάνη, για την πολύτιμη αρωγή του στη διεξαγωγή των πειραμάτων, αλλά και τους συναδέλφους κύριο Λάμπρο Κατσαρό, κυρία Τιτίκα Σφακιανάκη, κύριο Διονύση Αραβαντινό, κύριο Χρήστο Κοντογιάννη και κυρία Μαρία Νανά για τη συμβολή τους στην επιτυχή εκτέλεση των πειραμάτων.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Απόστολο Παπαλόη και το προσωπικό του Ερευνητικού και Πειραματικού Κέντρου ΕΛΠΕΝ για τη βοήθειά τους στην οργάνωση και διεξαγωγή των πειραμάτων.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Γεννήθηκα το 1986 στη Λαμία. Αποφοίτησα το 2004 με βαθμό «Άριστα» (19,5/20) από το 2^ο Ενιαίο Λύκειο Λαμίας και το ίδιο έτος εισήλθα στην Ιατρική Σχολή του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, μέσω πανελληνίων εισαγωγικών εξετάσεων. Κατά τη διάρκεια της φοίτησής μου, έλαβα υποτροφία του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών από το κληροδότημα Αντωνίου Παπαδάκη για τα τρία τελευταία έτη των σπουδών μου. Αποφοίτησα τον Ιούλιο του 2010 με βαθμό «Άριστα».

Από τον Οκτώβριο του 2010 έως τον Απρίλιο του 2013 εργάστηκα ως επιστημονικός συνεργάτης στη Γ' Καρδιολογική Κλινική του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Καθηγητής κ. Ιωάννης Νανάς), όπου συμμετείχα στην παρακολούθηση ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια και σε ευρύ φάσμα ερευνητικών δραστηριοτήτων σχετικών με τη στεφανιαία νόσο και την καρδιακή ανεπάρκεια. Κατά το ανωτέρω διάστημα, έλαβα ερευνητική υποτροφία για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής από τη φαρμακευτική βιομηχανία ELPEN.

Μετά το πέρας της υποχρεωτικής υπηρεσίας υπαίθρου στο Περιφερειακό Ιατρείο Μαυρολιθαρίου του νομού Φωκίδας, εκπαιδεύτηκα στην Παθολογία από τον Ιούνιο του 2014 έως τον Φεβρουάριο του 2016 στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Η Ελπίς».

Αφού εκπλήρωσα τις στρατιωτικές μου υποχρεώσεις ως οπλίτης ιατρός στο ΣΤ.ΕΠ. Φρουράς Λαμίας, από τον Φεβρουάριο του 2017 συνεχίζω την ειδίκευσή μου στην Καρδιολογία στο «Κωνσταντοπούλειο» Γενικό Νοσοκομείο Νέας Ιωνίας.

Δημοσιεύσεις σε ξενόγλωσσα περιοδικά

1. J Terrovitis, C Kapelios, G. Sainis, A. Ntalianis, E Kaldara, **V. Sousonis**, S. Vakrou, N. Michelinakis, D. Anagnostou, Z. Margari, J. Nanas.
Elevated left ventricular filling pressures can be estimated with accuracy by a new mathematical model.
J Heart Lung Transplant. 32(5):511-7, 2013
2. **Sousonis V**, Nanas J, Terrovitis J.
Cardiosphere-derived progenitor cells for myocardial repair following myocardial infarction.
Curr Pharm Des. 2014;20(12):2003-11
3. Kapelios CJ, Kaldara E, Ntalianis A, Nana E, Pantsios C, Repasos E, Margari Z, **Sousonis V**, Malliaras K, Nanas JN.
Lowering furosemide dose in stable chronic heart failure patients with reduced ejection fraction is not accompanied by decompensation: a randomized study.
Int J Cardiol. 2014;177(2):690-2.
4. Tasoulis A, Dimopoulos S, Repasos E, Manetos C, Tzanis G, **Sousonis V**, Papazachou O, Terrovitis J, Nanas S.
Respiratory drive and breathing pattern abnormalities are related to exercise intolerance in chronic heart failure patients.
Respir Physiol Neurobiol. 2014;192:90-4
5. C. Kapelios, E. Kaldara, A. Ntalianis, **V. Sousonis**, E. Repasos, T. Sfakianaki, S. Vakrou, C. Pantsios, J. Nanas, J. Terrovitis.
High furosemide dose has detrimental effects on survival of patients with stable heart failure.
Hellenic J Cardiol. 2015 Mar-Apr;56(2):154-9
6. M. Tsamatsoulis, C.J. Kapelios, L. Katsaros, S. Vakrou, V. Sousonis, S. Sventzouri, N. Michelinakis, D.N. Perrea, M. Anastasiou-Nana, K. Malliaras
Cardioprotective effects of intracoronary administration of 4-chlorodiazepam in small and large animal models of ischemia-reperfusion.
Int J Cardiol. 2016;224:90-95
7. S. Sventzouri, I. Nanas, S. Vakrou, C. Kapelios, **V. Sousonis**, T. Sfakianaki, A. Papalois, A. Manolis, J. Nanas, K. Malliaras.

Pharmacologic inhibition of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger protects against ventricular arrhythmias in a porcine model of ischemia-reperfusion.

Hellenic J Cardiol. 2018 Jul - Aug;59(4):217-222

8. **Sousonis V**, Sfakianaki T, Ntalianis A, Nanas I, Kontogiannis C, Aravantinos D, Kapelios C, Katsaros L, Nana M, Sampatziotis D, Sanoudou D, Papalois A, Malliaras K.

Intracoronary administration of allogeneic cardiosphere-derived cells immediately prior to reperfusion in pigs with acute myocardial infarction reduces infarct size and attenuates adverse cardiac remodeling.

J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2020 doi: 10.1177/1074248420941672

Δημοσιεύσεις σε ελληνικά περιοδικά

1. **Β.Γ. Σουσώνης**, Ι.Β. Τερροβίτης

Αναστολή και αναστροφή της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας με φαρμακευτικές και κυτταρικές θεραπείες.

Καρδιολογική Γνώμη. 2012;7(4):327-331

Κεφάλαια βιβλίων

1. **Sousonis V**, Malliaras K, Terrovitis J, Nanas J. "Cell therapy in cardiac diseases." In *Introduction to translational cardiovascular research*, Dennis V. Cokkinos (ed.), Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London pp. 565-582 (2015)

Ανακοινώσεις σε διεθνή επιστημονικά συνέδρια

1. Ntalianis, E. Konstantakis, C. Kapelios, G. Sainis, **V. Sousonis**, E. Kaldara, E. Tsagalou, J. Kanakakis, J. Terrovitis, J. Nanas

The role of anemia in early left ventricular remodelling and in-hospital mortality after an acute myocardial infarction

ESC Heart Failure Congress, 2011

2. J. Terrovitis, C. Kapelios, E. Kaldara, G. Sainis, **V. Sousonis**, N. Michelinakis, S. Sventzouri, Z. Margari, A. Ntalianis, J. Nanas

High furosemide dose is an independent risk factor for mortality in patients with chronic heart failure

American College of Cardiology Congress, 2012

3. J. Terrovitis, L. Katsaros, M. Tsamatsoulis, S. Sventzouri, **V. Sousonis**, M. Bonios, C. Kapelios, S. Vakrou, A. Ntalianis, A. Papalois, B. O'Rourke, J. Nanas
Cardioprotection by stimulation of mitochondrial benzodiazepine receptors during reperfusion, in a porcine acute ischemia-reperfusion model

American College of Cardiology Congress, 2012
4. J. Terrovitis, E. Kaldara, A. Ntalianis, C. Kapelios, L. Katsaros, **V. Sousonis**, N. Michelinakis, D. Anagnostou, M. Bonios, G. Sainis, J. Nanas

Anemia correction improves prognosis in advanced heart failure patients refractory to standard medical treatment

American College of Cardiology Congress, 2012
5. **V. Sousonis**, J. Terrovitis, C. Kapelios, A. Ntalianis, E. Kaldara, N. Michelinakis, G. Sainis, Z. Margari, A. Antoniou, J. Nanas
Suppression of frequent PVCs amiodarone may be associated with left ventricular systolic function improvement in patients with heart failure

ESC Heart Failure Congress, 2012
6. C. Kapelios, E. Kaldara, **V. Sousonis**, N. Michelinakis, P. Siskas, S. Sventzouri, Z. Margari, A. Ntalianis, J. Terrovitis, J. Nanas
High furosemide dose is associated with worsening of renal function in patients with chronic heart failure independently of pre-existing chronic kidney disease

ESC Heart Failure Congress, 2012
7. N. Michelinakis, J. Terrovitis, **V. Sousonis**, C. Kapelios, E. Kaldara, A. Ntalianis, S. Sventzouri, S. Vacrou, Z. Margari, J. Nanas
The clinical course of patients with tachycardia induced cardiomyopathy is better compared to patients with idiopathic dilated cardiomyopathy

ESC Heart Failure Congress, 2012
8. C. Kapelios, J. Terrovitis, G. Sainis, **V. Sousonis**, N. Michelinakis, S. Sventzouri, S. Vacrou, E. Kaldara, J. Nanas
A method for clinical estimation of left ventricular filling pressures in patients with chronic heart failure

ESC Heart Failure Congress, 2012

9. J. Terrovitis, S. Vakrou, C. Kapelios, M. Bonios, **V. Sousonis**, S. Sventzouri, G. Nanas, N. Michelinakis, A. Ntalianis, J. Nanas

Intracoronary administration of cardiosphere derived stem cells during the acute phase of myocardial infarction results in high cell retention without worsening microvascular obstruction

ESC Congress, 2012

10. J Terrovitis, C Kapelios, E Kaldara, A Ntalianis, **V Sousonis**, T Sfakianaki, Z. Margari, J Nanas
High furosemide doses increase mortality and morbidity in stable chronic heart failure: a prospective, randomized study

American College of Cardiology Congress, 2013

11. J Terrovitis, S Sventzouri, L Katsaros, **V Sousonis**, N Michelinakis, C Kapelios, T Sfakianaki, A Ntalianis, A Papalois, J Nanas

Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger inhibition during reperfusion exhibits potential cardioprotective effect, in a Porcine Ischemia-Reperfusion Model

American College of Cardiology Congress, 2013

12. C. Kapelios, J. Terrovitis, E. Kaldara, A. Ntalianis, E. Repasos, C. Pantsios, **V. Sousonis**, T. Sfakianaki, Z. Margari, J. Nanas

Decrease of elevated PCWP is not accompanied by a benefit in mid-and long-term survival in CHF

ESC Heart Failure Congress, 2013

13. E. Repasos, J. Terrovitis, E. Kaldara, A. Ntalianis, M. Marougas, C. Kapelios, **V. Sousonis**, T. Sfakianaki, J. Boletis, J. Nanas

The prognostic implications of vascular access methods for chronic intermittent ultrafiltration, in end-stage heart failure patients with cardiorenal syndrome

ESC Heart Failure Congress, 2013

14. C. Kapelios, J. Terrovitis, E. Kaldara, A. Ntalianis, **V. Sousonis**, M. Tsamatsoulis, S. Vacrou, L. Katsaros, C. Charitos, J. Nanas

The use of dabigatran etexilate as first line anticoagulation therapy in patients with a left ventricular assist device

ESC Heart Failure Congress, 2013

15. L Karatzanos, S Dimopoulos, N Panagopoulou, G Mitsiou, **V Sousonis**, P Hatzis, C Kapelios, E Zerva, J Terrovitis, S Nanas
Differential effects of high intensity interval training protocols in chronic heart failure
ESC EuroPrevent Congress, 2013
16. A. Ntalianis, T. Sfakianaki, **V. Sousonis**, E. Repasos, M. Nana, C. Kontogiannis, L. Katsaros, A. Papalois, J. Nanas, I. Terrovitis
Intracoronary Infusion of Allogeneic Cardiosphere Derived Cells, During Acute Myocardial Infarction Delays but Eventually Does Not Limit Remodeling of the Left Ventricle
American Heart Association Scientific Sessions 2013
17. C. Kapelios, I. Terrovitis, A. Ntalianis, E. Kaldara, E. Repasos, P. Siskas, C. Kontogiannis, **V. Sousonis**, T. Sfakianaki, C. Charitos, G. Alexopoulos, J. Nanas
Intra-Aortic Balloon Pump Improves Right Ventricular Function in Patients with End-Stage Congestive Heart Failure
American Heart Association Scientific Sessions 2013
18. **V. Sousonis**, E. Kaldara, C. Pantsios, E. Repasos, C. Kapelios, E. Nana, Z. Margari, J. Nanas.
PVC suppression with amiodarone is associated with improvement in systolic function: a prospective, randomized study
ESC Heart Failure Congress, 2014
19. C. Kapelios, E. Kaldara, **V. Sousonis**, A. Ntalianis, S. Vacrou, J. Terrovitis, C. Charitos, J. Nanas
Late-onset right ventricular failure in patients on long-term mechanical support with continuous-flow LVADs
ESC Heart Failure Congress, 2014
20. **V. Sousonis**, E. Kaldara, J. Taxliampouris, C. Kapelios, C. Pantsios, E. Repasos, E. Nana, Z. Margari, J. Nanas
Adverse events in heart failure patients treated with long term administration of low dose amiodarone
ESC Heart Failure Congress, 2014

21. N Panagopoulou, S Dimopoulos, A Tasoulis, L Karatzanos, O Papazachou, G Tzani, **V Sousonis**, C Kapelios, Z Margari, S Nanas
Beneficial effects of exercise training rehabilitation in periodic breathing in chronic heart failure
ESC Heart Failure Congress, 2014

22. C. Kapelios, L. Katsaros, M. Tsamatsoulis, S. Vakrou, **V. Sousonis**, S. Sventzouri, D. Perrea, J. Nanas, K. Malliaras
Cardioprotective Effects of Intracoronary Administration of 4-Chlorodiazepam in Small and Large Animal Models of Ischemia-Reperfusion
American Heart Association Scientific Sessions 2016

23. D. Theodoridis, E. Moustafieri, D. Antonatos, **V. Sousonis**, N. Katsiadas, A. Tsifi, S. Patsilinakos, P. Paraskevopoulou
Evaluation of iron deficiency parameters in patients with heart failure
World Congress on Medical and Health Sciences 2019

Ανακοινώσεις σε ελληνικά επιστημονικά συνέδρια

1. Ε. Ρεπάσος, Ι. Τερροβίτης, Α. Νταλιάνης, Ε. Καλδάρια, Ν. Μιχελινάκης, Δ. Αναγνώστου, Ε. Κωνσταντάκης, **Β. Σουσιώνης**, Γ. Αλεξόπουλος, Ι. Κανακάκης, Ι. Νανάς
Παράγοντες αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου σε ασθενείς με τελικού σταδίου καρδιακή ανεπάρκεια που υποβάλλονται σε εμφύτευση αρτηριοφλεβικού μοσχεύματος για χρόνια διαλείπουσα αιμοδιήθηση
12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2011

2. Χ. Καπέλιος, Ν. Μιχελινάκης, Σ. Σβεντζούρη, Σ. Βάκρου, **Β. Σουσιώνης**, Δ. Αναγνώστου, Ε. Κωνσταντάκης, Γ. Σαΐνης, Ε. Καλδάρια, Α. Νταλιάνης, Ι. Τερροβίτης, Ι. Νανάς
Ταχεία αποσυμφόρηση ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια σε εξωτερική βάση με ενδοφλέβια χορήγηση φουροσεμίδης: κατά ώσεις (bolus) ή στάγδην;
12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2011

3. Ε. Κωνσταντάκης, Α. Νταλιάνης, Χ. Καπέλιος, Γ. Σαΐνης, Ν. Μιχελινάκης, Δ. Αναγνώστου, **Β. Σουσιώνης**, Ε. Καλδάρια, Ε. Τσαγάλου, Ι. Κανακάκης, Ι. Τερροβίτης, Ι. Νανάς

Η σχέση της αναιμίας σε νοσηλευόμενους ασθενείς με οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου με την έκταση του εμφράγματος και τους δείκτες φλεγμονής

12^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2011

4. Η. Ποζιός, Ι. Τερροβίτης, Λ. Κατσαρός, Ν. Διάκος, Ε. Τσέλιου, Α. Νταλιάνης, Ν. Μιχελινάκης, Σ. Σβεντζούρη, Σ. Βάκρου, **Β. Σουσιώνης**, Α. Παπαλόης, Ι. Νανάς

Η ελάττωση της αρτηριακής πίεσης βελτιώνει το συστολικό και διαστολικό δυσσυγχρονισμό της αριστεράς κοιλίας σε πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

32^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 2011

5. Ν. Μιχελινάκης, Ι. Τερροβίτης, Ε. Καλδάρα, **Β. Σουσιώνης**, Δ. Αναγνώστου, Σ. Σβεντζούρη, Χ. Καπέλιος, Σ. Βάκρου, Ε. Κωνσταντάκης, Ζ. Μάργαρη, Ι. Νανάς

Η κλινική πορεία ασθενών με ταχυμυοκαρδιοπάθεια είναι ευνοϊκότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη ασθενών με ιδιοπαθή διατακτικού τύπου μυοκαρδιοπάθεια προσφάτου ενάρξεως

32^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 2011

6. Χ. Καπέλιος, Ι. Τερροβίτης, **Β. Σουσιώνης**, Ν. Μιχελινάκης, Γ. Σαΐνης, Σ. Σβεντζούρη, Σ. Βάκρου, Ζ. Μάργαρη, Α. Νταλιάνης, Ε. Καλδάρα, Σ. Νανάς, Ι. Νανάς

Ένα προτεινόμενο μαθηματικό μοντέλο για τη μη επεμβατική εκτίμηση των πιέσεων πλήρωσης της αριστερής κοιλίας σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια

13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2012

7. **Β. Σουσιώνης**, Ι. Τερροβίτης, Χ. Καπέλιος, Α. Νταλιάνης, Ε. Καλδάρα, Ν. Μιχελινάκης, Σ. Σβεντζούρη, Σ. Βάκρου, Ζ. Μάργαρη, Α. Αντωνίου, Ι. Νανάς

Αμιωδαρόνη σε ασθενείς με κοιλιακές συστολές και επηρεασμένο κλάσμα εξωθήσεως

13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2012

8. Χ. Καπέλιος, Ι. Τερροβίτης, Ε. Καλδάρα, **Β. Σουσιώνης**, Ν. Μιχελινάκης, Π. Σίσκας, Σ. Σβεντζούρη, Σ. Βάκρου, Ζ. Μάργαρη, Α. Νταλιάνης, Τ. Σφακιανάκη, Ι. Νανάς

Η υψηλή δόση φουροσεμίδης ως προγνωστικός παράγοντας σε χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια

13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2012

9. Ε. Καλδάρα, Ι. Τερροβίτης, Χ. Καπέλιος, Σ. Σβεντζούρη, Ν. Μιχελινάκης, **Β. Σουσιώνης**, Γ. Σαΐνης, Γ. Αλεξόπουλος, Δ. Μπαρμπαρούση, Χ. Ματσούκα, Ι. Νανάς

Η θεραπεία της αναιμίας βελτιώνει την πρόγνωση στη βαρεία καρδιακή ανεπάρκεια

13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2012

10. Ι. Τερροβίτης, Ε. Καλδάρια, Χ. Καπέλιος, Σ. Σβεντζούρη, Ν. Μιχελινάκης, **Β. Σουσιώνης**, Γ. Σαΐνης, Ε. Ρεπάσος, Δ. Μπαρμπαρούση, Χ. Ματσούκα, Ι. Νανάς
Διαγνωστικός αλγόριθμος αναιμίας σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια

13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2012

11. Ν. Μιχελινάκης, Ι. Τερροβίτης, **Β. Σουσιώνης**, Χ. Καπέλιος, Ε. Καλδάρια, Α. Νταλιάνης, Σ. Σβεντζούρη, Σ. Βάκρου, Ζ. Μάργαρη, Α. Αντωνίου, Ι. Νανάς
Πρόγνωση ταχυμυοκαρδιοπάθειας σε σχέση με ιδιοπαθή διατατική μυοκαρδιοπάθεια

13^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2012

12. Ε. Ρεπάσος, Ε. Καλδάρια, Α. Νταλιάνης, Μ. Μαρούγκας, Ε. Νανά, Χ. Καπέλιος, **Β. Σουσιώνης**, Τ. Σφακιανάκη, Ι. Μπολέτης, Ι. Τερροβίτης, Ι. Νανάς
Μέθοδος αγγειακής προσπέλασης και επιβίωση ασθενών με καρδιονεφρικό σύνδρομο

14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2013

13. **Β. Σουσιώνης**, Α. Νταλιάνης, Τ. Σφακιανάκη, Μ. Αθ. Νανά, Λ. Κατσαρός, Μ. Τσαματσούλης, Σ. Βάκρου, Α. Παπαλόης, Μ. Αναστασίου-Νανά, Ι. Νανάς
Ασφαλής ενδοστεφανιαία χορήγηση καρδιακών προγονικών κυττάρων στο οξύ έμφραγμα

14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2013

14. Χ. Καπέλιος, Ε. Καλδάρια, Α. Νταλιάνης, **Β. Σουσιώνης**, Μ. Τσαματσούλης, Σ. Βάκρου, Λ. Κατσαρός, Χ. Χαρίτος, Ι. Τερροβίτης, Ι. Νανάς
Dabigatran ως αντιπηκτική αγωγή σε ασθενείς με συσκευή υποβοήθησης της αριστερής κοιλίας

14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2013

15. **Β. Σουσιώνης**, Ε. Ρεπάσος, Χ. Πάντσιος, Ε. Καλδάρια, Ζ. Μάργαρη, Α. Νταλιάνης, Τ. Σφακιανάκη, Χ. Καπέλιος, Α. Αντωνίου, Ι. Τερροβίτης, Ι. Νανάς
Αμιωδαρόνη σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και πολλαπλές κοιλιακές έκτακτες συστολές μια προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη

14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2013

16. Χ. Καπέλιος, Ε. Καλδάρια, Α. Νταλιάνης, **Β. Σουσιώνης**, Τ. Σφακιανάκη, Χ. Πάντσιος, Ε. Ρεπάσος, Ζ. Μάργαρη, Ι. Τερροβίτης, Ι. Νανάς

Η Ελάττωση της πίεσης ενσφήνωσης δεν βελτιώνει την πρόγνωση στη χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια

14^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2013

17. Α. Νταλιάνης, Τ. Σφακιανάκη, **Β. Σουσιώνης**, Ε. Ρεπάσος, Μ. Νανά, Χ. Κοντογιάννης, Λ. Κατσαρός, Α. Παπαλόης, Ι. Νανάς, Ι. Τερροβίτης

Χορήγηση αλλογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων με σκοπό τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά από οξύ έμφραγμα μυοκαρδίου

34^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 2013

18. Ε. Νανά, Π. Πιτυχούτης, **Β. Σουσιώνης**, Δ. Αρβανίτης, R. Bouchan, P. Barton, M. Yacoub, Ι. Νανάς, Ι. Τερροβίτης

Εφαρμογή νέων τεχνολογιών στην σφαιρική διερεύνηση του γενετικού υποστρώματος της διατακτικής μυοκαρδιοπάθειας

34^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 2013

19. Χ. Καπέλιος, **Β. Σουσιώνης**, Α. Νταλιάνης, Σ. Βάκρου, Ε. Καλδάρα, Μ. Τσαματσούλης, Σ. Θεοδωρόπουλος, Χ. Χαρίτος, Ι. Νανάς, Ι. Τερροβίτης

Όψιμη εμφάνιση δεξιάς καρδιακής ανεπάρκειας σε ασθενείς υπό μακροχρόνια μηχανική υποβοήθηση της αριστερής κοιλίας

34^ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο, 2013

20. **Β. Σουσιώνης**, Ε. Καλδάρα, Χ. Πάντσιος, Ε. Ρεπάσος, Χ. Καπέλιος, Ζ. Μάργαρη, Ι. Νανάς

Βελτίωση του δυσσυγχρονισμού με αμιωδαρόνη – προοπτική τυχαίοποιημένη μελέτη

15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2014

21. **Β. Σουσιώνης**, Ε. Καλδάρα, Ι. Ταχλιαμπούρης, Χ. Καπέλιος, Χ. Πάντσιος, Ε. Ρεπάσος, Ε. Νανά, Ζ. Μάργαρη, Ι. Νανάς

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

15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Καρδιακής Ανεπάρκειας, 2014

22. Σ. Σβεντζούρη, Γ. Νανάς, Τ. Σφακιανάκη, **Β. Σουσιώνης**, Δ. Αραβαντινός, Ε. Βλάρας, Χ. Καπέλιος, Α. Παπαλόης, Κ. Μαλλιάρης, Ι. Νανάς

Η φαρμακολογική αναστολή της μιτοχονδριακής αντλίας Na^+/Ca^{2+} σε ισχαιμικό μυοκάρδιο προστατεύει έναντι των κοιλιακών αρρυθμιών σε παρακλινικό μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης

- 23.** Κ. Κιντής, Χ. Μαντής, Λ. Κυριάκου, Α. Ιβάνος, Κ. Κούρτης, Γ. Μηνιασή, Α. Κολλόκας, Χ. Λεσγίδης, Λ. Κατσαρός, **B. Σουσιώνης**, Κ. Συρμαλή, Ν. Κατσιάδας, Ε. Λάμπας, Σ. Πατσιλινάκος
Η αποτελεσματικότητα και η έκθεση στην ακτινοβολία των 4 French διαγνωστικών καθετήρων κατά την στεφανιογραφία μέσω κερκιδικής προσπέλασης

3ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Καρδιά Διαβήτη & Μυοσκελετικό, 2018

- 24.** Κ. Κιντής, Χ. Μαντής, Λ. Κυριάκου, Α. Ιβάνος, Κ. Κούρτης, Γ. Μηνιασή, Α. Κολλόκας, Χ. Λεσγίδης, Λ. Κατσαρός, **B. Σουσιώνης**, Κ. Συρμαλή, Ν. Κατσιάδας, Ε. Λάμπας, Σ. Πατσιλινάκος
Ενδιαφέρουσα περίπτωση θρόμβου αριστερής κοιλίας με πολλαπλές αρτηριακές εμβολές μετά από έμφραγμα μυοκαρδίου τύπου 5

3ο Μετεκπαιδευτικό Συνέδριο Καρδιά Διαβήτη & Μυοσκελετικό, 2018

- 25.** Λ. Λουγκοβόη, **B. Σουσιώνης**, Ε. Καστρινέλλη, Α. Γεωργιάδου, Δ. Αντωνάτος, Ν. Κατσιάδας, Σ. Πατσιλινάκος, Π. Παρασκευοπούλου
Εκτίμηση βιοχημικών παραμέτρων σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια

8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοχημείας 2019

- 26.** Ε. Μουσταφέρη, Δ. Θεοδωρίδης, Δ. Αντωνάτος, **B. Σουσιώνης**, Μ. Σκούρα, Ν. Κατσιάδας, Σ. Πατσιλινάκος, Π. Παρασκευοπούλου
Εκτίμηση δεικτών σιδηροπενικής αναιμίας σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια

8ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ιατρικής Βιοχημείας 2019

- 27.** Χ. Μαντής, Κ. Κιντής, Α. Αναδιώτης, Χ. Λεσγίδης, Λ. Κατσαρός, **B. Σουσιώνης**, Σ. Πατσιλινάκος
Οι επιπτώσεις της νεφρικής δυσλειτουργίας σε ασθενείς με απορρύθμιση καρδιακής ανεπάρκειας

40ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο 2019

- 28.** Κ. Κιντής, Χ. Λεσγίδης, Α. Αναδιώτης, **B. Σουσιώνης**, Λ. Κατσαρός, Σ. Πατσιλινάκος
Η θεραπευτική αγωγή ασθενών με καρδιακή ανεπάρκεια μετά από επεισόδιο οξείας απορρύθμισης: δεδομένα ενός κέντρου.

40ο Πανελλήνιο Καρδιολογικό Συνέδριο 2019

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου

Ο όρος οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) αποδίδεται σε περιπτώσεις οξείας μυοκαρδιακής βλάβης στα πλαίσια κλινικά αποδεδειγμένης οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας¹. Συνοδεύεται από αύξηση ή/και ελάττωση των τιμών των καρδιακών βιοδεικτών στο αίμα (κατά προτίμηση της καρδιακής τροπονίνης) με ανεύρεση μίας τουλάχιστον τιμής πάνω από την 99^η εκατοστιαία θέση της ανώτερης τιμής αναφοράς σε συνδυασμό με ένα από τα παρακάτω:

- Συμπτώματα μυοκαρδιακής ισχαιμίας.
- Νέες ηλεκτροκαρδιογραφικές ισχαιμικές αλλοιώσεις.
- Ανάπτυξη παθολογικών κυμάτων Q στο ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ).
- Απεικονιστική απόδειξη νέας απώλειας μυοκαρδιακού ιστού ή νεοεμφανιζόμενες διαταραχές της τμηματικής κινητικότητας.
- Παρουσία ενδοαγγειακού θρόμβου κατά την αγγειογραφία ή την νεκροψία.

Ως OEM θεωρούνται επίσης οι περιπτώσεις καρδιακού θανάτου με συμπτώματα ενδεικτικά μυοκαρδιακής ισχαιμίας και νέες ή πιθανώς νεοεμφανιζόμενες ηλεκτροκαρδιογραφικές ισχαιμικές αλλοιώσεις προτού προλάβουν να καθοριστούν ή να αυξηθούν οι καρδιακοί βιοδείκτες, οι περιπτώσεις εμφράγματος του μυοκαρδίου σχετιζόμενες με διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση (percutaneous coronary intervention – PCI) ή τη θρόμβωση στεφανιαίας ενδοπρόθεσης (stent), καθώς και οι σχετιζόμενες με επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης.

Κοινός παθοφυσιολογικός μηχανισμός στο OEM είναι η αναντιστοιχία μεταξύ των μεταβολικών αναγκών του μυοκαρδίου σε οξυγόνο και της μυοκαρδιακής αιμάτωσης η οποία οδηγεί σε ισχαιμική νέκρωση των μυοκαρδιακών κυττάρων². Η οξεία ισχαιμική προσβολή είναι συχνότερα αποτέλεσμα στεφανιαίας νόσου και θρόμβωσης του αυλού των στεφανιαίων αγγείων³. Η ρήξη της ευάλωτης αθηρωματικής πλάκας αποτελεί τη συχνότερη αιτία θρόμβωσης των στεφανιαίων αρτηριών. Η διάσπαση της λεπτής ινώδους κάψας εκθέτει το θρομβογόνο λιπώδη πυρήνα της πλάκας στην αιματική κυκλοφορία και επάγει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων ενεργοποιώντας τον καταρράκτη της πήξης. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία θρόμβου ο οποίος φράσει πλήρως ή μερικώς τον στεφανιαίο αυλό⁴. Για κλινικούς λόγους που σχετίζονται με τη διαστρωμάτωση κινδύνου και τη στρατηγική θεραπευτικής αντιμετώπισης, οι ασθενείς με OEM διακρίνονται σε όσους

παρουσιάζουν ανύψωση του διαστήματος ST στο ΗΚΓ και οι οποίοι συνήθως εμφανίζουν πλήρη απόφραξη του αυλού της υπεύθυνης στεφανιαίας αρτηρίας που απαιτεί άμεση επαναιμάτωση είτε με πρωτογενή αγγειοπλαστική είτε με θρομβόλυση (ST Elevation Myocardial Infarction – STEMI)⁵ και σε όσους δεν παρουσιάζουν ανύψωση του διαστήματος ST και στους οποίους η απόφραξη του αυλού της υπεύθυνης στεφανιαίας αρτηρίας είναι συνήθως μερική (non ST elevation myocardial infarction – NSTEMI)⁶.

Η επίπτωση του OEM στις ΗΠΑ υπολογίζεται σε 805000 περιπτώσεις ετησίως με τον επιπολασμό να κυμαίνεται στο 3% για το χρονικό διάστημα 2013-2016⁷. Στο Ηνωμένο Βασίλειο κατά το έτος 2013 ο επιπολασμός του OEM ήταν 2,46% για τους άντρες και 0,87% για τις γυναίκες⁸, ενώ η επίπτωσή του κυμαίνεται από 90 έως 312 νέες περιπτώσεις ανά 100000 κατοίκους ετησίως στις χώρες της Ευρώπης^{9,10}. Διαχρονικά καταγράφεται μείωση της επίπτωσης των STEMI και ελαφρά αύξηση των NSTEMI¹¹. Παρότι η έγκαιρη επαναιμάτωση του μυοκαρδίου με τη χρήση της πρωτογενούς αγγειοπλαστικής έχει συμβάλει σημαντικά στη μείωση των θανάτων από OEM τα τελευταία χρόνια¹¹⁻¹³, η συνολική ενδονοσοκομειακή θνητότητα του STEMI στις χώρες της Ευρώπης κυμαίνεται από 3% έως 10%^{14,15}, ενώ η θνητότητα στις 30 ημέρες υπολογίζεται στο 7,3% και το 8,4% για τους ασθενείς με STEMI και NSTEMI αντίστοιχα¹⁰.

Σε κυτταρικό επίπεδο η παρατεινόμενη ισχαιμία του μυοκαρδίου οδηγεί σε θάνατο των μυοκαρδιακών κυττάρων μέσω νέκρωσης και απόπτωσης². Η απελευθέρωση μορίων με προφλεγμονώδη δράση (πρωτεΐνες θερμικού σοκ, πρωτεΐνες S100 και HMGB1, εξωκυττάριο RNA, ιντερλευκίνη 1α, νουκλεοτίδια) πυροδοτεί μία άσηπτη φλεγμονώδη αντίδραση που οδηγεί σε διήθηση του ισχαιμικού μυοκαρδίου από λευκοκύτταρα και απομάκρυνση των νεκρών μυοκαρδιακών κυττάρων μέσω φαγοκυττάρωσης¹⁶⁻¹⁹. Η απομάκρυνση των νεκρών κυττάρων και η έκφραση αντιφλεγμονωδών κυτταροκινών έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή της φλεγμονώδους απάντησης²⁰. Τα σήματα αυτά προάγουν επίσης την νεοαγγειογένεση²¹ και την ενεργοποίηση καρδιακών ινοβλαστών για την παραγωγή κολλαγόνου και την τελική δημιουργία ουλής²².

Φαινόμενο μη επαναρροής και βλάβη από επαναιμάτωση

Μετά την αποκατάσταση της βατότητας του υπεύθυνου επικαρδιακού αγγείου (πρωτογενής αγγειοπλαστική, θρομβόλυση) η επαναιμάτωση του ισχαιμικού μυοκαρδίου εξαρτάται από την ακεραιότητα της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας. Ως φαινόμενο μη επαναρροής (no-reflow phenomenon) ορίζεται η ατελής και ανομοιογενής επαναιμάτωση μιας περιοχής του μυοκαρδίου σε επίπεδο μικροκυκλοφορίας παρά την αποκατάσταση της βατότητας και της αιματικής ροής στο επικαρδιακό αγγείο που την αρδεύει μετά από ένα OEM²³.

Μετά από παρατεταμένη ισχαιμία που ακολουθείται από επαναιμάτωση παρατηρείται ένα σύνολο δομικών αλλοιώσεων στη μικροκυκλοφορία οι οποίες εμποδίζουν την αποκατάσταση της αιμάτωσης σε κυτταρικό επίπεδο. Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας, επέρχεται αύξηση της διαπερατότητας των στεφανιαίων τριχοειδών, συνεπεία ισχαιμικής βλάβης του ενδοθηλίου. Αποτέλεσμα είναι η δημιουργία οιδήματος στο διάμεσο ιστό το οποίο προκαλεί συμπίεση των αγγείων της μικροκυκλοφορίας²⁴. Επιπλέον, σε μυοκαρδιακές περιοχές μη επαναρροής τα ενδοθηλιακά κύτταρα εμφανίζονται εξοιδημένα, με ευμεγέθεις προσεκβολές εντός του τριχοειδικού αυλού, οι οποίες σε ορισμένες περιπτώσεις οδηγούν στην απόφραξη του²⁵. Παράλληλα, η ισχαιμική προσβολή οδηγεί σε αναστολή της αντλίας Na^+/K^+ και σε οίδημα των μυοκαρδιακών κυττάρων που επιτείνει τη συμπίεση της μικροκυκλοφορίας^{26,27}. Κατά την επαναιμάτωση, η σύσπαση των μυοκαρδιακών κυττάρων φαίνεται επίσης να συμβάλει στη συμπίεση των τριχοειδικών στεφανιαίων αγγείων²⁸. Η επαναιμάτωση συνδέεται επίσης με την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ενεργών ριζών οξυγόνου οι οποίες προκαλούν καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης και δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων. Ως αποτέλεσμα, το οίδημα των μυοκαρδιακών κυττάρων και η προκαλούμενη από αυτό συμπίεση των στεφανιαίων τριχοειδών επιτείνονται, ενώ αρκετά μυοκαρδιακά κύτταρα οδηγούνται σε κυτταρικό θάνατο (βλάβη από επαναιμάτωση)²⁹⁻³¹. Επιπρόσθετα, η συσσώρευση αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και ινικής μπορεί να προκαλέσει απόφραξη του αυλού των στεφανιαίων τριχοειδών συμβάλλοντας με τον τρόπο αυτό στην εμφάνιση περιοχών μη επαναρροής³²⁻³⁴. Μέσω των παραπάνω παθοφυσιολογικών μηχανισμών, κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας σχηματίζονται ορισμένες αρχικές περιοχές μη επαναρροής εξαιτίας της βλάβης του ενδοθηλίου και του οιδήματος των μυοκαρδιακών κυττάρων,

οι οποίες, κατά την επαναιμάτωση, με το επιπλέον οίδημα, τη μυοκαρδιακή σύσπαση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, ινικής και λευκοκυττάρων αυξάνονται σταδιακά σε μέγεθος και αριθμό.

Το φαινόμενο μη επαναρροής αποτελεί μία δυναμική διαδικασία. Σε πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης σε σκύλους, μυοκαρδιακή ισχαιμία διάρκειας 40 λεπτών δεν συνοδεύτηκε από εμφάνιση περιοχών μη επαναρροής μετά την επαναιμάτωση, ενώ η παράτασή της για 90 λεπτά οδήγησε σε ανομοιογενή επαναιμάτωση με την εμφάνιση ζωνών μη επαναρροής στην υπενδοκαρδιακή, αρχικά, στοιβάδα του μυοκαρδίου²⁵. Με βάση αυτές τις παρατηρήσεις, είναι σαφές ότι υπάρχει ελάχιστη διάρκεια ισχαιμίας η οποία απαιτείται για την εγκατάσταση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που οδηγούν στην εμφάνιση του φαινομένου. Πέραν αυτής της διάρκειας η έκταση του φαινομένου συνεχώς αυξάνεται³⁵.

Άλλοι παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την έκταση του φαινομένου μη επαναρροής είναι η έκταση του εμφράγματος και η διάρκεια της επαναιμάτωσης. Είναι γνωστό από πειραματικές μελέτες ότι το φαινόμενο μη επαναρροής αυξάνεται με την αύξηση της έκτασης του εμφράγματος, υποδηλώνοντας ότι η ισχαιμική νέκρωση αποτελεί τον κύριο ρυθμιστή του φαινομένου³⁶⁻³⁸. Υποστηρίζεται ότι απαιτείται έμφρακτο τουλάχιστον 20% της περιοχής υπό κίνδυνο ώστε να ανιχνευθούν ζώνες μη επαναρροής³⁹. Η έκταση του φαινομένου μη επαναρροής αυξάνεται επίσης με την πάροδο της επαναιμάτωσης, αποτυπώνοντας την επίδραση της βλάβης από επαναιμάτωση στη μικροκυκλοφορία. Σε πειραματικό μοντέλο κονίκλων η περιοχή μη επαναρροής μετά από μυοκαρδιακή ισχαιμία αυξάνεται από 12,2% της υπό κίνδυνο περιοχής στα 2 πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης σε 30,8% και 34,9% στις 2 και 8 ώρες αντίστοιχα, ενώ η αιματική ροή στην εν λόγω περιοχή του μυοκαρδίου ακολουθεί φθίνουσα πορεία έπειτα από μία υπεραιμική φάση κατά τα πρώτα λεπτά της επαναιμάτωσης³⁷. Παρόμοια είναι η πορεία του φαινομένου μη επαναρροής προϊόντος του χρόνου και σε άλλα πειραματικά μοντέλα, ενώ σταδιακά εξαπλώνεται από την υπενδοκαρδιακή στην υποεπικαρδιακή στιβάδα του μυοκαρδίου^{25,39,40}. Περιοχές μη επαναρροής μπορούν να ανιχνευθούν με τη χρήση μαγνητικού συντονισμού σε ασθενείς μέχρι και ένα μήνα μετά από OEM⁴¹.

Η εμφάνιση φαινομένου μη επαναρροής αποτελεί δυσμενή προγνωστικό παράγοντα σε ασθενείς μετά από OEM. Συνδέεται με αυξημένη επίπτωση κοιλιακών

αρρυθμιών και καρδιακής ανεπάρκειας και αποτελεί ανεξάρτητο προγνωστικό δείκτη καρδιακού θανάτου⁴².

Από το οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου στην καρδιακή ανεπάρκεια. Αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας.

Η απώλεια λειτουργικού μυοκαρδιακού ιστού και η δημιουργία ουλής μετά από ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου οδηγούν σε μεταβολές των συνθηκών φόρτισης της αριστερής κοιλίας και σε ενεργοποίηση του νευροορμονικού άξονα^{43,44}. Μέσω μίας διαδικασίας η οποία είναι γνωστή ως αναδιαμόρφωση (remodeling)⁴⁵⁻⁴⁷, η αριστερή κοιλία υπόκειται σε ένα σύνολο γεωμετρικών και κυτταρικών μεταβολών που χαρακτηρίζονται από διάταση της κοιλότητας και σφαιρική διαμόρφωση αυτής, λέπτυνση των εμφραχθέντων μυοκαρδιακών τμημάτων, καθώς επίσης υπερτροφία και ίνωση του βιώσιμου μυοκαρδίου⁴⁸. Η διεργασία της αναδιαμόρφωσης αποτελεί μία αντιρροπιστική διαδικασία ώστε να διατηρηθεί επαρκής καρδιακή παροχή μετά από απώλεια λειτουργικού μυοκαρδιακού ιστού μέσω της αύξησης του όγκου παλμού⁴³. Μακροπρόθεσμα ωστόσο, η διάταση της αριστερής κοιλίας σχετίζεται με περαιτέρω επιδείνωση της συστολικής καρδιακής λειτουργίας και συνδέεται με αυξημένη θνητότητα, αυξημένη επίπτωση κοιλιακών αρρυθμιών και χειρότερη πρόγνωση των ασθενών μετά από OEM^{43,49-51}. Υπολογίζεται ότι, παρά την έγκαιρη επαναιμάτωση με πρωτογενή αγγειοπλαστική και τη σύγχρονες φαρμακευτικές θεραπείες, έως και 30% των ασθενών θα έχουν αναπτύξουν καρδιακή ανεπάρκεια στα πέντε έτη μετά από ένα OEM⁵²⁻⁵⁴.

Μυοκαρδιακή αναγέννηση

Η ενδογενής ικανότητα του καρδιακού ιστού για αναγέννηση αποτέλεσε αντικείμενο επιστημονικής αντιπαράθεσης για δεκαετίες. Παραδοσιακά, το ανθρώπινο μυοκάρδιο θεωρούταν ένα τελικώς διαφοροποιημένο όργανο χωρίς ικανότητα δημιουργίας νέων μυοκαρδιακών κυττάρων. Μυοκαρδιακή αναγέννηση μετά από εκτομή μυοκαρδιακού ιστού είχε αναγνωριστεί μόνο σε κατώτερα σπονδυλωτά είδη, όπως στους τελεόστεους ιχθύες⁵⁵ και τα ουροδελή αμφίβια⁵⁶. Χαρακτηριστικά, το ψάρι ζέβρα (zebra fish, *Danio rerio*) εμφανίζει ικανότητα μυοκαρδιακής αναγέννησης μετά από εκτομή έως και 20% της κοιλίας επιτυγχάνοντας επούλωση της βλάβης χωρίς τη δημιουργία ουλώδους ιστού⁵⁷. Η ικανότητα αυτή φαίνεται ότι επιτυγχάνεται μέσω του πολλαπλασιασμού προϋπάρχοντων μυοκαρδιακών κυττάρων⁵⁷. Παρόμοια δυνατότητα διατηρείται και σε μικρά θηλαστικά (μύες) την πρώτη ημέρα μετά τη γέννηση, χάνεται ωστόσο πλήρως κατά την πρώτη εβδομάδα της νεογνικής ζωής⁵⁸.

Πειραματικές μελέτες έχουν πλέον αναδείξει την ύπαρξη μυοκαρδιακής αναγέννησης σε ενήλικα θηλαστικά. Υπολογίζεται ότι τα μυοκαρδιακά κύτταρα του μυός ανανεώνονται σε ποσοστό που κυμαίνεται από λιγότερο του 1% έως και 4% ετησίως και το οποίο αυξάνεται μετά από μυοκαρδιακή βλάβη⁵⁹⁻⁶¹. Ο βασικός αυτός ρυθμός ανανέωσης επιτυγχάνεται με την επανείσοδο στον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό προϋπάρχοντων μυοκαρδιακών κυττάρων⁶⁰⁻⁶¹. Βασιζόμενοι στη σήμανση του DNA των μυοκαρδιακών κυττάρων με ¹⁴C σε νεκροτομικό υλικό (τα επίπεδα ¹⁴C στην ατμόσφαιρα αυξήθηκαν ραγδαία μετά το 1955 εξαιτίας των πυρηνικών δοκιμών κατά τη διάρκεια του ψυχρού πολέμου), οι Bergmann και συν., σε μία πρωτοποριακή μελέτη, υπολόγισαν ότι τα μυοκαρδιακά κύτταρα στον άνθρωπο ανανεώνονται σε ποσοστό περίπου 1% κατά έτος στην ηλικία των 20 ετών, το οποίο μειώνεται σε 0,3% στην ηλικία των 75 ετών⁶². Στην ηλικία των 50 ετών μόνο το 60% των μυοκαρδιακών κυττάρων προέρχονται από τη στιγμή της γέννησης ενός ανθρώπου, με το υπόλοιπο 40% να υπολογίζεται ότι έχει προκύψει από μυοκαρδιακή ανανέωση κατά την πορεία της ζωής του. Ο ρυθμός μυοκαρδιακής ανανέωσης όμως είναι εξαιρετικά χαμηλός και δεν επαρκεί ώστε να αναπληρώσει την απώλεια λειτουργικού μυοκαρδιακού ιστού μετά από μία μείζονα καρδιακή βλάβη, όπως ένα OEM. Η ανάδειξη ωστόσο της ικανότητας του ανθρώπινου μυοκαρδίου για ανανέωση

αποτέλεσε το έναυσμα για εκτεταμένη έρευνα στο πεδίο της κυτταρικής θεραπείας για μυοκαρδιακή αναγέννηση.

Καρδιακά προγονικά κύτταρα

Τα τελευταία χρόνια αρκετές μελέτες υποστηρίζουν ότι η καρδιά των ενήλικων θηλαστικών διαθέτει τη δική της δεξαμενή από αρχέγονα προγονικά κύτταρα. Διάφοροι πληθυσμοί καρδιακών προγονικών κυττάρων έχουν προταθεί με βάση την έκφραση αντιγόνων επιφανείας ή την εμφάνιση λειτουργικών ιδιοτήτων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην αναγνώριση προγονικών πληθυσμών σε άλλα όργανα. Ο μεγάλος αριθμός διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών με προγονικά χαρακτηριστικά που έχουν περιγραφεί και παρατίθενται παρακάτω δε συμβαδίζει με την περιορισμένη ικανότητα αναγέννησης του ενήλικου μυοκαρδίου. Οι διαφορετικοί αυτοί πληθυσμοί είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν διαφορετικά στάδια στην πορεία της ανάπτυξης και διαφοροποίησης των καρδιακών στελεχιαίων κυττάρων.

Sca-1⁺ προγονικά κύτταρα

Μικρά διάμεσα κύτταρα που εκφράζουν στην επιφάνειά τους το αντιγόνο 1 των στελεχιαίων κυττάρων (stem cell antigen-1 - Sca-1) έχουν περιγραφεί στο ενήλικο μυοκάρδιο μυών⁶³. Διαθέτουν την ικανότητα έκφρασης καρδιακών γονιδίων, καρδιακών συσταλτών πρωτεϊνών και παρουσιάζουν τροπισμό για το τραυματισμένο μυοκάρδιο μετά από ενδοφλέβια χορήγησή τους σε πειραματόζωα⁶³⁻⁶⁵. Παρότι δεν έχει αναγνωριστεί ανθρώπινο ανάλογο του αντιγόνου Sca-1, με τη χρήση παρόμοιας μεθόδου έχουν απομονωθεί και από το ανθρώπινο μυοκάρδιο κύτταρα με δυνατότητα έκφρασης πρώιμων για τη μυοκαρδιακή σειρά μεταγραφικών παραγόντων (GATA-4, Mef2c, Nkx-2.5) και διαφοροποίησης σε μυοκαρδιακά κύτταρα *in vitro*⁶⁶.

c-kit⁺ προγονικά κύτταρα

Κύτταρα θετικά για το αντιγόνο επιφανείας CD117, (c-kit, τον υποδοχέα για τον παράγοντα των στελεχιαίων κυττάρων – stem cell factor) έχουν απομονωθεί από το ανθρώπινο μυοκάρδιο ενηλίκων^{67,68}. Στους επίμυες, μικρές ομάδες c-kit⁺ κυττάρων

ανιχνεύονται στο διάμεσο ιστό ανάμεσα σε πλήρως διαφοροποιημένα μυοκαρδιακά κύτταρα⁶⁹. Πρόκειται για κύτταρα μη αιματολογικής προέλευσης, τα οποία εκφράζουν και άλλα αντιγόνα επιφανείας στελεχιαίων κυττάρων (Sca-1, MDR-1) καθώς επίσης και μεταγραφικούς παράγοντες πρώιμης μυοκαρδιακής διαφοροποίησης (GATA-4, Nkx-2.5)⁶⁸. *In vitro*, τα c-kit⁺ κύτταρα έχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης και σχηματισμού κυτταρικών κλώνων, ενώ μπορούν επίσης να διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά, μυοκαρδιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, παρότι ανώριμα. *In vivo*, η χορήγηση c-kit⁺ προγονικών κυττάρων σε πειραματικά μοντέλα μυοκαρδιακής ισχαιμίας σχετίζεται με βελτίωση της λειτουργικότητας και περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας μετά από OEM^{68,70,71}. Η μελέτη SCIPPIO αποτέλεσε την πρώτη κλινική μελέτη για τη χορήγηση c-kit⁺ καρδιακών προγονικών κυττάρων σε ασθενείς με ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια μετά από χειρουργική επέμβαση αορτοστεφανιαίας παράκαμψης⁷². Η ενδοστεφανιαία χορήγηση των c-kit⁺ καρδιακών κυττάρων είχε ως αποτέλεσμα τη βελτίωση τόσο της τμηματικής όσο και της συνολικής συσπαστικότητας της αριστερής κοιλίας, τη μείωση της έκτασης του εμφράγματος και την αύξηση του βιώσιμου μυοκαρδιακού ιστού σε μαγνητική τομογραφία καρδιάς, 12 μήνες μετά τη χορήγησή τους.

Islet-1⁺ προγονικά κύτταρα

Πρόκειται για κύτταρα τα οποία εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα islet-1, ο οποίος παίζει σημαντικό ρόλο στην εμβρυϊκή μυοκαρδιακή διαφοροποίηση και ανάπτυξη⁷³. Islet-1⁺ κύτταρα μπορούν να ανευρεθούν στο μυοκάρδιο μύων, επίμυων και ανθρώπων, νεογνικής κυρίως ηλικίας και έχουν τη δυνατότητα διαφοροποίησης *in vitro* σε μυοκαρδιακά, λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα^{74,75}. Παρόλα αυτά, η εμβρυϊκή και νεογνική κυρίως προέλευση των islet-1⁺ προγονικών κυττάρων εγείρει ηθικούς προβληματισμούς σχετικά με τη χρήση του συγκεκριμένου κυτταρικού πληθυσμού για θεραπευτικές παρεμβάσεις.

SSEA-1⁺ προγονικά κύτταρα

Κύτταρα τα οποία εκφράζουν το εμβρυϊκό αντιγόνο SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen 1) έχουν περιγραφεί σε επίμυες⁷⁶ και στο νεογνικό ανθρώπινο

μυοκάρδιο⁷⁷. Στο νεογνικό μυοκάρδιο εκφράζουν πρώιμους καρδιακούς δείκτες (GATA-4, Nkx-2.5) υποδηλώνοντας ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο ως προγονικά καρδιακά κύτταρα, ενώ στο ενήλικο μυοκάρδιο προσομοιάζουν περισσότερο σε εμβρυϊκά στελεχιαία κύτταρα. Μετά από καλλιέργεια με τους κατάλληλους παράγοντες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μυοκαρδιακά, λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα⁷⁶. Η μελέτη CAREMI, αποτέλεσε μία κλινική μελέτη φάσης I/II, στην οποία αλλογενή καρδιακά προγονικά κύτταρα χορηγήθηκαν σε ασθενείς με μέτριο προς αυξημένο κίνδυνο εκδήλωσης καρδιακής ανεπάρκειας (κλάσμα εξώθησης αριστερής κοιλίας $\leq 45\%$ και έκταση εμφράγματος $\geq 25\%$ της μάζας της αριστερής κοιλίας), 5-7 ημέρες μετά από OEM και επιτυχή επαναιμάτωση του υπεύθυνου στεφανιαίου αγγείου με πρωτογενή αγγειοπλαστική⁷⁸. Παρότι ετερογενής, ο κυτταρικός πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε περιείχε SSEA-1⁺ προγονικά κύτταρα σε ποσοστό 20,1 – 34,9% και σχεδόν καθόλου c-kit⁺ κύτταρα ($< 0,7\%$)⁷⁹. Δεν παρατηρήθηκαν σοβαρά ανεπιθύμητα καρδιακά συμβάματα ή ανεπιθύμητα συμβάματα ανοσολογικής αντίδρασης στους ασθενείς που έλαβαν θεραπεία με αλλογενή καρδιακά προγονικά κύτταρα. Παράλληλα, παρατηρήθηκε μείωση στην έκταση του εμφράγματος κατά 15,6% στην ομάδα των καρδιακών προγονικών κυττάρων έναντι 13,3% στην ομάδα ελέγχου, όπως υπολογίστηκε με τη χρήση μαγνητικού συντονισμού ένα χρόνο μετά τη χορήγηση⁷⁹. Παρότι σε πρώιμο στάδιο, η κυτταρική θεραπεία με SSEA-1⁺ καρδιακά προγονικά κύτταρα μετά από OEM φαίνεται να σχετίζεται με μείωση της έκτασης του εμφράγματος.

MDR1⁺ προγονικά κύτταρα

Πρόκειται για κύτταρα τα οποία έχουν απομονωθεί από μυοκάρδιο ενήλικων θηλαστικών και εκφράζουν το αντιγόνο MDR1 των στελεχιαίων κυττάρων, ενώ παράλληλα χαρακτηρίζονται από ικανότητα αυτοανανέωσης και διαφοροποίησης σε μυοκαρδιακά κύτταρα⁸⁰. Ο αριθμός τους έχει φανεί ότι αυξάνεται στο ανθρώπινο μυοκάρδιο μετά από OEM ή σε ασθενείς με χρόνια ισχαιμική μυοκαρδιοπάθεια υποδηλώνοντας τη συμμετοχή τους σε κυτταρικούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης⁸¹. Η *in vivo* διέγερσή τους με αυξητικούς παράγοντες (HGF, IGF-1) σε πειραματικά μοντέλα οξείας ισχαιμίας σχετίζεται με μυοκαρδιακή αναγέννηση η οποία οδηγεί σε μείωση της έκτασης του εμφράγματος και λειτουργικά οφέλη⁸².

Καρδιακά κύτταρα πλευρικού πληθυσμού

Τα κύτταρα πλευρικού πληθυσμού (side population cells) εκφράζουν το μεταφορέα ABCG2 (ATP-binding cassette transporter) και χαρακτηρίζονται από την ενδογενή τους ικανότητα να απεκκρίνουν τη χρωστική Hoechst 33342. Κύτταρα με φαινότυπο πλευρικού πληθυσμού έχουν βρεθεί στο αναπτυσσόμενο αλλά και το ενήλικο μυοκάρδιο⁸³⁻⁸⁵. Εκφράζουν διάφορους δείκτες προγονικών κυττάρων, όπως Sca-1 και islet-1^{84,86} και πιθανά παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη του μυοκαρδίου και τη διατήρηση των μυοκαρδιακών κυττάρων⁸⁷. *In vitro*, τα καρδιακά κύτταρα πλευρικού πληθυσμού μπορούν να διαφοροποιηθούν σε ενδοθηλιακά και μυοκαρδιακά κύτταρα μετά από κατάλληλα ερεθίσματα^{88,89}.

Προγονικά κύτταρα προερχόμενα από το επικάρδιο

Κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη, κύτταρα από το επικάρδιο μεταναστεύουν στο αναπτυσσόμενο μυοκάρδιο και συμβάλουν στο σχηματισμό λείων μυϊκών κυττάρων και ινοβλαστών⁹⁰. Τα προερχόμενα από το επικάρδιο προγονικά κύτταρα συμβάλουν επίσης στην ανανέωση των μυοκαρδιακών κυττάρων μετά από απώλεια μυοκαρδιακού ιστού^{91,92}.

Προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες

Οι Messina και συν., το 2004, περιέγραψαν την απομόνωση αδιαφοροποίητων, προγονικών κυττάρων από το μυοκάρδιο ενήλικο μυών και ανθρώπων, τα οποία χαρακτηρίζονται από την ικανότητα σχηματισμού κυτταρικών κλώνων, την ικανότητα αυτο-οργάνωσης σε σφαιρικές δομές *in vitro*, τις καρδιόσφαιρες (cardiospheres, CSs) και τη δυνατότητα διαφοροποίησης σε μυοκαρδιακά και ενδοθηλιακά κύτταρα⁹³. Οι καρδιόσφαιρες αποτελούν πολυκύτταρους σφαιρικούς σχηματισμούς οι οποίοι διαθέτουν έναν πυρήνα πλούσιο σε κύτταρα με αντιγόνα επιφανείας στελεχιαίων (c-kit, CD34, Sca-1) και ενδοθηλιακών κυττάρων (KDR/flk1, CD31)⁹³ και ο οποίος περιβάλλεται από μία στιβάδα από μεσεγχυματικά κύτταρα (CD105)⁹⁴. Η ενδομυοκαρδιακή χορήγηση CSs περιεμφραγματικά σε πειραματικά μοντέλα μυοκαρδιακής ισχαιμίας συνοδεύεται από βελτίωση της λειτουργικότητας και

περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας^{93,95}, το μεγάλο μέγεθος ωστόσο των CSs (50-200 μm) περιορίζει την θεραπευτική τους χρήση αποκλειστικά σε ενδομυοκαρδιακές χορηγήσεις.

Περαιτέρω καλλιέργεια των CSs σε κυτταρικές καλλιέργειες μονής στιβάδας επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό και την απομόνωση των προγονικών κυττάρων προερχόμενων από καρδιόσφαιρες (cardiosphere derived cells – CDCs)⁹⁴. Τα CDCs αποτελούν έναν ετερογενή κυτταρικό πληθυσμό μη-αιματολογικής προέλευσης (CD45⁻). Εκφράζουν στην πλειοψηφία τους το αντιγόνο επιφανείας CD105, ενώ ένας υποπληθυσμός τους (~25%) είναι θετικός για το αντιγόνο CD90 των μεσεγχυματικών στρωματικών κυττάρων και ένα μικρό ποσοστό (~3-10%) εκφράζει τον υποδοχέα για τον παράγοντα των στελεχιαίων κυττάρων (c-kit⁺). Περιέχουν επίσης κύτταρα τα οποία φαινοτυπικά ομοιάζουν με ενδοθηλιακά κύτταρα (CD34⁺, CD31⁺) καθώς και κύτταρα στα οποία εκφράζονται οι καρδιακές πρωτεΐνες α -σαρκομερική ακτίνη και κονεξίνη 43, με την παρουσία της τελευταίας να υποδηλώνει την ικανότητα των CDCs για ηλεκτρική σύζευξη τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα ενδογενή καρδιακά κύτταρα⁹⁴. Δεδομένου ότι διάφοροι τύποι προγονικών κυττάρων μπορούν να αποικήσουν το μυοκάρδιο μέσω της αιματικής ροής, μελέτες χαρτογράφησης της προέλευσης των CDCs έχουν δείξει ότι αποτελούν ενδογενή καρδιακό κυτταρικό πληθυσμό⁹⁶.

Τα CDCs είναι πολυδύναμα κύτταρα με ικανότητα αυτό-ανανέωσης, σχηματισμού κυτταρικών κλώνων και διαφοροποίησης σε κύτταρα με χαρακτηριστικά μυοκαρδιακών, λείων μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων *in vitro*⁹⁷. Τα CDCs μπορούν να απομονωθούν εύκολα από βιοψίες μυοκαρδίου και να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο σε επαρκείς αριθμούς για θεραπευτική χρήση⁹⁴. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά καθιστούν τα CDCs ελκυστικό κυτταρικό πληθυσμό για χρήση στην κλινική πράξη.

Καρδιακά προγονικά κύτταρα και κυτταρική θεραπεία μετά από OEM

Η συμβολή των ενδογενών κυτταρικών πληθυσμοί που διαθέτουν χαρακτηριστικά καρδιακών προγονικών κυττάρων στη μυοκαρδιακή ανανέωση του φυσιολογικού, αλλά και την αναγέννηση του τραυματισμένου ενήλικου μυοκαρδίου αποτελεί αντικείμενο αντιπαράθεσης. Παρότι έχουν την ικανότητα έκφρασης μυοκαρδιακών πρωτεϊνών *in vitro* ή μετά από χορήγησή τους σε μυοκάρδιο πειραματοζώων, ο φυσιολογικός ρόλος των καρδιακών προγονικών κυττάρων στην κυτταρική ανανέωση του υγιούς ενήλικου μυοκαρδίου είναι ιδιαίτερα περιορισμένος. Αυξανόμενα δεδομένα συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι ο πολλαπλασιασμός προϋπάρχοντων κυττάρων αποτελεί τον κύριο μηχανισμό μυοκαρδιακής ανανέωσης στο φυσιολογικό ενήλικο μυοκάρδιο^{60,61,98}. Μετά από μυοκαρδιακή βλάβη, ωστόσο, τα καρδιακά προγονικά κύτταρα συμβάλλουν στη μυοκαρδιακή ανανέωση και επιδιόρθωση^{61,98}.

Δεδομένης της αναγεννητικής τους ικανότητας και της φυσικής τους συμβολής στην επιδιόρθωση του τραυματισμένου μυοκαρδιακού ιστού, καρδιακά προγονικά κύτταρα έχουν χρησιμοποιηθεί σε προκλινικά πειραματικά μοντέλα και σε κλινικές μελέτες με σκοπό την επιδιόρθωση του μυοκαρδίου μετά από OEM. Παρότι δεν υπάρχει ομοφωνία, ο ιδανικός πληθυσμός για κυτταρική θεραπεία θα πρέπει:

- να είναι ασφαλής και να μην προκαλεί αρρυθμιογένεση ή ογκογένεση,
- να είναι ανεκτός από το ανοσοποιητικό σύστημα του λήπτη,
- να σχηματίζει (άμεσα ή έμμεσα) νέο λειτουργικό μυοκαρδιακό ιστό και νέο αγγειακό δίκτυο, δομικά και λειτουργικά ενσωματωμένα στο μυοκάρδιο του λήπτη,
- να βελτιώνει την καρδιακή δομή και λειτουργία (μειώνοντας ή αναστρέφοντας τη διαδικασία της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας),
- να μπορεί να απομονώνεται εύκολα στην κλινική πράξη και να καλλιεργείται γρήγορα και σε επαρκείς αριθμούς,
- να είναι άμεσα διαθέσιμος για χρήση στην κλινική πράξη και η χορήγησή του να μπορεί να γίνει με ελάχιστα επεμβατικές τεχνικές,
- η απομόνωσή του να μην εγείρει ηθικά ζητήματα⁹⁹.

Προς το παρόν, δεν έχει καθοριστεί ο ιδανικός πληθυσμός καρδιακών προγονικών κυττάρων για θεραπευτική χρήση. Τα κύτταρα από καρδιόσφαιρες (CDCs), ωστόσο,

συγκεντρώνουν αρκετά από τα παραπάνω χαρακτηριστικά. Έχουν χορηγηθεί με ασφάλεια σε πλήθος πειραματικών¹⁰⁰⁻¹⁰⁷ και κλινικών μελετών^{108,109}, δε διεγείρουν σημαντικά το ανοσοποιητικό σύστημα του λήπτη^{102,106} και συμβάλλουν στη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας μετά από OEM^{103,104,106-108}. Στην κλινική πράξη, μπορούν να απομονωθούν με τη χρήση καθημερινών τεχνικών, να καλλιεργηθούν σε μεγάλους αριθμούς⁹⁴ και να χορηγηθούν με ευκολία μέσω της ενδοστεφανιαίας οδού στους ασθενείς που τα έχουν ανάγκη^{109,110}. Τέλος, η απομόνωσή τους από το ενήλικο μυοκάρδιο δεν εγείρει ηθικούς προβληματισμούς στη χρήση τους.

Κυτταρική θεραπεία με CDCs - πειραματικά μοντέλα

Πλήθος πειραματικών μελετών σε μικρά πειραματόζωα έχουν αναδείξει την ασφάλεια της χορήγησης CDCs σε μοντέλα μυοκαρδιακής ισχαιμίας και την αποτελεσματικότητά τους στη βελτίωση της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας. Σε μελέτες σε μύες έχει παρατηρηθεί αύξηση των ζωνών μυοκαρδιακής αναγέννησης και βελτίωση του κλάσματος εξωθήσεως σε όσα ζώα χορηγήθηκαν ενδομυοκαρδιακά CDCs κατά τη διάρκεια OEM, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα πειραματόζωα τα οποία έλαβαν δερματικούς ινοβλάστες ή PBS^{94,100}. Σε άλλη μελέτη, η χορήγηση CDCs σε μύες μετά από μόνιμη απολίνωση της πρόσθιας κατιούσας στεφανιαίας αρτηρίας σχετίστηκε με μείωση της σχηματισθείσας ουλής, αύξηση του βιώσιμου μυοκαρδιακού ιστού, βελτίωση της συσπαστικότητας και περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας⁶¹. Η μείωση της έκτασης του εμφράγματος, η βελτίωση της λειτουργικότητας και ο περιορισμός της αναδιαμόρφωσης είναι σταθερά και αναπαραγόμενα αποτελέσματα μετά από χορήγηση CDCs σε μοντέλα μυοκαρδιακής ισχαιμίας σε μικρά πειραματόζωα^{101,102}. Τα λειτουργικά οφέλη της κυτταρικής θεραπείας με CDCs σε επίμυες και ο περιορισμός της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας έχουν επιβεβαιωθεί και με τη χρήση καρδιακού μαγνητικού συντονισμού και διατηρούνται επί μακρόν, έως και 16 μήνες μετά τη χορήγηση των κυττάρων^{103,104}. Η πρόελευση των CDCs αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιτυχία της κυτταρικής θεραπείας. Ανθρώπινα CDCs από νεογνικό μυοκάρδιο είναι ιδιαίτερα πλούσια σε προγονικά κύτταρα και η χορήγησή τους σε επίμυες μετά από OEM είναι περισσότερο αποτελεσματική στη διατήρηση της μυοκαρδιακής λειτουργίας, τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας και τη νεοαγγειογένεση συγκριτικά με CDCs

από ενήλικο μυοκάρδιο και καρδιακούς ινοβλάστες¹¹¹. Η παρατήρηση αυτή αποδεικνύει ότι η προγονική κυτταρική συνιστώσα του πληθυσμού των CDCs κατέχει κεντρικό ρόλο στην καρδιοπροστατευτική τους δράση μετά από OEM.

Οι μελέτες σε μύες και επίμυες ανέδειξαν την ευεργετική δράση των CDCs στο ισχαιμικό μυοκάρδιο. Ωστόσο, η επιβεβαίωση των ανωτέρω ευρημάτων σε προκλινικά μοντέλα ισχαιμίας σε μεγαλύτερα ζώα είναι απαραίτητη προτού η κυτταρική θεραπεία με CDCs δοκιμαστεί σε κλινικές μελέτες. Οι Johnston και συν. απέδειξαν ότι η ενδοστεφανιαία χορήγηση αυτόλογων CDCs τέσσερις εβδομάδες μετά από OEM σε χοίρειο μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης είναι ασφαλής και δε συνοδεύεται από απόφραξη της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας και φαινόμενα αρρυθμιογένεσης ή ογκογένεσης¹⁰⁵. Παράλληλα, η κυτταρική θεραπεία μείωσε την έκταση του εμφράγματος, περιόρισε την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας και βελτίωσε το αιμοδυναμικό προφίλ των πειραματοζώων στα οποία εφαρμόστηκε. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η ενδομυοκαρδιακή χορήγηση αυτόλογων CDCs στο ίδιο πειραματικό μοντέλο⁹⁵. Η χρήση αλλογενών CDCs έχει επιτρέψει τη χορήγησή τους σε πρωϊμότερα στάδια, όπως κατά τη φάση της επαναιμάτωσης ενός OEM. Συγκεκριμένα, η ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών CDCs αποδείχτηκε ασφαλής 30 λεπτά μετά την αποκατάσταση της αιμάτωσης σε πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας-επαναιμάτωσης σε χοίρους¹⁰⁷. Παράλληλα σημειώθηκε ελάττωση της έκτασης του εμφράγματος, μείωση της απόφραξης της μικροκυκλοφορίας και της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων και περιορισμός της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας 48 ώρες μετά τη χορήγηση της κυτταρικής θεραπείας. Τα παραπάνω αποτελέσματα διατηρούνται επί μακρόν όπως φάνηκε σε πειραματόζωα τα οποία υποβλήθηκαν σε καρδιακό μαγνητικό συντονισμό 8 εβδομάδες μετά τη χορήγηση των αλλογενών CDCs¹⁰⁶. Σε μικροσκοπικό επίπεδο, η κυτταρική θεραπεία οδήγησε σε μείωση της ίνωσης και της κυτταρικής απόπτωσης και σε αύξηση της πυκνότητας των αιμοφόρων αγγείων στη ζώνη του εμφράκτου, ενώ στα απομακρυσμένα μυοκαρδιακά τμήματα παρατηρήθηκε μείωση της κυτταρικής υπερτροφίας. Τα παραπάνω ευρήματα συνοδεύτηκαν από βελτίωση τόσο της τμηματικής όσο και της συνολικής συσπαστικότητας του μυοκαρδίου σε λειτουργικό επίπεδο¹⁰⁶.

Κυτταρική θεραπεία με CDCs – κλινικές μελέτες

Μετά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα των προκλινικών πειραματικών μελετών, κλινικές μελέτες φάσης I και II σχεδιάστηκαν και διεξήχθησαν ώστε να καθοριστεί η ασφάλεια της χορήγησης καρδιακών προγονικών κυττάρων από καρδιόσφαιρες στους ανθρώπους.

Η μελέτη CADUCEUS (Cardiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricular dysfunction) ήταν η πρώτη κλινική μελέτη φάσης I που αξιολόγησε την ασφάλεια της χορήγησης CDCs σε ασθενείς με δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας μετά από OEM¹¹⁰. Ασθενείς με επιτυχή διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση επαναιμάτωσης μετά από OEM και κλάσμα εξωθήσεως αριστερής κοιλίας 25-45% τυχαιοποιήθηκαν σε ενδοστεφανιαία χορήγηση αυτόλογων CDCs εντός 3 μηνών από το OEM ή στη συμβατική αγωγή, με τους ασθενείς στο σκέλος της κυτταρικής θεραπείας να υποβάλλονται αρχικά σε ενδομυοκαρδιακή βιοψία για την απομόνωση και καλλιέργεια των CDCs. Πρωτογενή καταληκτικά σημεία ασφάλειας στους 6 μήνες αποτέλεσαν η εκδήλωση κοιλιακών αρρυθμιών και ο θάνατος μετά τη χορήγηση CDCs, το έμφραγμα του μυοκαρδίου, ο αιφνίδιος θάνατος, τα μείζονα καρδιακά ανεπιθύμητα συμβάματα και η δημιουργία όγκων, ενώ μελετήθηκαν και δευτερογενή σημεία αποτελεσματικότητας με τη χρήση καρδιακού μαγνητικού συντονισμού. Δεκαεπτά ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν στη χορήγηση CDCs και 8 στη συμβατική αγωγή. Οι ασθενείς στο σκέλος της κυτταρικής θεραπείας έλαβαν αυτόλογα CDCs σε αυξανόμενη δόση με παράλληλη αξιολόγηση της ασφάλειας έτσι ώστε 4 ασθενείς να λάβουν 12,5 εκατομμύρια κύτταρα και 12 ασθενείς 25 εκατομμύρια κύτταρα. Σε έναν ασθενή χορηγήθηκε ενδιάμεση δόση 17,3 εκατομμυρίων κυττάρων λόγω προβλημάτων στην καλλιέργεια των CDCs. Η λήψη των βιοψιών για την απομόνωση των CDCs ήταν ασφαλής σε όλους τους ασθενείς. Κατά τη διάρκεια των 12 μηνών της περιόδου παρακολούθησης της μελέτης αναφέρθηκε μία περίπτωση OEM χωρίς ανάσπαση του ST διαστήματος 7 μήνες μετά τη χορήγηση των CDCs. Παρόλα αυτά, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στα σοβαρά ανεπιθύμητα συμβάματα μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών. Επιπλέον, οι ασθενείς που έλαβαν CDCs εμφάνισαν μείωση της έκτασης της ουλής και αύξηση του βιώσιμου μυοκαρδιακού ιστού της αριστερής κοιλίας καθώς επίσης σημαντικά βελτιωμένη τμηματική συσπαστικότητα των εμφραχθέντων μυοκαρδιακών τμημάτων στη μαγνητική τομογραφία καρδιάς¹⁰⁸.

Η μελέτη ALLSTAR (Allogeneic Heart Stem Cells to Achieve Myocardial Regeneration) αποτέλεσε μία διπλά τυφλή, τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη φάσης I/II για την ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών CDCs σε ασθενείς με πρόσφατο (1-3 μήνες) OEM με επιτυχή διαδερμική στεφανιαία παρέμβαση επαναιμάτωσης και δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας. Για την ένταξη στη μελέτη η τελευταία ορίστηκε ως η ύπαρξη κλάσματος εξωθήσεως αριστερής κοιλίας $\leq 45\%$ σε συνδυασμό με έκταση εμφράγματος $\geq 15\%$ της μάζας της αριστερής κοιλίας. Για αμφότερες τις φάσεις της μελέτης πρωτογενές καταληκτικό σημείο ασφάλειας ήταν η εμφάνιση μυοκαρδίτιδας σχετιζόμενης με την κυτταρική θεραπεία, ο θάνατος εξαιτίας κοιλιακής μαρμαρυγής ή κοιλιακής ταχυκαρδίας, ο αιφνίδιος θάνατος και τα μείζονα καρδιακά ανεπιθύμητα συμβάματα. Για τη μελέτη φάσης II πρωτογενές καταληκτικό σημείο αποτελεσματικότητας ήταν το ποσοστό της μείωσης στην έκταση του εμφράγματος 12 μήνες μετά τη χορήγηση των CDCs¹⁰⁹. Η μελέτη συμπεριέλαβε συνολικά 134 ασθενείς, από τους οποίους οι 90 τυχαιοποιήθηκαν στο σκέλος της κυτταρικής θεραπείας με ενδοστεφανιαία χορήγηση 25 εκατομμυρίων CDCs και οι 44 στο σκέλος της συμβατικής αγωγής. Κατά την ενδιάμεση στατιστική ανάλυση δεν αναφέρθηκαν πρωτογενή καταληκτικά σημεία ασφάλειας σε κανένα σκέλος της μελέτης, ούτε σημαντική διαφορά στα σοβαρά ανεπιθύμητα συμβάματα. Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα της κυτταρικής θεραπείας, η μελέτη δεν κατάφερε να δείξει διαφορά στην ποσοστιαία μείωση της έκτασης του εμφράγματος μεταξύ των δύο ομάδων ασθενών στους 6 και 12 μήνες μετά τη χορήγηση των CDCs¹¹².

Μηχανισμοί δράσης

Εάν υποθεθεί ότι η δράση των CDCs διαμεσολαβείται αποκλειστικά μέσω πιθανής διαφοροποίησής τους σε νέα λειτουργικά μυοκαρδιακά κύτταρα, τότε το χαμηλό ποσοστό κατακράτησής τους στο μυοκάρδιο του λήπτη¹¹³⁻¹¹⁵ δε συμβαδίζει με τα λειτουργικά οφέλη που έχουν παρατηρηθεί στις διάφορες πειραματικές μελέτες. Επιπλέον, ελάχιστα CDCs μπορούν να ανιχνευθούν στα ζώα λήπτες 3 εβδομάδες μετά τη χορήγηση, ενώ η βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας διατηρείται για σημαντικά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, έως και 6 μήνες μετά τη χορήγηση της κυτταρικής θεραπείας¹⁰². Τα παραπάνω στοιχεία υποδηλώνουν ότι η δράση των CDCs διαμεσολαβείται από έμμεσους μηχανισμούς.

Σε μία προσπάθεια διάκρισης της άμεσης αναγέννηση από έμμεσους παρακρινικούς μηχανισμούς δράσης, οι Chimenti και συν. βρήκαν ότι η χορήγηση ανθρώπινων CDCs σε μοντέλο μυοκαρδιακής ισχαιμίας σε μύες οδήγησε σε αύξηση των τριχοειδικών αγγείων και των μυοκαρδιακών κυττάρων από το οποία, ένα μικρό μόνο ποσοστό (10% και 12% αντίστοιχα) είχαν ανθρώπινη προέλευση¹⁰⁰. Επιπλέον, εστίες ενδογενών c-kit⁺ κυττάρων παρατηρήθηκαν γύρω από τα χορηγηθέντα ανθρώπινα CDCs. Τα ευρήματα αυτά συγκλίνουν στην άποψη ότι τα χορηγούμενα CDCs προάγουν έμμεσα ενδογενείς μυοκαρδιακούς μηχανισμούς επιδιόρθωσης.

Τόσο οι καρδιόσφαιρες όσο και τα CDCs έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν *in vitro* ένα μεγάλο αριθμό αυξητικών παραγόντων με προαγγειογενετική και κυτταροπροστατευτική δράση, όπως αγγειοποιητίνη-2, βασικό ινοβλαστικό αυξητικό παράγοντα (basic fibroblast growth factor, bFGF), αυξητικό παράγοντα στρωματικών κυττάρων (stromal cell-derived factor, SDF), αυξητικό παράγοντα ηπατοκυττάρων (hepatocyte growth factor, HGF), ινσουλινόμορφο αυξητικό παράγοντα 1 (insulin like growth factor-1, IGF-1) και αγγειακό ενδοθηλιακό αυξητικό παράγοντα (vascular endothelial growth factor, VEGF)^{100,116}. Επιπλέον, η έκκριση HGF και VEGF σχετίζεται με αντι-αποπτωτική δράση και μπορεί να συμβάλει στη διάσωση ενδογενών μυοκαρδιακών κυττάρων σε συνθήκες ισχαιμίας¹⁰⁰. Συγκρινόμενα με άλλους κυτταρικούς πληθυσμούς που έχουν χρησιμοποιηθεί στο πεδίο της κυτταρικής θεραπείας (μεσεγχυματικά κύτταρα από το μυελό των οστών, από το λιπώδη ιστό και μονοκύτταρα από το μυελό των οστών) τα CDCs διαθέτουν ένα πλουσιότερο και περισσότερο εξισορροπημένο παρακρινικό προφίλ¹¹⁶. Μέσω των ανωτέρω αυξητικών παραγόντων τα CDCs ασκούν αντι-αποπτωτική δράση στο μυοκάρδιο του λήπτη, προάγουν την αγγειογένεση και τη στρατολόγηση ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων, ενώ επίσης διεγείρουν προϋπάρχοντα μυοκαρδιακά κύτταρα στα όρια της εμφραχθείσας περιοχής ώστε να επανεισέλθουν στον κυτταρικό κύκλο και να πολλαπλασιαστούν^{61,100,102}.

Νεότερα δεδομένα δείχνουν ότι τα CDCs εκκρίνουν εξωσώματα, νανοσωματίδια που περιβάλλονται από διπλή στιβάδα λιπιδίων, τα οποία διαθέτουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Μεταξύ άλλων, τα εξωσώματα των CDCs περιέχουν microRNAs (ιδιαίτερα πλούσια σε miR-146a) μέσω των οποίων συμβάλλουν στην

αναστολή της απόπτωσης, τη διέγερση του πολλαπλασιασμού των μυοκαρδιακών κυττάρων στο ισχαιμικό μυοκάρδιο και την αγγειογένεση¹¹⁷.

Τέλος, η κυτταρική θεραπεία με CDCs ασκεί ρυθμιστική δράση στη φλεγμονώδη απάντηση μετά από OEM. Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η χορήγηση CDCs στο ισχαιμικό μυοκάρδιο οδηγεί σε αλλαγές στην έκφραση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών *in vivo* και μείωση του αριθμού των μακροφάγων που προσελκύονται στο μυοκάρδιο¹¹⁸. Επιπλέον, παρατηρούνται αλλαγές στον φαινότυπο των μακροφάγων, τα οποία αποκτούν περισσότερο κυτταροπροστατευτική δράση συμβάλλοντας στον περιορισμό της απόπτωσης των μυοκαρδιακών κυττάρων. Η καρδιοπροστατευτική δράση των CDCs είναι, επομένως, έμμεση και διαμεσολαβείται μέσω ποικίλων μηχανισμών.

Προκλήσεις κυτταρικής θεραπείας με CDCs

Κυτταρική κατακράτηση στο μυοκάρδιο του λήπτη

Τα χαμηλά ποσοστά ενσωμάτωσης των χορηγούμενων κυττάρων στο μυοκάρδιο του λήπτη αποτελούν σημαντικό εμπόδιο στην κυτταρική θεραπεία^{114,115}. Η πρώιμη κυτταρική κατακράτηση στο μυοκάρδιο πειραματοζώων και ανθρώπων υπολογίζεται σε <10%, ανεξάρτητα από τον τύπο των χορηγούμενων κυττάρων και την οδό χορήγησης^{119,120}. Ειδικότερα, η μυοκαρδιακή κατακράτηση των CDCs, μία ώρα μετά τη χορήγηση, δεν ξεπερνά το 10% μέσω της ενδοστεφανιαίας και το 15% μέσω της ενδομυοκαρδιακής οδού έγχυσης¹¹³. Η πλειονότητα των κυττάρων απομακρύνεται προς τους πνεύμονες μέσω της φλεβικής αιματικής απορροής ή χάνεται τοπικά από το σημείο της έγχυσης στις περιπτώσεις ενδομυοκαρδιακής χορήγησης. Η ενδοφλέβια χορήγηση CDCs οδηγεί σε ακόμη χαμηλότερα ποσοστά κατακράτησης (<1%) λόγω μαζικού εμβολισμού των κυττάρων στην πνευμονική μικροκυκλοφορία¹¹³.

Πειραματικές μελέτες συσχετίζουν τα μακροπρόθεσμα λειτουργικά οφέλη με την κατακράτηση των CDCs στο μυοκάρδιο του λήπτη 60 λεπτά μετά τη χορήγησή τους¹¹⁴ και διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την ενίσχυση της κυτταρικής κατακράτησης. Μεταξύ αυτών, η αναστολή της καρδιακής λειτουργίας μετά τη χορήγηση των κυττάρων, η επιβράδυνση της καρδιακής συχνότητας με αδενοσίνη,

η εφαρμογή κόλλας από ινική στα σημεία ενδομυοκαρδιακών χορηγήσεων και η μαγνητική καθοδήγηση των χορηγούμενων CDCs είναι τρόποι που αυξάνουν την κατακράτηση των κυττάρων στο μυοκάρδιο του λήπτη και παράλληλα ενισχύουν τα λειτουργικά οφέλη της κυτταρικής θεραπείας^{113,114,121}.

Χρήση αλλογενών κυττάρων

Η χρήση αυτόλογων CDCs, παρότι ελκυστική λόγω απουσίας ανοσολογικής απόρριψης, παρουσιάζει σοβαρούς περιορισμούς στην κλινική της εφαρμογή. Συγκεκριμένα, η αυτόλογη κυτταρική θεραπεία απαιτεί ειδική συλλογή μυοκαρδιακού ιστού από κάθε ασθενή, καλλιέργεια, επεξεργασία και ποιοτικό έλεγχο των CDCs, διαδικασίες οι οποίες θέτουν σημαντικούς υλικοτεχνικούς, οικονομικούς και κυρίως χρονικούς περιορισμούς στην εφαρμογή της στην κλινική πράξη. Επιπλέον, η ικανότητα ανάπτυξης και η πλαστικότητα των προγονικών κυττάρων ενδέχεται να επηρεάζονται από την ηλικία και τις συννοσηρότητες, με αποτέλεσμα να υπάρχει πιθανή μεταβλητότητα μεταξύ των ασθενών στην απάντηση στην κυτταρική θεραπεία¹²².

Τα CDCs διαθέτουν χαρακτηριστικό ανοσοφαινότυπο που επιτρέπει τη χρήση αλλογενών κυττάρων σε θεραπευτικές εφαρμογές. Στερούνται αντιγόνων επιφανείας του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II καθώς και συνδιεγερτικών μορίων CD80/CD86, γεγονός που τους επιτρέπει να αποφεύγουν την αναγνώριση από τα CD4⁺ βοηθητικά T λεμφοκύτταρα¹⁰². *In vitro*, τα αλλογενή CDCs εμφανίζουν αμελητέα ανοσογονικότητα σε σύγκριση με τα αυτόλογα κύτταρα, η οποία χαρακτηρίζεται από ήπιο λεμφοκυτταρικό πολλαπλασιασμό και αμελητέα αύξηση των προφλεγμονωδών κυτταροκινών¹⁰². *In vivo*, η χορήγησή τους σε πειραματικό μοντέλο μυοκαρδιακής ισχαιμίας σε επίμυες δε συνοδεύεται από ιστολογική εικόνα απόρριψης ή συστηματική ανοσολογική διέγερση¹⁰².

Η χρήση των αλλογενών CDCs παρουσιάζει αποτελεσματικότητα συγκρίσιμη με αυτή των αυτόλογων κυττάρων. Σε πειραματικό μοντέλο μυοκαρδιακής ισχαιμίας σε επίμυες τα αλλογενή CDCs μείωσαν την έκταση του εμφράγματος και βελτίωσαν τη λειτουργικότητα της αριστερής κοιλίας στον ίδιο βαθμό με τα αυτόλογα κύτταρα, παρότι η επιβίωσή τους, 3 εβδομάδες μετά τη χορήγηση, ήταν μικρότερη. Το

λειτουργικό όφελος των αλλογενών CDCs διατηρείται έως και 6 μήνες μετά τη χορήγησή τους και αποδίδεται στη διέγερση ενδογενών μηχανισμών μυοκαρδιακής αναγέννησης, με αποτέλεσμα να είναι ανεξάρτητο από την επιβίωση των κυττάρων¹⁰². Σε χοίρεια πειραματικά μοντέλα OEM η χρήση αλλογενών CDCs αποδείχθηκε εξίσου ασφαλής και αποτελεσματική αναφορικά με τη μείωση της έκτασης του εμφράγματος, τη βελτίωση της λειτουργικότητας και τον περιορισμό της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας^{106,107}. Στην κλινική πράξη, αλλογενή CDCs χορηγήθηκαν με ασφάλεια σε ασθενείς μετά από πρόσφατο OEM στη μελέτη ALLSTAR, χωρίς ωστόσο να παρατηρηθούν τα αναμενόμενα λειτουργικά οφέλη¹¹².

Ιδανικός χρονική στιγμή χορήγησης

Παρά την εκτεταμένη προκλινική έρευνα σχετικά με την επίδραση των CDCs στην έκταση του εμφράγματος και την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας¹⁰³⁻¹⁰⁷, η ιδανική χρονική στιγμή χορήγησής του μετά από OEM δεν έχει ακόμη καθοριστεί. Η πρώτη κλινική μελέτη σχετικά με τη χορήγηση αλλογενών CDCs σε ασθενείς μετά από OEM δεν κατάφερε να αναπαράγει τα αποτελέσματα των πειραματικών μελετών αναφορικά με τα οφέλη της κυτταρικής θεραπείας¹¹². Ένας λόγος για αυτή την αναντιστοιχία ίσως αποτελεί η καθυστερημένη (4 εβδομάδες έως 12 μήνες μετά το OEM) χορήγηση των κυττάρων, σε μία χρονική στιγμή κατά την οποία έχει εγκατασταθεί η βλάβη της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας από επαναιμάτωση, κάτι που δεν επιτρέπει στα χορηγούμενα κύτταρα να προσεγγίσουν μυοκαρδιακές περιοχές μη επαναρροής⁴¹. Η πρώιμη ενδοστεφανιαία χορήγηση CDCs στο OEM έχει αποδειχτεί εφικτή και αποτελεσματική, όταν αυτά χορηγήθηκαν 30 λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης σε πειράματα οξείας μυοκαρδιακής ισχαιμίας σε χοίρους^{106,107}. Ακόμη όμως και σε αυτή τη χρονική στιγμή, ένα σημαντικό μέρος του φαινομένου μη επαναρροής έχει ήδη συντελεστεί²⁵. Επιπλέον, η διάμετρος των CDCs ($\approx 21\mu\text{m}$) είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των στεφανιαίων τριχοειδών^{105,123} με αποτέλεσμα, όσο περισσότερο η χορήγηση των κυττάρων πλησιάζει χρονικά την οξεία βλάβη της μικροκυκλοφορίας (ισχαιμική προσβολή ή βλάβη από επαναιμάτωση), τόσο να αυξάνεται ο κίνδυνος κυτταρικού εμβολισμού και επιδείνωσης του φαινομένου μη επαναρροής. Παράλληλα, οι συνθήκες υποξίας και φλεγμονής στο ισχαιμικό

μυοκάρδιο ενδέχεται να επηρεάζουν αρνητικά την επιβίωση και λειτουργικότητα των CDCs.

Εάν η ενδοστεφανιαία χορήγηση CDCs πριν ή αμέσως μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης, όταν η στεφανιαία μικροκυκλοφορία είναι όσο το δυνατόν ανέπαφη, αποδειχθεί ασφαλής και αποτελεσματική ως προς την μείωση της έκτασης του εμφράγματος, τότε τα CDCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς αγγειοπλαστικής στην κλινική πράξη σαν ένα έτοιμο κυτταρικό προϊόν για τη θεραπεία του OEM.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πειραματικής μελέτης είναι η διερεύνηση της ασφάλειας της ενδοστεφανιαίας χορήγησης αλλογενών CDCs κατά την επαναιμάτωση ενός OEM ως προς την επιδείνωση του φαινομένου μη επαναρροής και η αξιολόγηση αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης ως προς τον περιορισμό της έκτασης του εμφράγματος σε χοίρειο μοντέλο μυοκαρδιακής ισχαιμίας και επαναιμάτωσης.

ΜΕΘΟΔΟΙ

Χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 73 χοίροι σωματικού βάρους 30 έως 40 κιλών. Από αυτούς, 10 αρσενικοί χοίροι χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση και καλλιέργεια CDCs και 63 χοίροι θηλυκού γένους χρησιμοποιήθηκαν στις υπόλοιπες πειραματικές διαδικασίες. Το πειραματικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την Κτηνιατρική Υπηρεσία της Περιφέρειας Αττικής, σύμφωνα με την ελληνική και ευρωπαϊκή νομοθεσία.

Πραγματοποιήθηκαν οι παρακάτω ομάδες πειραμάτων μυοκαρδιακής ισχαιμίας - επαναιμάτωσης: α) μία σειρά από προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας, όπου τα CDCs χορηγήθηκαν είτε 5 λεπτά πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης (πειράματα 5' pre-*rep*), είτε 5 λεπτά μετά την έναρξη αυτής (πειράματα 5' post-*rep*), όπου εκτιμήθηκε τόσο η έκταση του φαινομένου μη επαναρροής με τη χορήγηση αυξανόμενων δόσεων κυττάρων, όσο και η κατακράτηση των χορηγηθέντων κυττάρων και β) πειράματα αποτελεσματικότητας όπου εκτιμήθηκε η έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου 30 ημέρες μετά τη χορήγηση των CDCs.

1) Πρωτόκολλο αναισθησίας

Η προνάρκωση των πειραματοζώων γινόταν με ενδομυϊκή χορήγηση κεταμίνης σε δόση 15 mg/kg σωματικού βάρους, μιδαζολάμης σε δόση 0,5 mg/kg σωματικού βάρους και 1mg ατροπίνης. Τα πειραματόζωα τοποθετούνταν σε ύπτια θέση στο χειρουργικό τραπέζι και ακολουθούσε σύνδεση με καταγραφέα ηλεκτροκαρδιογραφήματος, τοποθέτηση φλεβοκαθετήρα στη ραχιαία επιφάνεια του ωτός και εισαγωγή στη γενική αναισθησία με εφάπαξ ενδοφλέβια χορήγηση

προποφόλης σε δόση 1-3 mg/kg σωματικού βάρους, φεντανύλης σε δόση 0,012 mg/kg σωματικού βάρους και σισατρακούριου σε δόση 0,5 mg/kg σωματικού βάρους. Τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε ενδοτραχειακή διασωλήνωση με τραχειοσωλήνα Νο 6,5-7,5 και μηχανικό αερισμό ελεγχόμενου όγκου με μείγμα οξυγόνου και ατμοσφαιρικού αέρα (FiO₂ 40%), αναπνεόμενο όγκο 10-15 mL/kg σωματικού βάρους και συχνότητα αναπνοών 15/λεπτό. Η διατήρηση της αναισθησίας γινόταν με ενδοφλέβια στάγδην χορήγηση προποφόλης με ωριαίο ρυθμό 10-20 mg/kg σωματικού βάρους στα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας και με εισπνεόμενο πτητικό αναισθητικό (σεβοφλουράνιο 1-2%) στα πειράματα της αποτελεσματικότητας. Κατά την διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας όλα τα πειραματόζωα λάμβαναν ενδοφλεβίως φεντανύλη με ωριαίο ρυθμό 6-10 μg/kg σωματικού βάρους για αναλγησία και σισατρακούριο με ωριαίο ρυθμό 1-2 mg/kg σωματικού βάρους για μυοχάλαση. Η θερμοκρασία των ζώων διατηρούταν στους 37±0.5 °C καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων με τη χρήση θερμαινόμενης κουβέρτας.

2) Απομόνωση και καλλιέργεια CDCs

Για την απομόνωση των CDCs χρησιμοποιήθηκαν 10 υγιείς αρσενικοί χοίροι. Μετά από γενική αναισθησία και διασωλήνωση, τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε μέση στερνοτομή για τη διάνοιξη του θώρακα και σε διάνοιξη περικαρδίου για την αποκάλυψη της καρδιάς. Ακολουθούσε λήψη πολλαπλών βιοψιών από το σύνολο της αριστερής κοιλίας με τη χρήση 14G βελόνης βιοψίας μαλακών μορίων και εν συνεχεία, τα ζώα χρησιμοποιούνταν σε μη καρδιακά πειραματικά πρωτόκολλα.

Τα δείγματα μυοκαρδιακού ιστού που λαμβάνονταν μέσω της βελόνης βιοψίας επεξεργάστηκαν σύμφωνα με τις τυποποιημένες μεθόδους που περιγράφονται στη βιβλιογραφία, προκειμένου να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν CDCs σε επαρκείς αριθμούς^{93,94}. Συγκεκριμένα, αφού ξεπλένονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (phosphate buffered solution, PBS, GIBCO) και επεξεργάζονταν ενζυμικά με θρυψίνη (0,25% Trypsin-EDTA, GIBCO) για 3 λεπτά, τα δείγματα του μυοκαρδιακού ιστού τεμαχίζονταν σε ιστοτεμαχίδια πάχους 1-2 mm και τοποθετούνταν σε πλαστικά αποστειρωμένα τρυβλία κυτταροκαλλιέργειας, τα οποία προηγουμένως είχαν

επωασθεί με φιμπρονεκτίνη (20 mg/mL, Sigma-Aldrich) για 24 ώρες. Τα τρυβλία τοποθετούνταν σε κλίβανο επώαση στους 37 °C και καλλιεργούνταν με ορό ο οποίος περιείχε θρεπτικό υλικό (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, GIBCO) σε συνδυασμό με 10% ορό εμβρύου βοός (HyClone), 2 mmol/L-γλουταμίνη (GIBCO), 100 U/mL πενικιλίνη G (GIBCO) και 100 U/mL στρεπτομυκίνη (GIBCO). Μετά από μερικές ημέρες καλλιέργειας ένα στρώμα από μικρά διαυγή κύτταρα αναδύονταν από τα ιστοτεμαχίδια (εικόνα 1A) και όταν τα κύτταρα αυτά επικάλυπταν πλήρως το τρυβλίο της καλλιέργειας, συλλέγονταν μετά από ήπια ενζυμική πέψη με θρυψίνη για 3-5 λεπτά. Μετά τη συλλογή τους, τα κύτταρα τοποθετούνταν σε πλάκες 24 κυψελίδων (24-well plates) επικαλυμμένες με poly-D-lysine, σε αριθμούς 3 - 5 x 10⁴ κύτταρα/κυψελίδα. Οι πλάκες επωάζονταν σε κλίβανο στους 37 °C για το σχηματισμό καρδιοσφαιρών (CSs, εικόνα 1B).

Μετά την ανάπτυξή τους, οι ελεύθερες CSs συλλέγονταν και τοποθετούνταν σε φιάλες ώστε να καλλιεργηθούν σε μονή στιβάδα. Στις κυτταροκαλλιέργειες αυτές πολλαπλασιάζονταν τα καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες (εικόνα 1Γ). Τα CDCs συλλέγονταν έπειτα από ήπια ενζυμική πέψη με θρυψίνη για 3-5 λεπτά και χρησιμοποιούνταν στις περαιτέρω πειραματικές διαδικασίες μετά από ανασύσταση σε διάλυμα PBS.



Εικόνα 1. Απομόνωση και καλλιέργεια CDCs. (A) Διαυγή κύτταρα που πρόκειται να σχηματίσουν καρδιόσφαιρες (βέλος) αναδύονται από ιστοτεμαχίδιο μυοκαρδιακού ιστού (κεφαλή βέλους). **(B)** Ελεύθερη καρδιόσφαιρα σε πλάκα 24 κυψελίδων. **(Γ)** Προγονικά καρδιακά κύτταρα από καρδιόσφαιρες (CDCs) σε καλλιέργεια μονής στιβάδας.

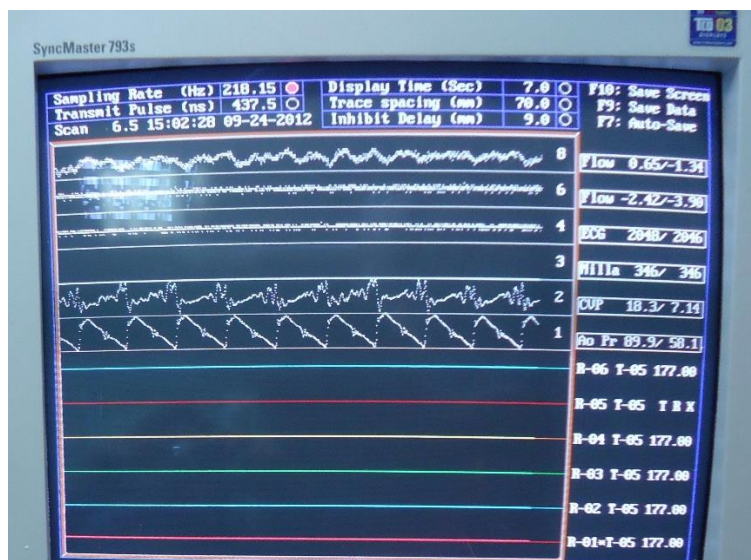
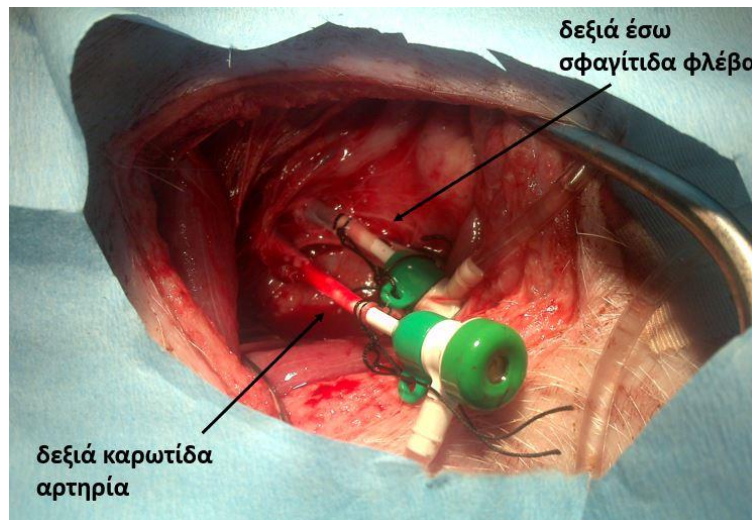
3) Χειρουργικές παρασκευές

Προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας

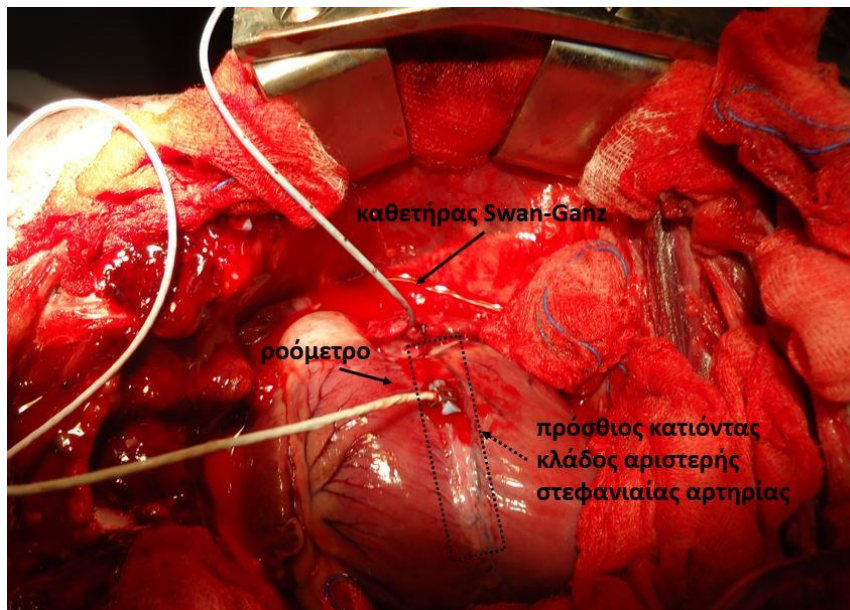
Μετά από γενική αναισθησία και διασωλήνωση, ακολουθούσε καθαρισμός του δέρματος του τραχήλου και του θώρακα και παρασκευή των μεγάλων αγγείων της δεξιάς και αριστερής τραχηλικής χώρας. Θηκάρι 6F τοποθετούταν στη δεξιά έσω σφαγίτιδα φλέβα για συνεχή καταγραφή της κεντρικής φλεβικής πίεσης και στη δεξιά καρωτίδα αρτηρία για συνεχή καταγραφή της αρτηριακής πίεσης (εικόνα 2). Ένας επιπλέον καθετήρας τριών αυλών 6F τοποθετούταν στην αριστερή έσω σφαγίτιδα φλέβα για τη χορήγηση υγρών και φαρμάκων κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Η προσπέλαση της καρδιάς γινόταν με διάνοιξη αρχικά του θώρακα με μέση στερνοτομή και στη συνέχεια του περικαρδίου. Καθετήρας Swan-Ganz τοποθετούταν στο ωτίο του αριστερού κόλπου για συνεχή καταγραφή της πίεσης αυτού. Ακολουθούσε παρασκευή του πρόσθιου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας και τοποθέτηση δακτυλίου υπερηχητικού ροομέτρου τύπου transit time (Transonic Systems Inc) μεταξύ της έκφυσης του πρώτου και δευτέρου διαγωνίου κλάδου για συνεχή καταγραφή της στεφανιαίας ροής (εικόνα 3). Ράμμα μεταξιού 2/0 τοποθετούταν στον πρόσθιο κατιόντα κλάδο μετά την έκφυση του πρώτου διαγωνίου κλάδου και κεντρικότερα από το δακτύλιο του ροομέτρου για απολίνωση του πρόσθιου κατιόντα κλάδου και πρόκληση μυοκαρδιακής ισχαιμίας σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τα απαραίτητα φάρμακα για διατήρηση της αναισθησίας, αναλγησία και μυοχάλαση, τα πειραματοζώα λάμβαναν ενδοφλεβίως 5000 IU ηπαρίνης αμέσως πριν την πρόκληση ισχαιμίας, για αποφυγή σχηματισμού θρόμβων και ευχερή επαναιμάτωση. Χορηγούταν επίσης ενδοφλεβίως φυσιολογικός ορός για αναπλήρωση των απωλειών σε υγρά, σύμφωνα με τις ανάγκες του πειραματοζώου και λιδοκαΐνη σε εφάπαξ δόσεις των 60-100mg για την αντιμετώπιση αρρυθμιών εφόσον χρειαζόταν.



Εικόνα 2. Χειρουργική παρασκευή δεξιάς τραχηλικής χώρας πειραματοζώου. Επάνω: Διακρίνονται η δεξιά καρωτίδα αρτηρία και η δεξιά σφαγιτίδα φλέβα μετά από την εισαγωγή των θηκαριών. Κάτω: συνεχής ταυτόχρονη καταγραφή κεντρικής φλεβικής και αρτηριακής πίεσης μέσω των καθετήρων. Η καταγραφή της πίεσης του αριστερού κόλπου εμφανιζόταν στο ίδιο κανάλι με την κεντρική φλεβική πίεση μετά από αλλαγή του σήματος προέλευσης.



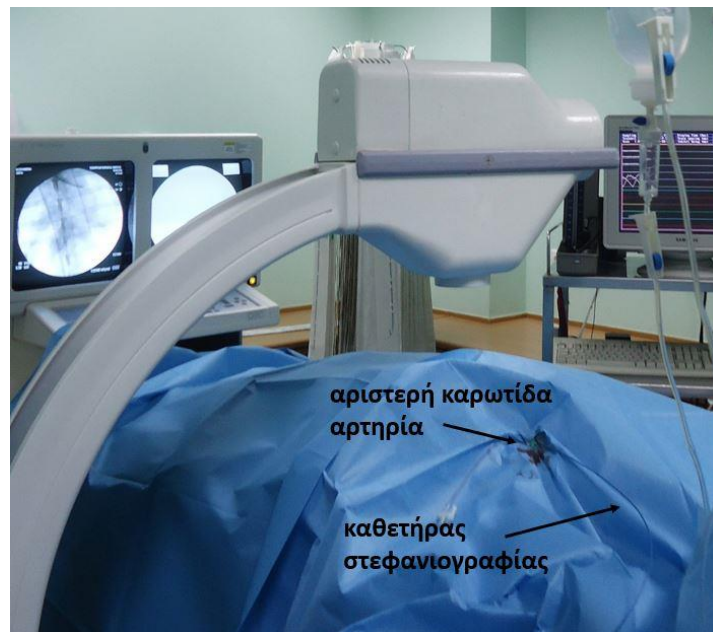
Εικόνα 3. Χειρουργική παρασκευή προκαταρκτικού πειράματος ασφάλειας. Διακρίνεται καθετήρας Swan-Ganz εντός του αριστερού κόλπου, ο πρόσθιος κατιόντας κλάδος της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας και υπερηχητικό ροόμετρο επί του πρόσθιου κατιόντα κλάδου.

Πειράματα αποτελεσματικότητας

Μετά από γενική αναισθησία και διασωλήνωση, ακολουθούσε καθαρισμός του δέρματος του τραχήλου και τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε αποκάλυψη και παρασκευή της αριστερής καρωτίδας αρτηρίας υπό άσηπτες συνθήκες. Θηκάρι 6F τοποθετούταν στην αριστερή καρωτίδα αρτηρία για συνεχή καταγραφή της αρτηριακής πίεσης και καρδιακό καθετηριασμό, καθώς επίσης στην αριστερή έσω σφαγίτιδα φλέβα για συνεχή καταγραφή της κεντρικής φλεβικής πίεσης. Μέσω του θηκαριού της αριστερής καρωτίδας αρτηρίας, οδηγό σύρμα και καθετήρας στεφανιογραφίας Judkins προωθούνταν στη ρίζα της αορτής για καθετηριασμό και σκιαγράφιση της δεξιάς και αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας με τη βοήθεια ακτινοσκόπησης (εικόνα 4). Εν συνεχεία, σύρμα αγγειοπλαστικής προωθούνταν στον πρόσθιο κατιόντα κλάδο της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας και, μέσω αυτού, μπαλόνι αγγειοπλαστικής τύπου over-the-wire τοποθετούταν μεταξύ της έκφυσης του πρώτου και δεύτερου διαγώνιου κλάδου. Ακολουθούσε η απόφραξη του πρόσθιου κατιόντα κλάδου με διάταση του

μπαλονιού αγγειοπλαστικής και πρόκληση μυοκαρδιακής ισχαιμίας σύμφωνα με το πειραματικό πρωτόκολλο.

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, εκτός από τα απαραίτητα φάρμακα για διατήρηση της αναισθησίας, αναλγησία και μυοχάλαση, τα πειραματοζώα λάμβαναν ενδοφλεβίως 5000 IU ηπαρίνης προ της εισαγωγής των καθετήρων ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος θρομβώσεων. Χορηγούταν επίσης ενδοφλεβίως φυσιολογικός ορός για αναπλήρωση των απωλειών σε υγρά, σύμφωνα με τις ανάγκες του πειραματοζώου και λιδοκαΐνη σε εφάπαξ δόσεις των 60-100 mg για την αντιμετώπιση αρρυθμιών εφόσον χρειαζόταν.



Εικόνα 4. Πειραματική διάταξη πειράματος αποτελεσματικότητας. Διακρίνεται το αποστειρωμένο πεδίο, θηκάρι εντός της αριστερής καρωτίδας αρτηρίας με καθετήρα στεφανιογραφίας εντός αυτού, καθώς επίσης ακτινοσκοπικό μηχάνημα C-arm.

4) Πρωτόκολλο ισχαιμίας- επαναιμάτωσης και χορήγησης CDCs

Μετά την ολοκλήρωση των χειρουργικών παρασκευών και την αναπλήρωση των απολεσθέντων υγρών ακολουθούσε ένα χρονικό διάστημα άνευ παρεμβάσεων έως την αιμοδυναμική σταθεροποίηση των πειραματοζώων. Το πειραματικό πρωτόκολλο και οι ομάδες πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν απεικονίζονται σχηματικά στην εικόνα 5.

Προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας

Στα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 45 πειραματοζώα, τα οποία υποβλήθηκαν σε ισχαιμία διάρκειας 60 λεπτών με απολίνωση του προσθίου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας και στη συνέχεια σε επαναιμάτωση με λύση της απολίνωσης. Καθόλη τη διάρκεια του πειράματος καταγράφονταν, ανά 15 λεπτά, η αρτηριακή, η κεντρική φλεβική και η πίεση του αριστερού κόλπου των πειραματοζώων.

Μετά από καθετηριασμό του προσθίου κατιόντα κλάδου με καθετήρα 24 G, αμέσως περιφερικότερα της απολίνωσης, χορηγήθηκαν ενδοστεφανιαία αλλογενή CDCs σε διάλυμα PBS ή διάλυμα PBS χωρίς κύτταρα (ομάδα ελέγχου). Η χορήγηση του διαλύματος και η επαναιμάτωση διεξήχθησαν σε κάθε ομάδα των προκαταρκτικών πειραμάτων ασφάλειας ως εξής:

- Στα πειράματα 5' pre-*rep*, μετά τη συμπλήρωση 60 λεπτών ισχαιμίας χορηγήθηκαν βραδέως ενδοστεφανιαία, μέσα σε διάστημα 30 δευτερόλεπτων, αλλογενή CDCs (σε διάλυμα PBS τελικού όγκου 5 mL, με προσθήκη 100 U/mL ηπαρίνης και 50 mg/mL νιτρογλυκερίνης) ή αντίστοιχο διάλυμα 5 mL χωρίς την προσθήκη κυττάρων (ομάδα ελέγχου). Η χορήγηση ακολουθούταν από έγχυση 1 mL PBS ώστε να ξεπλυθεί πλήρως ο νεκρός χώρος των καθετήρων. Πέντε λεπτά μετά την έναρξη της χορήγησης, γινόταν λύση της απολίνωσης και επαναιμάτωση (εικόνα 5A).
- Στα πειράματα 5' post-*rep*, μετά τη συμπλήρωση 60 λεπτών ισχαιμίας, γινόταν λύση της απολίνωσης και επαναιμάτωση. Κατά την συμπλήρωση των 5 πρώτων λεπτών της επαναιμάτωσης, χορηγήθηκαν ενδοστεφανιαία αλλογενή

CDCs (σε διάλυμα PBS τελικού όγκου 10 mL με προσθήκη 100 U/mL ηπαρίνης και 50 mg/mL νιτρογλυκερίνης) ή αντίστοιχο διάλυμα 10 mL χωρίς την προσθήκη κυττάρων (ομάδα ελέγχου). Η χορήγηση γινόταν σε τρεις ισόποσες δόσεις διάρκειας δύο λεπτών η κάθε μία, με παράλληλο αποκλεισμό της αιματικής ροής στην πρόσθιο κατιόντα κλάδο κεντρικότερα του σημείου της χορήγησης. Μεταξύ των τριών χορηγήσεων μεσολαβούσαν διαστήματα επαναιμάτωσης διάρκειας δύο λεπτών (εικόνα 5B).

Σε κάθε ομάδα προκαταρκτικών πειραμάτων ασφάλειας χορηγήθηκαν αρχικά 10 εκατομμύρια CDCs, με βάση τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης των Kanazawa και συν., σύμφωνα με τα οποία η ενδοστεφανιαία χορήγηση 10 εκατομμυρίων αλλογενών CDCs, 30 λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης, δεν οδηγεί σε επιδείνωση της βατότητας της μικροκυκλοφορίας¹⁰⁷. Στη συνέχεια, η δόση των χορηγούμενων κυττάρων αυξανόταν ή μειωνόταν, ανάλογα με την έκταση του φαινομένου μη επαναρροής σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ώστε να καθοριστεί ο μέγιστος αριθμός κυττάρων που μπορεί να χορηγηθούν με ασφάλεια σε κάθε χρονική στιγμή χορήγησης.

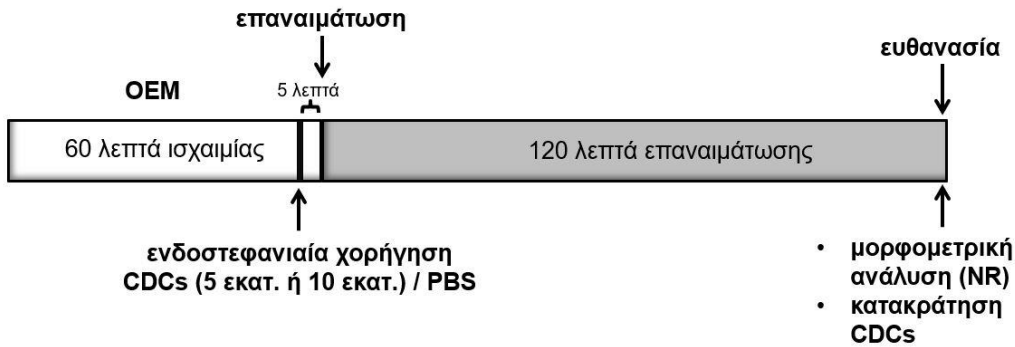
Πειράματα αποτελεσματικότητας

Στα πειράματα αποτελεσματικότητας χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 18 πειραματόζωα, τα οποία υποβλήθηκαν σε ισχαιμία διάρκειας 60 λεπτών με απόφραξη του προσθίου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, υπό ακτινοσκόπηση, με τη χρήση μπαλονιού αγγειοπλαστικής τύπου over-the-wire. Καθόλη τη διάρκεια του πειράματος καταγράφονταν, ανά 15 λεπτά, η αρτηριακή και η κεντρική φλεβική πίεση των πειραματοζώων. Μετά τη συμπλήρωση 60 λεπτών ισχαιμίας, χορηγήθηκαν, δια μέσω του over-the-wire balloon καθετήρα, μέσα σε διάστημα 30 δευτερόλεπτων, αλλογενή CDCs (σε διάλυμα PBS τελικού όγκου 5 mL, με προσθήκη 100 U/mL ηπαρίνης και 50 mg/mL νιτρογλυκερίνης) ή αντίστοιχο διάλυμα 5 mL χωρίς την προσθήκη κυττάρων (ομάδα ελέγχου). Η επιλογή της δόσης των κυττάρων και της χρονικής στιγμής της χορήγησής τους έγινε με βάση τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων σχετικά με την έκταση του φαινομένου μη επαναρροής και την κατακράτηση των CDCs. Ακολουθούσε έγχυση

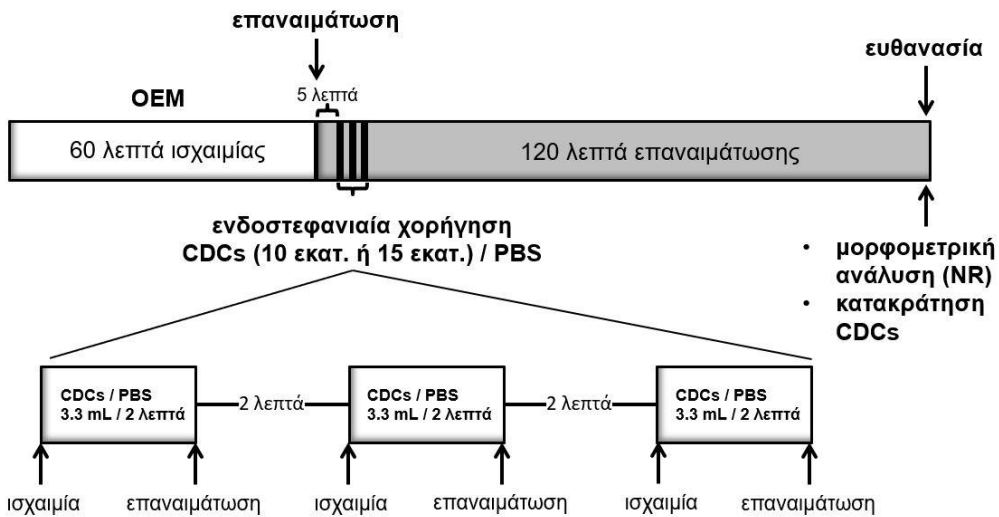
κατάλληλου όγκου PBS ώστε να ξεπλυθεί πλήρως ο νεκρός χώρος των καθετήρων και, 5 λεπτά μετά την έναρξη της χορήγησης, ακολουθούσε απομάκρυνση του μπαλονιού και επαναιμάτωση (εικόνα 5Γ).

Μετά το πέρας 30 λεπτών επαναιμάτωσης, και εφόσον τα πειραματόζωα ήταν αιμοδυναμικά σταθερά, αφαιρούταν το θηκάρι από την αριστερή καρωτίδα αρτηρία με ταυτόχρονη απολίνωσή της και γινόταν σύγκλειση του τραχήλου. Στη συνέχεια, τα ζώα αφυπνίζονταν, αποσωληνώνονταν και παρέμεναν υπό παρακολούθηση για χρονικό διάστημα 30 ημερών. Κατά τη διάρκεια του διαστήματος παρακολούθησης όλα τα ζώα ελάμβαναν *per os* αντιαρρυθμική αγωγή με αμιωδαρόνη (200 mg ημερησίως).

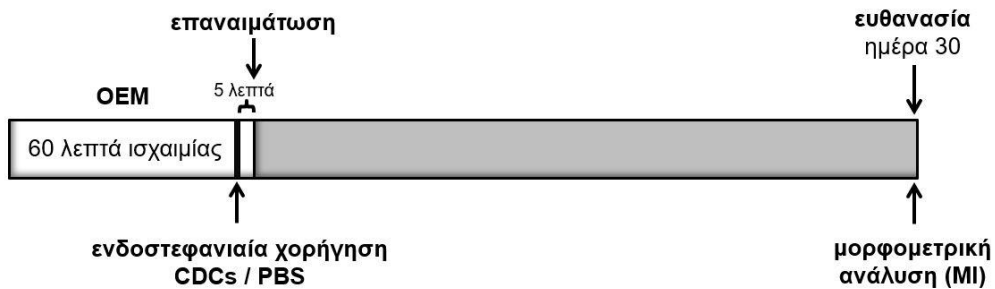
A



B



Γ



Εικόνα 5. Σχηματική απεικόνιση των πειραματικών ομάδων (A) Προκαταρκτικό πείραμα ασφάλειας 5' pre-rer. **(B)** Προκαταρκτικό πείραμα ασφάλειας 5' post-rer. **(Γ)** Πείραμα αποτελεσματικότητας. Η επιλογή της χρονικής στιγμής της χορήγησής των CDCs έγινε με

βάση τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων σχετικά την κατακράτηση των κυττάρων.

OEM: οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες, PBS: ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, NR: περιοχές μη επαναρροής (no-reflow), MI: έκταση εμφράγματος του μυοκαρδίου.

5) Αιμοδυναμικές μετρήσεις

Σε όλες τις ομάδες πειραμάτων, συγκρίθηκαν οι καταγραφόμενες αιμοδυναμικές παράμετροι πριν (60 λεπτά ισχαιμίας) και μετά (15 λεπτά επαναιμάτωσης) τη χορήγηση των κυττάρων ή του διαλύματος ελέγχου, ώστε να διερευνηθούν πιθανές αιμοδυναμικές επιδράσεις της ενδοστεφανιαίας χορήγησης CDCs κατά την οξεία φάση ενός εμφράγματος του μυοκαρδίου.

6) Υπολογισμός της έκτασης του φαινομένου μη επαναρροής

Η έκταση του φαινομένου μη επαναρροής (no-reflow phenomenon, NR) και της υπό κίνδυνο περιοχής του μυοκαρδίου καθορίστηκαν στα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας με τη βοήθεια των χρωστικών θειοφλαβίνης S και ιώδους της γεντιανής. Η θειοφλαβίνη αποτελεί φθορίζουσα χρωστική η οποία χρωματίζει το αγγειακό ενδοθήλιο που δέχεται φυσιολογική αιμάτωση. Ως αποτέλεσμα, οι περιοχές μη επαναρροής εμφανίζονται σαν μη φθορίζουσες ζώνες μυοκαρδιακού ιστού κάτω από υπεριώδες φως²⁵. Στα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας, μετά το πέρας 2 ωρών επαναιμάτωσης, γινόταν έγχυση στον αριστερό κόλπο, μέσω του καθετήρα Swan-Ganz, 1 mg/kg σωματικού βάρους θειοφλαβίνης S 2% (Sigma-Aldrich). Δύο λεπτά αργότερα, γινόταν εκ νέου απολίνωση του προσθίου κατιόντα κλάδου, στο ίδιο ακριβώς σημείο στο οποίο είχε απολινωθεί κατά τη φάση της ισχαιμίας και, αμέσως μετά, έγχυση 0,3 mL/kg σωματικού βάρους ιώδους της γεντιανής 1% (Sigma-Aldrich) μέσω του καθετήρα Swan-Ganz. Με τον τρόπο αυτό, το ιώδες της γεντιανής χρωματίζει μπλε όλη την αριστερή κοιλία εκτός της περιοχής την οποία δεν προσέγγιζε λόγω της απόφραξης του προσθίου κατιόντα κλάδου. Η περιοχή αυτή, η οποία ονομάζεται περιοχή υπό κίνδυνο (area at risk, AR), αντιπροσωπεύει το μυοκάρδιο που αρδεύεται

από το αποφραχθέν τμήμα του αγγείου και εκφράζει την περιοχή του μυοκαρδίου που πρόκειται να νεκρωθεί εάν δεν επέλθει καμία μορφή επαναιμάτωσης και ταυτόχρονα δεν υφίσταται παράπλευρο αγγειακό δίκτυο. Μετά τη χορήγηση των δύο χρωστικών, τα πειραματόζωα υποβλήθηκαν σε ευθανασία μέσω πρόκλησης κοιλιακής μαρμαρυγής με τη χρήση συνεχούς ρεύματος. Ακολούθησε αφαίρεση της καρδιάς και διαχωρισμός της αριστερής κοιλίας από τους κόλπους και τη δεξιά κοιλία. Η αριστερή κοιλία τεμαχίστηκε σε τομές πάχους 1 εκατοστού, κάθετες προς τον επιμήκη της άξονα. Στις δύο επιφάνειες κάθε τομής καθορίστηκαν τα όρια της AR από την απουσία του μπλε χρώματος του ιώδους της γεντιανής και, έπειτα, οι τομές τοποθετήθηκαν κάτω από λαμπτήρα υπεριώδους ακτινοβολίας (μήκος κύματος 365 nm) και προσδιορίστηκε η έκταση των ζωνών NR, ως το σύνολο των περιοχών που δεν εμφάνιζαν το ζωηρό, φθορίζον χρώμα της θειοφλαβίνης. Οι μυοκαρδιακές τομές, αφού ζυγίστηκαν, φωτογραφήθηκαν υπό υπεριώδες φως και πλανιμετρήθηκαν με τη χρήση λογισμικού ανάλυσης εικόνων (ImageJ) για τον υπολογισμό της έκτασης της AR και του NR. Η AR εκφράστηκε σαν ποσοστό της συνολικής μάζας της αριστερής κοιλίας και το NR σαν ποσοστό της AR.

7) Υπολογισμός της κατακράτησης CDCs

Η κατακράτηση των CDCs, 2 ώρες μετά τη χορήγησή τους, υπολογίστηκε με ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) στα ζώα τα οποία έλαβαν τη μέγιστη ασφαλή δόση κυττάρων σε κάθε ομάδα των προκαταρκτικών πειραμάτων ασφαλείας (5' pre-rep και 5' post-rep). Δεδομένου ότι CDCs από αρσενικούς χοίρους χορηγήθηκαν σε θηλυκά ζώα, χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο SRY που βρίσκεται μόνο στο χρωμόσωμα Y.

Μετά τον καθορισμό των περιοχών μη επαναροής, απομονώθηκε η περιοχή υπό κίνδυνο από κάθε μυοκαρδιακή τομή και ζυγίστηκε. Ελήφθησαν δείγματα μυοκαρδιακού ιστού, συνολικού βάρους 25 mg, από τρεις διαφορετικές περιοχές της AR κάθε τομής (ένα δείγμα από το κέντρο και δύο από την περιφέρεια). Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν και απομονώθηκε το γενωμικό DNA χρησιμοποιώντας τυποποιημένο kit απομόνωσης (DNeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen), σύμφωνα με

το πρωτόκολλο της εταιρείας. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του αριθμού των κατακρατηθέντων κυττάρων με το γονίδιο SRY του χοίρου ως εκμαγείο χρησιμοποιήθηκε δοκιμασία TaqMan (Applied Biosystems), χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμους εκκινητές και ανιχνευτές (Applied Biosystems). Για την ποσοτικοποίηση του αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου SRY, κατασκευάστηκε μία πρότυπη καμπύλη από δείγματα γενωμικού DNA από CDCs αρσενικών χοίρων, σε διάφορες αραιώσεις. Ο αριθμός αντιγράφων του γονιδίου SRY σε κάθε σημείο της πρότυπης καμπύλης υπολογίστηκε με βάση την ποσότητα DNA σε κάθε δείγμα και τη συνολική μάζα του γονιδιώματος του χοίρου ανά διπλοειδές κύτταρο¹²⁴. Κάθε δείγμα μυοκαρδιακού ιστού εξετάστηκε σε τριπλέτα και για κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 50 ng DNA. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης 50 ng γενωμικού DNA θηλυκού χοίρου, ώστε να ελεγχθεί η επίδραση που θα μπορούσε αυτό να έχει στην αποτελεσματικότητα της αντίδρασης. Για την πραγματοποίηση της qRT-PCR χρησιμοποιήθηκε σύστημα Corbett RG-6000 (Qiagen). Μετά από αναγωγή του αποτελέσματος κάθε αντίδρασης (αντίγραφα γονιδίου SRY σε 50 ng γενωμικού DNA) στο βάρος της αντίστοιχης περιοχής υπό κίνδυνο, υπολογίστηκε ο απόλυτος αριθμός CDCs στην υπό κίνδυνο περιοχή (κύτταρα/AR), καθώς επίσης και το ποσοστό κατακράτησης CDCs, μετά από διαίρεση με το συνολικό αριθμό των χορηγηθέντων κυττάρων.

8) Υπολογισμός της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου

Έπειτα από 30 ημέρες παρακολούθησης, όλα τα ζώα στα πειράματα αποτελεσματικότητας υποβάλλονταν ξανά σε γενική αναισθησία και διασωλήνωση. Μετά από χειρουργική παρασκευή της δεξιάς καρωτίδας αρτηρίας, εισαγόταν θηκάρι 6F και καθετήρας στεφανιογραφίας και ακολουθούσε σκιαγράφιση των στεφανιαίων αρτηριών, ώστε να επιβεβαιωθεί η βατότητά τους.

Εν συνεχεία, τα πειραματόζωα υποβάλλονταν σε μέση στερνοτομή και απολίνωση του προσθίου κατιόντα κλάδου της αριστερής στεφανιαίας αρτηρίας, στην ίδια ακριβώς θέση όπου είχε γίνει απόφραξη αυτού κατά την οξεία φάση. Μετά από

ενδοκαρδιακή έγχυση 0,3 mL/kg σωματικού βάρους ιώδους της γεντιανής 1% (Sigma-Aldrich) για τον καθορισμό της υπό κίνδυνο περιοχής, ακολουθούσε ευθανασία του πειραματοζώου μέσω πρόκλησης κοιλιακής μαρμαρυγής με τη χρήση συνεχούς ρεύματος και αφαίρεση της καρδιάς. Η αριστερή κοιλία, αφού απομονωθεί από τους κόλπους και τη δεξιά κοιλία, τεμαχιζόταν σε τομές πάχους 1 εκατοστού, κάθετες προς τον επιμήκη της άξονα. Οι τομές βυθίζονταν σε διάλυμα χλωριούχου τετραζολίου 1% (TTC, Sigma-Aldrich) σε σκοτεινό θάλαμο για τουλάχιστον 20 λεπτά, προκειμένου να προσδιοριστεί η έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (myocardial infarction, MI). Το TTC είναι άχρωμο διάλυμα το οποίο, παρουσία δεϋδρογονασών στα ζωντανά μυοκαρδιακά κύτταρα, μετατρέπεται σε αδιάλυτο ίζημα ζωηρού ερυθρού χρώματος. Η αντίδραση αυτή εξαρτάται από το συνένζυμο NADH. Τα κύτταρα που έχουν υποστεί μη αναστρέψιμη βλάβη χάνουν σε διάστημα λίγων ωρών τα συγκεκριμένα ένζυμα και δεν χρωματίζονται ερυθρά από το TTC¹²⁵. Οι μυοκαρδιακές τομές, αφού ζυγίστηκαν, φωτογραφήθηκαν και πλανιμετρήθηκαν με τη χρήση λογισμικού ανάλυσης εικόνων (ImageJ) για τον υπολογισμό της έκτασης της AR και του MI. Η AR εκφράστηκε σαν ποσοστό της συνολικής μάζας της αριστερής κοιλίας και το MI σαν ποσοστό της AR.

9) Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μετρήσεις εκφράστηκαν σαν μέση τιμή \pm σταθερή απόκλιση. Για τη σύγκριση των αιμοδυναμικών παραμέτρων πριν και μετά τη χορήγηση των CDCs, στα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας, χρησιμοποιήθηκε η δοκιμασία t-test ανά ζεύγη. Στα ίδια πειράματα, η σύγκριση της έκτασης της περιοχής μη επαναροής μεταξύ των πειραματοζώων που έλαβαν CDCs σε διάφορες δόσεις και των αντίστοιχων ομάδων ελέγχου έγινε με το t-test ανεξάρτητων δειγμάτων. Η ίδια στατιστική δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε και για τη σύγκριση της κατακράτησης των CDCs ανάμεσα στα πειράματα 5' pre-ger και 5' post-ger, αλλά και για τη σύγκριση της έκτασης του εμφράγματος μεταξύ των ζώων που έλαβαν CDCs και της ομάδας ελέγχου στα πειράματα αποτελεσματικότητας. Όταν η τιμή του p ήταν κάτω από 0.05, οι συγκρινόμενες διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν τα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας, στα οποία τα καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες χορηγήθηκαν σε αυξανόμενες δόσεις, σε πρώιμα στάδια της επαναιμάτωσης προκειμένου να μελετηθεί η έκταση του φαινομένου μη επαναρροής και η κατακράτηση των CDCs στο μυοκάρδιο του λήπτη. Στη συνέχεια, με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων ασφάλειας, πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα αποτελεσματικότητας με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης των CDCs στην έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, 30 ημέρες μετά τη χορήγησή τους.

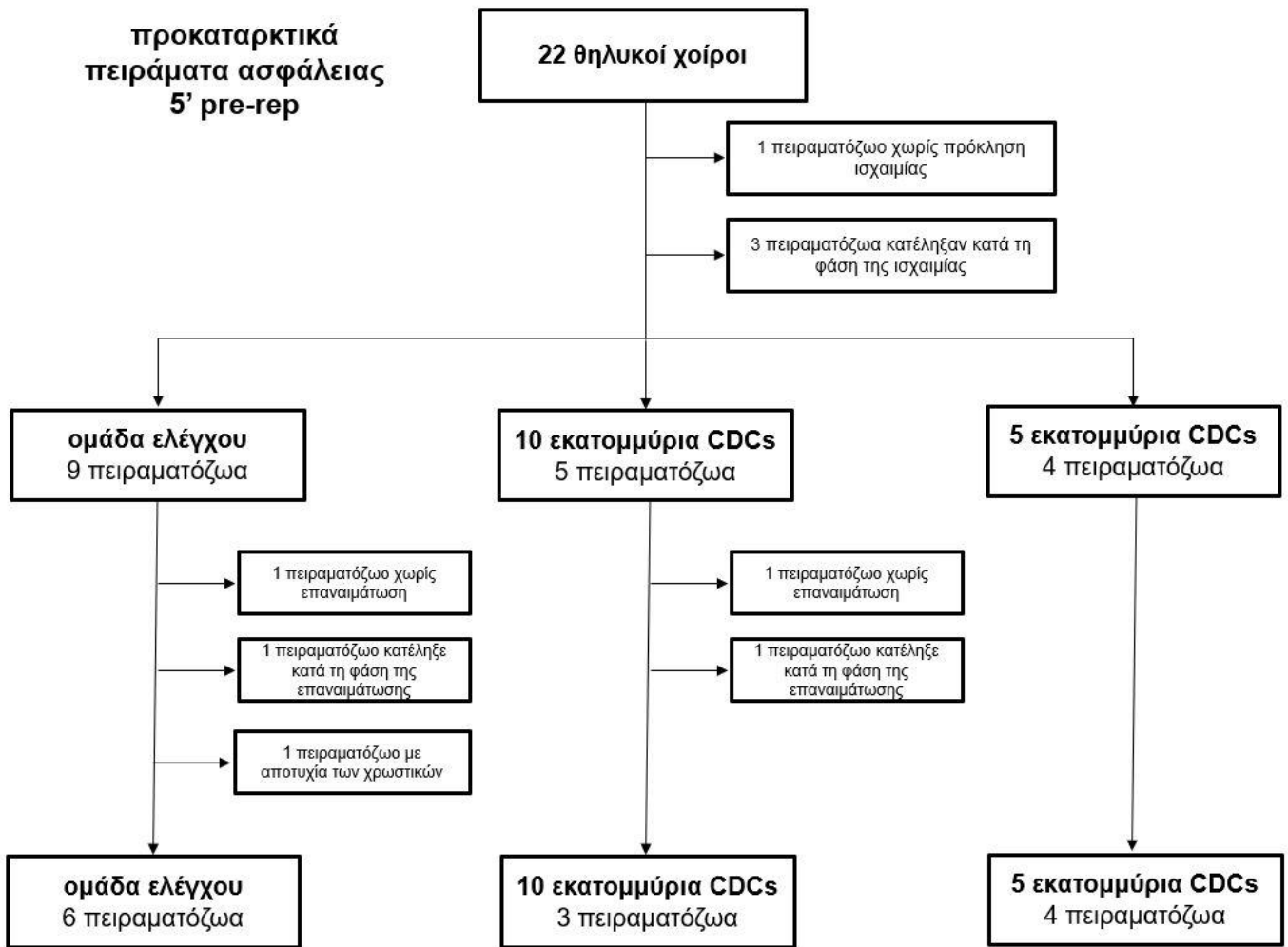
A) Προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας

Στα πλαίσια των προκαταρκτικών πειραμάτων ασφάλειας υπήρξαν κάποιες απώλειες ζώων που καταγράφονται αναλυτικά στην υπο-ενότητα «Θνητότητα και συμβάματα». Στη συνέχεια, μελετήθηκαν διεξοδικά αιμοδυναμικές, μορφομετρικές και κυτταρικές παράμετροι, όπως περιγράφονται στις αντίστοιχες υπο-ενότητες.

1. Θνητότητα και συμβάματα

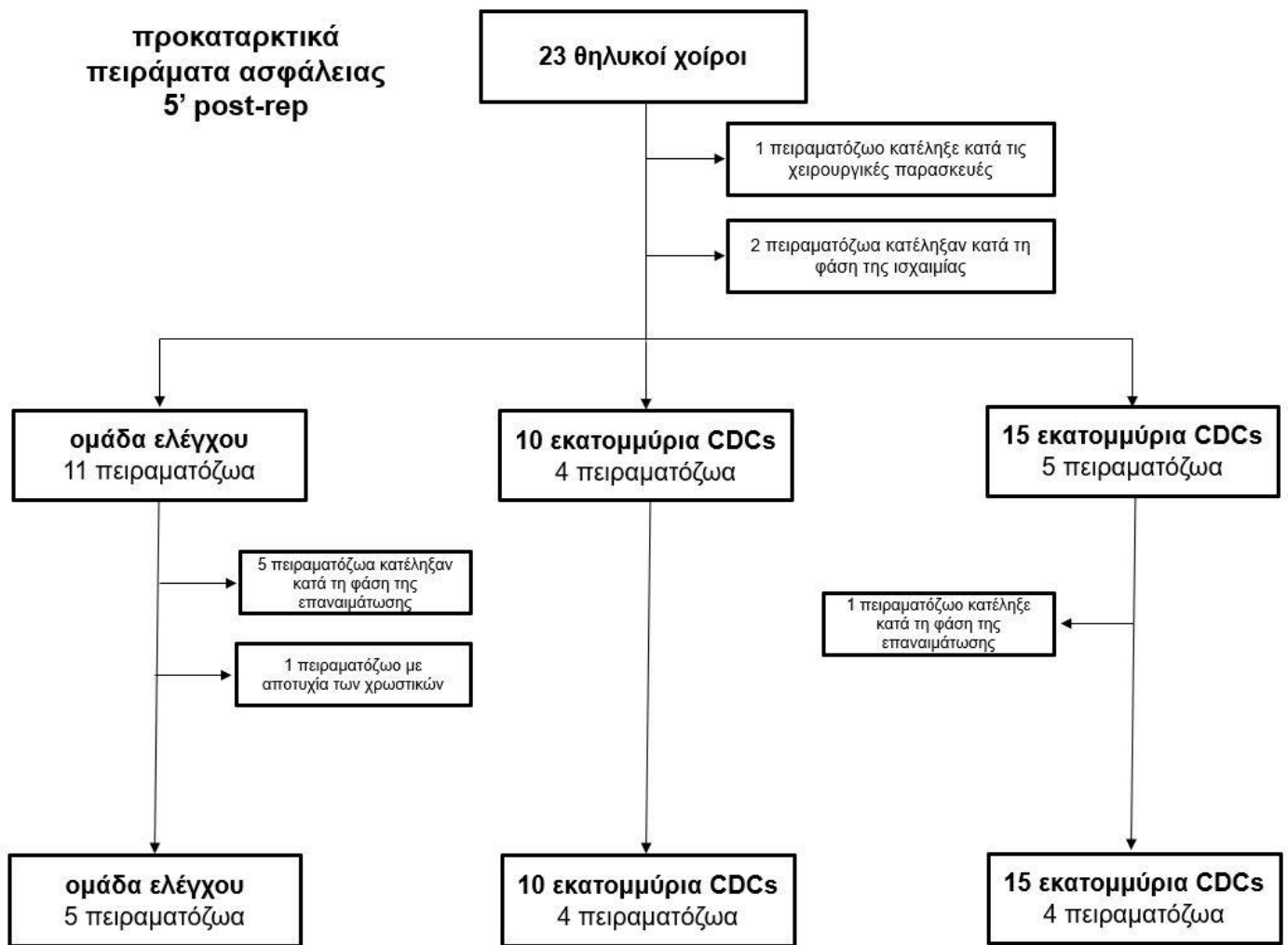
Για την ολοκλήρωση των πειραμάτων 5' pre-per χρησιμοποιήθηκαν 22 θηλυκοί χοίροι (εικόνα 6). Από αυτούς, 3 πειραματόζωα κατέληξαν κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας λόγω καρδιογενούς καταπληξίας ή μη ανατάξιμης κοιλιακής μαρμαρυγής και 2 πειραματόζωα κατέληξαν κατά τη φάση της επαναιμάτωσης εξαιτίας καρδιογενούς καταπληξίας. Επιπλέον, σε ένα ζώο δεν κατέστη δυνατή η πρόκληση ισχαιμίας λόγω ατελούς απόφραξης του προσθίου κατιόντα κλάδου και σε 2 χοίρους δεν κατέστη εφικτή η επαναιμάτωση μετά τη λύση της απολίνωσης. Τέλος, ένα πειραματόζωο αποκλείστηκε από την τελική ανάλυση λόγω τεχνικής αποτυχίας κατά τη χορήγηση των χρωστικών. Συνολικά 13 πειραματόζωα ολοκλήρωσαν επιτυχώς το πειραματικό πρωτόκολλο και συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων (6 πειραματόζωα στην ομάδα ελέγχου, 3 πειραματόζωα που έλαβαν 10 εκατομμύρια CDCs και 4 πειραματόζωα που έλαβαν 5 εκατομμύρια CDCs).

Στα πειράματα 5' post-rep χρησιμοποιήθηκαν 23 θηλυκοί χοίροι (εικόνα 7). Ένα πειραματόζωο κατέληξε κατά τη διάρκεια των χειρουργικών παρασκευών εξαιτίας τρώσης του προσθίου κατιόντα κλάδου και 2 ζώα κατέληξαν κατά τη φάση της ισχαιμίας λόγω μη ανατάξιμης κοιλιακής μαρμαρυγής. Επιπλέον, 6 χοίροι κατέληξαν κατά τη φάση της επαναιμάτωσης λόγω καρδιογενούς καταπληξίας και ένα πειραματόζωο αποκλείστηκε από την τελική ανάλυση λόγω τεχνικής αποτυχίας κατά τη χορήγηση των χρωστικών. Συνολικά 13 πειραματόζωα ολοκλήρωσαν επιτυχώς το πειραματικό πρωτόκολλο και συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων (5 πειραματόζωα στην ομάδα ελέγχου, 4 πειραματόζωα που έλαβαν 10 εκατομμύρια CDCs και 4 πειραματόζωα που έλαβαν 15 εκατομμύρια CDCs).



Εικόνα 6. Σχηματική απεικόνιση συμβαμάτων στα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας 5' pre-ger.

CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιάσφαιρες.



Εικόνα 7. Σχηματική απεικόνιση συμβαμάτων στα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας 5' post-rep.

CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες.

2. Αιμοδυναμικές μετρήσεις

Οι μεταβολές της αρτηριακής πίεσης (συστολικής, διαστολικής και μέσης), της κεντρικής φλεβικής πίεσης και της πίεσης του αριστερού κόλπου μετά την πειραματική παρέμβαση (χορήγηση διαλύματος ελέγχου ή CDCs) μελετήθηκαν στο σύνολο των πειραμάτων 5' pre-rep. Σε όλες τις ομάδες πειραματοζώων παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της συστολικής αρτηριακής πίεσης (πίνακας 1). Συγκεκριμένα, στην ομάδα ελέγχου η συστολική αρτηριακή πίεση μειώθηκε από $91,3 \pm 21$ mmHg σε $77,8 \pm 13,5$ mmHg ($p=0,03$), στην ομάδα των 5 εκατομμυρίων CDCs από $90 \pm 18,1$ mmHg σε $79,5 \pm 15,5$ mmHg ($p=0,04$) και στην ομάδα των 10 εκατομμυρίων CDCs από $98,3 \pm 17,8$ mmHg σε $88,7 \pm 19,7$ mmHg ($p=0,05$). Στην ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκε επιπρόσθετα σημαντική μείωση τόσο της διαστολικής αρτηριακής πίεσης από $64,7 \pm 12,8$ mmHg σε $53 \pm 9,3$ mmHg ($p=0,03$), όσο και της μέσης αρτηριακής πίεσης από $73,6 \pm 15,4$ mmHg σε $61,3 \pm 10,3$ mmHg ($p=0,03$), ενώ οι αντίστοιχες μεταβολές στα πειραματοζώα τα οποία έλαβαν CDCs δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές (πίνακας 1). Σε καμία ομάδα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές της κεντρικής φλεβικής πίεσης και της πίεσης του αριστερού κόλπου. Όπως προκύπτει από τις παραπάνω αιμοδυναμικές καταγραφές, συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου, η χορήγηση των CDCs στα πειράματα 5' pre-rep δεν συνοδεύτηκε από επιδείνωση του αιμοδυναμικού προφίλ των πειραματοζώων.

Οι μεταβολές της αρτηριακής πίεσης (συστολικής, διαστολικής και μέσης), της κεντρικής φλεβικής πίεσης και της πίεσης του αριστερού κόλπου μετά την πειραματική παρέμβαση (χορήγηση διαλύματος ελέγχου ή CDCs) μελετήθηκαν επίσης στα πειράματα 5' post-rep. Σε όλα τα πειραματοζώα παρατηρήθηκε μικρή, μη στατιστικά σημαντική, μείωση της συστολικής, διαστολικής και μέσης αρτηριακής πίεσης μετά την πειραματική παρέμβαση (πίνακας 2). Σε καμία ομάδα δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές της κεντρικής φλεβικής πίεσης και της πίεσης του αριστερού κόλπου. Σύμφωνα με τις παραπάνω αιμοδυναμικές καταγραφές, συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου, η χορήγηση των CDCs στα πειράματα 5' post-rep δεν οδήγησε σε αιμοδυναμική επιβάρυνση των πειραματοζώων.

Πίνακας 1. Αιμοδυναμικές μετρήσεις, ανά ομάδες, στα πειράματα 5' pre-per πριν και μετά τη χορήγηση CDCs ή διαλύματος ελέγχου.

	ΣΑΠ (mmHg)			ΔΑΠ (mmHg)			ΜΑΠ (mmHg)		
	πριν	μετά	p	πριν	μετά	p	πριν	μετά	p
ομάδα ελέγχου	91,3±21	77,8±13,5	0,03	64,7±12,8	53±9,3	0,03	73,6±15,4	61,3±10,3	0,03
5x10⁶ CDCs	90±18,1	79,5±7,8	0,04	57,8±13,8	55,5±5,3	0,61	68,5±14,6	63,5±12,2	0,22
10x10⁶ CDCs	98,3±17,8	88,7±19,7	0,05	61,7±17,5	60±16,5	0,8	70,9±17,8	69,6±17,6	0,83
	ΚΦΠ (mmHg)			ΠΑΚ (mmHg)					
	πριν	μετά	p	πριν	μετά	p			
ομάδα ελέγχου	11.5±1.5	13.5±4.2	0,14	16.4±4.3	16.6±4	0,89			
5x10⁶ CDCs	7±1,4	7,8±2,1	0,32	13,5±3,4	14±5,3	0,64			
10x10⁶ CDCs	8,7±2,5	7,7±1,2	0,23	15,3±6,7	14,7±8,1	0,53			

ΣΑΠ: συστολική αρτηριακή πίεση, ΔΑΠ: διαστολική αρτηριακή πίεση, ΜΑΠ: μέση αρτηριακή πίεση, ΚΦΠ: κεντρική φλεβική πίεση, ΠΑΚ: πίεση αριστερού κόλπου, CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιάσφαιρες, η τιμή p είναι το αποτέλεσμα της στατιστικής δοκιμασίας t-test ανά ζεύγη.

Πίνακας 2. Αιμοδυναμικές μετρήσεις, ανά ομάδες, στα πειράματα 5' post-rep πριν και μετά τη χορήγηση CDCs ή διαλύματος ελέγχου.

	ΣΑΠ (mmHg)			ΔΑΠ (mmHg)			ΜΑΠ (mmHg)		
	πριν	μετά	p	πριν	μετά	p	πριν	μετά	p
ομάδα ελέγχου	103,6±7,7	90±17,1	0,17	71,4±7,4	57±12,5	0,06	82,1±7,1	68±13,6	0,09
10x10⁶ CDCs	95±13,1	94,3±4,7	0,95	70±11,1	58,7±6,7	0,37	78,3±11,7	70,6±6	0,51
15x10⁶ CDCs	92,5±22	74±21	0,17	59±17,7	50,5±12,8	0,28	70,2±19	58,3±15,2	0,22
	ΚΦΠ (mmHg)			ΠΑΚ (mmHg)					
	πριν	μετά	p	πριν	μετά	p			
ομάδα ελέγχου	9,4±3	10±3,3	0,47	11,3±5,1	11±4,4	0,81			
10x10⁶ CDCs	10±0,82	9,8±0,96	0,76	15,5±5,8	14±6,4	0,06			
15x10⁶ CDCs	9,5±0,7	11±0,1	0,21	13,5±3,5	13,5±0,7	1,0			

ΣΑΠ: συστολική αρτηριακή πίεση, ΔΑΠ: διαστολική αρτηριακή πίεση, ΜΑΠ: μέση αρτηριακή πίεση, ΚΦΠ: κεντρική φλεβική πίεση, ΠΑΚ: πίεση αριστερού κόλπου, CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιάσφαιρες, η τιμή p είναι το αποτέλεσμα της στατιστικής δοκιμασίας t-test ανά ζεύγη.

3. Μορφομετρικές μετρήσεις

Η έκταση της περιοχής υπό κίνδυνο (AR) και του φαινομένου μη επαναρροής (NR) στα πειράματα 5' pre-rep εκτιμήθηκαν με τη βοήθεια των χρωστικών ιώδους της γεντιανής και θειοφλαβίνης S (πίνακας 3). Όταν χορηγήθηκαν 10 εκατομμύρια CDCs (n=3), το NR αυξήθηκε σε $45,4 \pm 11,5\%$ της AR σε σύγκριση με $21,3 \pm 5,2\%$ στην ομάδα ελέγχου (n=6, $p=0,003$, εικόνα 8A-B). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην AR ανάμεσα στις δύο ομάδες ($26,2 \pm 5,4\%$ της συνολικής μυοκαρδιακής μάζας στην ομάδα των 10 εκατομμυρίων CDCs έναντι $25,5 \pm 5,5\%$ στην ομάδα ελέγχου, $p=0,85$, εικόνα 8Γ). Λόγω της σημαντικής αύξησης του NR με τη χορήγηση 10 εκατομμυρίων CDCs, η δόση των κυττάρων μειώθηκε στη συνέχεια στα 5 εκατομμύρια. Η έκταση του NR ήταν συγκρίσιμη μεταξύ των πειραματοζώων που έλαβαν 5 εκατομμύρια CDCs ($21,2 \pm 4,8\%$ της AR, n=4) και της ομάδας ελέγχου ($21,3 \pm 5,2\%$ της AR, $p=0,98$, εικόνα 8A-B). Η AR δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($23,1 \pm 3,2\%$ της συνολικής μυοκαρδιακής μάζας στην ομάδα των 5 εκατομμυρίων CDCs έναντι $25,5 \pm 5,5\%$ στην ομάδα ελέγχου, $p=0,45$, εικόνα 8Γ). Με βάση τα παραπάνω, η χορήγηση 5 εκατομμυρίων CDCs στα πειράματα 5' pre-rep θεωρήθηκε ασφαλής δόση που διατηρεί ικανοποιητική τη βατότητα της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας χωρίς να επιδεινώνει το φαινόμενο μη επαναρροής.

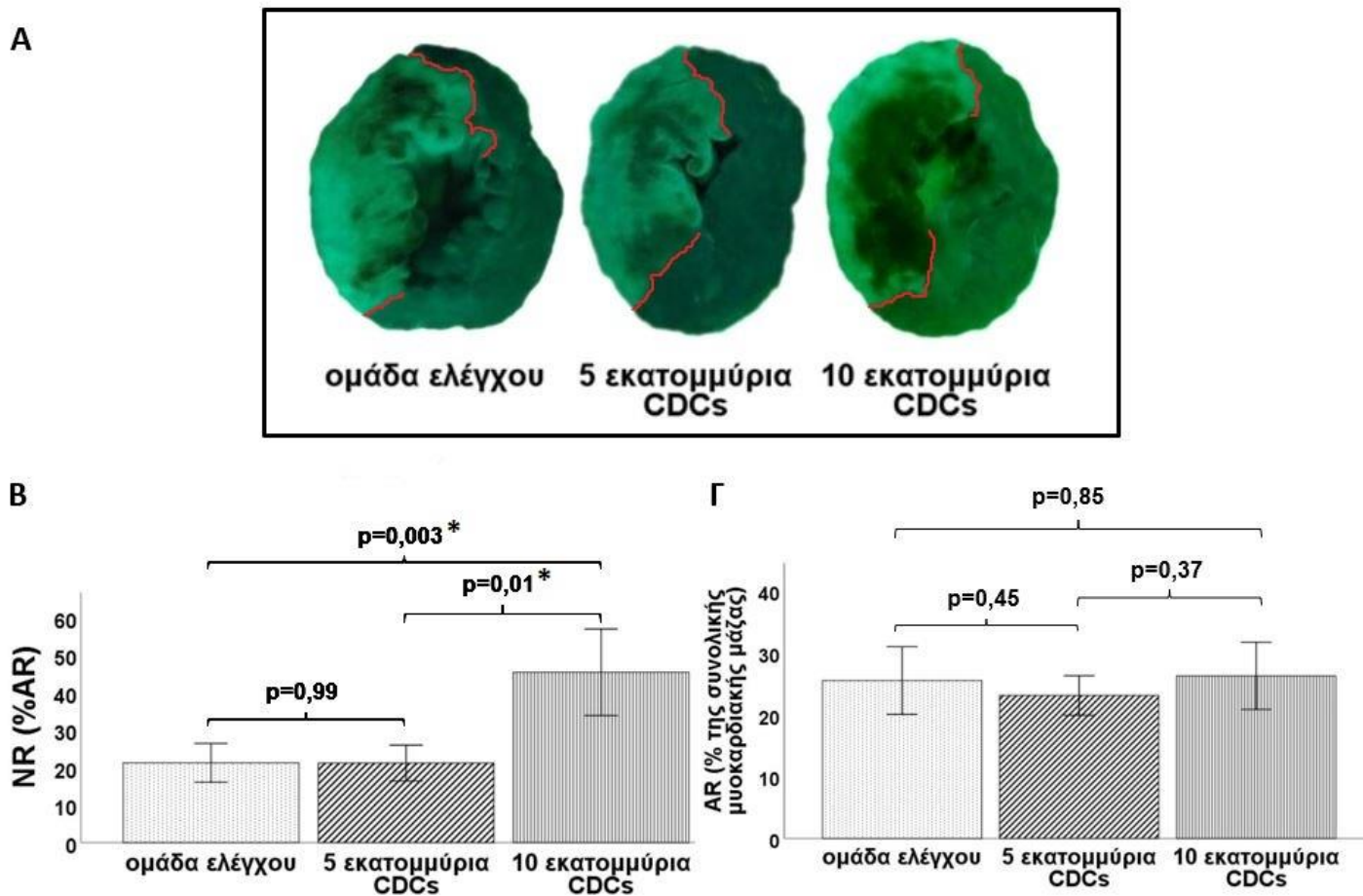
Στα πειράματα 5' post-rep εκτιμήθηκε επίσης η έκταση της AR και του NR με τη βοήθεια των ίδιων χρωστικών (πίνακας 4). Όταν χορηγήθηκαν 10 εκατομμύρια CDCs (n=4), δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο NR μεταξύ των πειραματοζώων που έλαβαν κύτταρα ($15,5 \pm 3,2\%$ της AR) και της ομάδας ελέγχου ($15,6 \pm 4,5\%$, n=5, $p=0,99$, εικόνα 9A-B). Δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στην AR ανάμεσα στις δύο ομάδες ($19,6 \pm 2,5\%$ της συνολικής μυοκαρδιακής μάζας στην ομάδα των 10 εκατομμυρίων CDCs έναντι $19,5 \pm 3,9\%$ στην ομάδα ελέγχου, $p=0,96$, εικόνα 9Γ). Λόγω συγκρίσιμης έκτασης του φαινομένου μη επαναρροής μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των ζώων που έλαβαν 10 εκατομμύρια CDCs, η δόση των κυττάρων αυξήθηκε στη συνέχεια στα 15 εκατομμύρια. Η αύξηση της δόσης είχε ως αποτέλεσμα σημαντικά μεγαλύτερη έκταση NR στα πειραματοζώα που έλαβαν 15 εκατομμύρια CDCs ($36,9 \pm 12,1\%$ της AR, n=4) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($15,6 \pm 4,5\%$ της AR, $p=0,008$, εικόνα 9A-B). Η AR δεν διέφερε σημαντικά ανάμεσα στις δύο ομάδες ($20,1 \pm 6,3\%$ της συνολικής μυοκαρδιακής μάζας στην ομάδα των 15 εκατομμυρίων CDCs έναντι $19,5 \pm 3,9\%$ στην

ομάδα ελέγχου, $p=0,86$, εικόνα 9Γ). Με βάση τα παραπάνω, η χορήγηση 10 εκατομμυρίων CDCs στα πειράματα 5' post-rep θεωρήθηκε ασφαλής δόση που διατηρεί ικανοποιητική τη βατότητα της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας χωρίς να οδηγεί σε κυτταρικό εμβολισμό και επιδείνωση του φαινομένου μη επαναρροής.

Πίνακας 3. Έκταση περιοχής υπό κίνδυνο και φαινομένου μη επαναρροής στα πειράματα 5' pre-ger.

Ομάδα	AR (%)	NR (%)
control	31,2	21,5
control	21,1	16,5
control	25,3	14,8
control	33,0	21,6
control	22,4	29,2
control	19,9	24,0
5 εκατομμύρια CDCs	27,1	23,2
5 εκατομμύρια CDCs	23,3	24,9
5 εκατομμύρια CDCs	22,6	22,5
5 εκατομμύρια CDCs	19,3	14,2
10 εκατομμύρια CDCs	32,3	53,0
10 εκατομμύρια CDCs	21,9	32,1
10 εκατομμύρια CDCs	24,5	51,1

control: ομάδα ελέγχου, AR: περιοχή υπό κίνδυνο, NR: φαινόμενο μη επαναρροής, CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες.



Εικόνα 8. Μορφομετρικές μετρήσεις στα πειράματα 5' pre-rep. (A) Αντιπροσωπευτικές μυοκαρδιακές τομές μετά από χρώση με θειοφλαβίνη S και ιώδες της γεντιανής υπό υπεριώδες φως. Τα όρια της AR έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα. Οι σκοτεινές, μη φθορίζουσες ζώνες μυοκαρδιακού ιστού εντός της AR αντιπροσωπεύουν περιοχές μη επαναρροής. **(B)** Σύγκριση της έκτασης του NR μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των πειραματοζώων που έλαβαν διαφορετικές δόσεις CDCs. **(Γ)** Σύγκριση της AR μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των πειραματοζώων που έλαβαν διαφορετικές δόσεις CDCs.

CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιάσφαιρες, NR: φαινόμενο μη επαναρροής, AR: περιοχή υπό κίνδυνο. Η τιμή p είναι το αποτέλεσμα της στατιστικής δοκιμασίας t -test ανεξάρτητων δειγμάτων.

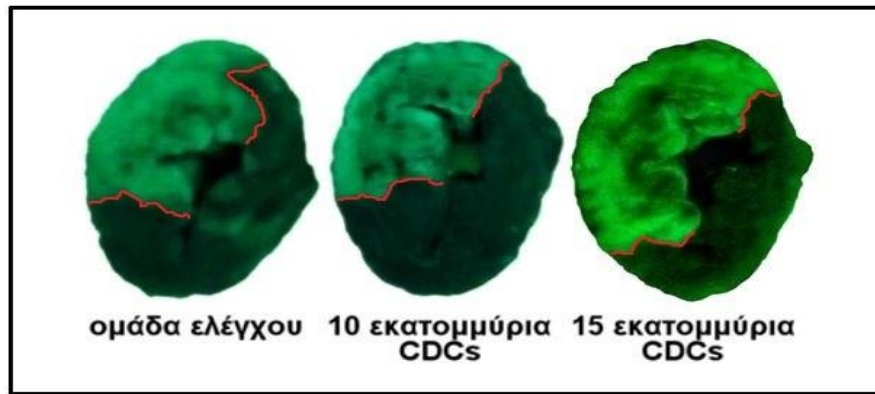
**Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκαν τιμές $p < 0,05$.*

Πίνακας 4. Έκταση περιοχής υπό κίνδυνο και φαινομένου μη επαναρροής στα πειράματα 5' post-rep.

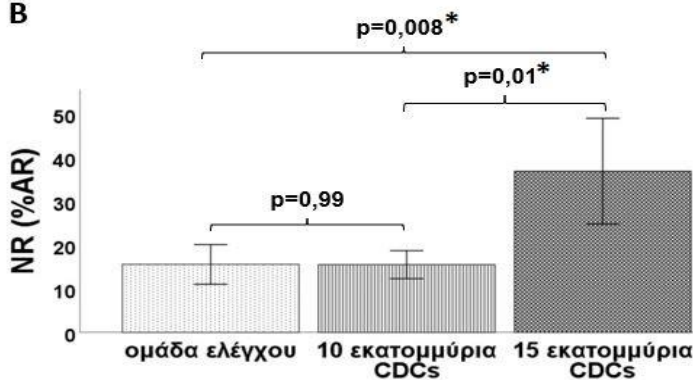
Ομάδα	AR (%)	NR (%)
control	14,8	11,2
control	20,5	20,7
control	19,1	17,4
control	17,7	18,2
control	25,5	10,4
10 εκατομμύρια CDCs	16,1	12,5
10 εκατομμύρια CDCs	21,9	13,1
10 εκατομμύρια CDCs	20,5	19,0
10 εκατομμύρια CDCs	20,0	17,4
15 εκατομμύρια CDCs	25,1	25,6
15 εκατομμύρια CDCs	14,2	32,6
15 εκατομμύρια CDCs	15,3	54,0
15 εκατομμύρια CDCs	26,0	35,5

Control: ομάδα ελέγχου, AR: περιοχή υπό κίνδυνο, NR: φαινόμενο μη επαναρροής, CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες.

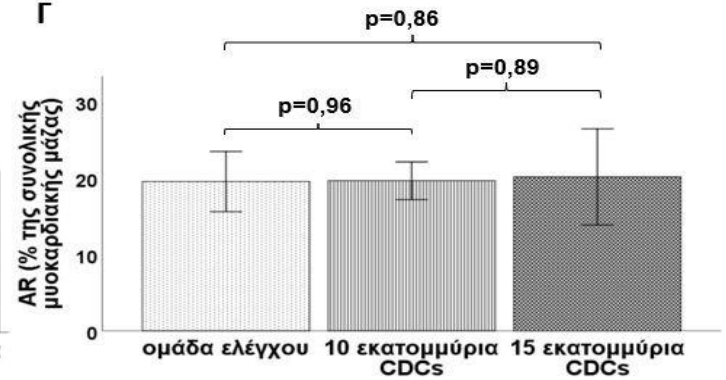
A



B



Γ



Εικόνα 9. Μορφομετρικές μετρήσεις στα πειράματα 5' post-rep. (A) Αντιπροσωπευτικές μυοκαρδιακές τομές μετά από χρώση με θειοφλαβίνη S και ιώδες της γεντιανής υπό υπεριώδες φως. Τα όρια της AR έχουν επισημανθεί με κόκκινο χρώμα. Οι σκοτεινές, μη φθορίζουσες ζώνες μυοκαρδιακού ιστού εντός της AR αντιπροσωπεύουν περιοχές μη επαναροής. **(B)** Σύγκριση της έκτασης του NR μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των πειραματοζώων που έλαβαν διαφορετικές δόσεις CDCs. **(Γ)** Σύγκριση της AR μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των πειραματοζώων που έλαβαν διαφορετικές δόσεις CDCs.

CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιάσφαιρες, NR: φαινόμενο μη επαναροής, AR: περιοχή υπό κίνδυνο. Η τιμή p είναι το αποτέλεσμα της στατιστικής δοκιμασίας t-test ανεξάρτητων δειγμάτων.

**Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκαν τιμές $p < 0,05$.*

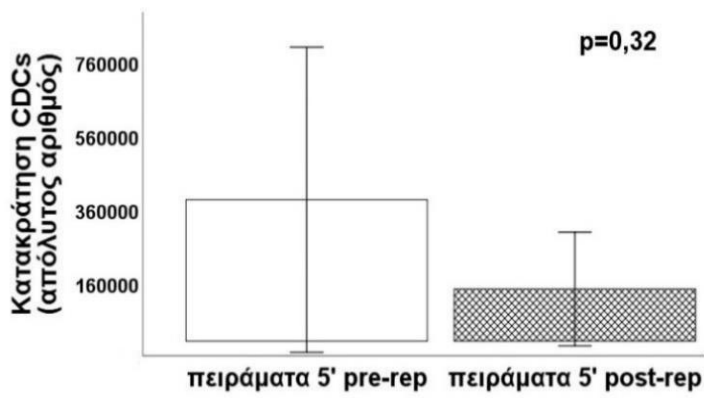
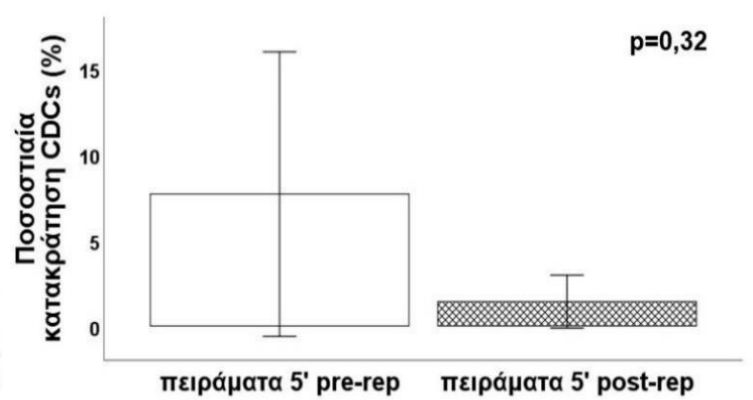
4. Κυτταρική κατακράτηση

Η κατακράτηση των CDCs συγκρίθηκε μεταξύ των δύο ομάδων προκαταρκτικών πειραμάτων ασφάλειας μετά από χορήγηση της εκάστοτε μέγιστης ασφαλούς δόσης κυττάρων (πειράματα 5' pre-rep, n=3, και πειράματα 5' post-rep, n=4, πίνακας 5). Σε ένα από τα πειράματα της ομάδας 5' post-rep δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευθούν CDCs. Δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες προκαταρκτικών πειραμάτων αναφορικά με τον απόλυτο αριθμό CDCs που κατακρατήθηκαν στην υπό κίνδυνο περιοχή (383753 ± 414152 στα πειράματα 5' pre-rep έναντι 141551 ± 154326 στα πειράματα 5' post-rep, $p=0,32$, εικόνα 10A) και το ποσοστό των κατακρατηθέντων κυττάρων ($7,7 \pm 8,3\%$ στα πειράματα 5' pre-rep έναντι $1,4 \pm 1,5\%$ πειράματα 5' post-rep, $p=0,32$, εικόνα 10B). Παρόλα αυτά, δεδομένου ότι τόσο ο απόλυτος αριθμός, όσο και το ποσοστό των CDCs που κατακρατήθηκαν στην περιοχή υπό κίνδυνο ήταν αριθμητικά μεγαλύτεροι στα πειράματα 5' pre-rep, το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χορήγησης επιλέχθηκε για τα πειράματα αποτελεσματικότητας.

Πίνακας 5. Απόλυτος αριθμός και ποσοστιαία κατακράτηση CDCs στην περιοχή υπό κίνδυνο στα πειράματα 5' pre-rep και 5' post-rep.

Πείραμα	Απόλυτος αριθμός CDCs	Κατακράτηση (%)
5' pre-rep	32268	0,6
5' pre-rep	278664	5,6
5' pre-rep	840326	16,8
5' post-rep	0	0
5' post-rep	90074	0,9
5' post-rep	115320	1,2
5' post-rep	360870	3,6

CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες

A**B**

Εικόνα 10. Κατακράτηση των CDCs στην υπό κίνδυνο περιοχή, δύο ώρες μετά τη χορήγηση, στα προκαταρκτικά πειράματα 5' pre-rep και 5' post-rep. **(A)** Απόλυτος αριθμός CDCs που κατακρατήθηκαν στην υπό κίνδυνο περιοχή. **(B)** Ποσοστό των χορηγηθέντων CDCs τα οποία κατακρατήθηκαν στην υπό κίνδυνο περιοχή.

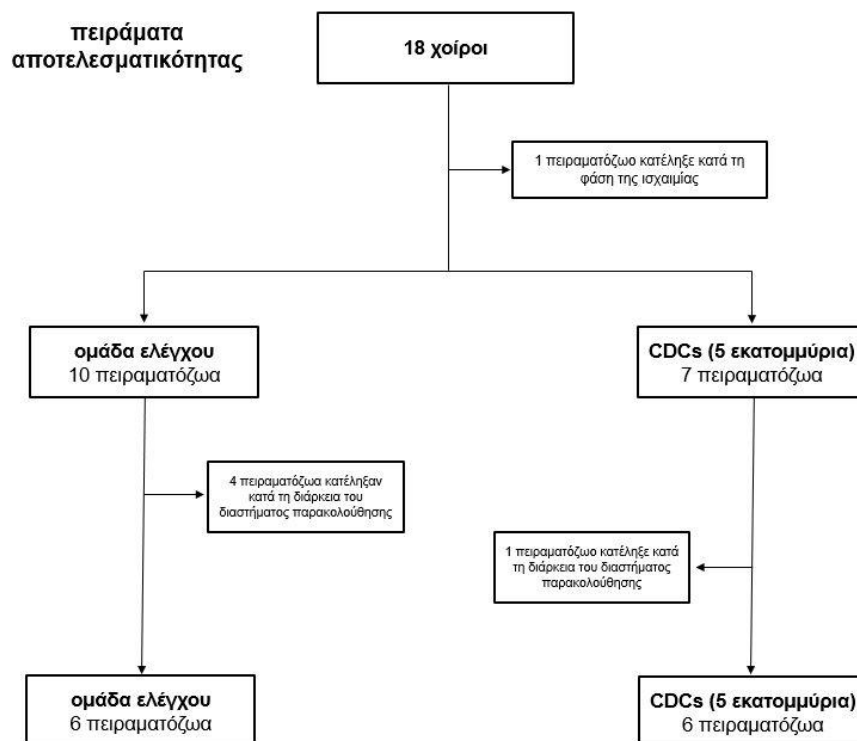
CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιάσφαιρες. Η τιμή p είναι το αποτέλεσμα της στατιστικής δοκιμασίας t -test ανεξάρτητων δειγμάτων. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκαν τιμές $p < 0,05$.

B) Πειράματα αποτελεσματικότητας

Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αποτελεσματικότητας υπήρξαν κάποιες απώλειες πειραματοζώων που περιγράφονται αναλυτικά στην υπο-ενότητα «Θνητότητα και συμβάματα». Στα ζώα που ολοκλήρωσαν το πειραματικό πρωτόκολλο μελετήθηκαν διεξοδικά αιμοδυναμικές και μορφομετρικές παράμετροι, όπως περιγράφονται στις αντίστοιχες υπο-ενότητες.

1. Θνητότητα και συμβάματα

Για την ολοκλήρωση των πειραμάτων αποτελεσματικότητας χρησιμοποιήθηκαν 18 χοίροι (εικόνα 11). Από αυτούς, 1 πειραματοζώο κατέληξε κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας λόγω μη ανατάξιμης κοιλιακής μαρμαρυγής. Πέντε επιπλέον ζώα κατέληξαν κατά το διάστημα παρακολούθησης των 30 ημερών. Συνολικά 12 πειραματοζώα ολοκλήρωσαν επιτυχώς το πειραματικό πρωτόκολλο και συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων (6 πειραματοζώα στην ομάδα ελέγχου και 6 πειραματοζώα στην ομάδα των CDCs).



Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση συμβαμάτων στα πειράματα αποτελεσματικότητας.

CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες.

2. Αιμοδυναμικές μετρήσεις

Στο σύνολο των πειραμάτων αποτελεσματικότητας μελετήθηκαν οι μεταβολές της αρτηριακής πίεσης (συστολικής, διαστολικής και μέσης) και της κεντρικής φλεβικής πίεσης μετά την πειραματική παρέμβαση (χορήγηση διαλύματος ελέγχου ή CDCs). Σε καμία ομάδα πειραματοζώων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις αιμοδυναμικές παραμέτρους που μελετήθηκαν (πίνακας 6). Σύμφωνα με τα παραπάνω, συγκρινόμενη με την ομάδα ελέγχου, η χορήγηση των CDCs στα πειράματα αποτελεσματικότητας δεν οδήγησε σε αιμοδυναμική επιβάρυνση των πειραματοζώων.

Πίνακας 6. Αιμοδυναμικές μετρήσεις, ανά ομάδες, στα πειράματα αποτελεσματικότητας πριν και μετά τη χορήγηση CDCs ή διαλύματος ελέγχου.

	ΣΑΠ (mmHg)			ΔΑΠ (mmHg)		
	πριν	μετά	p	πριν	μετά	p
ομάδα ελέγχου	97,2±15,8	102,8±10,9	0,51	69,4±25	69,8±10	0,96
CDCs	79±12,2	82,3±16,9	0,35	55±9,1	51,5±12,8	0,52
	ΜΑΠ (mmHg)			ΚΦΠ (mmHg)		
	πριν	μετά	p	πριν	μετά	p
ομάδα ελέγχου	78,7±21,2	80,8±7,2	0,78	10,8±1,9	11,4±1,5	0,67
CDCs	63±8	61,8±13,7	0,76	11,3±1,6	12±1	0,53

ΣΑΠ: συστολική αρτηριακή πίεση, ΔΑΠ: διαστολική αρτηριακή πίεση, ΜΑΠ: μέση αρτηριακή πίεση, ΚΦΠ: κεντρική φλεβική πίεση, CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες, η τιμή p είναι το αποτέλεσμα της στατιστικής δοκιμασίας t-test ανά ζεύγη. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκαν τιμές $p < 0,05$.

3. Μορφομετρικές μετρήσεις

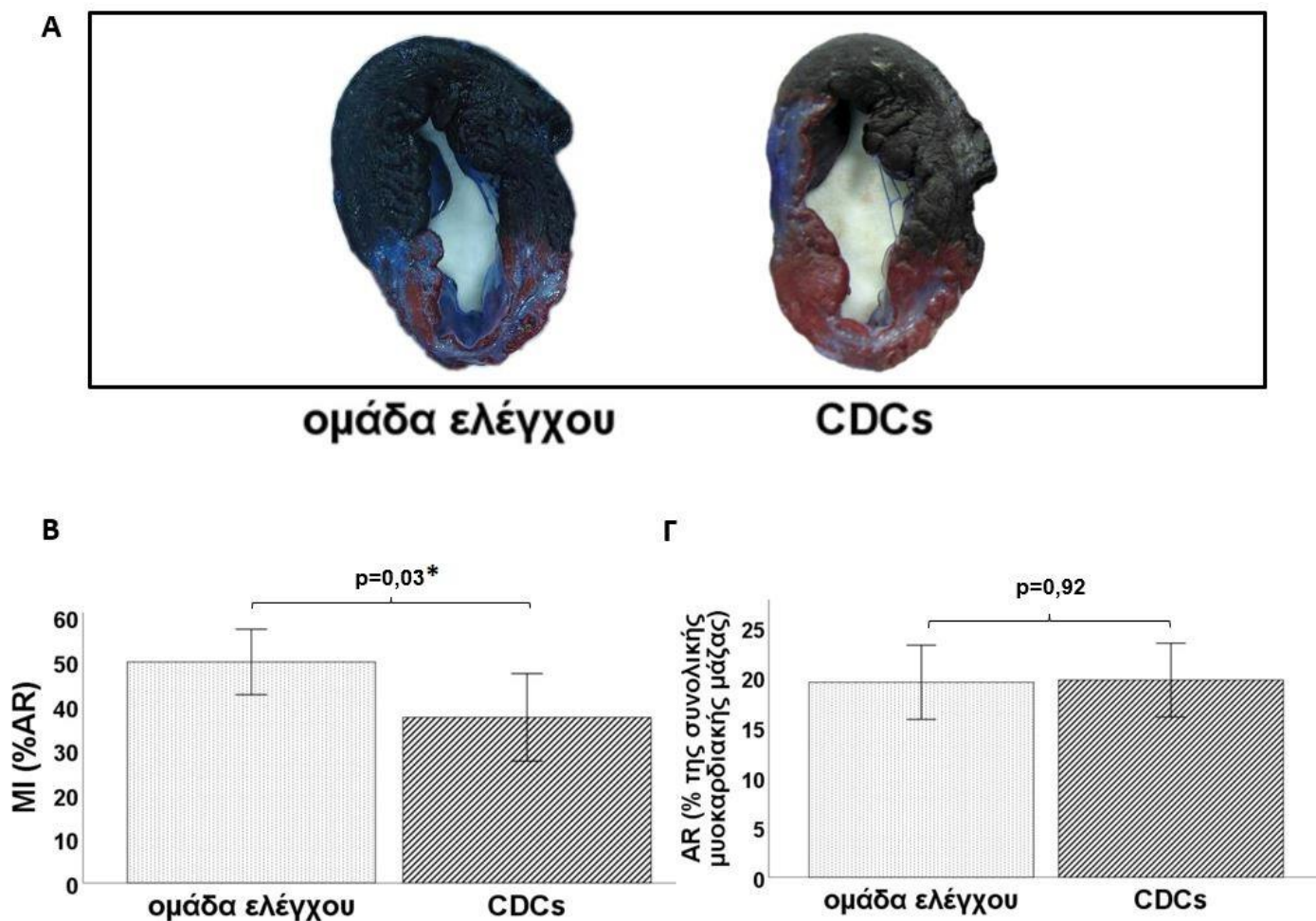
Η έκταση της περιοχής υπό κίνδυνο (AR) και η έκταση του εμφράγματος (MI) εκτιμήθηκαν στα πειράματα αποτελεσματικότητας με τη βοήθεια των χρωστικών χλωριούχου τετραζολίου (TTC) και ιώδους της γεντιανής (πίνακας 7). Στα πειραματοζώα που έλαβαν CDCs (n=6), η έκταση του εμφράγματος μετά από 30 ημέρες παρακολούθησης υπολογίστηκε σε 37,4±9,9% της AR και βρέθηκε σημαντικά

μικρότερη σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου (n=6), όπου η έκταση του εμφράγματος υπολογίστηκε σε 49,9±7,4% της AR (p=0,03, εικόνα 12A-B). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά στην AR ανάμεσα στις δύο ομάδες (19,7±3,7% της συνολικής μυοκαρδιακής μάζας στην ομάδα των CDCs έναντι 19,5±3,7% στην ομάδα ελέγχου, p=0,92, εικόνα 12Γ), γεγονός το οποίο υποδηλώνει συγκρίσιμη αρχικά ισχαιμική βλάβη. Συμπερασματικά, η ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών CDCs στα πειράματα αποτελεσματικότητας σχετίστηκε με μείωση της έκτασης του εμφράγματος μετά από 30 ημέρες παρακολούθησης των πειραματοζώων.

Πίνακας 7. Έκταση περιοχής υπό κίνδυνο και έκταση εμφράγματος στα πειράματα αποτελεσματικότητας.

Ομάδα	AR (%)	MI (%)
control	26,6	51,9
control	17,6	57,4
control	15,9	51,1
control	19,6	46,0
control	19,3	37,2
control	18,2	55,8
CDCs	18,1	47,8
CDCs	16,9	51,5
CDCs	20,3	32,2
CDCs	21,4	29,4
CDCs	25,9	35,3
CDCs	15,8	28,2

Control: ομάδα ελέγχου, AR: περιοχή υπό κίνδυνο, MI: έκταση εμφράγματος, CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες.



Εικόνα 12. Μορφομετρικές μετρήσεις στα πειράματα αποτελεσματικότητας. (Α) Αντιπροσωπευτικές μυοκαρδιακές τομές μετά από χρώση με χλωριούχο τετραζόλιο (TTC) και ιώδες της γεντιανής. Το ζωηρό ερυθρό χρώμα αντιπροσωπεύει περιοχές βιώσιμου μυοκαρδιακού ιστού εντός της AR. Παρατηρείται επίσης διατήρηση του πάχους του μυοκαρδίου εντός της AR στην τομή από το πειραματόζωο που έλαβε CDCs. **(Β)** Σύγκριση της έκτασης του εμφράγματος μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των πειραματοζώων που έλαβαν CDCs. **(Γ)** Σύγκριση της AR μεταξύ της ομάδας ελέγχου και των πειραματοζώων που έλαβαν CDCs.

CDCs: καρδιακά προγονικά κύτταρα από καρδιόσφαιρες, MI: έκταση εμφράγματος, AR: περιοχή υπό κίνδυνο. Η τιμή p είναι το αποτέλεσμα της στατιστικής δοκιμασίας t -test ανεξάρτητων δειγμάτων. *Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκαν τιμές $p < 0,05$.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η έγκαιρη και επιτυχής επαναιμάτωση με πρωτογενή αγγειοπλαστική αποτελεί την αποτελεσματικότερη θεραπευτική στρατηγική στην αντιμετώπιση του OEM⁵. Σε επίπεδο στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας, ωστόσο, η ίδια η επαναιμάτωση μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω αγγειακή βλάβη και εμφάνιση περιοχών μη επαναρροής (no-reflow phenomenon)²³. Η χαμηλή ανοσογονικότητα των αλλογενών CDCs¹⁰² έχει επιτρέψει τη χορήγησή τους κατά τη φάση της επαναιμάτωσης ενός OEM με συνακόλουθη μείωση της έκτασης του εμφράγματος σε προκλινικά πειραματικά μοντέλα^{106,107}, αλλά τα αποτελέσματα των μέχρι τώρα κλινικών μελετών παραμένουν φτωχά^{79,112}. Το φαινόμενο μη επαναρροής ενδεχομένως επιδρά αρνητικά στην ενδοστεφανιαία χορήγηση των αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων, καθώς εξελίσσεται ταχέως μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης³⁹ και η εμφάνισή του συνεπάγεται τη δημιουργία μυοκαρδιακών περιοχών, οι οποίες βρίσκονται σε κίνδυνο νέκρωσης από την ισχαιμική προσβολή και παράλληλα στερούνται αιματικής άρδευσης σε επίπεδο μικροκυκλοφορίας, με αποτέλεσμα να καθίστανται απροσπέλαστες τόσο από τη συνήθη φαρμακευτική αγωγή, όσο και από την ενδοστεφανιαία χορηγούμενη κυτταρική θεραπεία. Το γεγονός αυτό ίσως εξηγεί και τη χειρότερη πρόγνωση όσων ασθενών εμφανίζουν φαινόμενο μη επαναρροής μετά από OEM^{42,126}. Σε αντίθεση όμως με τη συνήθη φαρμακευτική αγωγή για την πρόληψη της αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας¹²⁷, η ενδοστεφανιαία χορήγηση των CDCs θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σε πρώιμα στάδια της επαναιμάτωσης, προτού εγκατασταθεί και εξελιχθεί το φαινόμενο μη επαναρροής. Στην παρούσα πειραματική μελέτη εξετάστηκε για πρώτη φορά η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα της ενδοστεφανιαίας χορήγησης αλλογενών CDCs πρώιμα κατά την επαναιμάτωση, σε χοίρειο μοντέλο μυοκαρδιακής ισχαιμίας – επαναιμάτωσης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνουν την ασφάλεια της ενδοστεφανιαίας οδού για τη χορήγηση των καρδιακών προγονικών κυττάρων. Η έγχυση κυττάρων εντός μιας στεφανιαίας αρτηρίας έχει αποδειχθεί ασφαλής σε προηγούμενες κλινικές μελέτες καρδιακών^{72,79,108,112} και αιμοποιητικών¹²⁸⁻¹³⁰ προγονικών κυττάρων και μπορεί εύκολα να διεξαχθεί στην κλινική πράξη με τη χρήση καθημερινών καθετήρων αγγειοπλαστικής. Σε αντίθεση με προηγούμενες εργασίες, η χορήγηση των CDCs στην παρούσα μελέτη, προτού εξελιχθεί η βλάβη της

μικροκυκλοφορίας και το φαινόμενο μη επαναρροής, επέτρεψε στα χορηγούμενα κύτταρα να προσπελάσουν περιοχές του μυοκαρδίου οι οποίες δεν λαμβάνουν αιματική ροή και οι οποίες κινδυνεύουν από ισχαιμική νέκρωση. Ο προσεκτικός καθορισμός της δόσης των χορηγούμενων CDCs στα προκαταρκτικά πειράματα ασφάλειας συνέβαλε στην ελαχιστοποίηση του κυτταρικού εμβολισμού της μικροκυκλοφορίας, με αποτέλεσμα να αποφευχθεί η επιδείνωση του φαινομένου μη επαναρροής. Στα πειράματα 5' pre-ger, ο μέγιστος αριθμός αλλογενών CDCs που διατήρησε ικανοποιητική τη βατότητα της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας υπολογίστηκε στα 5 εκατομμύρια κύτταρα. Η ανασύσταση των χορηγούμενων κυττάρων σε διάλυμα τελικού όγκου 5 mL και ο σχετικά ταχύς ρυθμός χορήγησης (συνεχής έγχυση εντός 30 δευτερολέπτων, προκειμένου να αποφευχθούν χρονικές καθυστερήσεις στην έγκαιρη επαναιμάτωση) είναι πιθανό να οδήγησαν στη δημιουργία κυτταρικών συσσωματωμάτων, ιδιαίτερα στις υψηλότερες δόσεις CDCs. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να εξηγήσει τη χαμηλότερη δόση αλλογενών CDCs που μπόρεσε να χορηγηθεί με ασφάλεια στα πειράματα 5' pre-ger σε σύγκριση με τα πειράματα 5' post-ger, αλλά και με προηγούμενες μελέτες^{106,107}. Στα πειράματα 5' post-ger, ο μέγιστος αριθμός αλλογενών CDCs που μπόρεσε να χορηγηθεί χωρίς να συνοδευτεί από επιδείνωση του φαινομένου μη επαναρροής προσδιορίστηκε στα 10 εκατομμύρια κύτταρα. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα της πειραματικής μελέτης των Kanazawa και συν., όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν 30 λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης¹⁰⁷ και η δόση των 10 εκατομμυρίων αλλογενών CDCs φαίνεται ότι αποτελεί τη μέγιστη ασφαλή δόση μετά την πυροδότηση του φαινομένου της βλάβης από επαναιμάτωση. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τόσο πριν όσο και μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης, υπάρχει ένας πεπερασμένος αριθμός κυττάρων που μπορεί να χορηγηθεί ενδοστεφανιαία, πέραν του οποίου το φαινόμενο μη επαναρροής αυξάνεται δραματικά.

Σε αντίθεση με τη μελέτη των Kanazawa και συν.¹⁰⁷, στην οποία η χορήγηση αλλογενών CDCs φάνηκε να βελτιώνει το φαινόμενο μη επαναρροής, στην παρούσα εργασία δεν παρατηρήθηκε μείωση της έκτασης του φαινομένου μετά από χορήγηση οποιασδήποτε δόσης κυττάρων. Στα πειράματα 5' pre-ger, η πιθανή δημιουργία κυτταρικών συσσωματωμάτων, όπως ήδη αναφέρθηκε, ενδεχομένως αντιστάθμισε την όποια ευεργετική επίδραση των κυττάρων στην έκταση του φαινομένου μη επαναρροής. Στα πειράματα 5' post-ger, από την άλλη, η μικρότερη δόση αλλογενών

CDCs που χορηγήθηκε ήταν 10 εκατομμύρια κύτταρα, δόση η οποία στη μελέτη των Kanazawa και συν. δεν συσχετίστηκε με στατιστικά σημαντική μείωση του φαινομένου μη επαναροής. Συμπερασματικά, καμία από τις χορηγούμενες δόσεις αλλογενών CDC δεν βρέθηκε να μειώνει το φαινόμενο μη επαναροής στην παρούσα πειραματική μελέτη.

Η περιορισμένη κατακράτηση των χορηγούμενων κυττάρων στο ισχαιμικό μυοκάρδιο αποτελεί ένα από τα βασικά προβλήματα της κυτταρικής θεραπείας^{102,113}. Δεδομένου ότι τα υψηλότερα ποσοστά κυτταρικής κατακράτησης έχουν συσχετιστεί με μεγαλύτερο μακροπρόθεσμο όφελος από την κυτταρική θεραπεία^{114,121}, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης κρίνονται ιδιαίτερα σημαντικά, καθώς, όταν η χορήγηση των CDCs πραγματοποιήθηκε πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης (πειράματα 5' pre-*rep*), παρατηρήθηκε πενταπλάσια αύξηση της ποσοστιαίας κυτταρικής κατακράτησης. Το γεγονός αυτό μεταφράστηκε σε μεγαλύτερο απόλυτο αριθμό προσκολληθέντων κυττάρων στα πειράματα 5' pre-*rep* συγκριτικά με τα πειράματα 5' post-*rep*, παρά την χαμηλότερη συνολική δόση χορηγούμενων CDCs. Οι λόγοι για την αυξημένη κυτταρική κατακράτηση που παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης δεν είναι σαφείς. Είναι γνωστό ότι η κατακράτηση των προγονικών κυττάρων στο μυοκάρδιο εξαρτάται από την ακεραιότητα του ενδοθηλίου και την ύπαρξη ενδογενών μορίων προσέλκυσης, η έκφραση των οποίων αυξάνεται μετά από μυοκαρδιακή βλάβη¹³¹. Θα μπορούσε επομένως να θεωρηθεί ότι η χορήγηση των CDCs πριν από την ανάπτυξη της βλάβης από επαναιμάτωση διευκολύνει την κυτταρική επιβίωση και την προσκόλληση των κυττάρων στο μυοκάρδιο του λήπτη. Επιπλέον, η απουσία στεφανιαίας αιματικής ροής τη στιγμή της χορήγησης έχει συσχετιστεί με αυξημένη κυτταρική κατακράτηση σε προηγούμενη μελέτη σε επίμυες¹¹³, καθώς αποτρέπει την απομάκρυνση των κυττάρων με την αιματική απορροή των στεφανιαίων αγγείων. Η παρατεταμένη απουσία αιματικής ροής στο στεφανιαίο αγγείο – στόχος κατά την έγχυση των CDCs στα πειράματα 5' pre-*rep* (έναρξη της επαναιμάτωσης 4,5 λεπτά μετά τη χορήγηση των κυττάρων έναντι 2 λεπτών στα πειράματα 5' post-*rep*) μπορεί επίσης να συνέβαλε στην αυξημένη κατακράτηση που παρατηρήθηκε όταν τα κύτταρα χορηγήθηκαν πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης. Με βάση τα αποτελέσματα των προκαταρκτικών πειραμάτων, προχωρήσαμε στα πειράματα αποτελεσματικότητας με τη χορήγηση 5 εκατομμυρίων αλλογενών CDCs, 5 λεπτά πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης.

Στα πειράματα αποτελεσματικότητας μελετήθηκε η έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου 30 ημέρες μετά τη χορήγηση των αλλογενών CDCs. Η έγχυση των κυττάρων αποδείχτηκε καλώς ανεκτή από όλα τα πειραματόζωα, καθώς δεν συνοδεύτηκε από αρρυθμίες ή οξείες αιμοδυναμικές μεταβολές. Η θεραπεία με αλλογενή CDCs στην παρούσα εργασία οδήγησε σε απόλυτη μείωση της έκτασης του εμφράγματος κατά 12,5% της υπό κίνδυνο μυοκαρδιακής περιοχής σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Το εύρημα αυτό βρίσκεται σε συμφωνία με προηγούμενες πειραματικές μελέτες, στις οποίες αλλογενή CDCs χορηγήθηκαν 30 λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης. Σε αυτές, τα πειραματόζωα που έλαβαν κυτταρική θεραπεία εμφάνισαν απόλυτη μείωση της έκτασης του εμφράγματος κατά 20,6%¹⁰⁷ και 15,9%¹⁰⁶ της υπό κίνδυνο περιοχής σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, στις δύο ημέρες και τους δύο μήνες μετά την χορήγηση των κυττάρων, αντίστοιχα. Κατά συνέπεια, η ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών CDCs κατά την επαναιμάτωση συνδέεται με σημαντική μείωση της έκτασης του εμφράγματος του μυοκαρδίου σε χοίρεια πειραματικά μοντέλα ισχαιμίας – επαναιμάτωσης.

Η αποσαφήνιση των μηχανισμών και των μοριακών μονοπατιών, μέσω των οποίων διαμεσολαβείται η μείωση της έκτασης του εμφράγματος στην παρούσα μελέτη, αποτελεί σημαντικό βήμα για την πληρέστερη κατανόηση του θεραπευτικού οφέλους που προκύπτει από τη χορήγηση των αλλογενών CDCs. Προς αυτή την κατεύθυνση, παρότι υπάρχουν αναφορές ότι τα CDCs μπορούν διαφοροποιηθούν σε μυοκαρδιακά κύτταρα *in vivo*, ο αριθμός των κυττάρων που προέρχονται από αυτή τη διαδικασία έχει βρεθεί ότι είναι εξαιρετικά μικρός για να εξηγήσει το όφελος από την κυτταρική θεραπεία^{70,100}. Στην πραγματικότητα, τα CDCs εκκρίνουν παρακρινικούς παράγοντες και εξωσώματα^{100,116} που προάγουν την αγγειογένεση, την στρατολόγηση ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων, την επανείσοδο προϋπάρχοντων μυοκαρδιακών κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο και τον πολλαπλασιασμό τους, ενώ ασκούν επίσης αντιαποπρωτική δράση στα ενδογενή μυοκαρδιακά κύτταρα και ρυθμίζουν την φλεγμονώδη απάντηση του λήπτη^{61,117,118,132}. Η παρατηρούμενη μείωση της έκτασης του εμφράγματος στην παρούσα μελέτη θα πρέπει, επομένως, να αποδοθεί σε έμμεσους μηχανισμούς δράσης των χορηγούμενων CDCs, όπως αυτοί που περιγράφονται παραπάνω.

Συμπερασματικά, η ενδοστεφανιαία χορήγηση 5 εκατομμυρίων αλλογενών CDCs πριν από την έναρξη της επαναιμάτωσης ενός OEM σχετίζεται με ικανοποιητικό ποσοστό κυτταρικής κατακράτησης και οδηγεί σε μείωση της έκτασης του εμφράγματος κατά 12,5%, χωρίς να συνοδεύεται από απόφραξη της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας και επιδείνωση του φαινομένου μη επαναρροής στην οξεία φάση. Η παρούσα πειραματική μελέτη επιβεβαιώνει την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα της χορήγησης αλλογενών CDCs στο OEM, ενώ παράλληλα αποτελεί την πρώτη προσπάθεια χορήγησης των CDCs ταυτόχρονα με την αποκατάσταση της βατότητας της υπεύθυνης στεφανιαίας αρτηρίας, παρακάμπτοντας χρονικά τα προβλήματα που προκαλεί στην χορήγηση των κυττάρων η ανάπτυξη του φαινομένου μη επαναρροής κατά την επαναιμάτωση. Στην κλινική πράξη, η χορήγηση αλλογενών CDCs νωρίτερα κατά την εξέλιξη ενός OEM θα μπορούσε να μεγιστοποιήσει τα περιθώρια θεραπευτικού οφέλους, δεδομένου ότι τα περισσότερα μυοκαρδιακά χάνονται κατά τις πρώτες ώρες μετά από ένα OEM¹³³ και άρα η ανάγκη για καρδιοπροστασία είναι μέγιστη. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας θέτουν τις βάσεις για την μελλοντική αξιοποίηση των καρδιακών προγονικών κυττάρων από καρδιόσφαιρες στην αντιμετώπιση του οξέος εμφράγματος του μυοκαρδίου. Συγκεκριμένα, αλλογενή CDCs θα μπορούσαν να χορηγούνται ενδοστεφανιαία κατά τη διάρκεια του καρδιακού καθετηριασμού, αμέσως πριν την επαναιμάτωση ενός οξέος εμφράγματος με πρωτογενή αγγειοπλαστική, και άρα να αναπτυχθούν και να είναι διαθέσιμα ως έτοιμο κυτταρικό προϊόν (βιολογικό φάρμακο) καρδιοπροστασίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η ενδοστεφανιαία χορήγηση αλλογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων από καρδιόσφαιρες (CDCs) κατά την επαναιμάτωση σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου (OEM) έχει αποδειχθεί ασφαλής και αποτελεσματική σε προκλινικά πειραματικά μοντέλα. Ωστόσο, η βλάβη της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας από επαναιμάτωση και το φαινόμενο μη επαναρροής (NR) ενδεχομένως να επηρεάζουν αρνητικά την κατανομή των CDCs στην υπό κίνδυνο περιοχή του μυοκαρδίου (AR), περιορίζοντας την αποτελεσματικότητά τους. Η χορήγηση CDCs κατά την επαναιμάτωση, ωστόσο, μπορεί να επιδεινώσει το NR λόγω κυτταρικού εμβολισμού της μικροκυκλοφορίας.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας πειραματικής εργασίας ήταν η μελέτη της ενδοστεφανιαίας χορήγησης αλλογενών CDCs κατά την οξεία φάση του εμφράγματος του μυοκαρδίου, πριν από την εγκατάσταση της βλάβης από επαναιμάτωση, σε χοίρειο πειραματικό μοντέλο ισχαιμίας – επαναιμάτωσης.

Μέθοδοι: Αρχικά, σε μία σειρά προκαταρκτικών πειραμάτων ασφάλειας, διαφορετικές δόσεις αλλογενών CDCs χορηγήθηκαν ενδοστεφανιαία, 5 λεπτά πριν ή 5 λεπτά μετά την έναρξη της επαναιμάτωσης (πειράματα 5' pre-*reper* και 5' post-*reper*, αντίστοιχα) και υπολογίστηκε η έκταση του NR, ώστε να καθοριστεί η μέγιστη ασφαλής κυτταρική δόση για κάθε χορήγηση. Εν συνεχεία, επιλέχθηκε η καταλληλότερη χρονική στιγμή χορήγησης με βάση την κατακράτησή των CDCs στην AR. Τέλος, στα πειράματα αποτελεσματικότητας μελετήθηκε η έκταση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (IS) 30 ημέρες μετά τη χορήγηση CDCs ή διαλύματος ελέγχου.

Αποτελέσματα: Η χορήγηση των κυττάρων δεν συνοδεύτηκε από αρρυθμίες ή οξείες αιμοδυναμικές μεταβολές. Η μέγιστη δόση αλλογενών CDCs που μπόρεσε να χορηγηθεί χωρίς να συνοδεύεται από επιδείνωση του NR υπολογίστηκε σε 5 και 10 εκατομμύρια κύτταρα στα πειράματα 5' pre-*reper* και 5' post-*reper*, αντίστοιχα. Η μελέτη 5' pre-*reper* έδειξε αυξημένη κατακράτηση των CDCs στην AR ($7,7 \pm 8,2\%$ έναντι $1,4 \pm 1,5\%$ στη μελέτη 5' post-*reper*) και, για το λόγο αυτό, στα πειράματα αποτελεσματικότητας χορηγήθηκαν 5 εκατομμύρια CDCs, 5 λεπτά πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης. Στο σκέλος της αποτελεσματικότητας, η θεραπεία με αλλογενή CDCs σχετίστηκε με μικρότερη IS ($37,4 \pm 9,9\%$ της AR) σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου ($49,9 \pm 7,4\%$ της AR, $p=0,03$).

Συμπεράσματα: Η ενδοστεφανιαία χορήγηση 5 εκατομμυρίων αλλογενών CDCs αμέσως πριν την έναρξη της επαναιμάτωσης ενός OEM σχετίζεται με ικανοποιητική κυτταρική κατακράτηση και οδηγεί σε μείωση της έκτασης του εμφράγματος, χωρίς να επιδεινώνει τη βατότητα της στεφανιαίας μικροκυκλοφορίας. Η προτεινόμενη θεραπευτική προσέγγιση θα μπορούσε εύκολα να εφαρμοστεί στην κλινική πράξη κατά τη διάρκεια της πρωτογενούς αγγειοπλαστικής για την επαναιμάτωση ενός OEM.

SUMMARY

Background: Intracoronary delivery of allogenic cardiosphere derived progenitor cells (CDCs) during reperfusion of an acute myocardial infarction (AMI) has been proven safe and effective in preclinical studies. However, reperfusion injury and no-reflow phenomenon (NR) may adversely affect the distribution of CDCs within the myocardial area at risk (AR) and limit their efficacy. Intracoronary CDC administration during reperfusion, however, can lead to microembolization and exacerbation of the NR.

Aim: The aim of this study was to evaluate the intracoronary administration of allogeneic CDCs during the acute phase of myocardial infarction, prior to the establishment of the NR, in a porcine ischemia – reperfusion model.

Methods: First, in a series of preliminary safety experiments, different doses of allogeneic CDCs were administered intracoronary, either 5 minutes before or 5 minutes after the onset of reperfusion (5' pre-rep and 5' post-rep studies, respectively). No-reflow areas were measured in order to define the maximum safe cell dose for each administration. Second, cell delivery timing was chosen based on CDC retention within the AR. Finally, infarct size (IS) was evaluated in an efficacy study, 30 days after CDC or control administration.

Results: Cell delivery did not cause any arrhythmias or hemodynamic impairment in treated animals. Five and ten million allogeneic CDCs could be safely administered without deterioration of NR in the 5' pre-rep and 5' post-rep studies, respectively. Cell delivery prior to reperfusion resulted in increased CDC retention within the AR ($7.7\pm 8.2\%$ vs $1.4\pm 1.5\%$ in the 5' post-rep study), thus, 5 million CDCs were administered, 5 minutes prior to reperfusion, in the efficacy study. Treatment with allogeneic CDCs, in the efficacy study, was associated with reduced IS ($37.4\pm 9.9\%$ of AR) compared to controls ($49.9\pm 7.4\%$ of AR, $p=0.03$).

Conclusions: Intracoronary delivery of 5 million allogeneic CDCs immediately prior to reperfusion onset is associated with satisfactory cell retention rates and leads to reduced infarct size without aggravation of microvascular obstruction. The proposed therapeutic approach could be easily applied to clinical practice during AMI reperfusion with primary percutaneous coronary intervention.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al.** *Fourth universal definition of myocardial infarction (2018)*. Eur Heart J. 2019;40(3):237-269.
2. **Frangogiannis, N G.** *Pathophysiology of Myocardial Infarction*. Compr Physiol. 2015;5:1841-1875.
3. **DeWood MA, Spores J, Notske R, et al.** *Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction*. N Engl J Med. 1980;303(16):897-902.
4. **Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E.** *Mechanisms of plaque formation and rupture*. Circ Res. 2014;114(12):1852-66.
5. **Ibanez B, James S, Agewall S, et al.** *2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation*. Eur Heart J. 2018;39(2):119-177.
6. **Roffi M, Patrono C, Collet JP et al.** *2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation*. Eur Heart J. 2016;37(3):267-315.
7. **Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, et al.** *Heart Disease and Stroke Statistics-2019 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation. 2019;139(10):e56-e528.
8. **Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Williams J, et al.** *The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014*. Heart. 2015;101(15):1182-1189.
9. **Widimsky P, Wijns W, Fajadet J, et al.** *Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction in Europe: description of the current situation in 30 countries*. Eur Heart J. 2010;31(8):943-957.
10. **Tousek P, Tousek F, Horak D, et al.** *The incidence and outcomes of acute coronary syndromes in a central European country: Results of the CZECH-2 registry*. Int J Cardiol. 2014;173(2):204-8.
11. **McManus DD, Gore J, Yarzabski J, et al.** *Recent trends in the incidence, treatment, and outcomes of patients with STEMI and NSTEMI*. Am J Med. 2011;124(1):40-7.
12. **Keeley EC, Boura JA, Grines CL.** *Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials*. Lancet. 2003;361(9351):13-20.
13. **Jernberg T, Johanson P, Held C, et al.** *Association between adoption of evidence-based treatment and survival for patients with ST-elevation myocardial infarction*. JAMA. 2011;305(16):1677-84.
14. **Kristensen SD, Laut KG, Kaifoszova Z, et al.** *Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction 2010/2011: current status in 37 ESC countries*. Eur Heart J. 2014;35(29):1957-70.
15. **Puymirat E, Battler A, Birkhead J, et al.** *Euro Heart Survey 2009 Snapshot: regional variations in presentation and management of patients with AMI in 47 countries*. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care. 2013;2(4):359-70.
16. **Timmers L, Pasterkamp G, de Hoog VC, et al.** *The innate immune response in reperfused myocardium*. Cardiovasc Res. 2012;94(2):276-83.

17. **Bianchi, M E.** *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.* J Leukoc Biol. 2007;81(1):1-5.
18. **Frangogiannis, N G.** *The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling.* Nat Rev Cardiol. 2014;11(5):255-65.
19. **Burke AP, Virmani R.** *Pathophysiology of acute myocardial infarction.* Med Clin North AM. 2007;91(4):553-72.
20. **Huynh ML, Fadok VA, Henson PM.** *Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation.* J Clin Invest. 2002;109(1):41-50.
21. **Ren G, Michael LH, Entman ML, Frangogiannis NG.** *Morphological characteristics of the microvasculature in healing myocardial infarcts.* J Histochem Cytochem. 2002;50(1):71-9.
22. **Shinde AV, Frangogiannis NG.** *Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair.* J Mol Cell Cardiol. 2014;70:74-82.
23. **Reffelmann T, Kloner RA.** *The no-reflow phenomenon: A basic mechanism of myocardial ischemia and reperfusion.* Basic Res Cardiol. 2006;101(5):359-72.
24. **Tranum-Jensen J, Janse MJ, Fiolet WT, et al.** *Tissue osmolality, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart.* Circ Res. 1981;49(2):364-81.
25. **Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB.** *The "No-Reflow" Phenomenon after Temporary Coronary Occlusion in the Dog.* J Clin Invest. 1974;54(6):1496-1508.
26. **Manciet LH, Poole DC, McDonagh PF, et al.** *Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon.* Am J Physiol. 1994;266:H1541-50.
27. **Gavin JB, Thomson RW, Humphrey SM, Herdson PB.** *Changes in vascular morphology associated with the no-reflow phenomenon in ischaemic myocardium.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1983;399(3):325-32.
28. **Lee BY, Wilson GJ, Domenech RJ, MacGregor DC.** *Relative roles of edema versus contracture in the myocardial postischemic "no-reflow" phenomenon.* J Surg Res. 1980;29(1):50-61.
29. **Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML.** *Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium.* Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84(5):1404-7.
30. **Vanden Hoek TL, Shao Z, Li C, et al.** *Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia.* Am J Physiol. 1996;270:H1334-41.
31. **Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, et al.** *Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin.* Circ Res. 2003;94(1):53-9.
32. **Topol EJ, Yadav JS.** *Recognition of the importance of embolization in atherosclerotic vascular disease.* Am J Cardiol. 2000;101(5):570-80.
33. **Michaels AD, Gibson CM, Barron HV.** *Microvascular dysfunction in acute myocardial infarction: focus on the roles of platelet and inflammatory mediators in the no-reflow phenomenon.* Circulation. 2000;85:50B-60B.

34. **Sheridan FM, Cole PG, Ramage D.** *Leukocyte adhesion to the coronary microvasculature during ischemia and reperfusion in an in vivo canine model.* *Circulation.* 1996;93(10):1784-7.
35. **Kloner RA, Rude RE, Carlson N, et al.** *Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first?* *Circulation.* 1980;62(5):945-52.
36. **Reffelmann T, Hale SL, Li G, Kloner RA.** *Relationship between no reflow and infarct size as influenced by the duration of ischemia and reperfusion.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282(2):H766-72.
37. **Reffelmann T, Kloner RA.** *Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(3):H1099-107.
38. **Reffelmann T, Kloner RA.** *Is microvascular protection by cariporide and ischemic preconditioning causally linked to myocardial salvage?* *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(4):H1134-41.
39. **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.
40. **Rochitte CE, Lima JA, Bluemke DA, et al.** *Magnitude and time course of microvascular obstruction and tissue injury after acute myocardial infarction.* *Circulation.* 1998;98(10):1006-14.
41. **Galiuto L, Lombardo A, Maseri A, et al.** *Temporal evolution and functional outcome of no reflow: sustained and spontaneously reversible patterns following successful coronary recanalisation.* *Heart.* 2003;89(7):731-7.
42. **Morishima I, Sone T, Okumura K, et al.** *Angiographic no-reflow phenomenon as a predictor of adverse long-term outcome in patients treated with percutaneous transluminal coronary angioplasty for first acute myocardial infarction.* *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(4):1202-9.
43. **Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N.** *Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling.* *J Am Coll Cardiol.* 2000;35(3):569-82.
44. **Rouleau JL, de Champlain J, Klein M, et al.** *Activation of neurohumoral systems in postinfarction left ventricular dysfunction.* *J Am Coll Cardiol.* 1993;22(2):390-8.
45. **Pfeffer MA, Braunwald E.** *Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications.* *Circulation.* 1990;81(4):1161-72.
46. **Pfeffer MA, Pfeffer JM.** *Ventricular enlargement and reduced survival after myocardial infarction.* *Circulation.* 1987;75:IV93-7.
47. **JA, Rumberger.** *Ventricular dilatation and remodeling after myocardial infarction.* *Mayo Clin Proc.* 1994;69(7):664-74.
48. **Schirone L, Forte M, Palmerio S, et al.** *A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling.* *Oxid Med Cell Longev.* 2017:3920195.
49. **Eaton LW, Weiss JL, Bulkley bh, et al.** *Regional cardiac dilatation after acute myocardial infarction: recognition by two-dimensional echocardiography.* *N Engl J Med.* 2, 1979;300(2):57-62.

50. **St John Sutton M, Lee D, Rouleau JL, et al.** *Left ventricular remodeling and ventricular arrhythmias after myocardial infarction.* *Circulation.* 2003;107(20):2577-82.
51. **St John Sutton, Pfeffer MA, Moye L, et al.** *Cardiovascular death and left ventricular remodeling two years after myocardial infarction: baseline predictors and impact of long-term use of captopril: information from the Survival and Ventricular Enlargement (SAVE) trial.* *Circulation.* 1997;96(10):3294-9.
52. **Velagaleti RS, Pencina MJ, Murabito JM, et al.** *Long-term trends in the incidence of heart failure after myocardial infarction.* *Circulation.* 2008;118(20):2057-62.
53. **Alnasser SM, Huang W, Gore JM, et al.** *Late Consequences of Acute Coronary Syndromes: Global Registry of Acute Coronary Events (GRACE) Follow-up.* *Am J Med.* 2015;128(7):766-75.
54. **Gerber Y, Weston SA, Enriquez-Sarano M, et al.** *Atherosclerotic Burden and Heart Failure After Myocardial Infarction.* *JAMA Cardiol.* 2016;1(2):156-62.
55. **Poss KD, Wilson LG, Keating MT.** *Heart regeneration in zebrafish.* *Science.* 2002;298(5601):2188-90.
56. **Becker RO, Chapin S, Sherry R.** *Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians.* *Nature.* 1974;248(5444):145-7.
57. **Kikuchi K, Holdway JE, Werdich AA, et al.** *Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation.* *Nature.* 2010;464(7288):601-5.
58. **Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al.** *Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart.* *Science.* 2011;331(6020):1078-80.
59. **Soonpaa MH, Field LJ.** *Assessment of cardiomyocyte DNA synthesis in normal and injured adult mouse hearts.* *Am J Physiol.* 1997;272:H220-6.
60. **Senyo SE, Steinhauser ML, Pizzimenti CL, et al.** *Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes.* *Nature.* 2013;493(7432):433-6.
61. **Malliaras K, Zhang Y, Seinfeld J, et al.** *Cardiomyocyte proliferation and progenitor cell recruitment underlie therapeutic regeneration after myocardial infarction in the adult mouse heart.* *EMBO Mol Med.* 2013;5(2):191-209.
62. **Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al.** *Evidence for cardiomyocyte renewal in humans.* *Science.* 2009;324(5923):98-102.
63. **Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al.** *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction.* *Proc Natl Sci U S A.* 2003;100(21):12313-8.
64. **Matsuura K, Nagai T, Nishigaki N, et al.** *Adult cardiac Sca-1-positive cells differentiate into beating cardiomyocytes.* *J Biol Chem.* 2004;279(12):11384-91.
65. **Liang SX, Tan TY, Gaudry L, Chong B.** *Differentiation and migration of Sca1+/CD31- cardiac side population cells in a murine myocardial ischemic model.* *Int J Cardiol.* 2010;138(1):40-9.
66. **Smits AM, van Vliet P, Metz CH, et al.** *Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology.* *Nat Protoc.* 2009;4(2): 232-43.

67. **Urbanek K, Quaini F, Tasca G, et al.** *Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(18):10440-5.
68. **Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al.** *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration.* Cell. 2003;114(6):763-76.
69. **Urbanek K, Cesseli D, Rota M, et al.** *Stem cell niches in the adult mouse heart.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(24):9226-31.
70. **Tang XL, Rokosh G, Sanganalmath SK, et al.** *Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction.* Circulation. 2010;121(2):293-305.
71. **Williams AR, Hatzistergos KE, Addicott B, et al.** *Enhanced effect of combining human cardiac stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells to reduce infarct size and to restore cardiac function after myocardial infarction.* Circulation. 2013;127(2):213-23.
72. **Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, et al.** *Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance.* Circulation. 2012;126(11):S54-S64.
73. **Cai CL, Liang X, Shi Y, et al.** *Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart.* Dev Cell. 2003;5(6):877-89.
74. **Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al.** *Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages.* Nature. 2005;433(7026):647-53.
75. **Moretti A, Caron L, Nakano A, et al.** *Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification.* Cell. 2006;127(6):1151-65.
76. **Ott HC, Mathiesen TS, Brechtken J, et al.** *The adult human heart as a source for stem cells: repair strategies with embryonic-like progenitor cells.* Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2007;4:S27-39.
77. **Elsheikh E, Genead R, Mansson-Broberg A, et al.** *Human Embryonic Non-haematopoietic SSEA-1+ Cells are Cardiac Progenitors Expressing Markers of Both the First and Second Heart Field.* J Cytol Histol. 2013;4(5):10.4172/2157-7099.1000192.
78. **Sanz-Ruiz R, Casado Plasencia A, Borlado LR, et al.** *Rationale and Design of a Clinical Trial to Evaluate the Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction: The Randomized Multicenter Double-Blind Controlled Controlled CAREMI Trial (Cardiac Stem Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction).* Circ Res. 2017;121(1):71-80.
79. **Fernández-Avilés F, Sanz-Ruiz R, Bogaert J, et al.** *Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction.* Circ Res. 2018;123(5):579-589.
80. **Linke A, Müller P, Nurzynska D, et al.** *Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(25):8966-71.
81. **Urbanek K, Torella D, Sheikh F, et al.** *Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(24):8692-7.

82. **Urbanek K, Rota M, Cascapera S, et al.** *Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival.* *Circ res.* 2005;97(7):663-73.
83. **Martin CM, Meeson AP, Robertson SM, et al.** *Persistent expression of the ATP-binding cassette transporter, *Abcg2*, identifies cardiac SP cells in the developing and adult heart.* *Dev Biol.* 2004;265(1):262-75.
84. **Alfakir M, Dawe N, Eyre R, et al.** *The temporal and spatial expression patterns of ABCG2 in the developing human heart.* *Int J Cardiol.* 2012;156(2):133-8.
85. **Sandstedt J, Jonsson M, Kajic K, et al.** *Left atrium of the human adult heart contains a population of side population cells.* *Basic Res Cardiol.* 2012;107(2):255.
86. **Oyama T, Nagai T, Wada H, et al.** *Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo.* *J Cell Biol.* 2007;176(3):329-41.
87. **Hierlihy AM, Seale P, Lobe CG, et al.** *The post-natal heart contains a myocardial stem cell population.* *FEBS Lett.* 2002;530(1-3):239-43.
88. **Yoon J, Choi SC, Park CY, et al.** *Cardiac side population cells exhibit endothelial differentiation potential.* *Exp Mol Med.* 2007;39(5):653-62.
89. **Pfister O, Mouquet F, Jain M, et al.** *CD31- but Not CD31+ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation.* *Circ Res.* 2005;97(1):52-61.
90. **Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, et al.** *Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions.* *Circ Res.* 1998;82(10):1043-52.
91. **van Wijk B, Gunst QD, Moorman AF, van den Hoff MJ.** *Cardiac regeneration from activated epicardium.* *PLoS One.* 2012;7(9):e44692.
92. **Smart N, Bollini S, Dubé KN, et al.** *De novo cardiomyocytes from within the activated adult heart after injury.* *Nature.* 2011;474(7353):640-4.
93. **Messina E, De Angelis L, Frati G, et al.** *Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart.* *Circ Res.* 2004;95(5):911-21.
94. **Smith RR, Barile L, Cho HC.** *Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens.* *Circulation.* 2007;115(7):896-908.
95. **Lee ST, White AJ, Matsushita S, et al.** *Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction.* *J Am Coll Cardiol.* 2011;57(4):455-65.
96. **White AJ, Smith RR, Matsushita S, et al.** *Intrinsic cardiac origin of human cardiosphere-derived cells.* *Eur Heart J.* 2013;34(1):68-75.
97. **Davis DR, Zhang Y, Smith RR, et al.** *Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue.* *PLoS One.* 2009;4(9):e7159.
98. **Hsieh PC, Segers VF, Davis ME, et al.** *Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury.* *Nat Med.* 2017;13(8):970-4.

99. **Malliaras K, Marban E.** *Cardiac cell therapy: where we've been, where we are, and where we should be headed.* Br Med Bull. 2011;98:161-85.
100. **Chimanti I, Smith RR, Li TS, et al.** *Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice.* Circ Res. 2010;106(5):971-80.
101. **Martens A, Gruh I, Dimitroulis D, et al.** *Rhesus monkey cardiosphere-derived cells for myocardial restoration.* Cytotherapy. 2011;13(7):864-72.
102. **Malliaras K, Li TS, Luthringer D, et al.** *Safety and efficacy of allogeneic cell therapy in infarcted rats transplanted with mismatched cardiosphere-derived cells.* Circulation. 2012;125(1):100-12.
103. **Davis DR, Kizana E, Terrovitis J, et al.** *Isolation and expansion of functionally-competent cardiac progenitor cells directly from heart biopsies.* J Mol Cell Cardiol. 2010;49(2):312-21.
104. **Carr CA, Stuckey DJ, Tan SC, et al.** *Cardiosphere-derived cells improve function in the infarcted rat heart for at least 16 weeks--an MRI study.* PLoS One. 2011;6(1):e25669.
105. **Johnston PV, Sasano, Mills K, et al.** *Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy.* Circulation. 2009;120(12):1075-83.
106. **Kanazawa H, Tseliou E, Dawkins JF, et al.** *Durable Benefits of Cellular Postconditioning: Long-Term Effects of Allogeneic Cardiosphere-Derived Cells Infused After Reperfusion in Pigs with Acute Myocardial Infarction.* J Am Heart Assoc. 2016;5(2):e002796.
107. **Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras K, et al.** *Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction.* Circ Heart Fail. 2015;8(2):322-32.
108. **Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, et al.** *Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CArdiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction).* J Am Coll Cardiol. 2014;63(2):110-22.
109. **Chakravarty T, Makkar RR, Ascheim DD, et al.** *ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR) Trial: Rationale and Design.* Cell Transplant. 2017;26(2):205-214.
110. **Makkar RR, Smith RR, Cheng K, et al.** *Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial.* Lancet. 2012;379(9819):895-904.
111. **Simpson DL, Mishra R, Sharma S, et al.** *A strong regenerative ability of cardiac stem cells derived from neonatal hearts.* Circulation. 2012;126(11 Suppl 1):S46-53.
112. **Henry TD, Kereiakes DJ, Kowalchuk J, et al.** *Intracoronary ALLogeneic Heart STem Cells to Achieve Myocardial Regeneration (ALLSTAR): A Randomized, placebo-controlled, double-blind trial.* presented at American Heart Association Annual Scientific Sessions; November 15, 2017; Anaheim, CA.
113. **Bonios M, Terrovitis J, Chang CY, et al.** *Myocardial substrate and route of administration determine acute cardiac retention and lung bio-distribution of cardiosphere-derived cells.* J Nucl Cardiol. 2011;18(3):443-50.

114. **Terrovitis J, Lautamäki R, Bonios M, et al.** *Noninvasive quantification and optimization of acute cell retention by in vivo positron emission tomography after intramyocardial cardiac-derived stem cell delivery.* J Am Coll Cardiol. 2009;54(17):1619-26.
115. **Terrovitis J, Smith RR, Marbán E.** *Assessment and optimization of cell engraftment after transplantation into the heart.* Circ Res. 2010;106(3):479-94.
116. **Li TS, Cheng K, Malliaras K, et al.** *Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells.* J Am Coll Cardiol. 2012;59(10):942-53.
117. **Ibrahim AG, Cheng K, Marbán E.** *Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy.* Stem Cell Reports. 2014;2(5):606-19.
118. **de Couto G, Liu W, Tseliou E, et al.** *Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction.* J Clin Invest. 2015;125(8):3147-62.
119. **Hou D, Youssef EA, Brinton TJ, et al.** *Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials.* Circulation. 2005;112(Suppl):I150-6.
120. **Hofmann M, Wollert KC, Meyer GP, et al.** *Monitoring of bone marrow cell homing into the infarcted human myocardium.* Circulation. 2005;111(17):2198-202.
121. **Cheng K, Li TS, Malliaras K, et al.** *Magnetic targeting enhances engraftment and functional benefit of iron-labeled cardiosphere-derived cells in myocardial infarction.* Circ Res. 2010;106(10):1570-81.
122. **Dimmeler S, Leri A.** *Aging and disease as modifiers of efficacy of cell therapy.* Circ Res. 2008;102(11):1319-30.
123. **Kassab GS, Rider CA, Tang NJ, Fung YC.** *Morphometry of pig coronary arterial trees.* Am J Physiol. 1993;265:H350-65.
124. **DOGS - Database Of Genome Sizes.** [Ηλεκτρονικό] BTU Bioinformatics Department of Bio and Health Informatics. www.cbs.dtu.dk/databases/DOGS/index.html.
125. **Johnston WE, Vinten-Johansen J, Patel A, Santamore WP.** *Right ventricular free wall ischemia: correlation of ischemic duration with extent of infarction in dogs.* Ann Thorac Surg. 1989;47(5):729-34.
126. **Bolognese L, Carrabba N, Parodi 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.
127. **Ishii H, Amano T, Matsubara T, Murohara T.** *Pharmacological intervention for prevention of left ventricular remodeling and improving prognosis in myocardial infarction.* Circulation. 25, 2008;118(25):2710-8.
128. **Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, et al.** *Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial.* Eur Heart J. 2006;27(23):2775-83.

129. **Sürder D, Manka R, Lo Cicero V, et al.** *Intracoronary injection of bone marrow-derived mononuclear cells early or late after acute myocardial infarction: effects on global left ventricular function.* *Circulation.* 2013;127(19):1968-79.
130. **Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, et al.** *Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy.* *Clin Res Cardiol.* 2011;100(10):925-34.
131. **Li X, He XT, Yin Y, et al.** *Administration of signalling molecules dictates stem cell homing for in situ regeneration.* *J Cell Mol Med.* 2017;21(12):3162-3177.
132. **Tseliou E, Pollan S, Malliaras K, et al.** *Angiogenesis, cardiomyocyte proliferation and anti-fibrotic effects underlie structural preservation post-infarction by intramyocardially-injected cardiospheres.* *J Am Coll Cardiol.* 2013;61(10):1108-19.
133. **V. Taki J, Higuchi T, Kawashima A, et al.** *Detection of cardiomyocyte death in a rat model of ischemia and reperfusion using 99mTc-labeled annexin.* *J Nucl Med.* 2004;45(9):1536-41.