



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρικό Τμήμα

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΕΤΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΡΙΣΗΣ: 2021



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Ιατρικό Τμήμα

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Ιατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

Ο ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΗΝ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΟΥ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ ΦΟΙΤΗΤΗ: ΠΑΠΑΝΙΚΟΛΑΟΥ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΓΓΕΛΙΔΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

ΕΤΟΣ ΚΑΤΑΘΕΣΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΡΙΣΗΣ: 2021

Η έγκριση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος).

Παπανικολάου Δημήτριος

Τίτλος ΜΔΕ: Ο ρόλος των βλαστικών κυττάρων στην αναγέννηση του μυοκαρδίου

Ημερομηνία παρουσίασης: 17/ 5/ 2021

Εξεταστική επιτροπή: Αγγελίδης Χαράλαμπος, Διευθυντής Π.Μ.Σ ΒΒΕ, Καθηγητής Βιολογίας Ιατρικού Τμήματος.

Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Βιολογίας Ιατρικού Τμήματος.

Βεζυράκη Πατρώνα, Καθηγήτρια-Διευθύντρια Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιατρικού Τμήματος.

Η διαδικασία επικυρώνεται από:

Την/ον διευθυντή του ΠΜΣ ΒΒΕ

Την/ον Πρόεδρο του Τμήματος

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, τον κύριο Αγγελίδη Χαράλαμπο, καθηγητή Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής και Διευθυντή του Π.Μ.Σ, για τον πολύτιμο χρόνο και την ανιδιοτελή βοήθεια που μου προσέφερε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας, καθώς και αμφότερα τα άλλα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, την κυρία Βεζυράκη Πατρώνα, καθηγήτρια Φυσιολογίας του Τμήματος Ιατρικής και την κυρία Σύρρου Μαρίκα, καθηγήτρια Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής για όλη τη βοήθεια και τις υποδείξεις τους πάνω στο αντικείμενο που διαπραγματεύομαι. Η εργασία ακόμα δε θα μπορούσε να ολοκληρωθεί χωρίς την παραγωγική βοήθεια και τη συμβολή του επίκουρου καθηγητή Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής, κύριου Κούκλη Παναγιώτη. Τέλος είμαι ευγνώμων για την υπομονή και την εμπιστοσύνη της οικογένειάς μου, χάρη στην οποία η προσπάθεια για την απόκτηση του μεταπτυχιακού διπλώματος έγινε πραγματικότητα.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια είναι από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου παγκοσμίως αριθμώντας πάνω από 9 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο. Μια από τις συχνότερες αιτίες της είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, που σταματά μερικώς ή εξ'ολοκλήρου η παροχή αίματος στην καρδιά. Ακολουθεί θάνατος αριθμού καρδιομυοκυττάρων, απόθεση κολλαγόνου-ινώδη ιστού στην καρδιά, λέπτυνση του τοιχώματος, διάταση της αριστερής κοιλίας και επιπρόσθετος κυτταρικός θάνατος, οδηγώντας στην αδυναμία εξώθησης επαρκούς όγκου αίματος, μια διαδικασία που ονομάζεται αναδιαμόρφωση της καρδιάς. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα του μυοκαρδίου είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του αίματος στο περιβάλλον της καρδιάς, όπου δεχόμενα ηλεκτρικά ερεθίσματα συσπώνται και χαλαρώνουν σε συγχρονισμό με τα γειτονικά τους μέσω του συστήματος ακτινομυοσίνης. Τα φαρμακευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται σε ήπιες ανεπάρκειες ή η θεραπεία με στεντ, μπαϊπας ή μεταμόσχευση καρδιάς δεν αντικαθιστούν τα νεκρά ούτε δημιουργούν νέα καρδιομυοκύτταρα. Από την άλλη, πολλοί ζωικοί οργανισμοί κατέχουν ικανότητα αναγέννησης των καρδιακών ιστών, αλλά στα θηλαστικά η δυνατότητα αυτή είναι περιορισμένη, ελάχιστα βλαστικά κύτταρα συνθέτουν ένα καρδιακό πληθυσμό ο οποίος αντικαθιστά νεκρά καρδιομυοκύτταρα κατά τη διάρκεια της ζωής τους, αλλά δεν είναι ικανός να ανταποκριθεί αφ'εαυτού σε τραυματισμούς του μυοκαρδίου. Γιαυτό και η εργασία αυτή επικεντρώνεται σε μια αναθεώρηση των κύριων προσπαθειών της αναγέννησης του μυοκαρδιακού ιστού μέσω εξωγενών βλαστικών κυττάρων, είτε με τη διαφοροποίησή τους σε ώριμα καρδιομυοκύτταρα και αντικατάσταση του εμφραγματικού ιστού είναι με παρακρινείς μηχανισμούς που ενεργοποιούν τον ενδογενή βλαστικό πληθυσμό και προστατεύουν την καρδιά. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν κατηγορίες κυττάρων όπως τα καρδιακά βλάστικά κύτταρα (CSCs) ή τα εμβρυονικά και τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (ESCs/iPSCs). Και οι δύο κυτταρικοί τύποι κατέχουν ιδιότητες αυτοανανέωσης και κλωνογονικότητας, αλλά τα ESCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε κύτταρα και των 3 βλαστικών στοιβάδων και προκύπτουν από καλλιέργεια κυττάρων της βλαστοκύστης, ενώ τα CSCs διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα, λεία μυϊκά ή ενδοθηλιακά κύτταρα. CSCs διατηρούνται σε ενδογενή πληθυσμό που φθίνει με την πάροδο του χρόνου και ενεργοποιείται σε περίπτωση τραυματισμού, ενώ αντίστοιχα τα iPSCs ομοιάζουν πολύ από άποψη γενετικής και επιγενετικής ταυτότητας, πολυδυναμίας, προσφοράς στη γαμετική σειρά και μορφολογίας με τα ESCs, επάγονται εύκολα μέσω 4 παραγόντων (oskms) και δίνουν λύση σε προβλήματα διαθεσιμότητας και ηθικά ζητήματα, αλλά χρειάζονται χρόνο και προσοχή στην επεξεργασία τους. Αντίθετα στη δεύτερη κατηγορία ανήκουν κύτταρα όπως τα μεσεγγυματικά βλαστικά (MSCs), τα μονοπύρνα του μυελού των οστών (BMNCs), τα CD133+/CD34+, και οι σκελετικοί μυοβλάστες (skms). Γενικά τα κύτταρα αυτά έχουν ισχυρές προαγγειογενείς και αντιαποπτωτικές ιδιότητες, χαμηλό κόστος διαχείρισης, ευρεία διαθεσιμότητα, ενώ οι skms κατέχουν ικανότητα διαφοροποίησης μέσω δορυφορικών κυττάρων, και τα MSCs χαρακτηρίζονται από σημαντικές ανοσορυθμιστικές και ανοσοκατασταλτικές ιδιότητες. Συνολικά τα βλαστικά κύτταρα έχουν ιδιαίτερο κυτταρικό κύκλο με εξαιρετικά βραχεία φάση G1, απύσα φάση G0 και αλλαγές στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, ευρυσκόμενα συχνότερα στη φάση διαίρεσης του γενετικού υλικού. Αν και η ασφάλεια των κυτταρικών θεραπειών έχει επανειλημμένως αποδειχθεί, η αποτελεσματικότητά τους στην επίτευξη των ανωτέρω σκοπών παραμένει ασαφής, αλλά βέβαια διαμέσου αυτών έχουμε κατανοήσει καλύτερα τους κυτταρικούς και μοριακούς μηχανισμούς της καρδιακής αναγέννησης σε μια προσπάθεια να βρεθεί το «άγιο δισκοπότηρο» των κυττάρων προκειμένου να αντιμετωπίσουμε μεγάλους καρδιακούς κινδύνους της εποχής μας.

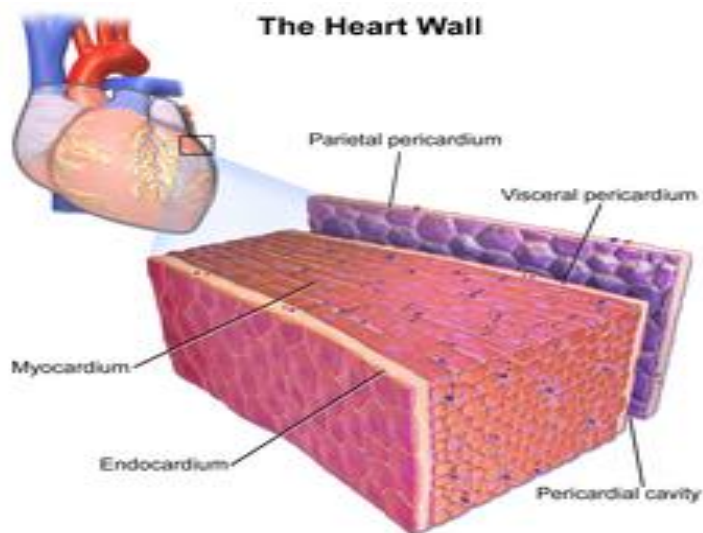
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. Εισαγωγή: σελίδα 13
 - 1.1 Το μυοκάρδιο: σελίδα 13
 - 1.2 Καρδιακή ανεπάρκεια: σελίδα 15
 - 1.3 Ενδογενής αναγεννητική ικανότητα: σελίδα 17
 - 1.4 Τα βλαστικά κύτταρα: σελίδα 18
2. Κυρίως μέρος: σελίδα 23
 - 2.1 Σκελετικοί Μυοβλάστες (skms): σελίδα 23
 - 2.2 Μονοπύρηνια κύτταρα μυελού των οστών (BMNCs): σελίδα 33
 - 2.3 Μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs): σελίδα 48
 - 2.4 Καρδιακά βλαστικά και προγονικά κύτταρα (CSCs/ CPCs/ CDCs): σελίδα 62
 - 2.5 Αιματοποιητικά προγονικά κύτταρα CD133⁺/ CD34⁺ κύτταρα: σελίδα 79
 - 2.6 Εμβρυονικά και επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (ESCs/ iPSCs): σελίδα 83
3. Περίληψη: σελίδα 104
4. Βιβλιογραφία: σελίδα 107

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΟ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟ

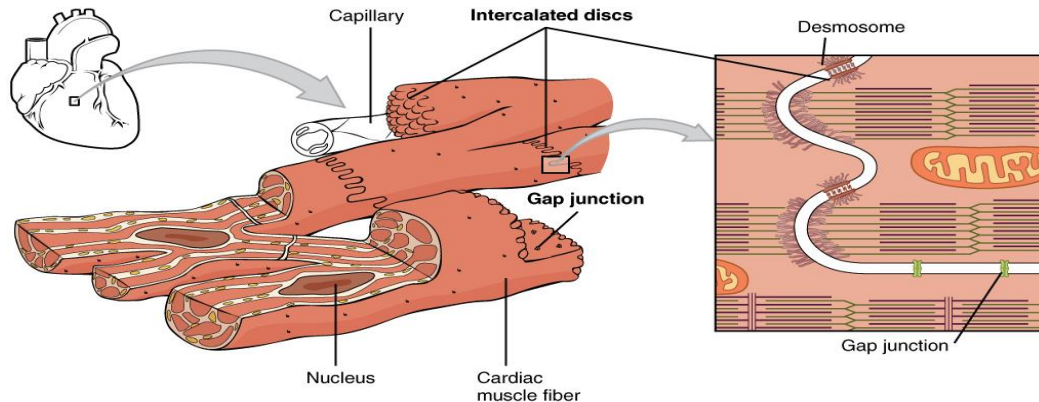
Το μυοκάρδιο (μυϊκός ιστός της καρδιάς) σχηματίζει μια παχιά στοιβάδα μεταξύ του εξώτερου στρώματος της καρδιάς (εξωκάρδιο) και του ενδοτέρου στρώματος (ενδοκάρδιο) και τροφοδοτείται με οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά από τη στεφανιαία κυκλοφορία. Αποτελείται από τα καρδιομυοκύτταρα, τα οποία έρχονται σε επαφή με τους ενδιάμεσους δίσκους και περιβάλλονται από ίνες κολλαγόνου και άλλες πρωτεΐνες που σχηματίζουν την εξωκυττάρια μήτρα. Το ενδοκάρδιο είναι αυτό που διαχωρίζει τους καρδιακούς θαλάμους, σκεπάζει τις βαλβίδες και ενώνεται με το ενδοθήλιο, το οποίο εγκιβωτίζει τα αιμοφόρα αγγεία που φτάνουν στην καρδιά. Στην εξώτερη μοίρα, το επικάρδιο αποτελεί τμήμα του περικαρδίου, το οποίο εμπρικλείει την καρδιά, την προστατεύει και την λιπαίνει. Η σύσπαση του καρδιακού μύος χρειάζεται πολύ ενέργεια και άρα μια σταθερή παροχή αίματος το οποίο θα παρέχει το αντίστοιχο οξυγόνο και θρεπτικά συστατικά. Το σκοπό αυτό επιτελούν οι στεφανιαίες αρτηρίες οι οποίες βρίσκονται στο αορτικό τόξο (στο εξώτερο τμήμα του επικαρδίου). Το αίμα στη συνέχεια φεύγει μέσω των στεφανιαίων φλεβών στον δεξί κόλπο (Sinnatambby S., et al, 2006). Οι στεφανιαίες αρτηρίες είναι αυτές που πλήττονται (φράσσονται) σε περίπτωση εμφράγματος του μυοκαρδίου, καθώς αποκόπτεται εν μέρει ή εξ' ολοκλήρου η παροχή αίματος στην καρδιά.



Εικόνα 1. Μυοκάρδιο. Η στοιβάδα του καρδιακού τοιχώματος ανάμεσα στο επικάρδιο (εξωτερική στοιβάδα) και το ενδοκάρδιο (εσωτερική στοιβάδα). Blaus B., 2014 Medical gallery of Blausen Medical

Σε μια μικροσκοπική παρατήρηση το μυοκάρδιο μοιάζει με τον τοίχο ενός σπιτιού, όπου τα τούβλα είναι τα ξεχωριστά μυοκαρδιακά κύτταρα και η λάσπη που περικλείει τα τούβλα είναι η εξωκυττάρια μήτρα η οποία παράγεται από βοηθητικά κύτταρα, τους ινοβλάστες. Όπως σε ένα σπίτι υπάρχουν ηλεκτρικά καλώδια, έτσι και στο μυοκάρδιο υπάρχουν εξιδεικευμένα κύτταρα τα οποία μεταφέρουν στον ιστό ταχύτατα τα ηλεκτρικά σήματα καθώς και αγγεία τα οποία τροφοδοτούν το μυοκάρδιο με θρεπτικά στοιχεία και απομακρύνουν τα προϊόντα του μεταβολισμού (στεφανιαίες αρτηρίες, τριχοειδή, φλέβες) (Stephens A., et al, 1997). Τα κύτταρα του μυοκαρδίου είναι υπεύθυνα για την μεταφορά του αίματος στην καρδιά μέσω της συστολής τους. Όλα τα κύτταρα πρέπει να συστέλλονται σε

συγχρονισμό με τα γειτονικά (λειτουργικό συγκλήτιο) έτσι ώστε να διατηρείται η τροφοδότηση- και εάν αυτός ο συγχρονισμός σταματήσει να υπάρχει, τότε παρόλο που τα κύτταρα μπορεί να συστέλονται μόνα τους, μπορεί να μην πηγαίνει καθόλου αίμα στη καρδιά, όπως συμβαίνει σε κάποιους μη κανονικούς καρδιακούς ρυθμούς όπως η κοιλιακή μαρμαρυγή (Thomas F., et al, 2009). Το κάθε μυοκαρδιακό κύτταρο ενώνεται στην άκρη τους με άλλα μέσω των ενδιάμεσων δίσκων, σχηματίζοντας μακριές ίνες. Το κάθε κύτταρο αποτελείται από μικροϊνίδια τα οποία περνούν το ένα δίπλα από το άλλο και οργανώνονται σε σαρκομερή, την θεμελιώδη συστατική μονάδα ενός καρδιομυοκυττάρου. Η τακτική οργάνωση των ινιδίων δίνει στο κύτταρο μια ριγωτή όψη στο μικροσκόπιο, στην οποία διαφαίνονται πιο φωτεινές ζώνες οι οποίες αποτελούνται από την πρωτεΐνη ακτίνη και πιο σκούρες που αποτελούνται από τη μυοσίνη (Stephens A., et al, 1997). Στο εσωτερικό των καρδιομυοκυττάρων βρίσκονται επίσης τα σωληνάκια T, τα οποία είναι σωληνάκια που διατρέχουν το εσωτερικό των κυττάρων από άκρη σε άκρη, βρίσκονται κοντά στις αποθήκες ασβεστίου του κυττάρου (σαρκοπασματικό δίκτυο) και βοηθούν στη συστολή μεταφέροντας τα ηλεκτρικά σήματα διαμέσου των κυττάρων (Bers D., et al 2001). Οι ενδιάμεσοι δίσκοι είναι οι δομές που φέρνουν το ένα καρδιομυοκύτταρο σε επαφή με το άλλο, δημιουργώντας ένα ηλεκτροχημικό συγκλήτιο στο οποίο τα ηλεκτρικά ερεθίσματα μεταφέρονται ταχύτατα, έχοντας ως κύριο σκοπό τους την υποβοήθηση της συστολής του καρδιακού μυός (Moini J., et al, 2011). Τέλος η εξωκυττάρια μήτρα η οποία περικλείει τα καρδιομυοκύτταρα και η οποία παράγεται από τους ινοβλάστες, αποτελείται από πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και η ελαστίνη σε συνδυασμό με πολυσακχαρίτες, δίνοντας στον καρδιακό μυ υποβοήθηση, δύναμη και ελαστικότητα. Τα καρδιομυοκύτταρα προσδέονται στην εξωκυττάρια μήτρα, η οποία αλλιώς λέγεται και βασική μεμβράνη μέσω γλυκοπρωτεϊνών, των ιντεγκρινών (Stephens A., et al, 1997, Horn, M., et al, 2016).



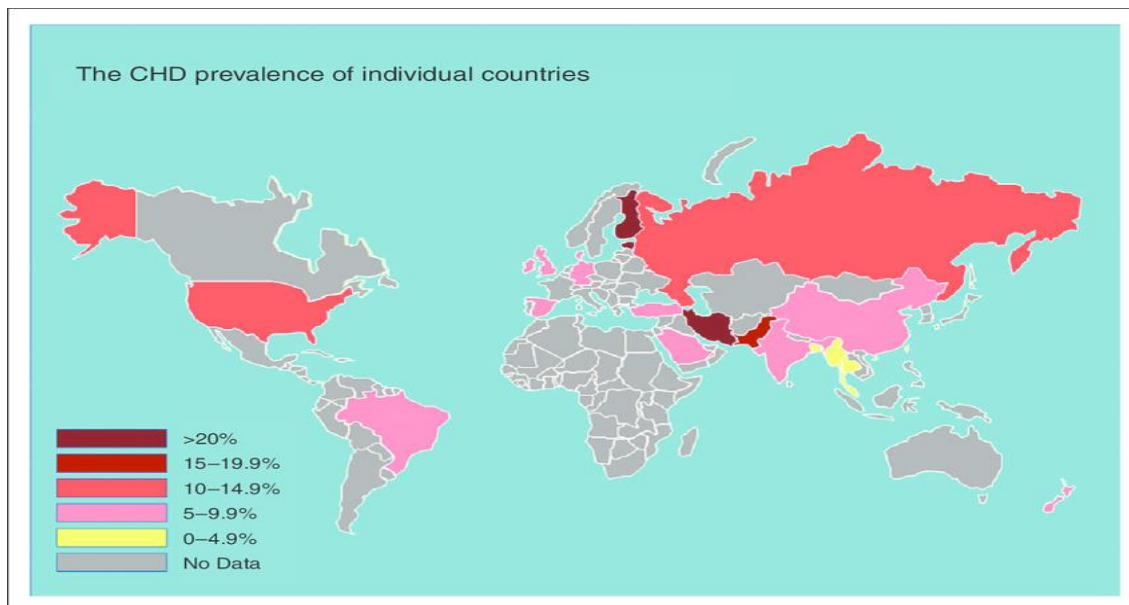
Εικόνα 2. Οι ενδιάμεσοι δίσκοι είναι τμήμα του σαρκολείμματος του καρδιακού μυός και περιβάλλουν τους χασμοσυνδέσμους και τα δεσμοσώματα. from the Textbook OpenStax Anatomy and Physiology Published May 18, 2016.

Όσον αφορά τη φυσιολογία της καρδιάς, τα καρδιομυοκύτταρα εμπεριέχουν 2 τύπους μακρινών μυοϊνιδίων, τα παχιά ινίδια τα οποία αποτελούνται από μυοσίνη και τα λεπτά ινίδια που αποτελούνται από ακτίνη, τροπονίνη και τροπομυοσίνη. Τα ινίδια αυτά περνούν το ένα δίπλα από το άλλο βραχάινοντας έτσι το κύτταρο και αυτό συμβαίνει μέσω του ασβεστίου. Το ασβέστιο συνδέεται με την τροπονίνη, η οποία ύστερα σε συνδυασμό με τη τροπομυοσίνη αποκαλύπτει θέσεις κλειδιά στην ακτίνη, η οποία με αυτό τον τρόπο συνδέεται με την μυοσίνη, η οποία με τη σειρά της μπορεί να τραβήξει τα παχιά και τα λεπτά ινίδια έτσι να περάσουν το ένα πάνω από το άλλο. Εν συνεχεία, όταν η

συγκέντρωση του ασβεστίου στο κύτταρο πέφτει, η τροπονίνη και η τροπομυοσίνη καλύπτουν τις θέσεις κλειδιά της ακτίνης, επιτρέποντας στο κύτταρο να χαλαρώσει (Bers D., et al, 2001).

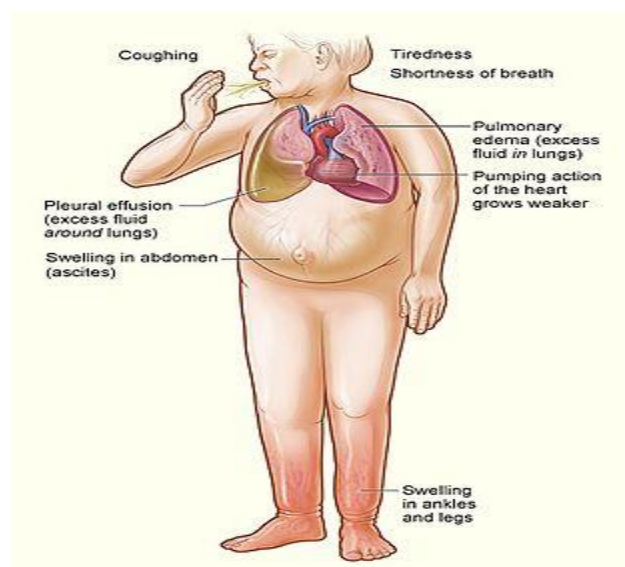
1.2 ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ

Καρδιακή ανεπάρκεια ονομάζουμε το φαινόμενο στο οποίο η καρδιά αδυνατεί να εξωθήσει κλάσμα αίματος ανάλογο με τις ανάγκες του σώματος (Shiel, W., et al, 2011). Κύριες αιτίες μια καρδιακής ανεπάρκειας μπορεί να είναι η στεφανιαία νόσος, η οποία μπορεί να περιλαμβάνει και κάποιο εμφραγμα του μυοκαρδίου, η κολπική μαρμαρυγή, η αυξημένη πίεση, κάποια καρδιομυοπάθεια άγνωστης αιτίας, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ, κάποια μόλυνση ή κάποια πάθηση των βαλβίδων (McMurray J., et al, 2005). Η καρδιακή ανεπάρκεια δεν είναι ταυτόσημη με το έμφραγμα του μυοκαρδίου (στο οποίο μέρος του καρδιακού μυ πεθαίνει) ούτε και με το καρδιακό επεισόδιο (όπου η παροχή αίματος σταματά εξολοκλήρου) (Lippincott W., et al, 2012). Η καρδιακή ανεπάρκεια είναι συχνή και μπορεί να οδηγήσει στο θάνατο. Περίπου 2% του παγκόσμιου πληθυσμού φέρει την πάθηση και τα ποσοστά αυτά αναμένεται να αυξηθούν (Metra M., et al, 2017). Η ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια είναι από τις πιο συχνές αιτίες θανάτου παγκοσμίως αριθμώντας πάνω από 9 εκατομμύρια θανάτους κάθε χρόνο (Roth A., et al, 2017). Πολλοί από τους ασθενείς δε βιώνουν μόνο την οξεία φάση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (myocardial infarction-MI) αλλά αναπτύσσουν και χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια που πηγάζει από δυσλειτουργία της αριστερής κοιλιάς λόγω των συνθηκών ισχαιμίας, η οποία ορίζεται ως ισχαιμική καρδιομυοπάθεια (Cohn N., et al, 2000). Το έμφραγμα του μυοκαρδίου είναι από τις πιο συχνές αιτίες της καρδιακής ανεπάρκειας και επέρχεται όταν εμφράσσεται μερικώς ή εξ' ολοκλήρου η στεφανιαία αρτηρία κόβοντας την παροχή οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών στο μυοκάρδιο, όπου καταλήγει η στεφανιαία αρτηρία (Thygesen K., et al, 2007). Μετά το έμφραγμα του μυοκαρδίου το μυοκάρδιο που έχει υποστεί ζημιά αντικαθίσταται από ινώδη (ουλώδη) ιστό, λόγω της πολύ μικρής αναγεννητικής ικανότητας του μυοκαρδίου στον ενήλικα άνθρωπο. Η παρουσία ουλώδους ιστού στην καρδιά σημαίνει δυσκολίες στην κυκλοφορία του αίματος στην καρδιά και μείωση του κλάσματος εξώθησης καθώς η καρδιά χάνει εν μέρει την λειτουργία της ως αντλία. Επακολούθως η καρδιά περνάει μια φάση αναδιοργάνωσης η οποία οδηγεί σε ακόμα μεγαλύτερη έλλειψη μυοκαρδιακού ιστού, διάταση της καρδιάς, εξάπλωση του ινώδους ιστού, λέπτυνση του κοιλιακού τοιχώματος, απώλεια συσταλτότητας και γενικότερα απουσίας λειτουργικότητας της καρδιάς (Cohn N., et al, 2000, Sutton J., et al, 2000).



Εικόνα 3. Η στεφανιαία νόσος στον παγκόσμιο χάρτη (Zhu K., et al, 2015).

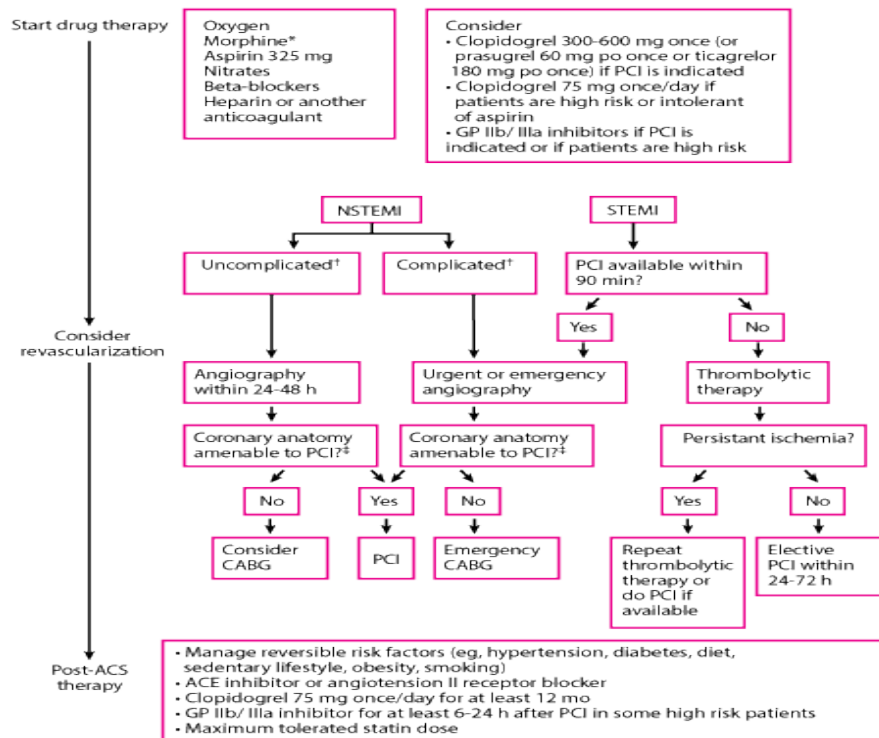
Οι σημαντικότεροι παράγοντες που μπορούν να επιφέρουν ένα MI είναι το κάπνισμα, η υψηλή αρτηριακή πίεση, η μεγάλη ηλικία, η υψηλή ολική χολιστερόλη και η λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας. Πολλά από αυτά είναι κοινά με την ασθένεια της στεφανιαίας αρτηρίας που είναι και η κύρια αιτία του εμφράγματος του μυοκαρδίου (Gaziano T., et al 2016, Mehta K., et al, 2015). Το πιο σημαντικό σύμπτωμα είναι πόνος στο στήθος ο οποίος μπορεί να ταξιδέψει στην πλάτη, το χέρι, τον ώμο, το λαιμό ή το σαγόι. Αυτός μπορεί να μοιάζει με κάψιμο (Kasper L., et al, 2015). Το έμφραγμα του μυοκαρδίου μπορεί να οδηγήσει σε καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιακό επεισόδιο, ασύγχρονους χτύπους στη καρδιά ή καρδιακό σοκ.



Εικόνα 4. Σημάδια και συμπτώματα της σοβαρής καρδιακής ανεπάρκειας (Thomas C., et al, 2005).

Όσον αφορά τη θεραπεία με κλασικά φαρμακευτικά σκευάσματα, έχουν χρησιμοποιηθεί αναστολείς του ενζύμου μετατροπής της αγγειοτενσίνης, ανταγωνιστές της αλδοστερόνης, θρομβολυτικοί παράγοντες ή β-παρεμποδιστές. Σε πιο σοβαρές περιπτώσεις χρησιμοποιείται αγγειοπλαστική με μπαλονάκι ή η εισαγωγή stent προκειμένου να επιτευχθεί επαναιμάτωση του μυοκαρδίου. Το μπαϊπάς (bypass) του μυοκαρδίου προτείνεται μόνο όταν υπάρχει πολύ σοβαρή και ανεπανόρθωτη απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας. Καμία από αυτές τις θεραπείες παρόλα αυτά δε καταφέρνει να απομακρύνει τον νεκρωμένο μυοκαρδιακό ιστό ή να δημιουργήσει νέα μυοκαρδιακά κύτταρα, και έτσι τα εναπομείναντα κύτταρα εξαναγκάζονται να αυξήσουν την συσταλτότητά τους ώστε να τροφοδοτήσουν αποτελεσματικά το σώμα (Sutton J., et al, 2000). Όσον αφορά την θεραπεία της καρδιακής ανεπάρκειας, στους ασθενείς με χρόνια ήπια σταθερή ανεπάρκεια συνίσταται κόψιμο του καπνίσματος, φυσική άσκηση, συγκεκριμένη δίαιτα καθώς και φαρμακευτική αγωγή. Σε τελικά στάδια καρδιακής ανεπάρκειας, μηχανικές συσκευές όπως εμφυτεύσιμος βηματοδότης ή απινιδωτής δείχνουν

Θετικά αποτελέσματα με τη μήνη βιώσιμη θεραπευτική στρατηγική να είναι η μεταμόσχευση καρδιάς (Rose A., et al, 2001, Bristow R., et al, 2004). Παρόλα αυτά η μειωμένη αναλογία δότη προς δέκτη όσο αφορά τα μοσχεύματα, η μακριά λίστα αναμονής και οι επιπλοκές που υπάρχουν μετά την εγχείρηση αποτελούν μερικά από τα μειονεκτήματα της στρατηγικής αυτής (Yacoub M., et al, 2015).



Εικόνα 5. Προσέγγιση του εμφράγματος του μυοκαρδίου (Sweis R., et al, 2020).

Το ηλεκτροκαρδιόγραμμα, είναι μια τεχνική που μετράει τα ηλεκτρικά σήματα του μυοκαρδίου που σχετίζονται με την συστολή. Είναι σημαντικό μέρος της διάγνωσης ενός AMI (acute myocardial infarction) και πολλές φορές επαναλαμβάνεται κάθε λίγες ώρες. Παράγει ένα κύμα στο οποίο μέσω κατάλληλων δεικτών υποδεικνύεται εάν υπάρχει έμφραγμα (Colledge N., et al, 2010). Άλλες μέθοδοι για τη διάγνωση και το χαρακτηρισμό ενός εμφράγματος είναι το ηχοκαρδιογράφημα, όπου μέσω υπερήχων έχουμε μια αναπαράσταση της καρδιάς, του σχήματος, του μεγέθους, και της ανώμαλης κίνησης που μπορεί να έχουν τα τοιχώματά της και να υποδεικνύουν έμφραγμα του μυοκαρδίου. Μέσω του ηλεκτροκαρδιογραφήματος τα εμφράγματα του μυοκαρδίου ταξινομούνται στις κατηγορίες: ST elevated myocardial infarction (STEMI) ή Non- ST elevated myocardial infarction (NSTEMI) (Thygesen K., et al, 2012). Επιπλέον χρωστικές ουσίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν την εικόνα. Άλλες απεικονίσεις της καρδιάς χρησιμοποιούν ραδιενεργά παράγωγα όπως το SPECT-CT scan (απεικόνιση της καρδιάς με ραδιοϊσότοπα ποζιτρονίων) ή το PET-CT scan (απεικόνιση της καρδιάς με ακτινοβολία γάμμα) (Thygesen K., et al, 2012).

1.3 ΕΝΔΟΓΕΝΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΤΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Τα καρδιομυοκύτταρα θεωρείται ότι βρίσκονται σε τελικός διαφοροποιημένο στάδιο. Παρόλα αυτά η ικανότητα της καρδιάς για αναγέννηση διαφέρει από είδος σε είδος και σε πολλά είδη διαφέρει στα διάφορα στάδια ζωής. Σε ορισμένα είδη όπως τα αξολοτλ, οι σαλαμάνδρες, ο βάτραχος και το zebrafish

τα καρδιομυοκύτταρα διατηρούν σε ολόκληρη τη ζωή του ζώου την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται (Poss D., et al, 2002, Porello R., et al, 2014). Αντίθετα στα ενήλικα θηλαστικά θεωρείται ότι τα καρδιομυοκύτταρα είναι τελικώς διαφοροποιημένα και γηρασμένα, χωρίς ικανότητα ανανέωσης και πολλαπλασιασμού. Παρόλα αυτά μετά από τραυματισμό έχει δειχθεί ότι η καρδιά ενός ποντικού μιας μέρας μπορεί να αναγεννηθεί μέσα σε μια περίοδο τριών εβδομάδων, ενώ σε αντίστοιχο συμβάν την έβδομη μέρα δε μπορεί να επανακτήσει τα χαμένα κύτταρα. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπάρχει μια μεταβατική περίοδος την πρώτη εβδομάδα της ζωής του ζώου όπου τα καρδιομυοκύτταρα του χάνουν την ιδιότητα της αναγέννησης (Porello R., et al, 2011). Πηγαίνοντας στον άνθρωπό, ένα νεογέννητο έδειξε σημάδια λειτουργικής αποκατάστασης του μυοκαρδίου μετά από έμφραγμα, το οποίο δείχνει κάποια αναγεννητική ικανότητα της νεογέννητης καρδιάς. Με εντυπωσιακό τρόπο η καρδιά του νεογέννητου μωρού ανάρρωσε παρά την καθυστερημένη θρομβολυτική θεραπεία και δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές από αντίστοιχες καρδιές ενός χρόνου (Haubner J., et al, 2016). Έρευνες στο ρυθμό με τον οποίο ανανεώνονται τα ενήλικα καρδιομυοκύτταρα δείχνει ότι σε ηλικία 25 ετών τα καρδιομυοκύτταρα ανανεώνονται με ρυθμό 1%, ενώ σε ηλικία 75 ετών ο ρυθμός αυτός είναι 0,45%. Ο ρυθμός αυτός δεν είναι επαρκής για την πλήρη ανανέωση όλων των καρδιομυοκυττάρων κατά την διάρκεια ζωής ενός ανθρώπου και σίγουρα η καρδιά δεν είναι ικανή να ανακτήσει την συσταλτική της λειτουργία μετά από ένα έμφραγμα του μυοκαρδίου, όπου χάνονται μέχρι και 1 δισεκατομμύριο καρδιομυοκύτταρα (Laflamme A., et al, 2011). Για αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η ανάπτυξη αναγεννητικών θεραπειών στους ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια. Ασχέτως με την περιορισμένη αναγεννητικότητα, στην καρδιά έχουν εντοπιστεί πλυθυσμοί βλαστικών κυττάρων (cardiac stem cells-CSCs) καθώς και προγονικών κυττάρων (cardiac progenital cells- CPCs) (Beltrami P. et al, 2003). Ο προσδιορισμός των κυττάρων αυτών βέβαια είναι πολύ δύσκολος καθώς στερούνται δεικτών επιφανείας και άρα για να χαρακτηρισθούν χρησιμοποιούνται δείκτες καρδιομυικής προέλευσης όπως οι NKx2.5, GATA4 και MEF2C. Οι πλυθυσμοί αυτοί των κυττάρων μπορούν να διαφοροποιηθούν σε όλες τις κατηγορίες των μυοκαρδιακών κυττάρων και επομένως είναι πολύ χρήσιμα στην αναγέννηση του μυοκαρδίου μετά από τραυματισμό (Anversa P., et al, 2006). Νέες ανακαλύψεις δείχνουν ότι οι πλυθυσμοί αυτοί μπορούν να υιοθετήσουν μυοκαρδιακούς φαινοτύπους και επιπλέον να ενεργοποιηθούν ώστε να συμμετάσχουν στην αναγέννηση του μυοκαρδίου (Rota M., et al, 2008). Προσπάθειες που έχουν γίνει για την απομόνωση και την καλλιέργεια των πλυθυσμών αυτών *in vitro* έχουν ενθαρυντικά αποτελέσματα (Matsuura K., et al 2009).

1.4 ΤΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

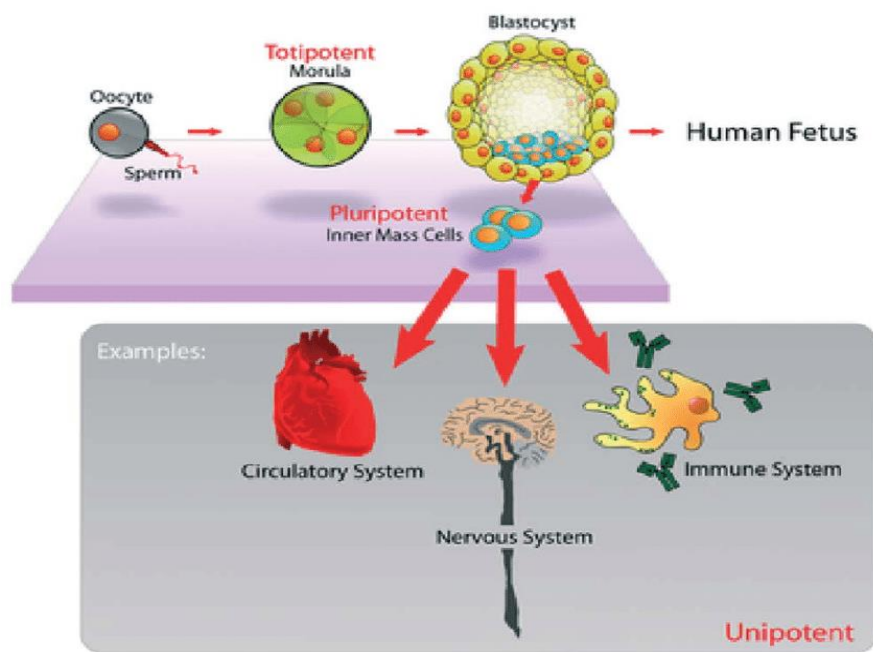
Η έννοια των βλαστικών κυττάρων σαν θεραπευτική προσέγγιση στις καρδιαγγειακές παθήσεις πρωτοεμφανίστηκε τουλάχιστον είκοσι χρόνια πριν (Marelli D. et al. 1992) και οι πρώτες ενδείξεις κλινικών εφαρμογών ήταν δέκα χρόνια αργότερα. Ένας μεγάλος αριθμός θεραπευτικών προσεγγίσεων που βασίζονται σε κύτταρα μπήκε σε εφαρμογή. Οι προσεγγίσεις αυτές περιελάσσονται γύρω από 2 κύριους άξονες:

-αυτές που στοχεύουν την απευθείας δημιουργία μυϊκού ιστού που θα αντικαταστήσει τον νεκρωμένο ιστό του μυοκαρδίου. Αυτές συνήθως χρησιμοποιούν εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (ESCs) ή επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) τα οποία έχουν ξεκάθαρη ικανότητα μετατροπής σε κύτταρα του μυοκαρδίου (Behfar A., et al, 2007)

-αυτές που στοχεύουν τους ενδογενείς μηχανισμούς αναγέννησης. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιεί προγονικά κύτταρα όπως τα μονοπύρρηνα βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών (BMNCs), τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), τα ίδια τα προγονικά κύτταρα της καρδιάς (CPCs) ή τα ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (EPCs).

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς τα βλαστικά κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα ή μερικώς διαφοροποιημένα κύτταρα τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε διάφορους τύπους κυττάρων ή πολλαπλασιαστούν επ' άοριστον δίνοντας τον ίδιο τύπο βλαστικού κυττάρου. Είναι ο πρώτος τύπος που συναντάται στις γενεαλογίες των κυττάρων. Βρίσκονται τόσο στους εμβρυικούς όσο στους ενήλικες οργανισμούς με μικρές διαφορές ως προς τις ιδιότητές τους. Διαφοροποιούνται από τα προγονικά κύτταρα τα οποία δε μπορούν να διαφοροποιούνται επ' άοριστον, όπως και από τα πρόδρομα κύτταρα τα οποία είναι δεσμευμένα να διαφοροποιηθούν προς συγκεκριμένη κυτταρική σειρά.

Στα θηλαστικά, περίπου 50-150 κύτταρα διαμορφώνουν την εσωτερική κυτταρική μάζα στο στάδιο της βλαστοκύστης κατά την εμβρυονική διαφοροποίηση, τις μέρες 5-14. Αυτά τα κύτταρα έχουν βλαστικές ιδιότητες. Τα κύτταρα αυτά διαφοροποιούνται *in vivo* σε όλους τους κυτταρικούς τύπους (πολυδύναμα κύτταρα). Η διαδικασία ξεκινά με την ανάπτυξη των τριών βλαστικών σιβάδων, του εξωδέρματος του μεσοδέρματος και του ενδοδέρματος, κατά την γαστριδίωση. Παρόλα αυτά τα κύτταρα της βλαστοκύστης μπορούν να απομονωθούν και να καλλιεργηθούν *in vitro* διατηρώντας την πολυδυναμία τους και αυτά είναι που ονομάζουμε εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells – ESCs). (Atala A., et al, 2012).



Εικόνα 6. Τα πολυδύναμα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα προέρχονται από την εσωτερική κυτταρική μάζα της βλαστοκύστης. Αυτά τα βλαστικά κύτταρα μπορούν να δώσουν οποιοδήποτε ιστό του ενήλικου σώματος εκτός από τον πλακούντα. Μόνο κύτταρα από μια προηγούμενη κατάσταση του εμβρύου, γνωστή και ως μορίδιο, είναι ολοδύναμα, μπορούν να δώσουν δηλαδή όλους τους ιστούς καθώς και τον πλακούντα (Milanko S., et al, 2013).

Τα βλαστικά κύτταρα των ενηλίκων βρίσκονται σε συγκεκριμένα περιβάλλοντα (θώκους) , όπως ο μυελός των οστών ή οι γονάδες. Στα θηλαστικά περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τα αιματοποιητικά κύτταρα τα οποία αναγεννούν κύτταρα του αίματος και κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα κύτταρα της βλαστικής στιβάδας του δέρματος, από τα οποία προέρχονται τα κύτταρα του επιθηλίου της επιδερμίδας και τα μεσεγχυματικά κύτταρα, τα οποία είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση των οστών, των χόνδρων και των λιποκυττάρων. Τα ενήλικα βλαστικά κύτταρα είναι μια μικρή μειονότητα κυττάρων συγκρινόμενα με τα προγονικά κύτταρα και τα τελικώς διαφοροποιημένα κύτταρα στα οποία διαφοροποιούνται (Atala A, et al, 2012).

Ο κλασικός ορισμός του βλαστικού κυττάρου απαιτεί από αυτό να κατέχει δυο ιδιότητες:

-την ικανότητα αυτοανανέωσης, δηλαδή την ικανότητα του κυττάρου να περνά από πολυάριθμους κυτταρικούς κύκλους, να διαιρείται και να πολλαπλασιάζεται παραμένοντας σε αδιαφοροποίητη κατάσταση.

-την ικανότητα διαφοροποίησης σε συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους. Αυτό συνήθως προϋποθέτει το κύτταρο να είναι ολοδύναμο ή πολυδύναμο (totipotent or pluripotent) για να μπορεί να διαφοροποιηθεί σε όλους τους ενήλικους κυτταρικούς τύπους, αλλά πολλές φορές αναφερόμαστε και στα πλειοδύναμα ή τα μονοδύναμα κύτταρα σαν βλαστικά κύτταρα (Atala A, et al, 2012).

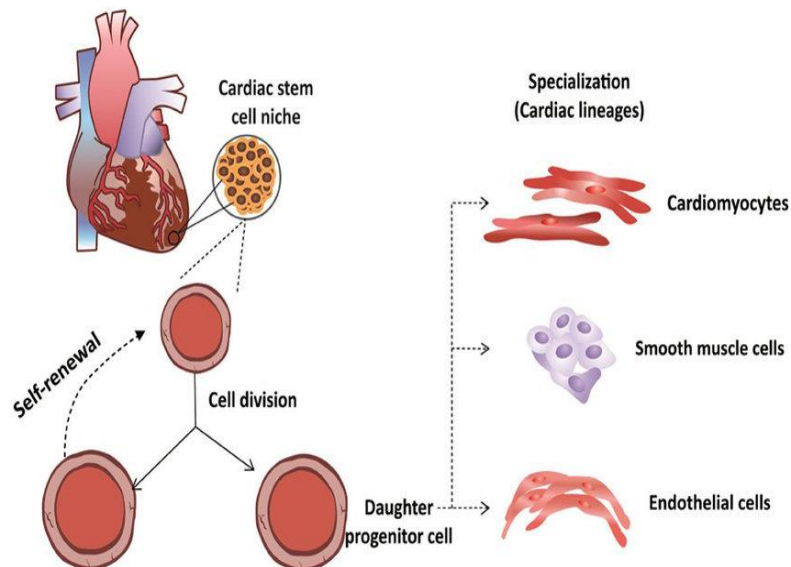
-Αυτοανανέωση:

Δύο μηχανισμοί εξασφαλίζουν ότι ένας πληθυσμός βλαστικών κυττάρων δε μικραίνει σε αριθμό κυττάρων

-η ασύμμετρη διαίρεση: το κύτταρο διαιρείται σε ένα μητρικό κύτταρο το οποίο είναι αντίγραφο του αρχικού κυττάρου και σε ένα θυγατρικό κύτταρο το οποίο είναι διαφοροποιημένο.

-η στοχαστική διαφοροποίηση: όταν ένα βλαστικό κύτταρο διαιρείται σε δύο διαφοροποιημένα θυγατρικά κύτταρα, ένα άλλο βλαστικό κύτταρο διαιρείται και δίνει δύο πανομοιότυπα κύτταρα με το αρχικό (Shenghui H., et al, 2009).

Τα βλαστικά κύτταρα χρησιμοποιούν την τελομεράση, μια πρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για τη διατήρηση των τελομερών, έτσι ώστε να προστατευτεί το DNA με σκοπό την διατήρηση της ικανότητας διαίρεσης επ' άοριστον (Cong S., et al, 2002).



Εικόνα 7. Λειτουργικές ιδιότητες των καρδιακών βλαστικών κυττάρων. Τα καρδιακά βλαστικά κύτταρα δεν είναι διαφοροποιημένα και μπορούν να διαιρεθούν χωρίς όρια. Κατά την κυτταρική διαίρεση μπορούν να διαιρεθούν συμμετρικά για να αυξήσουν τους αριθμούς τους. Εναλλακτικά, μπορούν να διαιρεθούν ασυμμετρικά για να παράξουν ένα θυγατρικό κύτταρο και ένα προγονικό κύτταρο, το οποίο δίνει μια από τις τρεις

κύριες καρδιακές γενεαλογίες: καρδιομυοκύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και λεία μυϊκά κύτταρα (Lopes C., et al, 2015).

Διαφοροποίηση:

Η ικανότητα διαφοροποίησης (potency) των βλαστικών κυττάρων σε επιμέρους κυτταρικές σειρές και τύπους κυττάρων συνίσταται στις εξής κατηγορίες κατά φθίνουσα σειρά:

-ολοδύναμα κύτταρα (totipotent) είναι αυτά των οποίων η διαφοροποίηση μπορεί να οδηγήσει τόσο σε εμβρυϊκές όσο και εξωεμβρυϊκές δομές και να δώσει ένα ολοκληρωμένο, ζώντα οργανισμό. Προκύπτουν από την ένωση ωαρίου και σπερματοζωαρίου. Τα κύτταρα που προκύπτουν από τις πρώτες διαιρέσεις του ζυγωτού είναι επίσης ολοδύναμα (Mitalipov S., et al, 2009).

-πολυδύναμα κύτταρα (pluripotent) είναι οι άμεσοι απόγονοι των ολοδύναμων κυττάρων οι οποίοι μπορούν να διαφοροποιηθούν σχεδόν σε όλα τα κύτταρα, όπως κύτταρα που προέρχονται από μια εκ των τριών βλαστικών στιβάδων (Ulloa-Montoya F., et al, 2005).

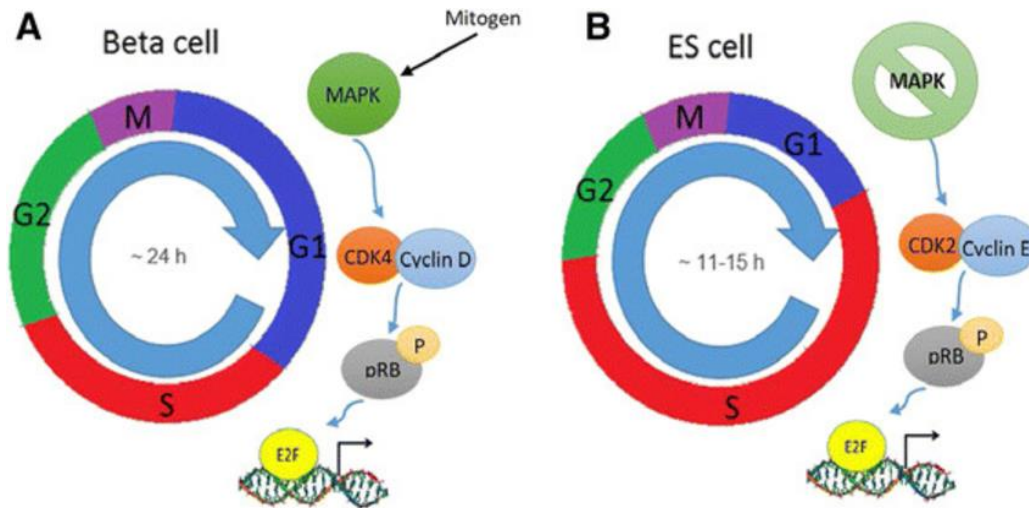
-πολυδύναμα κύτταρα (multipotent) τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν σε μια οικογένεια στενά συνδεδεμένων κυττάρων (Schöler H. R., 2007).

-ολιγοδύναμα (πλειοδύναμα) κύτταρα (oligopotent) τα οποία μπορούν να διαφοροποιηθούν μόνο σε πολύ λίγους τύπους κυττάρων, όπως τα λεμφοειδή ή τα μυελοειδή κύτταρα (Schöler R., et al, 2007).

-μονοδύναμα κύτταρα (unipotent) είναι τα κύτταρα που διαφοροποιούνται μόνο σε ένα τύπο κυττάρου, αλλά συνεχίζουν να κατέχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, η οποία τα ξεχωρίζει από τα μη βλαστικά κύτταρα (όπως τα προγονικά κύτταρα ή τα διαφοροποιημένα κύτταρα) (Schöler R., et al, 2007).

Τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα διαιρούνται επ'άοριστον και διατηρούν την πολυδυναμία τους χάρη συγκεκριμένων τροποποιήσεων στον κυτταρικό κύκλο τους (Koledova Z., et al, 2010). Συγκρινόμενα με τα σωματικά κύτταρα (somatic cells), τα βλαστικά έχουν μοναδικά χαρακτηριστικά, όπως ταχύτατη διαίρεση, προκαλούμενη από εξαιρετικά βραχεία φάση G1, απύσασ φάση G0 και αλλαγές στα σημεία ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, που τα κάνει να βρίσκονται κυρίως στη φάση διαίρεσης του γενετικού υλικού S (Koledova Z., et al, 2010, Barta T., et al, 2013). Η ταχεία διαίρεση των βλαστικών κυττάρων φαίνεται στον μικρό χρόνο διπλασιασμού τους που κυμαίνεται μεταξύ 8 και 10 ωρών, όταν ο χρόνος διαίρεσης ενός σωματικού κυττάρου είναι περίπου 20 ώρες ή περισσότερο (Zaveri L., et al, 2018). Όταν τα κύτταρα ξεκινούν να διαφοροποιούνται ο κυτταρικός κύκλος αλλάζει και οι φάσεις G1 και G2 μακραίνουν οδηγώντας το κύτταρο σε επιμήκυνση του κυτταρικού κύκλου. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι μια συγκεκριμένη δομή του κυτταρικού κύκλου μπορεί να συμβάλλει εν μέρει στην εγκαθίδρυση της πολυδυναμίας (Koledova Z, et al, 2010). Το γεγονός ότι η φάση G1 του κυτταρικού κύκλου είναι η φάση στην οποία τα κύτταρα έχουν αυξημένη ευαισθησία στην επαγωγή της διαφοροποίησης, μπορεί να εξηγήσει γιατί τα βλαστικά κύτταρα στα οποία η μειωμένης διάρκειας G1 είναι ένα κομβικό χαρακτηριστικό, μπορούν εύκολα να διατηρήσουν τον αδιαφοροποίητο φαινότυπό τους (Barta T., et al, 2013). Ακόμα ένας παράγοντας που συμβάλλει στον αδιαφοροποίητο φαινότυπο είναι η κινάση Cdk2 η οποία έχει εξέχων ρόλο στην όψιμη G1 και S φάση και η οποία είναι υπεύθυνη τόσο για την ρύθμιση

του κυτταρικού κύκλου όσο και για αποφάσεις που καθορίζουν το πεπρωμένο των κυττάρων στα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα του ποντικού (mESCs) ή και του ανθρώπου (hESCs). Απουσία της Cdk2 οδηγεί σε επιμύκηση της G1 φάσης, καθιερώνει φαινότυπο σωματικού τύπου στα κύτταρα και οδηγεί στην έκφραση δεικτών της διαφοροποίησης (Koledova Z, et al, 2010). Τέλος τα βλαστικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από απουσία λειτουργικότητας του σημείου ελέγχου της φάσης G1, όπου ελέγχεται μεταξύ των άλλων το γονιδιακό υλικό για μεταλλάξεις, μεταθέτωντας την λειτουργία αυτή σε άλλα σημεία ελέγχου στις φάσεις S και G2 ή υπόκεινται σε απόπτωση. Η απουσία του σημείου ελέγχου αυτού επιτρέπει την απομάκρυνση βλαστικών κυττάρων στα οποία έχουν γίνει λάθη στο DNA (Koledova Z., et al, 2010).



Εικόνα 8. Διαφορές στη μηχανική του κυτταρικού κύκλου των σωματικών και των εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ES cells). Ο κυτταρικός κύκλος των ES είναι σύντομος σε σχέση με τον αντίστοιχο των σωματικών, που οφείλεται κυρίως σε μια σύντομη G1 φάση. Α) Στα σωματικά κύτταρα, τα ερεθίσματα μέσω του μονοπατιού της MAP κινάσης ενεργοποιούν το σύμπλεγμα CDK-4-κυκλίνη D, που φωσφορυλιώνει το ρετινοβλάστωμα (pRB), γεγονός που οδηγεί σε απελευθέρωση του παράγοντα E2F, οδηγώντας σε ενεργοποίηση των απαραίτητων μεταγραφικών παραγόντων που χρειάζονται για τον κυτταρικό κύκλο. Β) Στα ES κύτταρα η σηματοδότηση μέσω της MAP κινάσης φαίνεται να μην παίζει κάποιο ρόλο. Η παραγωγή του συσσωματώματος κυκλίνης E-DCK-2, το οποίο φαίνεται να παράγεται συνεχώς και ανεξάρτητα από οτιδήποτε άλλο, οδηγεί κατευθείαν από τη φάση M στο τελευταίο στάδιο της φάσης G1. Έτσι συντομεύει ο κυτταρικός κύκλος (El-Badawy A., et al, 2016).

Υπάρχουν δύο είδη εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων:

-κύτταρα τα οποία προέρχονται από τους ιστούς του εμβρύου και συνήθως λαμβάνονται μετά από μια άμβλωση. Τα κύτταρα αυτά δεν είναι αθάνατα αλλά έχουν μεγάλη ικανότητα διαίρεσης και πολυδυναμίας (multipotency).

-κύτταρα που προέρχονται από τους εξωεμβρυϊκούς ιστούς, όπως οι εξωεμβρυϊκές μεμβράνες, τα οποία λαμβάνονται μετά τη γέννηση του μωρού και παρόλο που δεν είναι αθάνατα, έχουν επίσης μεγάλη ικανότητα διαίρεσης και πολυδυναμίας (pluripotency) (Moore L., et al, 2013).

Υπάρχουν 3 προσβάσιμες πηγές αυτόλογων βλαστικών κυττάρων στον άνθρωπο (κύτταρα που προέρχονται από το ίδιο το σώμα κάποιου) όπως και στα υπόλοιπα θηλαστικά και τρωκτικά:

-βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών.

-βλαστικά κύτταρα του λιπώδους ιστού (Coughlin R., et al, 2017).

-βλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στο αίμα.

Βλαστικά κύτταρα μπορούμε να εξάγουμε και από τον ομφάλιο λώρο, αμέσως μετά τη γέννα. Τα περισσότερα βλαστικά κύτταρα στο ανθρώπινο σώμα έχουν περιορισμένη πολυδυναμία (multipotency) (Barrilleaux B., et al, 2006). Παρόλα αυτά μπορούν να βρεθούν και κύτταρα με αυξημένη πολυδυναμία (pluripotency) στον ομφάλιο λώρο και σε άλλους ιστούς (Ratajczak Z., et al, 2007).

2. ΚΥΡΙΩΣ ΜΕΡΟΣ

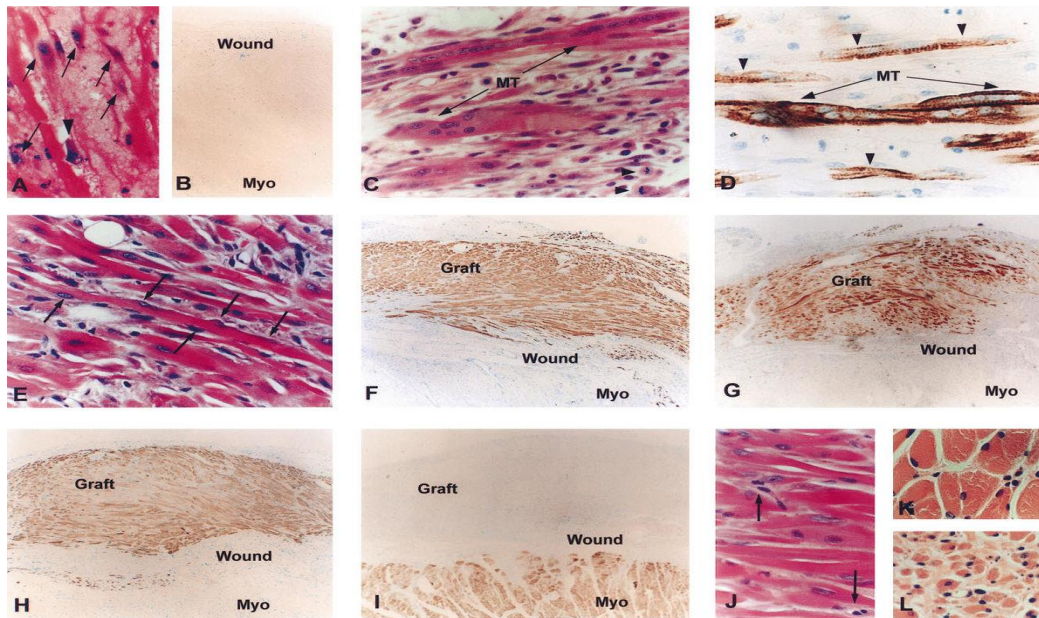
Οι αρχικές προσπάθειες περιλάμβαναν κύτταρα τα οποία θα αντικαθιστούσαν το νεκρωμένο μυοκάρδιο (Behfar A., et al, 2014). Αυτές ονομάστηκαν θεραπείες πρώτης γενιάς και περιλάμβαναν σκελετικούς μυοβλάστες (skeletal myoblasts-skms) οι οποίοι επρόκειται να συνισφέρουν στην ικανότητα της καρδιάς για σύσπαση, βλαστικά κύτταρα που προέρχονταν από τον μυελό των οστών (BMNCS) και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs) που όπως είχε δειχθεί διαφοροποιούνταν *in vitro* σε καρδιομυοκύτταρα (Menasche P., et al, 2008, Meyer P., et al, 2006, Hare M., et al, 2012). Η επόμενη γενιά κυττάρων περιλάμβανε κυτταρα που προέρχονταν από την καρδιά και είχαν επιδείξει βλαστικότητα. Αυτά τα καρδιακά κύτταρα ήταν επεκτάσιμα και πολυδύναμα και μπορούσαν να διαφοροποιηθούν σε διάφορους πληθυσμούς κυττάρων της καρδιάς *in vitro* (Beltrami P., et al, 2003). Η τελευταία προσέγγιση που χρησιμοποιήθηκε ήταν μέσω της διαφοροποίησης κυττάρων σε λειτουργικά καρδιομυοκύτταρα *in vitro* και η επακόλουθη μεταφορά τους στην τραυματισμένη καρδιά. Τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα, τα οποία είχε δειχθεί πως μπορούσαν να μετατραπούν αξιόπιστα σε καρδιομυοκύτταρα *in vitro* (Mummery L., et al, 2012).

2.1 ΣΚΕΛΕΤΙΚΟΙ ΜΥΟΒΛΑΣΤΕΣ (SKMS)

Τα πρώτα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι σκελετικοί μυοβλάστες (skeletal myoblasts-skms). Είναι κύτταρα που έχουν προέλευση τον μυελό των οστών και είναι υπεύθυνα για την αναγέννηση του σκελετικού μύος μετά από τραυματισμό. Τα χαρακτηριστικά που τους κάνουν ιδιαίτερα χρήσιμους είναι η διαθεσιμότητα σε αυτόλογες πηγές, η δυνατότητα να καλλιεργηθούν *in vitro*, η έλλειψη ογκογονικότητάς τους, η αντίσταση σε ισχαιμία και η ικανότητα μυογενούς διαφοροποίησης. Ακόμα όταν έρχονται σε επαφή με μυοκαρδιακά κύτταρα *in vivo* μπορούν να δημιουργήσουν στοιχεία που συσπώνται σε σύγχρονο ρυθμό (Menasche P., et al, 2007, Haider H., et al, 2004). Οι σκελετικοί μυοβλάστες αντίθετα με τα καρδιομυοκύτταρα είναι ικανοί να αναγεννηθούν μετά από τραυματισμό και αυτή η ιδιότητα οφείλεται σε αδιαφοροποίητα «δορυφορικά κύτταρα» (μυοβλάστες) που περιέχουν και τα οποία έχουν την δυνατότητα να συγχωνευτούν με άλλους μυοβλάστες ή και με τραυματισμένες μυϊκές ίνες και να δημιουργήσουν λειτουργικό σκελετικό μυ. *In vitro* οι αδιαφοροποίητοι σκελετικοί μυοβλάστες συνενώνονται για να δημιουργήσουν πολυπύρηνους μυϊκούς σωλήνες που εκφράζουν χαρακτηριστικούς δείκτες (μεταγραφικούς παράγοντες) των σκελετικών μυών, όπως η μυογενίνη (Bischoff R., et al, 1975).

Έτσι αναμένονταν να αντικαταστήσουν τα νεκρωμένα μυοκαρδιακά κύτταρα με νέα και να αποκαταστήσουν την συσταλτική λειτουργία της καρδιάς. Σε ζωικά μοντέλα μεταμοσχευμένοι

σκελετικοί μυοβλάστες διαφοροποιήθηκαν σε μυογενείς σειρές κυττάρων και βελτίωσαν το κλάσμα εξώθησης σε ισχαιμικές και μη καρδιομυοπάθειες (Marelli D., et al, 1992, Taylor A., et al, 1998, Al Attar N., et al, 2003, Durrani S., et al, 2010). Οι πρώτες κλινικές προσπάθειες έδειξαν θετικά αποτελέσματα με τη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας σε ασθενείς με ισχαιμική καρδιομυοπάθεια (Menasche P., et al, 2008, Rovsic J., et al, 2011). Παρόλα αυτά μακρόχρονη παρακολούθηση των υποκειμένων που έλαβαν τα κύτταρα δεν έδειξαν θετικά αποτελέσματα. Επίσης, δυσμενή αποτελέσματα όπως αρρυθμογένεση λόγω της αδυναμίας των skms να αλληλεπιδράσουν ηλεκτρομηχανικά με τα μυοκαρδιακά κύτταρα του περιβάλλοντός τους, απέκλεισαν τους skms από παραιτέρω κλινικές δοκιμές.

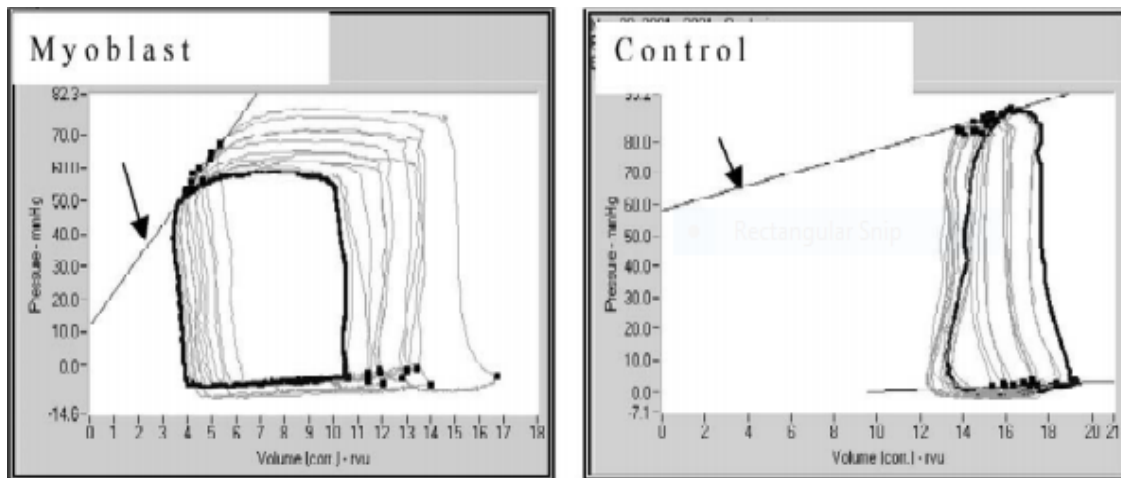


Εικόνα 9. Μορφολογία και έκφραση του μείζων αντιγόνου ιστοσυμβατότητας (MHC) skms. Καρδιές αρουραίων τραυματίστηκαν μέσω παγώματος-τήξης και συγγενικοί σκελετικοί μυοβλάστες μεταφέρθηκαν στις κακώσεις. Όλες οι εικόνες είναι από υποκείμενα στα οποία μεταμοσχεύθηκαν skms απευθείας μετά τον τραυματισμό (Wiseman R., et al, 1997).

Δεκατέσσερα σκυλιά υποβλήθηκαν σε χειρουργική αφαίρεση της πρόσθιας κνήμης τους (Marelli D., et al, 1992) και οι skms που ελήφθησαν πολλαπλασιάστηκαν *in vitro* και οι πυρήνες τους χρωματίστηκαν με θυμιδίνη. Τα κύτταρα έπειτα μεταφέρθηκαν στα ίδια ζώα (αυτόλογα), ενώ χρησιμοποιήθηκε και control από θρεπτικό μέσο χωρίς κύτταρα σε παρακείμενες θέσεις με αυτές της μεταμόσχευσης των skms. Η απομόνωση, η καλλιέργεια και η μεταμόσχευση των κυττάρων ήταν επιτυχής. Τρία από τα σκυλιά μετά από 6-8 εβδομάδες έδειξαν διατήρηση των καναλιών εμφύτευσης σε σχέση με τα control. Μακροσκοπικά υπήρχε μυϊκός ιστός που περιέβαλλε τον ουλώδη ιστό και στις θέσεις εμφύτευσης αντίθετα με τα control βρέθηκαν μυϊκές ίνες με ενδιάμεσους δίσκους. Σε δύο άλλα σκυλιά που μελετήθηκαν 14 εβδομάδες μετά την εγχείρηση, ο εντοπισμός του μυϊκού ιστού απέτυχε. Η συγκεκριμένη ομάδα έβγαλε λοιπόν το πόρισμα ότι αν και σε κατάλληλο περιβάλλον τα δορυφορικά κύτταρα των skms είναι ικανά να δημιουργήσουν μυϊκό ιστό, σε μακροχρόνιες μελέτες ο ιστός αυτός αποτυγχάνει να επιβιώσει.

Σε δεκατρία ποντίκια μετά από επαγόμενο έμφραγμα του μυοκαρδίου έγινε μεταμόσχευση αυτόλογων skms στα μισά, και στα άλλα μισά δόθηκε θρεπτικό μέσο χωρίς κύτταρα (Al Attar N., et al, 2003). Τα

ποντίκια επιβίωσαν ένα χρόνο και σε αυτή τη χρονική στιγμή έγινε εκτίμηση του αποτελέσματος με ηχοκαρδιογράφημα και καμπύλες πίεσης-όγκου και βρέθηκε ότι οι δείκτες σύσπασης-χαλάρωσης στα ποντίκια τα οποία είχαν λάβει τα κύτταρα ήταν βελτιωμένοι σε σχέση με το control group. Το κλάσμα εξώθησης (EF-ejection fraction) ήταν παρόμοιο στον ένα χρόνο με αυτό στους δύο μήνες και διπλασιάστηκε στα ποντίκια που έλαβαν τα κύτταρα (42% και 20% σε ποντίκια που έλαβαν κύτταρα και control στους 2 μήνες και 45% και 26% σε ποντίκια που έλαβαν κύτταρα και control στον 1 χρόνο αντίστοιχα) και αυτό δείχνει μια σταθερότητα του αποτελέσματος, ενώ αντίστοιχα οι σχέσεις των τελοσυστολικών και τελοδιαστολικών τιμών όγκου-πίεσης έδειξαν να μετατοπίζονται προς τα αριστερά στα ζώα που έλαβαν κύτταρα σε σχέση με τα control στις καμπύλες όγκου-πίεσης, που δείχνει καλύτερο ινοτροπισμό και αυξημένη συσπαστικότητα στα ζώα που έλαβαν σκελετικούς μυοβλάστες. Αν και ο αριθμός των skms που βρέθηκαν στον 1 χρόνο ήταν μειωμένος σε σχέση με την αρχή, η σχέση της αργής προς τη γρήγορη ισομορφή μυσίνης που εκφραζόταν από τα σκελετικά μυοϊνίδια που βρέθηκαν στον 1 χρόνο ήταν μεγαλύτερη από την αρχή, πράγμα που μπορεί να οφείλεται είτε σε απόρριψη από το περιβάλλον της ισομορφής της γρήγορης μυσίνης, είτε την σταδιακή αλλαγή των γρήγορων ισομορφών σε αργές για να ανταποκριθούν στα περιβάλλοντα κύτταρα. Η ομάδα απέδωσε τη λειτουργική βελτίωση σε παρακρινές φαινόμενο μέσω του οποίου ενεργοποιούνται η ενδογενής ομάδα των καρδιακών προγονικών κυτταρών του οργανισμού είτε σε αναδιαμόρφωση της εξωκυττάριας μήτρας από τα μεταμοσχευμένα κύτταρα.

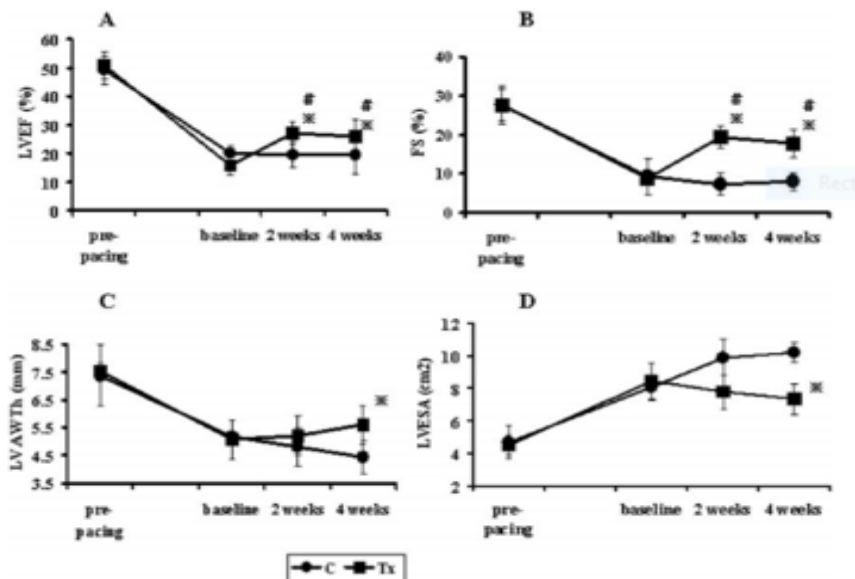


Εικόνα 10. Ενδεικτικές καμπύλες πίεσης-όγκου για μια control καρδιά (δεξιά εικόνα) και μια καρδιά στην οποία έχουν μεταμοσχευθεί skms (αριστερή εικόνα). ESPVR: σχέση τελοδιαστολικών πίεσης-όγκου, rvu: σχετικές μονάδες όγκου (Al Attar N., et al, 2003).

48 θηλυκά ποντίκια μελετήθηκαν για την επίδραση αλλογενών (ανθρώπινων) skms με ή χωρίς την παρουσία αγγειακού ενδοθηλιακού παράγοντα ανάπτυξης (VEGF) (Ye L., et al, 2005). Τραύμα στην καρδιά των ποντικών επήλθε με τεχνητό τρόπο που προσομοιάζει το έμφραγμα όσον αφορά την ισχαιμία και τον μυοκαρδιακό θάνατο και χωρίστηκαν σε τέσσερις ομάδες: μια που έλαβε σκέτους skms (n=12), μια με skms και VEGF (n=14), μια που αποτελούνταν από φυσιολογικά ποντίκια που δεν έλαβαν τίποτα (n=12) και μία μόνο με θρεπτικό μέσο (n=10). Τα ποντίκια έλαβαν ανοσοθεραπεία για 6 εβδομάδες και διενεργήθηκαν ιστοχημικές μελέτες, ενώ καρδιακή λειτουργία μελετήθηκε με ηχοκαρδιογράφημα. Οι μυοβλάστες επιζούν στα ποντίκια για τουλάχιστον 6 εβδομάδες όπως δείχνει ανάλυση PCR για το χρωμόσωμα ψ. Οι αναλύσεις έδειξαν πάνω από διπλάσια διαφορά στην πυκνότητα

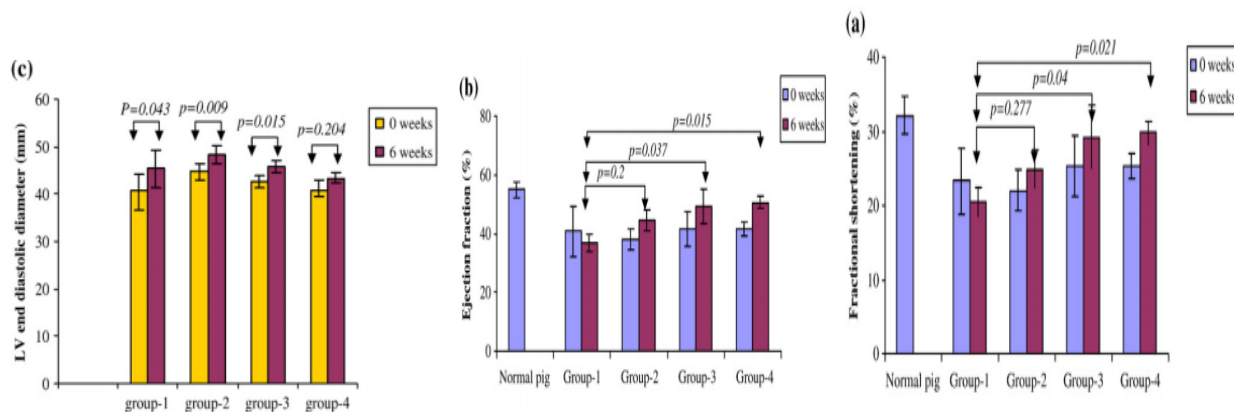
των αγγείων στα ποντίκια που έλαβαν VEGF σε σχέση με τις δυο άλλες ομάδες, ενώ το κλάσμα εξώθησης αυξήθηκε σημαντικά στις ομάδες που έλαβαν τους μυοβλάστες σε σχέση με την ομάδα που δεν πήρε κύτταρα (15% μείωση του EF στα ποντίκια που έλαβαν θρεπτικό μέσο έναντι 3% και 2% μείωση στα ποντίκια που έλαβαν skms και skms με VEGF αντίστοιχα). Ίδια εικόνα παρουσιάστηκε και για το FS (fractional shortening-μείωση του μήκους της τελοδιαστολικής διαμέτρου που συμβαίνει στο τέλος μια συστολής), που δείχνει τη μυϊκή ικανότητα της καρδιάς και το οποίο εμφάνισε σημαντική πτώση στα ζώα που έλαβαν θρεπτικό μέσο σε σχέση με αυτά των άλλων γκρουπ. Ταυτόχρονα ο LVSV αυξήθηκε από 0,10 cm στα φυσιολογικά ζώα στα 0,27 cm στα ποντίκια που πήραν θρεπτικό μέσο και στα 0,175 cm και 0,135 cm σε αυτά που πήραν κύτταρα και κύτταρα σε συνδυασμό με VEGF αντίστοιχα. Μια παρόμοια μικρότερη αύξηση παρατηρήθηκε στα ζώα που έλαβαν κύτταρα στην LVSD (0,626 cm στα ζώα με VEGF, 0,6 cm στα υπόλοιπα) σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα (0,667cm) από τα φυσιολογικά ζώα (0,493 cm).

Σε άλλο πείραμα που αφορά το μοντέλο του σκύλου (Hata H., et al, 2006), 12 ζώα έλαβαν skms αναπτυγμένους σε φύλλα κυττάρων με μηχανικό τρόπο (cell sheets) έτσι ώστε να αποφευχθούν δυσκολίες της ενέσως των κυττάρων ενδομυϊκά, όπως η απώλεια κυττάρων και η περιορισμένη επιφάνεια που μπορεί να προσαρμοστεί το μόσχευμα. Τα φύλλα προσαρμόστηκαν στην αριστερή κοιλία των ζώων χωρίς σοβαρά επακόλουθα, ενώ το κλάσμα εξώθησης και η FS (fractional shortening) ήταν 6% και 9% αυξημένα στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα, όπως έδειξαν τα ηχοκαρδιογραφήματα 4 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση. Η διαστολή της αριστερής κοιλίας μειώθηκε (3 cm² διαφορά μεταξύ των ζώων του control και των skms) και το πάχος του καρδιακού τοιχώματος αυξήθηκε (1,2mm), ενώ ιστολογικές μελέτες έδειξαν μείωση της ίνωσης και της απόπτωσης στα ζώα που έλαβαν τα φύλλα των μυοβλαστών, καθώς και ότι οι μυοβλάστες επέζησαν. Η πυκνότητα των αγγείων ήταν μεγαλύτερη στα ζώα που πήραν μόσχευμα κυττάρων αλλά όχι σημαντικά. Η ομάδα απέδωσε το θετικό αντίκτυπο όχι μόνο στον περιορισμένο αριθμό κυττάρων που επιβιώνουν, αλλά σε παρακρινές φαινόμενο που ενεργοποιεί παράγοντες όπως ο HGF, ο SDF-1 και ο VEGF και σύμφωνα με το οποίο δεν είναι απαραίτητη η συγχώνευση των μεταμοσχευθέντων κυττάρων.



Εικόνα 11. Δεδομένα ηχοκαρδιογραφήματος. Τα LVEF (A), LVFS (B) και LVAWTh (C) αυξήθηκαν, όταν η LVESA (D) μειώθηκε έπειτα από μεταμόσχευση στο γκρουπ Tx. Παρουσιάζεται ο μέσος όρος και η τυπική απόκλιση των δεδομένων (Hata H., et al, 2006).

29 ζωικά μοντέλα χοίρου με επαγώγιμο MI χωρίστηκαν σε 4 γκρουπ (Ye L., et al, 2007), από τα οποία στο ένα προστέθηκε μόνο θεραπευτικό υλικό, σε ένα δεύτερο μόνο skms προερχόμενοι από άνθρωπο, στο τρίτο συνδυασμός skms και αγγειοποιητίνη-1 (ang-1) και στο τέταρτο εκτός αυτών των δυο και VEGF με τη βοήθεια ενός αδενοϊικού φορέα. Μέσω ηχοκαρδιογραφήματος και φθορίζουσας βαφής στις 6 και 12 εβδομάδες διαπιστώσαμε τη βελτίωση κυρίως στο 3^ο και 4^ο γκρουπ της λειτουργίας της καρδιάς και της τοπικής ροής του αίματος, ενώ με ανάλυση του ψ χρωμοσώματος και ιστολογικές αναλύσεις έγινε φανερή η επιβίωση των μυοβλαστών στην καρδιά. Το κλάσμα εξώθησης είχε αρκετά μεγαλύτερη διαφορά στις 6 εβδομάδες στα γκρουπ 3 και 4 σε σχέση με το γκρουπ 2. Ο LVEDD ως δείκτης αναδιαμόρφωσης της αριστερής κοιλίας, αυξήθηκε σε όλα τα γκρουπ αλλά είχε μικρότερη αύξηση στο 4^ο γκρουπ και μεγαλύτερη στο 1^ο, όπως και η κλασματική μείωση η οποία έπαιρνε τη μικρότερη τιμή της στο γκρουπ ένα και τη μεγαλύτερη στο τέταρτο. Στα γκρουπ 3 και 4 παρουσιάστηκε ακόμα μεγάλη πυκνότητα ώριμων αγγείων στις εβδομάδες 6 και 12, στο 4 μεγαλύτερη από το 3 και αυτό αρκετά μεγαλύτερη από το 2 και το 1, δείχνοντας την συνέργεια μεταξύ των VEGF και ang-1 στην τοπική επανααιμάτωση. Η τοπική αιμάτωση ήταν ιδιαίτερα πιο σημαντική στα όρια του εμφραγματικού ιστού από το κέντρο του και περιοχές μακριά από αυτόν.

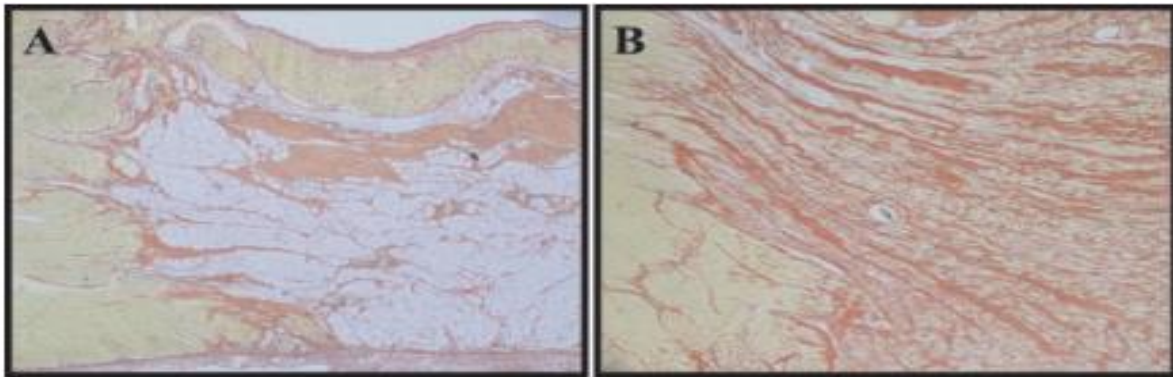


Εικόνα 12. Εκτίμηση της λειτουργίας καρδιάς χοίρου με ηχοκαρδιογράφημα 2-D (a) LVEF, (b) FS, (c) LVEDD. Γκρουπ 1=μόνο θεραπευτικό υλικό, Γκρουπ 2= θεραπευτικό υλικό και skms, Γκρουπ 3= θεραπευτικό υλικό, skms και ang-1, Γκρουπ 4= θεραπευτικό υλικό, skms, ang-1 και VEGF. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των δεδομένων (Ye L., et al, 2007).

Με παρόμοιες τεχνικές σε 18 γουρούνια τα οποία χωρίστηκαν σε 3 γκρουπ (Haider H., et al, 2004), το 1^ο μόνο με θεραπευτικό, το 2^ο με θεραπευτικό και μυοβλάστες και το 3^ο και με την προσθήκη VEGF και με την ανοσοκαταστολή μέσω κυκλοσπορίνης μελετήθηκε η καρδιά μεταξύ των βδομάδων 6 και 12. Τα κύτταρα επιβίωσαν και μάλιστα μέσω ανοσοφθορισμού δείχθηκε ότι εξέφρασαν μυοσίνη των καρδιομυικών κυττάρων. Η πυκνότητα των αγγείων ήταν αρκετά σημαντικότερη στο 3^ο γκρουπ, αν και το κλάσμα εξώθησης ήταν ελάχιστα μεγαλύτερο στο 3^ο από το 2^ο γκρουπ.

Τα ίδια περίπου αποτελέσματα φάνηκαν και σε μοντέλο προβάτου (Ghostine S., et al, 2002). Σε 16 υποκείμενα μετά από MI ακολούθησε η μεταφορά αυτόλογων σκελετικών μυοβλαστών και η καρδιακή λειτουργία εκτιμήθηκε στους μήνες 4 και 12 μέσω ηχοκαρδιογραφήματος. Στον 4^ο μήνα ο LVEDV ήταν αρκετά μειωμένος στα πρόβατα που έλαβαν τα κύτταρα σε σχέση με αυτά που πήραν μόνο θεραπευτικό

μέσο (33 ml), όπως και το κλάσμα εξώθησης το οποίο παρέμεινε σταθερό στα ζώα που πήραν τα κύτταρα ενώ μειώθηκε σε αυτά που δεν έγινε μεταμοσχευση skms. Στους δώδεκα μήνες τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια. Μυοκαρδιακές ίνες εντοπίστηκαν μέσω ανοσοϊστοχημείας στα ζώα που έλαβαν skms μέχρι και τον 12^ο μήνα με εντοπισμό της μυοσίνης των μυοκαρδιακών κυττάρων, καθώς και μείωση της πυκνότητας του κολλαγόνου στο γκρουπ των skms. Η εμφραγματική περιοχή παρουσίασε μείωση 6cm² στα ζώα που έλαβαν τους skms και παρατηρήθηκαν περιοχές μέσα στο έμφραγμα περιοχές με διαφοροποιημένα σκελετικά μυοκύτταρα σε παράλληλη διάταξη. Η περιοχή που εμφάνισε τα κύτταρα μέσα στον μυοκαρδιακό ιστό ήταν 57% αυτού και στα ζώα που έλαβαν κύτταρα παρατηρήθηκε μέχρι και 43% μείωση της κολλαγονικής περιοχής, ενώ στον 1 χρόνο ιστολογικές αναλύσεις επιβεβαίωσαν την παρουσία λειτουργικών μυοβλαστών και μυοσωλήνων μέσα στον εμφραγματικό ιστό. Στον 1 χρόνο η μυοσίνη που εκφραζόταν από το νέο ιστό ήταν κυρίως της αργής ισομορφής η οποία επήλθε πιθανότατα μετά από αλληλεπίδραση με τον περιβάλλοντα ιστό, ώστε να αντέξει ο μυς το φορτίο της δουλειάς, η απουσία κονεξίνης43 ήταν εμφανής, αλλά η λειτουργικότητα της συσκευής σύσπασης ήταν εμφανής (ανίχνευση Z δίσκων).



Εικόνα 13. (Α) MI σε ζώα control (Sirius red stain, x10), χαρακτηρίζεται από λιπώδη ιστό (άσπρο) και ινώδη (κόκκινο), ενώ το φυσιολογικό μυοκάρδιο σε κίτρινο. (Β) Περιοχή της μεταμόσχευσης στους 4 μήνες (Sirius red stain, x15) με τα μεταμοσχευμένα κύτταρα (ροζ) να αντικαθιστούν των ινώδη και το λιπώδη ιστό (Ghoshine S., et al, 2002).

Παρόλα αυτά η ικανότητα των σκελετικών μυοβλαστών να διαφοροποιηθούν επιτυχώς σε σειρές καρδιομυικών κυττάρων αμφισβητήθηκε έπειτα από μελέτες που έδειξαν ότι δεν μπορούσε να επιτευχθεί ηλεκτρομηχανική αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών και των καρδιομυοκυττάρων του δέκτη (Murry E., et al, 1996, Reinecke H., et al, 2000).

Σε ενήλικα ποντίκια τα οποία τραυματίστηκαν καρδιακά με τεχνητό τρόπο μεταφέρθηκαν άμεσα σκελετικοί μυοβλάστες νεογέννητων ποντικών (Murry E., et al, 1996). Την πρώτη μέρα στα ποντίκια δε βρέθηκε βαριά αλυσίδα μυοσύνης (MHC), ενώ στις τρεις μέρες βρέθηκε αλλά υπήρχε τόσο εμβρυονική όσο και ενήλικη. Στις 2 εβδομάδες η ηλεκτρονική μικροσκοπία παρουσίασε κύτταρα δορυφόρους ενώ στις 7 εβδομάδες τα μοσχεύματα άρχισα να εκφράζουν β-MHC ένα προάγγελο της ενήλικη μυοσίνης, ετού μέχρι τους 3 μήνες είχαμε ταυτόχρονη έκφραση εμβρυονικής, β και ενήλικης μυοσίνης. Τα ίδια αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και με την μεταμόσχευση έπειτα από μια βδομάδα από τον τραυματισμό. Τα μοσχεύματα ουδέποτε εξέφρασαν την ειδική μυοσίνη των καρδιομυοκυττάρων, την α-μυοσίνη. Στην

περίπτωση που η μεταφορά του μοσχεύματος έγινε στις 2 εβδομάδες, τα μοσχεύματα εμφάνισαν συστολή *ex vivo* και η συστολή μεγάλης συχνότητας οδήγησε σε τέτανο. Επομένως οι *skms* μπορούν να εγκαθιδρύνουν νέο μυϊκό ιστό όταν μεταμοσχευθούν σε καρδιά και ο οποίος μπορεί να ερεθιστεί ηλεκτρικά και να συσταλθεί, αλλά με αρρυθμίες λόγω της παρουσίας τόσο εμβρυονικής (αργής) όσο και ενήλικης (γρήγορης) μυοσίνης.

Σκελετικοί μυοβλάστες που έφεραν το γονίδιο φθορίζουσας ουσίας (EGFP) μεταμοσχεύθηκαν σε ενήλικα ποντίκια και μετρήθηκε η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου, ως δείκτης σύσπασης (Rubart M., et al, 2004). Παρόλο που οι περισσότεροι μυοβλάστες του δότη ήταν λειτουργικά απομονωμένοι από το μυοκάρδιο, υπήρχαν κύτταρα που εμφάνισαν σύγχρονες ανόδους και καθόδους της τιμής του ασβεστίου με καρδιομυοκύτταρα του δέκτη που βρισκόταν σε άμεση συνάφεια. Σε άλλη έρευνα καρδιομυοκύτταρα αρουραίου που εξέφραζαν το γονίδιο πράσινης φθορίζουσας ουσίας GFP, καθώς και το γονίδιο β γαλακτοζιδάσης καλλιεργήθηκαν με σκελετικούς μυοβλάστες και στις 3 μέρες βρέθηκαν *skms* σε μικρό ποσοστό να εκφράζουν και τα δύο γονίδια πράγμα που σημαίνει ότι συγχωνεύτηκαν με τα καρδιομυοκύτταρα σε πολύ μικρή συχνότητα. Το αποτέλεσμα εξακριβώθηκε μεταμοσχεύοντας σε αρουραίο *skms* που εξέφραζαν το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης και στις 2 εβδομάδες κύτταρα στη διεπαφή μοσχεύματος-δέκτη εξέφραζαν β-γαλακτοζιδάση και ελαφριά αλυσίδα καρδιακής μυοσίνης. Το αποτέλεσμα ελέγχθηκε και με σύστημα αναφοράς Cre/Lox μεταξύ καρδιομυοκυττάρων με υποκινητή βαριάς αλυσίδας της α-μυοσίνης και μυοβλάστες με γονίδιο β-γαλακτοζιδάσης. Τέλος, μετά από μεταμόσχευση σε καρδιές αρουραίων α-MHC-Cre⁺ ή α-MHC-Cre⁻, τα κύτταρα έδειξαν έκφραση του γονιδίου της β-γαλακτοζιδάσης μόνο στην πρώτη κατηγορία καρδιών (Reinecke H., et al, 2004).

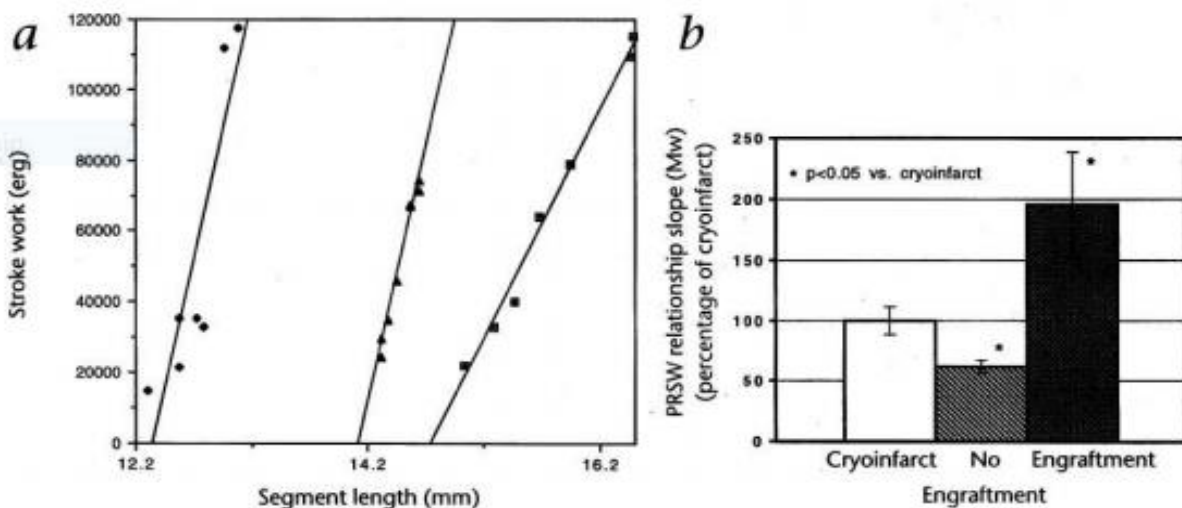
Σε άλλη έρευνα αυτή δείχθηκε ότι μη διαφοροποιημένοι σκελετικοί μυοβλάστες που εκφράζουν N-καδερίνη και κονεξίνη43 (κυρίαρχες πρωτεΐνες έκφυσης των καρδιομυοκυττάρων καθώς και πρωτεΐνες των χασμοσυνδέσμων) μειορρυθμίζονται εμφανώς όταν μεταφερθούν στην καρδιά καθώς και όταν διαφοροποιηθούν σε μυϊκές ίνες (Reinecke H., et al, 2000). Επομένως δε μπορεί να συμβεί ηλεκτρομηχανική σύμπτωση των μυοβλαστών και των καρδιομυοκυττάρων σε μεταμόσχευση *in vivo*. Παρόλα αυτά όταν διενεργήθηκε συγκαλλιέργεια ενήλικων ή νεογνικών καρδιομυοκυττάρων με σκελετικούς μυοβλάστες 10% των μυϊκών ινών είχε σύγχρονο κτύπο με τα καρδιομυοκύτταρα. Με αναστολείς των χασμοσυνδέσμων βρέθηκε ότι τα καρδιομυοκύτταρα συνέχισαν να χτυπούν φυσιολογικά, ενώ οι μυϊκές ίνες όχι. Η έκφραση των N-καδερίνη και κονεξίνη43 βρέθηκε ότι συνέχιζε να υπάρχει στους χασμοσυνδέσμους *in vitro* μέσω μικροσκοπίας. Επομένως τα καρδιομυοκύτταρα μπορούν να αναπτύξουν ηλεκτρομηχανικές συνδέσεις με σκελετικούς μυοβλάστες και να επάγουν την σύγχρονη ηλεκτρική τους διέγερση μέσω των χασμοσυνδέσμων, με τα καρδιομυοκύτταρα να είναι οι βηματοδότες.

Είναι γνωστό ότι ο VEGF είναι υπεύθυνος για την αγγειοδιαστολή των αγγείων και την αποτροπή της ισχαιμίας μέσω παραγωγής και νιτρικού οξειδίου (NO), πράγμα που φαίνεται να είναι χρήσιμο για την αποτροπή των αρνητικών επιδράσεων ενός MI με την ταυτόχρονη δημιουργία αγγείων σε τοπικό επίπεδο. Επαγωγή μηχανικού στρες σε σκελετικούς μυοβλάστες ποντικού σε καλλιέργεια οδήγησε μεταξύ άλλων στην απελευθέρωση ηπατικού παράγοντα αύξησης (HGF), ο οποίος οδηγεί σε επιτάχυνση της εισόδου των κυττάρων στον κυτταρικό κύκλο. Ταυτόχρονα επήλθε ενεργοποίηση της συνθάσης του NO, που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το μηχανικό στρες στους σκελετικούς μυοβλάστες μπορεί να οδηγήσει μέσω ενός παρακρινούς μονοπατιού στην σύνθεση NO, την απελευθέρωση HGF και τη ταχύτατη είσοδο κυττάρων του ενδογενούς καρδιακού πληθυσμού σε κυτταρικό κύκλο (Tatsumi

R., et al, 2002). Μια άλλη έρευνα έδειξε ότι οι skms προάγουν την χημειοταξία των ουδετερόφιλων μέσω ιντερλευκίνης 8 και του παράγοντα GM-CSF έπειτα από έντονο στρες (Peterson J., et al 2009). Επί προσθέτω, βρέθηκαν παρακρινείς μηχανισμοί που οδηγούν στην διατήρηση της αρχιτεκτονικής της εξωκυττάριας μήτρας, την αγγειογένεση στο εμφραγματικό μυοκάρδιο, την λειτουργική βελτίωση της καρδιάς και την μείωση της προοδευτικής αύξησης του τελοδιαστολικού όγκου (Rouzet B., et al, 2001).

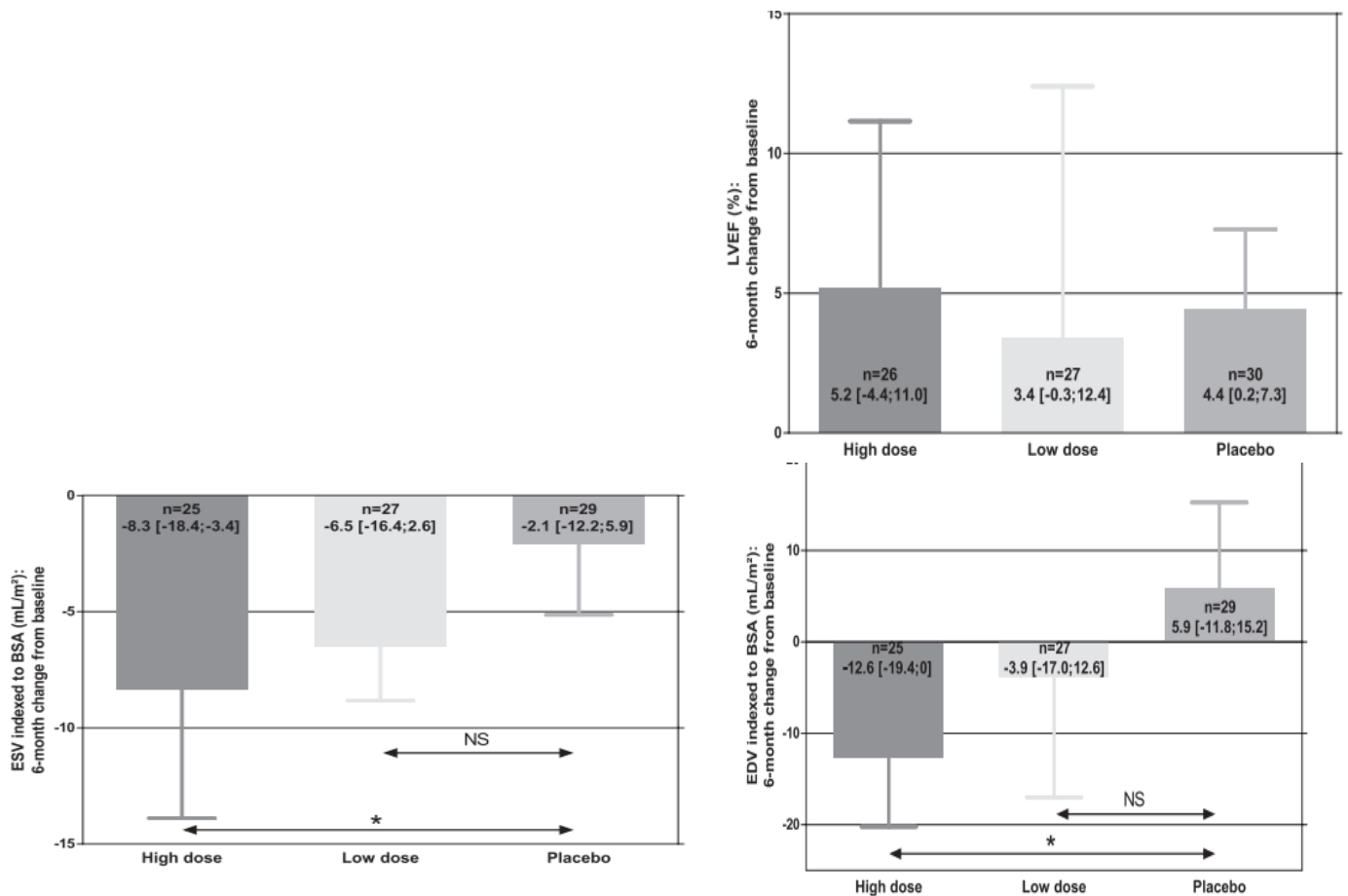
Δεδομένου του όγκου αγγειογενών και αντιαποπτωτικών παραγόντων που εκκρίνονται από τα κύτταρα του μυελού των οστών, θα ήταν φρόνιμο να υποθέσουμε ότι οι σκελετικοί μυοβλάστες επηρεάζουν το περιβάλλον της καρδιάς μέσω κυτταροκινών και παραγόντων αύξησης οι οποίοι αλλάζουν το περιβάλλον της εξωκυττάριας μήτρας, ενεργοποιούν τα ενδογενή καρδιομυοκύτταρα και αυξάνουν την τοπική αγγειογένεση (Kinnaird T., et al, 2004).

Σε 12 κουνέλια που υποβλήθηκαν σε κρουστρουματισμό για την εξομείωση των συνθηκών του MI, μεταφέρθηκαν αυτόλογοι skms χωρίς θνησιμότητα (Taylor A., et al, 1998). Σε 3 εβδομάδες μετά την έγχυση, παρατηρήθηκαν δομές που ομοιάζαν με σκελετικούς μυοσωλήνες περιέβαλλαν το έμφραγμα, οι οποίοι εξέφραζαν μυογενίνη (δείχνοντας την προέλευσή τους από σκελετικούς μύες), σε αντίθεση με τα περιβάλλοντα καρδιομυοκύτταρα. Η απόπτωση ενώ ήταν εμφανής στο περιβάλλον και στον ουλώδη ιστό, στο μόσχευμα αναστάληκε σε μεγάλο βαθμό. Ο καρδιακός ρυθμός και η LVESP δεν άλλαξαν. Από τα δώδεκα κουνέλια, μόνο στα 7 έγινε δυνατή η συγχώνευση των μοσχευμάτων και σε 5 από αυτά βελτιώθηκε η καρδιακή λειτουργία. Τα μεταμοσχευμένα κύτταρα δεν εμφάνιζαν πολυπήρηνους μυοσωλήνες αλλά διαφοροποιήθηκαν σε μονοπύρηνια κύτταρα που έμοιαζαν αρκετά με καρδιομυοκύτταρα και ενωνόταν με ενδιάμεσους δίσκους αλλά σε πολλά από αυτά έλειπαν χαρακτηριστικές δομές όπως οι Α-ζώνες και οι Μ-ζώνες (που μπορεί να σημαίνει απώλεια προσφοράς των κυττάρων στην συσπαστική λειτουργία) και εμφάνιζαν δομές γύρω από των πυρήνα όπως λυσοσώματα και άλλους κόκκους που δεν είναι καθόλου χαρακτηριστικά των ενδογενών καρδιομυοκυττάρων, αλλά σημαίνουν ότι μπορεί τα μεταμοσχευμένα κύτταρα να συγχωνευτούν και να επαναφέρουν κάποια καρδιομυοκύτταρα. Η ομάδα κατέληξε ότι οι skms δύναται να συνεισφέρουν θετικά στη συστολική λειτουργία.



Εικόνα 14. Αποτελέσματα κρουτραυματισμού και επακόλουθης μεταμόσχευσης skms σε καρδιά κουνελιού. α) τοπική συστολική λειτουργία. Το φορτίο που επιστρατεύεται πριν τη συστολή (PRSW) καθορίζεται από τη θέση μεταξύ της τμηματικής συστολικής λειτουργίας και του μήκους των τμημάτων μετά τη διαστολή για μια καρδιά σε control ζώα πριν τον κρουτραυματισμό (αριστερά) μια καρδιά μετά τον τραυματισμό (μέση) και τρεις εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση των skms (δεξιά). β) Μέση τιμή των δεδομένων που αντιπροσωπεύουν την αύξηση στο PRSW 3 εβδομάδες μετά τον κρουτραυματισμό σε ζώα control (άσπρο, σε σχέση) με αυτά στα οποία η μεταμόσχευση απέτυχε (γκρι) και με αυτά στα οποία η μεταμόσχευση ήταν επιτυχής (μαύρο) (Taylor A., et al, 1998).

97 ασθενείς με δυσλειτουργία αριστερής κοιλίας (EF < 35%) και MI υποβλήθηκαν σε μεταμόσχευση αυτόλογων skms (χωρίστηκαν σε 3 γκρουπ 1:1:1, 400 εκατομμύρια κύτταρα 2, 800 εκατομμύρια 3, και placebo 1) μέσω bypass στεφανιαίας αρτηρίας (CABG-coronary artery bypass grafting) και μελετήθηκαν μετά από 6 μήνες όσον αφορά την λειτουργία της αριστερής κοιλίας με ηχοκαρδιογράφημα (MAGIC TRIAL) (Menasche P., et al, 2008). Τα κύτταρα επέζησαν σε μεγάλο βαθμό και ήταν καθαρά, αλλά στους 6 μήνες το κλάσμα εξώθησης δεν μεταβλήθηκε στα 3 γκρουπ, καθώς παρουσίασε απόλυτη αύξηση 4,4%, 3,4% και 5,2% στα γκρουπ 1,2,3 αντίστοιχα, όπως και η κινητικότητα του μυοκαρδιακού τοιχώματος που συνολικά στην καρδιά παρουσίασε διαφορές 0,29, 0,22 και 0,38 μείωση από την αρχή του πειράματος στα γκρουπ 1,2,3 αντίστοιχα. Παρόλα αυτά υπήρξε πτώση στην τιμή του LVEDV (τριπλάσια στο γκρουπ 3 σε σχέση με το γκρουπ 2, ενώ αυξήθηκε στο 1 και του LVESV (μειώθηκε 2,2 ml/m παραπάνω στο γκρουπ της μεγαλύτερης δόσης και 4,4 ml/m στο γκρουπ της μικρής δόσης σε σχέση με το placebo), ενώ συνολικά η ποιότητα της ζωής των ασθενών μεταξύ των γκρουπ στους 6 μήνες δε διέφερε σημαντικά. Δεν παρατηρήθηκαν θάνατοι που οφειλόταν στη θεραπεία και οι αρρυθμίες που προέκυψαν δεν ήταν θανατηφόρες και δεν εξαρτώνταν από τον αριθμό των μεταμοσχευμένων μυοβλαστών. Επιπλέον οι αρρυθμίες δεν διέφεραν πολύ από το placebo group και μπορεί να οφειλόταν στον τρόπο μεταφοράς των κυττάρων ενδομυϊκά, ο οποίος δημιούργησε απομονωμένες μεταξύ τους νησίδες κυττάρων με διαφορετικό ηλεκτρικό δυναμικό. Η ομάδα απέδωσε την αναποτελεσματικότητα της θεραπείας όσον αφορά σημαντική αύξηση της λειτουργικότητας της καρδιάς σε απόπτωση και παρακείμενο θάνατο της πλειονότητας των κυττάρων λόγω ισχαιμίας, δυσκολίας μεταφοράς κυττάρων ενδομυϊκά μέσω ενέσεων καθώς και σε άλλες τεχνικές δυσκολίες, ενώ οι δοσοεξαρτώμενες βελτιώσεις των διαστάσεων τις καρδιάς αποδώθηκαν κυρίως σε παρακρινή δραστηριότητα των skms.

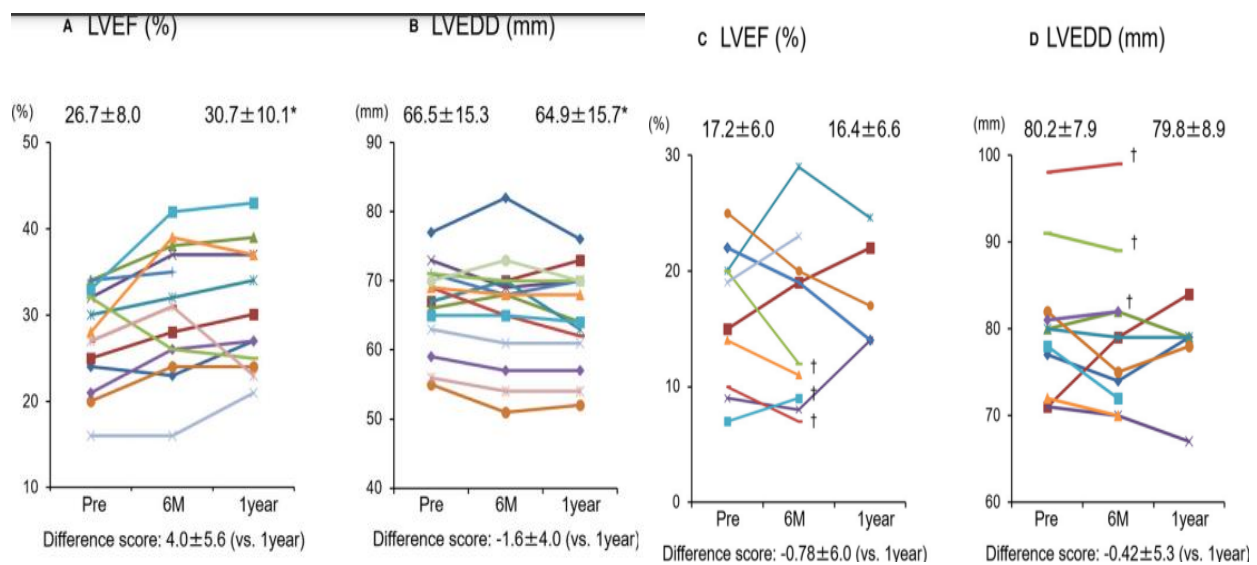


Εικόνα 15. Αλλαγές των LVEF, EDV και ESV στους 6 μήνες σε σχέση με την αρχή του πειράματος. Το BSA είναι η επιφάνεια του σώματος. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των δεδομένων (Menasche P., et al, 2008).

Παρόμοια αποτελέσματα επαναλήφθηκαν (Ponsic J., et al, 2011) με ενδομυϊκή μεταφορά αυτόλογων μυοβλαστών σε 23 ασθενείς (8-placebo, 7-χαμηλή δόση, 8-υψηλή δόση) με EF <35%. Η διαφορά στη συσταλτικότητα του καρδιακού τοιχώματος ήταν σημαντική και αυξανόταν με την αύξηση της δόσης των skms, ενώ δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές στο κλάσμα εξώθησης και τις διαστάσεις της αριστερής κοιλίας όπως βρέθηκε από ηχοκαρδιογράφημα στους 6 μήνες. Ακόμα τα περιστατικά κοιλιακής ταχυκαρδίας ήταν περισσότερα στους ασθενείς που έλαβαν μυοβλάστες (1 στο placebo 3 στη χαμηλή δόση και 4 στην υψηλή δόση). Στο τεστ του 6λεπτου περπατήματος οι placebo ασθενείς παρέμειναν σταθεροί, ενώ οι ασθενείς που πήραν μικρή δόση βελτιώθηκαν κατά 95 m και αυτοί που πήραν υψηλή δόση κατά 85 m.

Το γεγονός αυτό υποστηρίχθηκε (Miyagawa S., et al, 2017), σε μεταμόσχευση σε 15 ασθενείς με ισχαιμική και 12 ασθενείς με διατακτική καρδιομυοπάθεια φύλλα αυτόλογων $3-9 \times 10^8$ skms (cell sheets)

μέσω θωρακοτομής πάνω στην αριστερή κοιλία. HGF, VEGF και άλλες κυτοκίνες βρέθηκαν στο υπερκείμενο υγρό των μυοβλαστών. 1 μήνα μετά την μεταμόσχευση δε παρατηρήθηκαν παρακείμενες ή θανάσιμες αρρυθμίες. Όσον αφορά την καρδιακή λειτουργία, η LVEDD μειώθηκε 1 χρόνο μετά τη μεταμόσχευση κατά 2% στα υποκείμενα με καρδιομυοπάθεια ισχαιμικού τύπου αλλά δεν παρουσίασε διαφορές στα υπόλοιπα υποκείμενα. Το ίδιο ίσχυε και για το κλάσμα εξώθησης που αυξήθηκε κατά 4% στους ισχαιμικούς ασθενείς αλλά παρέμεινε σταθερό στους άλλους. Τέλος όσον αφορά τα εξάλεπτα τεστ περπατήματος (six- minute walk tests), αυξήθηκαν κατά 70 μέτρα στους 6 μήνες και 80 μέτρα στον 1 χρόνο στους ισχαιμικούς ασθενείς, αλλά παρουσίασαν μια μικρή μόνο αύξηση των 20 μέτρων στους υπόλοιπους ασθενείς, εκ των οποίων 3 ανέπτυξαν και καρδιακή ανεπάρκεια μέσα στο διάστημα ενός χρόνου. Το τοιχωματικό στρες μειώθηκε με τη μεταμόσχευση, σημαντικό βήμα για την αναστολή της ίνωσης στην αριστερή κοιλία. Ακόμα η ομάδα αυτή θίγει την εγκυρότητα του LVEF ως δείκτη βελτίωσης, καθώς εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το προφόρτιο και το μεταφορτίο.



Εικόνα 16. Ηχοκαρδιογραφική ανάλυση της καρδιακής λειτουργίας. Τα A και B υποδεικνύουν τις αλλαγές σε ασθενείς με ισχαιμική αιτιολογία, ενώ τα C και D τις αντίστοιχες αλλαγές σε ασθενείς με μη ισχαιμική αιτιολογία. Κάθε χρώμα αντιστοιχεί και σε ένα ασθενή (Miyagawa S., et al, 2017).

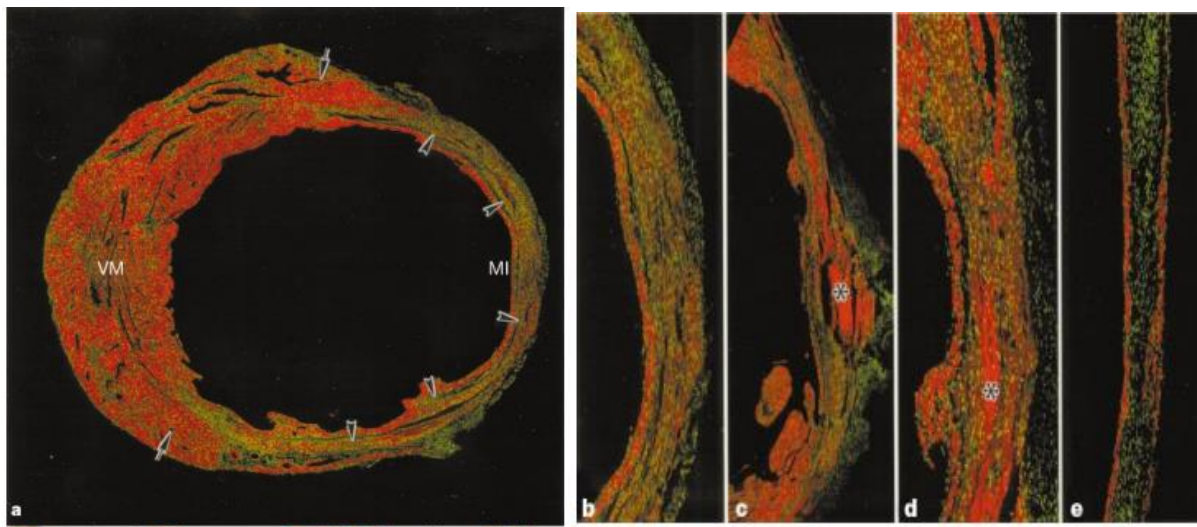
Συνοπτικά όσον αφορά τους σκελετικούς μυοβλάστες (skms), μπορούν να συνεισφέρουν θετικά στην λειτουργικότητα της καρδιάς και την αναδόμησή της. Οι μελέτες δείχνουν ότι μέρος τους μετά από μεταμόσχευση συγχωνεύεται στο καρδιομυικό περιβάλλον και παρόλο που δεν έχουν ικανότητα δια-διαφοροποίησης σε καρδιομυκύτταρα, μέσω παρακρινούς φαινομένου στο οποίο εμπλέκονται μόρια όπως τα VEGF, SDF-1 και HGF (τα οποία εκκρίνονται από τα skms, ίσως μετά από μηχανικό στρες) μπορούν να ενεργοποιήσουν τον ενδογενή βλαστικό καρδιομυικό πληθυσμό για την αναγέννηση της καρδιάς, εξ ου και μακροχρόνια δεν ανιχνεύονται στο περιβάλλον της καρδιάς. Σε περιπτώσεις ζώων τουλάχιστον, έχειδειχθεί ότι βελτιώνουν τα LVEDV, LVESV, LVEF και FS ή έστω αναστέλουν την επιδείνωσή τους. Παρόλο που κατά την ωρίμανσή τους στο περιβάλλον της καρδιάς χάνουν την έκφραση των πρωτεϊνών των χασμοσυνδέσμων, δύναται να δεχθούν ερεθίσματα από γειτονικά καρδιομυοκύτταρα που δρουν σα βηματοδότες για την σύγχρονη σύσπασή τους (βελτίωση της συστολικής λειτουργίας της καρδιάς), ενώ σταδιακά υφίστανται ωρίμανση χάνοντας την εμβρυική μυοσίνη και αποκτώντας ενήλικη, που τα βοηθάει να προσαρμοστούν στα φορτία αίματος που περνούν από την καρδιά. Ένα σημαντικό πρόβλημα στη χρήση τους είναι οι αρρυθμίες που προκαλούν

κυρίως σε μεγαλύτερες καρδιές, το οποίο αν ξεπεραστεί, και εν γνώσει της δοσοεξαρτώμενης επίδρασής τους στη βελτίωση, τουλάχιστον ισχαιμικών καρδιομυοπαθειών, μπορεί στο μέλλον να αποτελέσουν συστατικό συνδυαστικών θεραπειών για το καρδιομυϊκό περιβάλλον.

2.2 ΜΟΝΟΠΥΡΗΝΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΥΕΛΟΥ ΤΩΝ ΟΣΤΩΝ (BMNCS)

Τα κύτταρα με προέλευση τον μυελό των οστών ήταν η δεύτερη κατηγορία που χρησιμοποιήθηκε για κλινικές δοκιμές. Αρχικά προτιμήθηκαν για πρακτικούς λόγους όπως η ευρεία διαθεσιμότητά τους, η απουσία ανάγκης για ιδιαίτερη επεξεργασία προκειμένου να χρησιμοποιηθούν και το χαμηλό κόστος χρήσης τους (Menasce P., et al, 2018). Ο μυελός των οστών συνιστά ένα εξαιρετικά ετερογενές περιβάλλον κυττάρων με διαφορετικούς φαινότυπους και λειτουργίες, τα αιμοποιητικά και τα μη-αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα. Τα μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών (BMNCs-bone marrow mononuclear cells). Τα μονοπύρρηνα κύτταρα του μυελού των οστών είναι μια κατηγορία που αποτελείται από ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα (EPCs), μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα (MSCs), αιμοποιητικά βλαστικά κύτταρα (HSCs) και ορισμένες άλλες ομάδες σε διαφορετικά στάδια ωρίμανσης (Sanganalmath K., et al, 2013). Τα αδιαφοροποίητα μονοπύρρηνα ήταν τα πρώτα που χρησιμοποιήθηκαν σε δοκιμές μέσω αναρρόφησης του μυελού των οστών.

Πρώιμες μελέτες σε ζώα είχαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Χρησιμοποιήθηκαν διαγονιδιακά $Lin^{-}c-kit^{+}$ κύτταρα που εξέφραζαν την φθορίζουσα ουσία EGFP (enhanced green fluorescent protein-EGFP) σε ποντίκια που προέρχονται από MI με μεταμόσχευση στην αριστερή κοιλία και 9 μέρες μετά την μεταμόσχευση παρατήρησαν ότι το 68% του ουλώδους ιστού είχε αντικατασταθεί από πολλαπλασιαζόμενα μυοκύτταρα και αγγειακές δομές, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι υπήρξε de novo δημιουργία μυοκαρδίου και βελτίωση της στεφανιαίας νόσου (Orlic, D. et al 2001). Η αποκατάσταση του μυοκαρδίου επιτεύχθηκε στο 40% των ποντικών και οι αποτυχίες αποδώθηκαν στη δυσκολία της μεθόδου είτε σε ανοσολογική απόκριση. Αντίστοιχα νέα μυοκύτταρα δεν εντοπίστηκαν σε ποντίκια που έλαβαν $Lin^{-}c-kit^{-}$ κύτταρα. Στις καρδιές που υφίσταντο αναγέννηση βρέθηκαν μέσω της EGFP πρωτεΐνης και του ψ χρωμοσώματος και νέες ενδοθηλιακές λείες μυϊκές δομές. Για να επιβεβαιώσουν το γεγονός ότι μεταμόσχευση ήταν υπεύθυνη για τα νέα μυϊκά κύτταρα χρησιμοποίησαν τον ενισχυτικό παράγοντα των μυοκυττάρων (MEF2) τον ειδικό μεταγραφικό παράγοντα της καρδιάς GATA-4 και τους πρώιμους δείκτες της ανάπτυξης καρδιομυοκυττάρων Csx/Nkx2.5. Στην καρδιά ο GATA-4 επιστρατεύει τον MEF2 για να ενεργοποιηθούν αρκετά καρδιακά γονίδια μεταξύ των οποίων και η τροπονίνη T, η τροπονίνη I, η ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης, η βαριά αλυσίδα της μυοσίνης α , ο νατριουρητικός κολπικός παράγων και η α -ακτίνη (Durocher D., et al, 1997). Οι πρώτοι δύο παράγοντες βρέθηκαν σε όλα τα κύτταρα, ενώ οι Csx/Nkx2.5 μόνο στο 40% των κυττάρων. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από την κονεξίνη43 σαν δείκτης των χασμοσυνδέσμων που επάγει τον ηλεκτρομηχανικό συγχρονισμό των κυττάρων. Η LVEDP ήταν 36% μειωμένη σε ποντίκια με $Lin^{-}c-kit^{+}$ κύτταρα σε σχέση με $Lin^{-}c-kit^{-}$ ποντίκια και control.

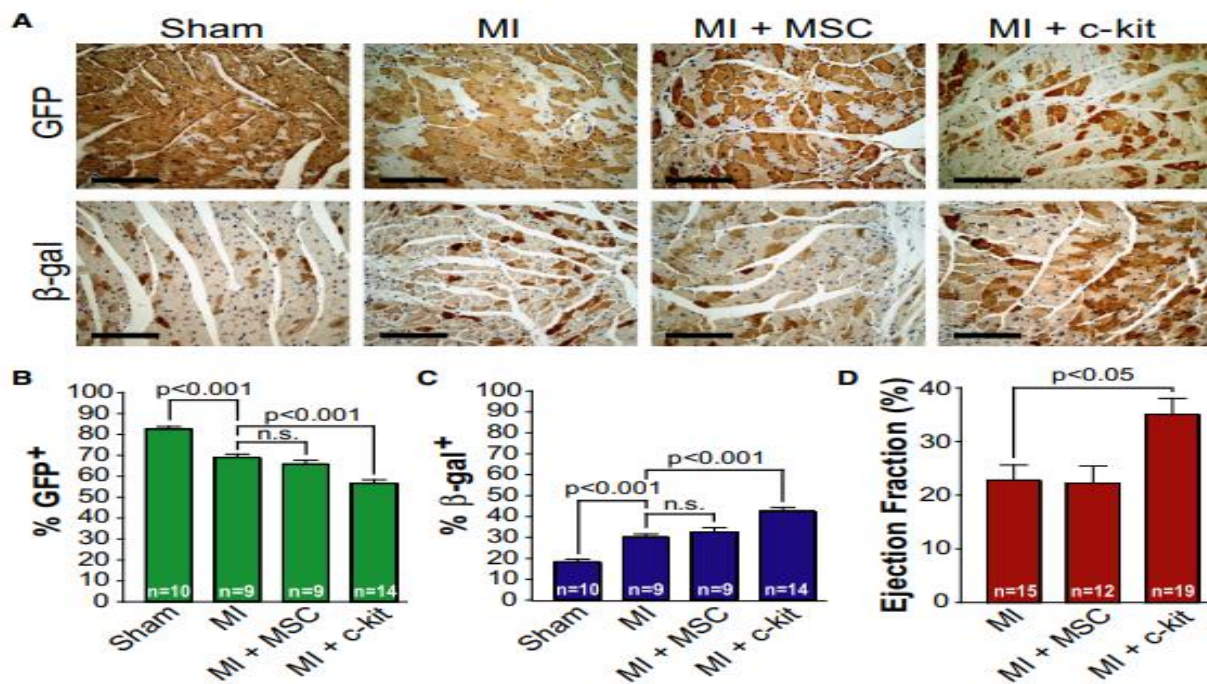


Εικόνα 17. Κύτταρα του μυελού των οστών και αναγέννηση του μυοκαρδίου. *a*, MI στο οποίο μεταμοσχεύθηκαν $Lin^- c-kit^{POS}$ κύτταρα μυελού των οστών (βέλη). Οι κεφαλές των βελών υποδεικνύουν τα τμήματα στα οποία έχουμε αναγέννηση του μυοκαρδίου. VM= ζωντανό μυοκάρδιο. *b*, Το ίδιο MI σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. *c, d*, Μικρές και μεγάλες μεγεθύνσεις MI μυοκαρδίου στο οποίο μεταμοσχεύθηκαν $Lin^- c-kit^{POS}$ κύτταρα. *e*, MI στο οποία έχουν μεταμοσχευθεί $Lin^- c-kit^{NEG}$ κύτταρα, η αναγέννηση είναι πολύ μικρότερη. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν το νεκρωμένο μυοκάρδιο. Το κόκκινο υποδεικνύει την καρδιακή μυοσίνη. Οι αρχικές μεγεθύνσεις: *x12* (*a*)*x25* (*c*)*x50* (*b, d, e*) (Orlic, D. et al 2001).

$Lin^- c-kit^+$ κύτταρα τα οποία εξέφραζαν γονίδιο β-γαλακτοζιδάση στον ενεργοποιητή της α-μυοσίνης, χαρακτηριστικής των καρδιομυικών κυττάρων, μεταφέρθηκαν στην περιοχή του εμφραγματικού ιστού σε 42 ποντίκια αφού εμπλουτίστηκαν με άλλα αιμοποιητικά κύτταρα 5 ώρες μετά την στεφανιαία έμφραξη. Δεν παρατηρήθηκε έκφραση της α μυοσίνης σε κανένα από τα ποντίκια καθώς κανένας πυρήνας δεν είχε μπλε χρωστική στα ποντίκια που έφεραν τα κύτταρα (Murry E., et al, 2004). Δεν υπήρξε άρα διαφοροποίηση σε καρδιομυοκύτταρα. Το ίδιο αποτέλεσμα είχαν και διαγονιδιακά $Lin^- c-kit^+ Sca-1^+$ κύτταρα εκφράζοντας το γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης έπειτα από μεταφορά σε φυσιολογικά ποντίκια, καμία ανίχνευση μπλε πυρήνων. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν, αυτή τη φορά με EGFP πρωτεΐνη σε $Lin^- c-kit^+$ κύτταρα, έτσι ώστε να αποκλειστεί το ενδεχόμενο η μπλε φθορίζουσα ουσία να επιδέχεται τροποποιήσεις (υπερβολική μεθυλίωση) και άρα σίγαση καθώς περνάει μέσα από κύτταρα του μυελού των οστών, και τα αποτελέσματα ήταν τα ίδια, κανένας εντοπισμός πράσινης φθορίζουσας ουσίας έπειτα από μεταφορά στο όριο της εμφραγματικής περιοχής σε ποντίκια. Άρα δυο γονίδια απέδειξαν ότι τα $Lin^- c-kit^+$ κύτταρα δεν διαφοροποιούνται σε καρδιακά σε ποντίκια-δέκτες μετά την μεταμόσχευση στο εμφραγματικό μυοκάρδιο. Τα αποτελέσματα αυτά συγκρινόμενα με αυτά των Orlic, D. et al 2001 έρχονται σε αντιπαράθεση και αυτό εξηγήθηκε πιθανότατα ως μικροδιαφορές στο πρωτόκολλο και στις τεχνικές προετοιμασίας των κυττάρων.

Σε διαγονιδιακά ποντίκια που εξέφραζαν γονίδιο για φθορίζουσα GFP πρωτεΐνη έγινε μεταφορά $Lin^- c-kit^+$ κυττάρων μετά την επαγωγή MI και διενεργήθηκαν ιστολογικές μελέτες για την GFP μετά από 8 εβδομάδες (Loffredo S., et al, 2011). Ταυτόχρονα μελετήθηκαν καρδιομυοκύτταρα που εξέφραζαν β-γαλακτοζιδάση, καθώς μια διαφοροποίηση των BMNCs σε καρδιομυοκύτταρα με επακόλουθη μείωση της GFP δε θα προκαλούσε και ταυτόχρονη αύξηση της β-γαλακτοζιδάσης. Το ποσοστό των ενδογενών κυττάρων που εξέφραζαν την GFP είχε μειωθεί αρκετά και επιπλέον μείωση παρατηρήθηκε στα ποντίκια που είχαν λάβει $Lin^- c-kit^+$ κύτταρα στην εμφραγματική περιοχή μόνο σε σχέση με το control,

καθώς και μια αντισταθμιστική αύξηση των κυττάρων που εξέφραζαν β-γαλακτοζιδάση, γεγονός το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι υπήρξε ενεργοποίηση των ενδογενών προγονικών καρδιακών κυττάρων και όχι δια-διαφοροποίηση των μεταμοσχευμένων κυττάρων του μυελού των οστών. Σε ανάλυση των ποντικών μετά από δυο εβδομάδες από τη μεταμόσχευση των κυττάρων παρατηρήθηκε και πάλι μια τάση προς μείωση των ενδογενών κυττάρων των ποντικών που εξέφραζαν GFP αλλά αυτή τη φορά δεν υπήρχε επιπλέον μείωση στα ποντίκια που είχαν λάβει $Lin^{-}c-kit^{+}$ που δείχνει ότι η παρακρινής δράση των κυττάρων δεν ξεκινά αμέσως μετά το MI. Σε δεύτερο παρόμοιο πείραμα με ίδια κύτταρα παρατηρήθηκε αύξηση των καρδιομυοκυττάρων που εξέφραζαν καρδιακή τροπονίνη στα ποντίκια, επομένως ενεργοποίηση των ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων. Η ομάδα επίσης απέκλεισε την πιθανότητα τα καινούργια κύτταρα να προέρχονται από δια-διαφοροποίηση των μεταμοσχευμένων κυττάρων καθώς και από συγχώνευση των $Lin^{-}c-kit^{+}$ κυττάρων και ενδογενών κυττάρων (μέσω ιστολογικής ανάλυσης των ψ χρωμωσωμάτων). Επίσης βρέθηκε ότι στην περιοχή του εμφράγματος υπήρξε αυξημένη έκφραση των παραγόντων $nkx2.5$ και $GATA4$ καθώς και κυττάρων που εξέφραζαν και τους δύο αυτούς παράγοντες αλλά όχι των παραγόντων $TBX5-$ ή $Mef2c$, και μέσω FISH ανάλυσης των ψ χρωμωσωμάτων οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ενεργοποίηση των ενδογενών καρδιακών κυττάρων 1 εβδομάδα μετά το MI. Σε άλλη μελέτη που απλά αντικατέστησε τα $Lin^{-}c-kit^{+}$ κύτταρα με MSCs δεν παρατηρήθηκαν οι αντίστοιχες μειώσεις στα GFP κύτταρα ούτε και η αύξηση στα κύτταρα που εξέφραζαν β-γαλακτοζιδάση, καθώς και δεν υπήρχε η αύξηση του κλάσματος εξώθησης που παρατηρήθηκε το πρώτο πείραμα της ομάδας, άρα συμπερασματικά τα μεσεγχυματικά

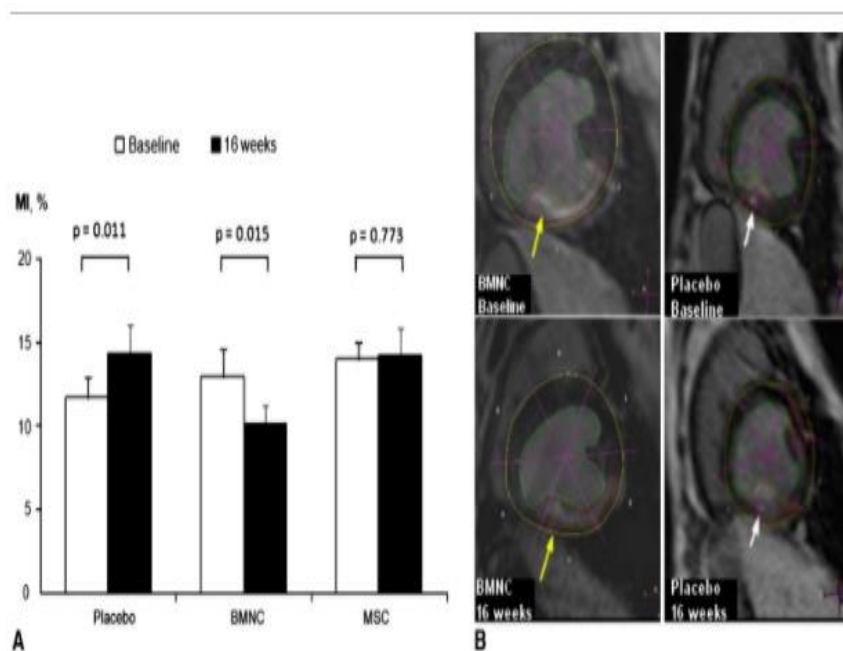


δεν ενεργοποιούν τα προγονικά καρδιακά κύτταρα όπως τα $Lin^{-}c-kit^{+}$ κύτταρα.

Εικόνα 18. Ενδομυϊκή μεταμόσχευση $Lin^{-}c-kit^{POS}$ του μυελού των οστών αλλά όχι MSC κυττάρων ενεργοποιούν την ενδογενή αναγέννηση των καρδιομυοκυττάρων (A). Μετά από 8 εβδομάδες η καρδιά βάφτηκε (καφέ) για την GFP (πάνω) ή τη β-γαλακτοζιδάση (κάτω), στην περιοχή του ορίου του MI. Το ποσοστό των κυττάρων που μείωσαν τα GFP κύτταρα ήταν πολύ μεγαλύτερο στα $Lin^{-}c-kit^{POS}$ κύτταρα, και συνοδεύτηκαν από τις αντίστοιχες

αυξήσεις στα κύτταρα της β-γαλακτοζιδάσης. Οι μπαρες αναλογούν σε 100 mm. (B and C) γράφημα που αντιπροσωπεύει το ποσοστό των GFP⁺ (B) και b-gal⁺ (C) καρδιομυοκυττάρων στην περιοχή του ορίου του MI. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση. (D) Γράφημα που δείχνει το EF μέσω καθητηριασμού στις 8 εβδομάδες μετά το MI. Τα δεδομένα εκφράζονται ως μέση τιμή και τυπική απόκλιση (Loffredo S., et al, 2011).

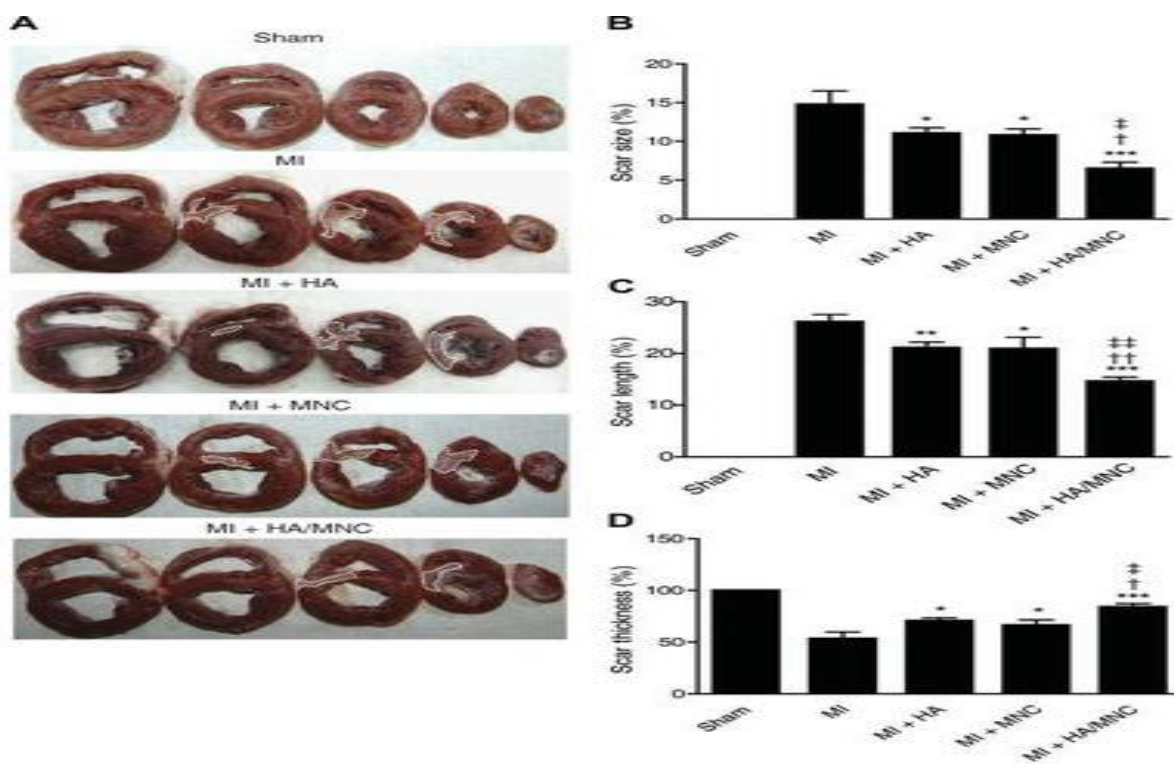
Σε μοντέλο σκύλου το οποίο έφερε χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια 24 υποκείμενα έλαβαν ενδομυϊκά ισόποσες ποσότητες BMNCs, MSCs και placebo, τα αποτελέσματα όσον αφορά την καρδιακή λειτουργία και την αναδιαμόρφωση του καρδιακού μυ εκτιμήθηκαν σε βάθος χρόνου 16 εβδομάδων (Mathieu M., et al, 2009). Το ηχοκαρδιογράφημα αποκάλυψε μια σταθερή βελτίωση της κινητικότητας των τοιχωμάτων στα BMNCs, ενώ τα MSCs παρουσίασαν περίπου την ίδια βελτίωση αλλά αργότερα χρονικά. Τα επίπεδα του κλάσματος εξώθησης παρέμειναν αμετάβλητα, το μέγεθος του εμφράγματος μειώθηκε κατά 3% στα BMNCs, η συσταλτικότητα αυξήθηκε και το σχετικό μέγεθος του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας ήταν μεγαλύτερο, ενώ στα άλλα δυο γκρουπ δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές. Όσον αφορά την αγγειακή δομή, ενώ δεν υπήρχαν διαφορές στα μικροαγγεία, η αρτηριακή πυκνότητα στο γκρουπ των BMNCs ήταν μεγαλύτερη από τα 2 άλλα γκρουπ και ο υποδοχέας 2 του VEGF εκφραζόταν σε μεγαλύτερο βαθμό. Όλα αυτά φανερώνουν μια υπεροχή των μονοπύρυνων κυττάρων του μυελού των οστών σε σχέση με τα μεσεγγυματικά βλαστικά κύτταρα τόσο στην κινητικότητα και την λειτουργική βελτίωση της καρδιάς όσο και στην αύξηση του αγγειακού χαρακτήρα που φάνηκε να σχετίζεται με τη λειτουργική πρόοδο.



Εικόνα 19. Μέγεθος του εμφράγματος στην αριστερή κοιλία A, το σχετικό μέγεθος του MI μέσω μαγνητικής τομογραφίας σε ζώα placebo, BMNC και MSC, αριστερά. B, αντιπροσωπευτικό παράδειγμα μεταμόσχευσης BMNC. Σημειώσατε σημαντική βελτίωση στις 16 εβδομάδες σε σχέση με την αρχή του πειράματος στα BMNC (κίτρινο βέλος). Από την άλλη στα placebo ο εμφραγματικός ιστός δεν υποχώρησε (άσπρο βέλος) (Mathieu M., et al, 2009).

Σε επόμενη έρευνα (Chen C., et al, 2014) πραγματοποιήθηκε μεταμόσχευση τζελ υδρογέλης σε μινι χοιρίδια για την εκτίμηση έπειτα από MI σε ισχαιμικές καρδιές. Χωρίζοντας σε γκρουπ τα υποκείμενά τους, στο 1^ο μεταμόσχευσαν ενδομυοκαρδιακά απλό αλατούχο διάλυμα, στο 2^ο αλατούχο διάλυμα με

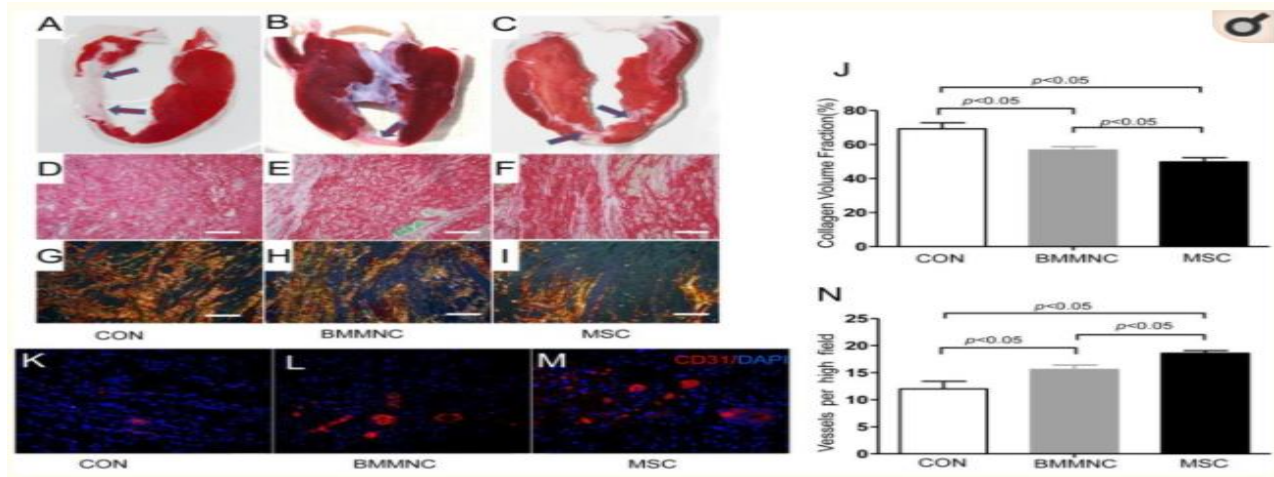
αυτόλογα BMNCs και στο 3^ο τζελ υδρογέλης με αυτόλογα BMNCs και με ηχοκαρδιογραφία και ιστολογικές αναλύσεις εκτιμήθηκε το αποτέλεσμα 1 και 2 μήνες μετά την εγχείρηση. Το EF έδειξε μείωση στα 2 πρώτα γκρουπ (αν και στο 2^ο ήταν μικρότερη) ενώ στο τζελ υδρογέλης αυξήθηκε κατά 3,3% μεταξύ 1^{ου} και 2^{ου} μήνα. Το διάφραγμα μεταξύ των κοιλιών τόσο στη διαστολή όσο και στη συστολή έδειξε την μεγαλύτερη πάχυνση στο 3^ο γκρουπ, ενώ στο control γκρουπ ήταν αμετάβλητο. Όσον αφορά την αναδιαμόρφωση της καρδιάς, μέσω καθετηριασμού εκτιμήθηκε ότι ο LVEDV και η LVEDP ήταν μικρότερα στα χοιρίδια που έλαβαν κύτταρα σε υδρογέλη, όπως και η ελαστικότητα η οποία ήταν μεγαλύτερη προδιαθέτωντας για μεγαλύτερη συσπαστικότητα της καρδιάς. Συνδυαστικά το γκρουπ 3 αποτρέπει την κοιλιακή αναδιαμόρφωση μετά από το έμφραγμα. Τέλος το μήκος και το πάχος του νεκρωμένου ιστού, όπως και ο ουλώδης ιστός στα πιο απομονωμένα σημεία του εμφράγματος εμφανίστηκαν μικρότερα λόγω της συνεργιστικής δράσης του τζελ και των κυττάρων, αλλά και η αρτηριακή και γενικότερη αγγειακή εικόνα του καρδιακού ιστού ήταν πολύ καλύτερη, όπως αποκάλυψαν ιστοχημικές μελέτες. Ουσιαστικά η ομάδα κατέληξε ότι η υδρογέλη προσφέρει ένα πολύ πιο φιλικό περιβάλλον στα BMNCs για να δράσουν και να αποκαταστήσουν την καρδιακή ζημιά, προσελκύοντας παράλληλα κύτταρα για να ενισχύσουν την τοπική αιμάτωση και αγγειογένεση. Επίσης αποδομώνται ταχύτερα από τα περισσότερα τεχνητά ικρίσματα, αποτρέποντας την δημιουργία ανοσολογικών αποκρίσεων και φλεγμονών (Chen C., et al, 2013).



Εικόνα 20. Ο συνδυασμός μεταμόσχευσης υαλουρονικού τζελ υδρογέλης (HA) και BMNC μετά το MI διατηρεί τον μυοκαρδιακό ιστό και μειώνει το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού. Α: αντιπροσωπευτικές εικόνες φυσιολογικών ζώων, MI, MI+HA, MI+MNC και MI+HA+MNC. Β–D: μέγεθος του εμφραγματικού ιστού (Β), μήκος εμφραγματικού ιστού (C), πάχος εμφραγματικού ιστού (D) Οι τιμές εμφράζουν μέση τιμή και τυπική απόκλιση. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, και *** $P < 0.001$ έναντι του MI γκρουπ, $†P < 0.05$, $††P < 0.01$ έναντι του MI γκρουπ και $‡P < 0.05$ και $‡‡P < 0.01$ έναντι του MI + MNC γκρουπ (Chen C., et al, 2014).

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν ως ένα βαθμό (Qian, H., et al, 2007), όπου σε 14 χοιρίδια μεταμοσχεύθηκαν αυτόλογα BMNCs (n=7), σε αντιπαράθεση με control (n=7) ζώα, επεξεργασμένα με φθορίζουσα ουσία, μετά από MI, μέσω της στεφανιαίας αρτηρίας και με τομογραφία βρέθηκε ο διαμοιρασμός τους κυρίως στο εμφραγματικό μυοκάρδιο. Η μελέτη εφάρμοσε μεταφορά των αυτόλογων κυττάρων μέσω στεφανιαίας κυκλοφορίας από ενδομυϊκή μεταφορά η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διεσπαρμένα νησίδια κυττάρων και άρα ελλιπή ηλεκτρομηχανική αλληλεπίδραση με τον ενδογενή ιστό. Μετά από 6 εβδομάδες εκτιμήθηκε ότι τα κύτταρα είχαν επιζήσει στο μεγαλύτερο μέρος τους και ότι είχαν συνεισφέρει στην αύξηση του EF κατά 7,3% σε σχέση με σταθερή κατάσταση στο control και την μείωση της LVESV σε σημαντικό βαθμό, ενώ ο LVEDV δε παρουσίασε σημαντική διαφορά. Οι τομές των ιστών έδειξαν μια τοπική πάχυνση του καρδιακού τοιχώματος στα δυσκινητικά τμήματα κατά 45% στο γκρουπ όπου είχαμε μεταμόσχευση κυττάρων ενώ στο control η λέπτυνση συνεχίστηκε μετά το MI και εν συνεχεία η μάζα του όγκου της αριστερής κοιλίας παρουσιάστηκε ως πολύ μικρότερη στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα. Έχουμε λοιπόν τόσο λειτουργική βελτίωση όσο και παρεμπόδιση της αναδιαμόρφωσης της καρδιάς. Τέλος μέσω ανοσοχημικής μελέτης βρέθηκε η πολύ καλύτερη αγγειώδης κατάσταση του BMNC γκρουπ τόσο στην εμφραγματική όσο και στην τριγύρω περιοχή καθώς και παρατηρήθηκαν μέσω ανοσοφθορισμού πρωτείνες ενδεικτικές καρδιομυοκυττάρων όπως η καρδιακή τροπονίνη T, η κονεξίνη43 και η α-ακτίνη αλλά και άλλες πρωτείνες που υποδεικνύουν ενδοθηλιακές και λείες μυϊκές δομές. Ακόμα η ομάδα κατέληξε ότι μάλλον το μεγαλύτερο μέρος της βελτίωσης τόσο της αγγειώδους δομής όσο και των υπόλοιπων μεταβλητών οφειλόταν σε παρακρινές φαινόμενο και ενεργοποίηση του ενδογενούς πληθυσμού καρδιομυοκυττάρων, αλλά και στη σημαντική διαπίστωση ότι λόγω της αύξησης του μεγέθους του εμφραγματικού ιστού και άρα της μείωσης της τοπικής αιμάτωσης σε σχέση με μικρότερες καρδιές, ανάλογα αυξήθηκε και η κατακράτηση των μεταμοσχευθέντων κυττάρων, ίσως λόγω αύξησης σημάτων εκλυόμενων από τον τραυματισμένο ιστό.

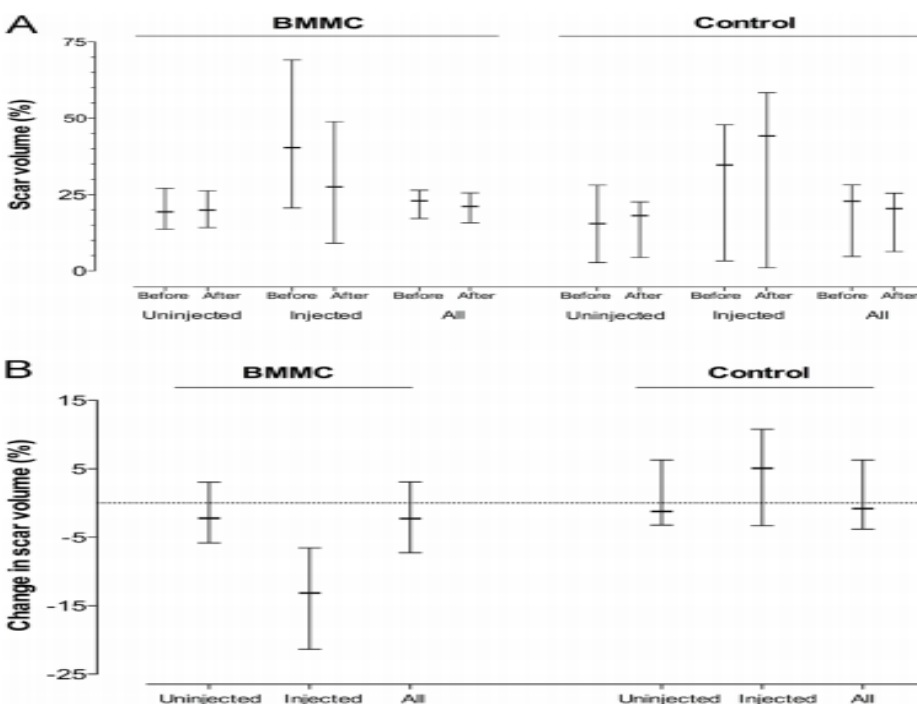
Μια άλλη έρευνα αντίθετα συνέκρινε τη ενδομυϊκή μεταφορά αυτόλογων MSCs και BMNCs σε 22 μικροχοιρίδια μετά από MI (Tao B., et al, 2015). 2 εβδομάδες μετά το εμφραγμα, μεταφέρθηκαν τα κύτταρα στα ζώα και μελετήθηκαν με ηχοκαρδιογράφημα και τομογραφία η καρδιακή λειτουργία, ενώ με ιστολογικές αναλύσεις η συγχώνευση των κυττάρων, η αγγειακή πυκνότητα και τα ποσοστά ουλώδους ιστού στην καρδιά, τόσο τη στιγμή της μεταφοράς όσο και 10 εβδομάδες μετά το MI. Το κλάσμα εξώθησης, ο LVEDV και ο LVESV δεν είχαν σημαντικές διαφορές σε κανένα γκρουπ στις 10 εβδομάδες από τις αντίστοιχες τιμές στην αρχή του πειράματος, αλλά η πάχυνση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας βελτιώθηκε κατά 10% μόνο στο γκρουπ που έλαβε MSCs όπως και η κινητικότητα του τοιχώματος, επομένως υπήρξε μια καλύτερευση της αναδιαμόρφωσης της καρδιάς μόνο στο γκρουπ των μεσεγχυματικών κυττάρων. Ακόμα η αγγειακή πυκνότητα και η ποσότητα του κολλαγόνου (50% στα MSCs, 59% στα BMNCs και 69% στο control) στα ζώα που έλαβαν MSCs ήταν μεγαλύτερη και μικρότερη αντίστοιχα, στα ζώα που είχαν λάβει τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα.



Εικόνα 21. Όρια του μυοκαρδίου σε ζώα control, BMNC και MSC (A-C, βέλη). Μετά από βαφή (D-F), και μικροσκοπία πολωμένου φωτός (G-I) αποκαλύφθηκε καλύτερη οργάνωση του ινώδους ιστού στο MSC γκρουπ (I) σχετιζόμενο με το control (G) και το BMMNC γκρουπ (H). Η περιοχή που καταλαμβάνεται από κολλαγόνο (CVF) εκτιμήθηκε στα εμφραγματικά μοντέλα (J). Το ίδιο και η πυκνότητα των αγγείων στην οριακή περιοχή. Ο συνολικός αριθμός $CD31^+$ αγγείων στα MSC ήταν μεγαλύτερος από τα BMNC και τα control. Αναπαριστώνται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις (Ταο Β., et al, 2015).

Περνώντας στον άνθρωπο, η πρώτη μελέτη έγινε το 2006 σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια (Hendriks M., et al, 2006) με ενδομυϊκή έγχυση αυτόλογων BMNCs σε 20 υποκείμενα έπειτα από bypass στεφανιαίας αρτηρίας και εκτίμηση του κλάσματος εξώθησης και της πάχυνσης του τοιχώματος μέσω μαγνητικής τομογραφίας έπειτα από 4 μήνες. Στο μεν πρώτο είχαμε μια αλλαγή της τάξεως του 3,5 % στους ασθενείς που αποτελούσαν το control και 6% στους ασθενείς που έλαβαν τα κύτταρα, που η ομάδα δε τη θεώρησε στατιστικά σημαντική. Οι LVESV και LVEDV παρέμειναν παρομοίως σταθεροί στους 4 μήνες, με μη σημαντικές βελτιώσεις στο γκρουπ των BMNCs. Στο δεύτερο δε, ενώ τα εμφραγματικά υποκείμενα του control group παρέμειναν στην πρότερη κατάσταση, οι ασθενείς που έλαβαν κύτταρα μετέβαλλαν κατά 2,4 mm το πάχος του τοιχώματός τους οδηγώντας σε σημαντική διαφορά. Στους μισούς ασθενείς που πήραν τα BMNCs εμφανίστηκαν ταχυκαρδίες, ενώ σε κανέναν από τους ασθενείς του control group δεν παρατηρήθηκε το φαινόμενο. Η μικρή βελτίωση στο κάσμα εξώθησης αποδόθηκε στη φύση της ασθένειας (χρόνια ανεπάρκεια) και συμπερασματικά δεν έρχεται σε αντίθεση με την εμφανή πάχυνση του μυοκαρδίου, καθώς για τη βελτίωση του LVEF πρέπει να βελτιωθούν τουλάχιστον 20% των δυσκινητικών τμημάτων της αριστερής κοιλίας, γεγονός απίθανο σε σχέση με τον αριθμό των μεταμοσχευθέντων κυττάρων.

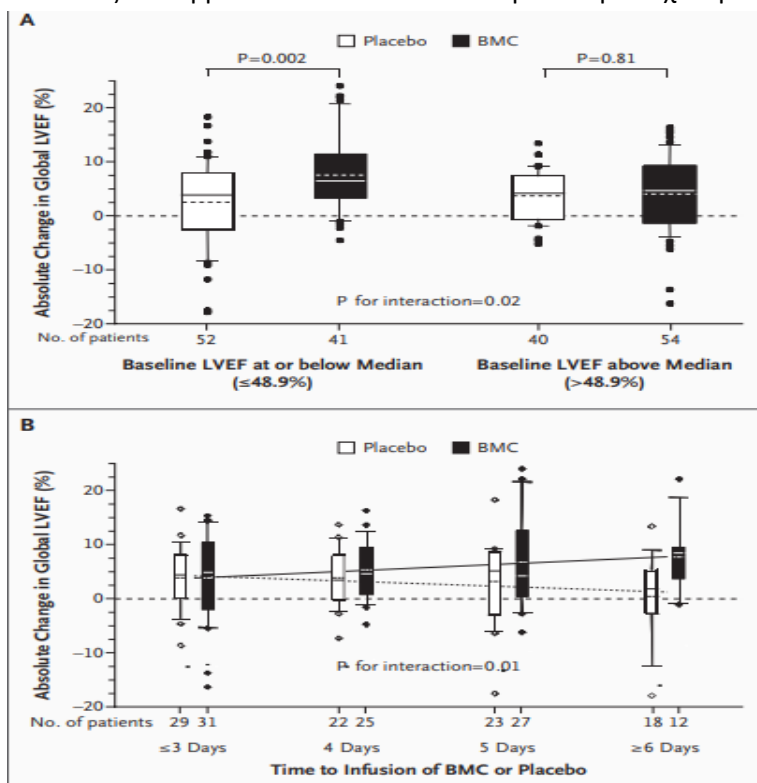
Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η επόμενη έρευνα (Pätilä T., et al, 2014), όταν από τους 102 ασθενείς με ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια, στους 39 με LVEF < 45% μεταμοσχεύθηκαν μετά από bypass στεφανιαίας αρτηρίας αυτόλογα BMNCs ενδομυϊκά και μελετήθηκαν τα αποτελέσματα της λειτουργικότητας της αριστερής κοιλίας και του εμφραγματικού ιστού μέσω μαγνητικής τομογραφίας μετά από 12 μήνες. Δεν αναφέρθηκε κάποια σημαντική διαφορά στο κλάσμα εξώθησης, το οποίο μάλιστα ήταν υψηλότερο στο control group, όπως και στον LVEDV και LVESV που είχαν μικρές μη σημαντικές μειώσεις και στα 2 γκρουπ, αλλά και η πάχυνση του τοιχώματος είχε την πολύ μικρή στατιστική διαφορά της τάξης του 1% μεταξύ των 2 γκρουπ. Το μέγεθος του νεκρωμένου ιστού βέβαια ενώ αυξήθηκε κατά 5% στα υποκείμενα που δεν έλαβαν κύτταρα, μειώθηκε κατά 13% στους ασθενείς με BMNCs.



Εικόνα 22. (Α) Μέσες τιμές και ενδοτεταρτημοριακές αποκλίσεις του μεγέθους του εμφραγματικού ιστού στη βάση του πειράματος και στον 1 χρόνο μέσω μαγνητικής τομογραφίας. (Β) Μέσες τιμές και ενδοτεταρτημοριακές αποκλίσεις των τμημάτων όσον αφορά την αλλαγή στον όγκο του εμφραγματικού ιστού (Pätilä T., et al, 2014).

Προσπάθεια έγινε επίσης για την μεταμόσχευση ενδοκαρδιακά αυτόλογων BMNCs αφού είχε προηγηθεί η διαδερμική εμφύτευση stent σε 60 ασθενείς (n=30 control group) μετά από AMI (acute myocardial infarction) και εκτίμησαν το αποτέλεσμα στους 6 μήνες, βλέποντας ότι η μεταμόσχευση δεν είχε σοβαρές παρενέργειες στα υποκείμενα, όπως όγκοι ή τραυματισμός του μυοκαρδίου (BOOST TRIAL) (Wollert K., et al, 2004). Το LVEF είχε σημαντική αύξηση του μεγέθους του 6,7% στους ασθενείς που πήραν BMNCs σε αντίθεση με τα placebo που παρέμεινε σταθερό, ενώ δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στα LVESV, LVEDV και τη μάζα της αριστερής κοιλίας, παρόλο που κατά τη διάρκεια του πειράματος το πρώτο έτεινε να αυξηθεί στο γκρουπ των BMNCs ενώ το δεύτερο έτεινε να μειωθεί. Επίσης η κίνηση του τοιχώματος κατά τη συστολή παρουσίασε σημαντική διαφορά στους BMNC ασθενείς στα όρια της εμφραγματικής περιοχής, αλλά όχι και μέσα στην εμφραγματική περιοχή τους 6 μήνες σε αντίθεση με τα placebo που ήταν σχετικά σταθερή. Η ομάδα υποστήριξε ότι η βελτίωση του LVEF οφειλόταν στην τοπική αύξηση της κινητικότητας στα όρια του εμφράγματος.

Τα ίδια συμπεράσματα εξήχθησαν και σε 204 ασθενείς με AMI έπειτα από την μεταμόσχευση ενδοστεφανιαία, αυτόλογων BMNCs στους μισούς από αυτούς 3-7 μέρες έπειτα από επαναιμάτωση (REPAIR AMI) (Schächinger V., et al 2006). Στους 4 μήνες το LVEF ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στην ομάδα των κυττάρων από την ομάδα των placebo (μέση αύξηση $5.5 \pm 7.3\%$ vs. $3.0 \pm 6.5\%$) ενώ οι ασθενείς με αρχικό EF κάτω του 48,9% έδειξαν τη μεγαλύτερη βελτίωση. Ο LVEDV αυξήθηκε ελαφρά και στα δυο γκρουπ 14 και 13 ml σε placebo και BMNC αντίστοιχα, αλλά η LVESV παρέμεινε σταθερή στο BMNC γκρουπ αλλά αυξήθηκε στο άλλο (5,6 ml αύξηση στο placebo). Στους 4 μήνες, όπως και στον 1 χρόνο υπήρχαν πολύ λιγότερα περιστατικά στο BMNC γκρουπ που σχετιζόταν με θανάτους, εισαγωγή στο νοσοκομείο λόγω καρδιακής ανεπάρκειας και επανεμφάνισης του μυοκαρδιακού εμφράγματος όπως και άλλων σοβαρών περιστατικών από τα placebo. Έγινε επίσης συσχέτιση μεταξύ του μέσου όρου του LVEF στην αρχή του πειράματος με την απόλυτη διαφορά στους 4 μήνες θεραπείας (οι ασθενείς που βρίσκονταν κάτω από το μέσο όρο είχαν μια τριπλάσια διαφορά στο EF μεταξύ των



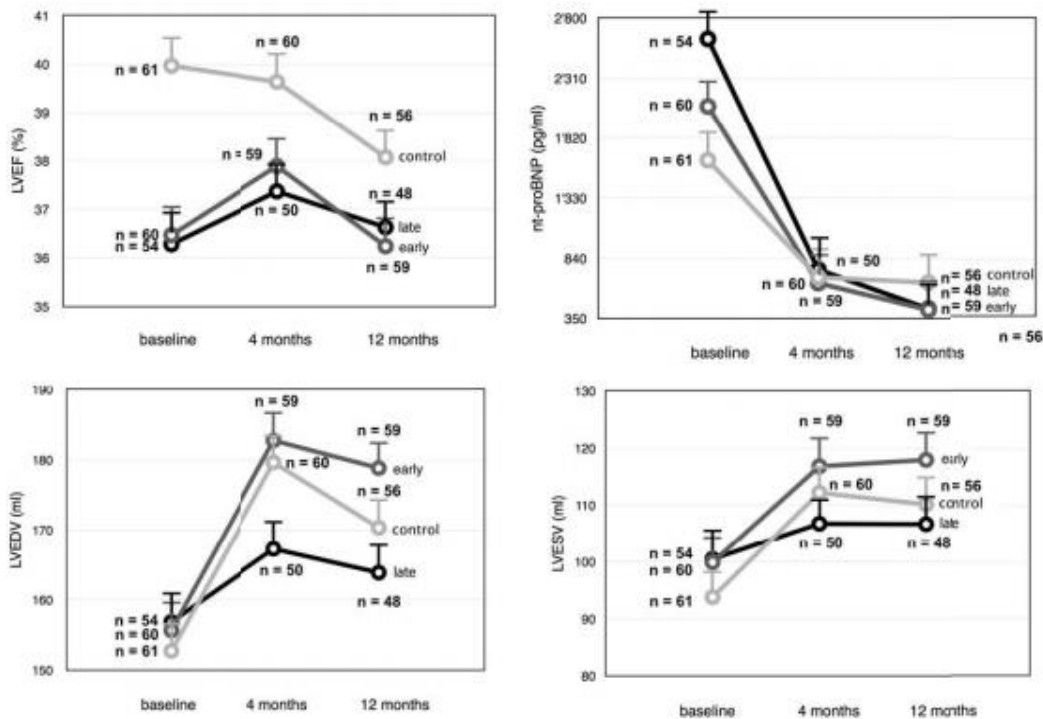
γκρουπ σε αντίθεση με αυτούς που ήταν πάνω από το μέσο όρο όπου οι διαφορές ήταν αμελητέες) καθώς και με το χρόνο μεταμόσχευσης έπειτα από την επαναιμάτωση των κυττάρων (όταν η μεταμόσχευση γινόταν την 3^η ή 4^η μέρα η διαφορά μεταξύ γκρουπς του LVEF ήταν πολύ μικρότερες από όταν γινόταν 5^η ή 6^η μέρα).

Εικόνα 23. Σχέσεις μεταξύ της απόλυτης διαφοράς στο LVEF μεταξύ της αρχικής τιμής και της τελικής εκτίμησης σε placebo και BMC (πίνακας A) και σχέση μεταξύ της απόλυτης διαφοράς στο LVEF και του χρόνου μεταμόσχευσης μετά τη θεραπεία επαναιμάτωσης ανάμεσα σε placebo και BMC (πίνακας B). Περιλαμβάνονται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των διαφορών τιμών (Schächinger V., et al 2006).

Μελετήθηκαν οι επιδράσεις των MSCs σε σύγκριση με τα BMNCs σε 65 ασθενείς με ισχαιμική καρδιομυπάθεια και LVEF μικρότερο του 50% (TAC-HFT Trial) (Heldman A., et al, 2014). Η μεταμόσχευση των αυτολογων κυττάρων έγινε ενδοκαρδιακά και τα γκρουπ που σχηματίστηκαν ήταν 1)MSCs σε 19 ασθενείς 2)placebo σε 11 ασθενείς για τα μεσεγχυματικά κύτταρα 3)BMNCs σε 19 ασθενείς και 4)placebo για τα μονοκύτταρα σε 10 ασθενείς. Οι ασθενείς αξιολογήθηκαν 1 χρόνο μετά για τις δομικές και λειτουργικές τους μεταβλητές. Στις 30 μέρες δεν υπήρχαν ασθενείς με σοβαρά προβλήματα λόγω θεραπείας, ενώ στον 1 χρόνο τα ποσοστά αυτά ήταν 31,6 % για τα γκρουπ που έλαβαν κύτταρα και 38% για τα control group. Όσον αφορά τη λειτουργική βελτίωση των ασθενών, το 6 λεπτο τεστ περπατήματος έδειξε βελτίωση για τους ασθενείς που έλαβαν MSCs, όπου στους 6 μήνες βελτιώθηκε κατά 28,2 m και στον 1 χρόνο κατά 32,6 m, αλλά όχι στους ασθενείς που έλαβαν BMNCs όπου στους 6 μήνες είχαμε το άσχημο αποτέλεσμα των -25,7 μέτρων και στους 12 μήνες 16,9 μέτρα. Μέσω MRI προσδιορίστηκε τόσο η συνολική μάζα μείωσης του ουλώδους ιστού όσο και η σχετική μάζα

σε σχέση με την αριστερή κοιλία και βρέθηκε ότι ενώ και τα δυο γκρουπ που έλαβαν κύτταρα μείωσαν τον ουλώδη ιστό, μόνο οι ασθενείς που έλαβαν MSCs μείωσαν τον ουλώδη ιστό σε σχέση με τη μάζα της αριστερής κοιλίας κατά 18,9%. Στους 12 μήνες μόνο τα MSCs αύξησαν τη μάζα του βιώσιμου ιστού. Οι τιμές των EF, LVEDV, LVESV παρέμειναν σχετικά σταθερές με τη μεταμόσχευση των κυττάρων. Η ομάδα ισχυρίστηκε ότι αλλαγές στον ουλώδη ιστό του μεγέθους των MSCs μπορεί να είναι ελπιδοφόρες όσον αφορά τη βιωσιμότητα της καρδιάς, της αναδιαμόρφωσής της ή και την λειτουργία της.

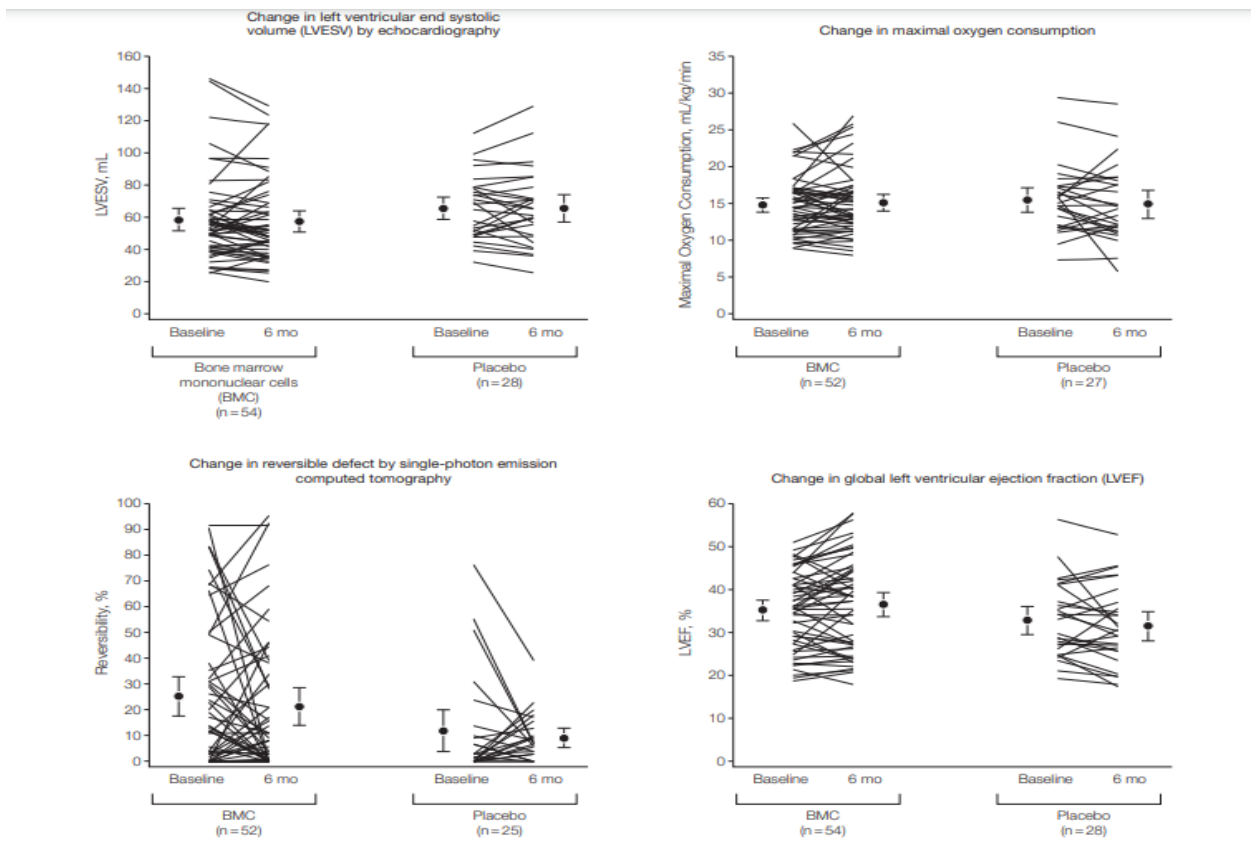
Σε μια από τις πιο εκτεταμένες έρευνες που έγιναν πάνω στα αυτόλογα BMNCs (Sürder D., et al, 2016) μετέφεραν ενδοκαρδιακά σε 200 ασθενείς με προηγηθέν AMI και LVEF<45% 1:1:1 BMNCs είτε σχετικά νωρίς (5-7 μέρες μετά το AMI- 1^ο γκρουπ) είτε σχετικά αργά (3-4 εβδομάδες μετά το AMI- 2^ο γκρουπ) (SWISS-AMI TRIAL). Όσον αφορά το LVEF στους ασθενείς του control μειώθηκε σταθερά από τη βάση ως τους 12 μήνες και στα δύο άλλα γκρουπ παρουσίασε μια τάση προς αύξηση ανάμεσα στους μήνες 0-4 αλλά απο εκεί και πέρα μέχρι τον μήνα 12 παρουσίασε μείωση, με τις τελικές τιμές της απόλυτης διαφοράς μεταξύ της βάσης και του 12^{ου} μήνα να είναι -1,9% για τα control, -0,9 για το πρώτο και 0,7 για το δεύτερο γκρουπ. Η αναδιαμόρφωση της καρδιάς παρουσιάστηκε σταθερή για το control και το 1^ο γκρουπ, ενώ στο δεύτερο είχαμε μικρότερη αναδιαμόρφωση από τους 0 έως τους 4 μήνες, ενώ απο τους 4 έως τους 12 τα δυο γκρουπ που έλαβαν κύτταρα φάνηκε να μη παρουσιάζουν παραπέρα αλλαγή ενώ στο control η αναδιαμόρφωση συνεχίστηκε, με τις τελικές διαφορές από τις αρχικές τιμές να είναι για LVEDV και LVESV: 19 και 17 ml για το control αντίστοιχα, 26 και 21 για το 1^ο γκρουπ αντίστοιχα και 11 και 10 για το 2^ο γκρουπ αντίστοιχα. Στο κομμάτι της μείωσης του μεγέθους του εμφραγματικού ιστού όλα τα γκρουπ παρουσίασαν παρόμοιες σταθερές μειώσεις μέχρι τον 12^ο μήνες με το 2^ο γκρουπ να έχει την πιο μικρή μείωση (-23g, -22g και -16g σε control, 1ο και 2^ο γκρουπ στους 12 μήνες), ενώ τα περιστατικά θανάτου στους 24 μήνες ήταν μηδενικά για το control, 3 για το 1^ο και 1 για το 2^ο γκρουπ και τα σοβαρά περιστατικά όπως εμφραγματικά επεισόδια, καρδιακή ανεπάρκεια και άλλα ήταν συγκρίσιμα σε όλα τα γκρουπ. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ίσως μια μικρή υπεροχή σε ασθενείς που λαμβάνουν BMNCs σε κάποιο αργότερο στάδιο χρονικά όσον αφορά τη λειτουργική κατάσταση της καρδιάς αλλά όχι και τη δομική.



Εικόνα 24. Αλλαγές στα: LVEF, LVEDV, LVESV και ποσοστά νατριουρητικού παράγοντα από τη βάση του πειράματος έως τους 12 μήνες. Σκούρα μαύρη γραμμή:γκρουπ που τα BMNC μεταφέρθηκαν αργά, γκρι γραμμή:γκρουπ

που τα BMNC μετα φέρθηκαν νωρίς, άσπρη γραμμή:control (Sürder D., et al, 2016).

Η επόμενη έρευνα περιλάμβανε 92 ασθενείς (Perin C., et al, 2012) (FOCUS-CCTRN TRIAL) οι οποίοι υπέφεραν από χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια και LVEF < ή = 45%, όπου μέσω απευθείας μεταμόσχευση στην καρδιά μετέφεραν αυτόλογα BMNCs σε 61 ασθενείς, ενώ οι υπόλοιποι πήραν placebo. Το αποτέλεσμα εκτιμήθηκε έπειτα από 6 μήνες. Το κυτταρικό προϊόν επιβίωσε κατά κύριο λόγο και από όλους τους ασθενείς που έλαβαν τα κύτταρα μόνο ένας παρουσίασε επαναλαμβανόμενες κοιλιακές ταχυκαρδίες. Στους 6 μήνες δε παρουσιάστηκε καμία αλλαγή στο LVESV σε κανένα από τα 2 γκρουπ (εκτίμηση με τομογραφία) και οι αλλαγές στα ποσοστά της αναστρέψιμης βλάβης ήταν επίσης μη σημαντικές και στα δυο γκρουπ (εκτίμηση με SPECT), καθώς και στο μέγεθος του τραύματος. Ακόμα ο LVEDV και η τοπική κινητικότητα του τοιχώματος της καρδιάς δε παρουσίασαν σημαντικές βελτιώσεις. Παρόλα αυτά η ομάδα έκρινε ως σημαντική την αλλαγή στο LVEF κατά 1,4% στο BMNCs γκρουπ (-1,3% στο placebo group), όπως επίσης και στον όγκο παλμού που αυξήθηκε 2,7 mL στους ασθενείς που πήραν τα κύτταρα σε σχέση με τους υπόλοιπους στους οποίους μειώθηκε κατά 5,8 mL. Η ομάδα παρατήρησε επίσης ότι όσο περισσότερα ήταν τα κύτταρα που εξέφραζαν τους δείκτες CD34 και CD133 τόσο καλύτερη ήταν η κλινική εικόνα των ασθενών και σε παραταίρω πειράματα για να εξακριβώσουν αυτή την υπόθεση, καθώς αύξησαν τον αριθμό των κυττάρων αυτών αυξήθηκε και το κλάσμα εξώθησης φτάνοντας σημαντικά στατιστικά επίπεδα.



Solid circles indicate mean values at baseline and 6 months. Error bars indicate 95% confidence intervals.

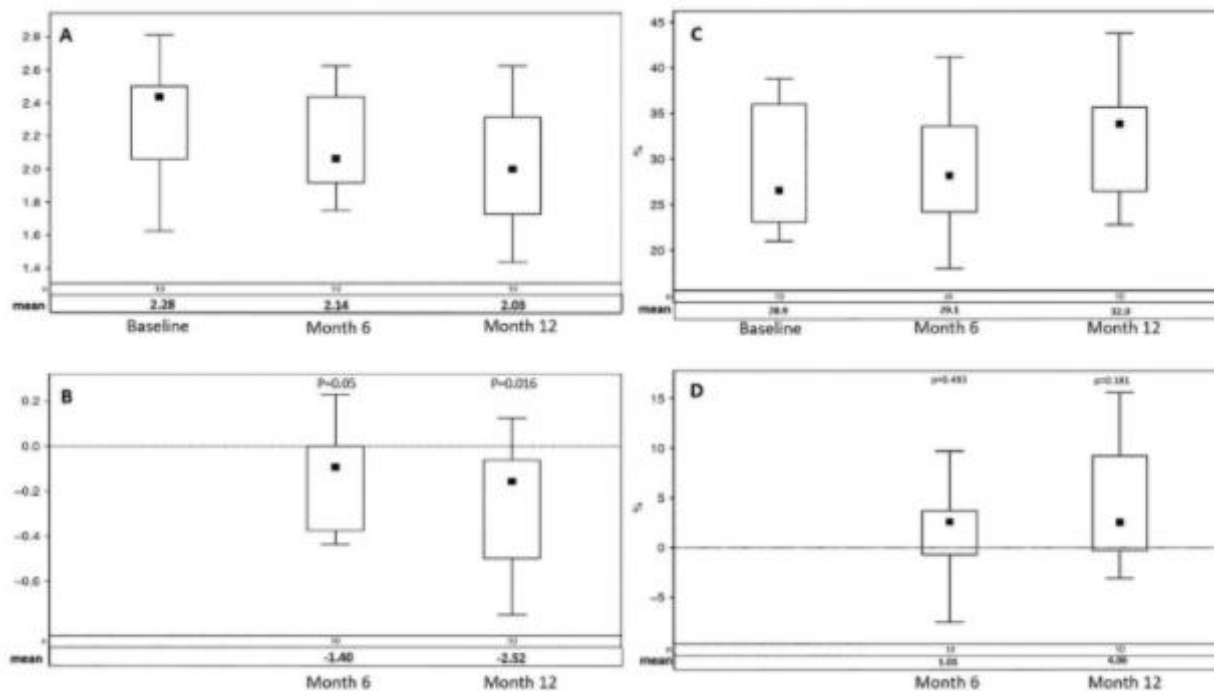
Εικόνα 25. Αλλαγές στον LVESV (πάνω αριστερά), την κατανάλωση του O_2 (πάνω δεξιά), του RS (κάτω αριστερά) και του LVEF (κάτω δεξιά) μεταξύ της βάσης του πειράματος και των 6 μηνών σε placebo και ζώα που έλαβαν BMNCs (Perin C., et al, 2012).

Εν συνεχεία έγινε προσπάθεια για να ερηνευτούν τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης με βάση τους διάφορους υποπληθυσμούς κυττάρων που ευρίσκονται στον μυελό των οστών (Taylor A., et al, 2016). Σε 78 ασθενείς της παραπάνω έρευνας λοιπόν, καθορίστηκαν οι ανοσοφαινότυποι με κυτταρομετρία ροής και η ενεργότητα των προγονικών κυττάρων με μελέτη των αποικιών που σχημάτιζαν. Υποκείμενα που παρουσίασαν βελτίωση στις τιμές των EF, LVESV και όγκο O_2 που εκλυόταν (γκρουπ 1 n=17) συγκρίθηκαν με ασθενείς που παρέμειναν σταθεροί ή χειρότερεψαν σε μια η περισσότερες από τις παραπάνω μεταβλητές (γκρουπ 2 n=61) και με ασθενείς όπου και οι τρεις μεταβλητές αυτές χειρότερεψαν, σε σχέση πάντα με τις αρχικές τιμές (γκρουπ 2A n=11). Τα αποτελέσματα όντως παρουσίασαν μια αυξημένη περιεκτικότητα στο γκρουπ 1 σε CD11b⁺, CD31dim, CD19⁺ και CXCR4⁺ (B κύτταρα και CXCR4⁺) καθώς και υποκατηγορίες αυτών σε σχέση με τα δυο άλλα γκρουπ, ενώ επίσης το γκρουπ 1 είχε αυξημένη περιεκτικότητα σε CD45⁺ CD19⁺, CD19⁺ CD11b⁺, CD19⁺ CXCR4⁺, και CD45⁺ CD11b⁺ αιμοποιητικά/ανοσοκύτταρα και μειωμένη περιεκτικότητα σε CD45⁺CD31^{bright} και ECFCs από το γκρουπ 2A. Αυτό δείχνει μια ανάγκη για εκτιμηση της σύνθεσης των BMNCs που λαμβάνονται και πρόκειται να μεταμοσχευθούν σε ασθενείς καθώς αυτή φαίνεται να επηρεάζει της λειτουργικές παραμέτρους της καρδιάς και την κλινική εικόνα του ασθενούς σε περιπτώσεις ισχαιμικών καρδιομυοπαθειών.

Ακόμα έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν οι στρεσογόνους παράγοντες του εκάστοτε ασθενή (CRFs- cardiovascular risk factors) οι οποίοι κατά την άποψή τους ευθυνόταν για την ετερογένεια των αποτελεσμάτων των διαφόρων αυτόλογων μεταμοσχεύσεων BMNCs (Contreras A., et al, 2017). Για αυτό το λόγο στρατολόγησαν 191 ασθενείς από προηγούμενες κλινικές δοκιμές (CCTRN TIME και LateTIME) και πραγματοποίησαν αναλύσεις. Κατέληξαν στο ότι η υπερλιπιδαιμία και η υπέρταση σχετίζονται με αυξημένη παρουσία CD11b⁺ κυττάρων, τα θηλυκά άτομα έχουν μικρότερες περιεκτικότητες σε CD11b⁺ και CD45⁺CD14⁺ κύτταρα, η ηλικία και το κάπνισμα ήταν αρνητικά σχετιζόμενα με τα CD45⁺CD31⁺ κύτταρα, ενώ η γλυκόζη ήταν θετική συνάρτηση των CD45⁺CD3⁺ κυττάρων και η κρεατινίνη αρνητική. Επομένως τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα αγγειογενή BMNCs φάνηκαν να εξαρτώνται από παράγοντες κινδύνου των εκάστοτε ασθενών και αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρέπει να δίνεται προσοχή στη σύσταση των μονοπύρηνων κυττάρων του μυελού οστών κατά τις κλινικές δοκιμές, καθώς φαίνεται ότι μπορεί να επιδράσουν στο κλινικό αποτέλεσμα μιας μελέτης.

Προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα αυτά σχεδιάστηκε μια μελέτη (Raval R., et al, 2020) η οποία αρχικά σκάνανε μέσω ειδικής πλατφόρμας ένα μικρό ποσοστό κυττάρων του μυελού των οστών για συγκεκριμένους δείκτες που μπορούν να συμβάλλουν στην αποτελεσματικότητα της θεραπείας και σε δεύτερο επίπεδο πραγματοποίησε αναρρόφηση του μυελού των οστών σε υποκείμενα που πληρούν τα ανάλογα κριτήρια και ενδοκαρδιακή μεταμόσχευση αυτόλογων 200×10^6 BMNCs σε 10 ασθενείς με χρόνια ισχαιμική καρδιομυοπάθεια έπειτα από MI και LVEF μεταξύ του 20 και 40%. Οι ασθενείς έφτασαν όλοι στην αξιολόγηση του 1^{ος} χρόνου και δέχτηκαν τα κύτταρα με επιτυχία, ενώ στις 40 μέρες δεν υπήρξαν αναφορές για σοβαρά περιστατικά σχετιζόμενα με τη θεραπεία. Στον 1 χρόνο βέβαια παρατηρήθηκαν 2 ασθενείς με κοιλιακές ταχυκαρδίες, 2 επανεμφάνισαν μυοκαρδιακό επεισόδιο και 1 χρειάστηκε να νοσηλευτεί λόγω καρδιακής ανεπάρκειας. Οι ασθενείς βελτιώθηκαν στο τεστ του 6λεπτου περπατήματος κατά 48 m στους 6 μήνες και 8 στους 10

διατήρησαν σταθερή τη βελτίωσή τους στους 12 μήνες. Τα τμήματα του μυοκαρδιακού ιστού που εμφανιζόταν ακινητικά μειώθηκαν κατά 1 (18%) και 2 (31%) στους 6 και 12 μήνες αντίστοιχα στους 8 από τους 10 ασθενείς καθώς αφομοιώθηκαν από διπλανά συσταλτά μυοκαρδιακά τμήματα στα οποία μεταμοσχεύθηκαν τα BMNCs, ενώ το σκορ της συσταλτικότητας του τοιχώματος βελτιώθηκε κατά 8,2% και 16,2% στους 6 και 12 μήνες αντίστοιχα. Το LVEF βελτιώθηκε στους 7 από τους 10 ασθενείς με μέσο όρο 4,1% στους 12 μήνες μετά τη μεταμόσχευση, ποσοστό που δε θεωρήθηκε σημαντικό.



Εικόνα 26: Δείκτης της κινητικότητας του τοιχώματος μέσω ηχοκαρδιογραφήματος (WMSI) και του κλάσματος εξώθησης της αριστερής κοιλίας (LVEF). A: WMSI στη βάση του πειράματος, τους 3, 6, 9 και 12 μήνες. B: WMSI κατά τη διάρκεια 12 μηνών συγκρινόμενο με την βάση του πειράματος. C: Το LVEF στη βάση του πειράματος, τους 3, 6, 9 και 12 μήνες. D: η αλλαγή στο LVEF κατά τη διάρκεια των 12 μηνών συγκρινόμενο με την αρχή του πειράματος. Το μαύρο τετράγωνο συμβολίζει τη μέση τιμή (Amish R., et al 2020).

Συνολικά, φαίνεται ότι τα BMNCs είναι μια ασφαλής και εφικτή πρακτική κυρίως σε συνδυαστικές θεραπείες και όχι τόσο μόνη της για την αποκατάσταση του μυοκαρδίου σε χρόνιες ή μη καρδιομυπάθειες ισχαιμικής φύσης. Κοινή γνώση αποτελεί σήμερα ότι δεν διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα μετά τη μεταμόσχευσή τους, μέσω ανίχνευσης με χρωστικές της πορείας τους μετά την είσοδο στον οργανισμό και την παρακολούθηση του καρδιομυϊκού περιβάλλοντος, αλλά συνεισφέρουν μέσω παρακρινούς φαινομένου στην ενεργοποίηση του ενδογενούς καρδιομυϊκού πληθυσμού, την τοπική αιμάτωση και την αναδιαμόρφωση του καρδιακού μυός. Στις διάφορες μελέτες έχει γίνει μεταμόσχευσή τους κυρίως ενδομυϊκά ή ενδοστεφανιαία, προσπαθώντας να εκμεταλευτούν τα μειονεκτήματα ή πλεονεκτήματα της κάθε μεθόδου, όπως το αν τραυματίζει παραπέρα το μυοκάρδιο, πόσα κύτταρα επιζούν ή αν προκαλεί ταχυκαρδίες και φαίνεται ότι τα BMNCs σχεδόν σε όλα τα πειράματα επιφέρουν βελτίωση στα χαρακτηριστικά του εμφραγματικού ιστού. Αυτά μπορεί να είναι τοπική πάχυνση του κοιλιακού τοιχώματος, βελτίωση της κινητικότητας, της ελαστικότητας ή της συσταλτικότητας των κοιλιακών τμημάτων, μείωση του ουλώδους ιστού, του μεγέθους ή της μάζας του. Μικρότερη γενικά φαίνεται να είναι η προσφορά τους, αν και ανιχνεύσιμη,

στον τομέα της λειτουργικής βελτίωσης όπως το LVEF, ή το τεστ του 6λεπτου περπατήματος, και ακόμα μικρότερη στην αναστολή αναδιαμόρφωση της καρδιάς, δηλαδή στα LVEDV και LVESV. Συγκρινόμενα σε πολλές έρευνες με MSCs, παίρνουμε αντιφατικά αποτελέσματα με τις 2 κατηγορίες κυττάρων να εναλλάσσονται στο ποια έχει τον πιο θετικό αντίκτυπο στην καρδιά. Τα BMNCs ενισχύουν ακόμα την τοπική αιμάτωση και συντελούν στην αγγειογένεση και ωρίμανση των αγγείων, ενώ έχει βρεθεί ότι ο χρόνος μεταφοράς των κυττάρων στον οργανισμό και το πόσο μειωμένο είναι το κλάσμα εξώθησης κάποιου είναι θετικοί παράγοντες στην λειτουργική αλλά όχι και τη δομική βελτίωση υποκειμένων. Ακόμα, έχει παρουσιαστεί η ανάγκη μοριακού χαρακτηρισμού των μεταφερόμενων BMNCs όσον αφορά τους δείκτες επιφανείας τους, καθώς και των στρεσογόνων παραγόντων των δεκτών οι οποίοι επηρεάζουν τους δείκτες επιφανείας, αφού φαίνεται να έχουν άμεση συνάφεια με το λειτουργικό αποτέλεσμα της επέμβασης σε μεταβλητές όπως το LVEF, O₂ ή LVESV. Τέλος, θετική παρουσιάστηκε η συνεισφορά φυσικών ικριωμάτων, όπως των υδρογελών, στη μεταμόσχευση BMNCs σε όλους τους τομείς, με έμφαση στο EF καθώς αυτές προφέρουν ένα περιβάλλον φιλικό στα κύτταρα και ελεύθερο ανοσολογικών αποκρίσεων ή φλεγμονών.

2.3 ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (MSCs)

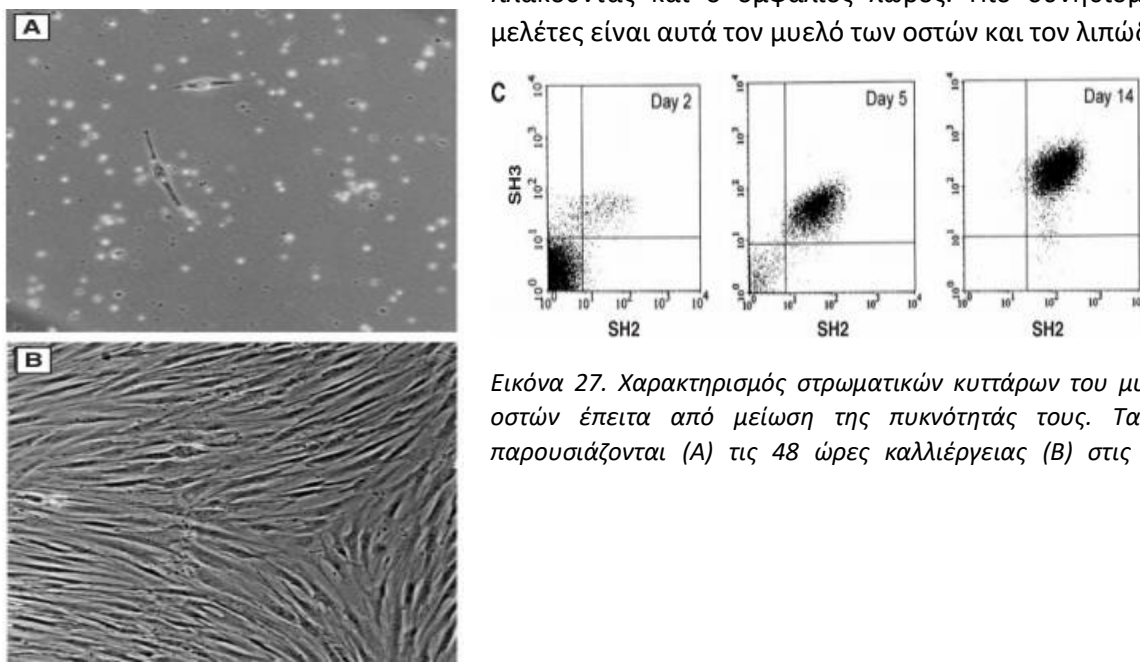
Το 2006 η Διεθνής Κοινότητα για την Κυτταρική Θεραπεία όρισε τα ελάχιστα κριτήρια για να ορίσει κάποιος τα MSCs (mesenchymal stem cells- μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα) τα οποία είναι:

-να διατηρούν πλαστικότητα κάτω από κανονικές συνθήκες καλλιέργειας

-να εκφράζουν του παράγοντες επιφανείας CD105, CD73, και CD90 αλλά όχι τους CD45, CD34, CD14 ή τον CD11b, CD79α ή τον CD19, ή HLA-DR.

-να διατηρούν *in vitro* ικανότητα διαφοροποίησης σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές και πιο συγκεκριμένα σε οστεοβλάστες, χονδροβλάστες και λιποκύτταρα (Dominici M., et al, 2006).

Στον άνθρωπο όπως και σε πολλά άλλα είδη μπορούν να βρεθούν πραγματικά MSCs, τα οποία διαιρούνται διατηρώντας παράλληλα τη βλαστικότητα τους και έχουν ικανότητα διαφοροποίησης σε διαφορετικές γενεαλογίες κυττάρων μεσοδερμικής προέλευσης (Pittenger F., et al, 1999). Τα MSCs είναι πανταχού παρόντα στο ανθρώπινο σώμα και μπορούν να βρεθούν σε πολλούς ιστούς και όργανα, μερικά από τα οποία είναι η καρδιά, το περιφερικό αίμα, ο μυελός των οστών ο λιπώδης ιστός, ο πλακούντας και ο ομφάλιος λώρος. Πιο συνηθισμένα στις μελέτες είναι αυτά τον μυελό των οστών και τον λιπώδη ιστό.



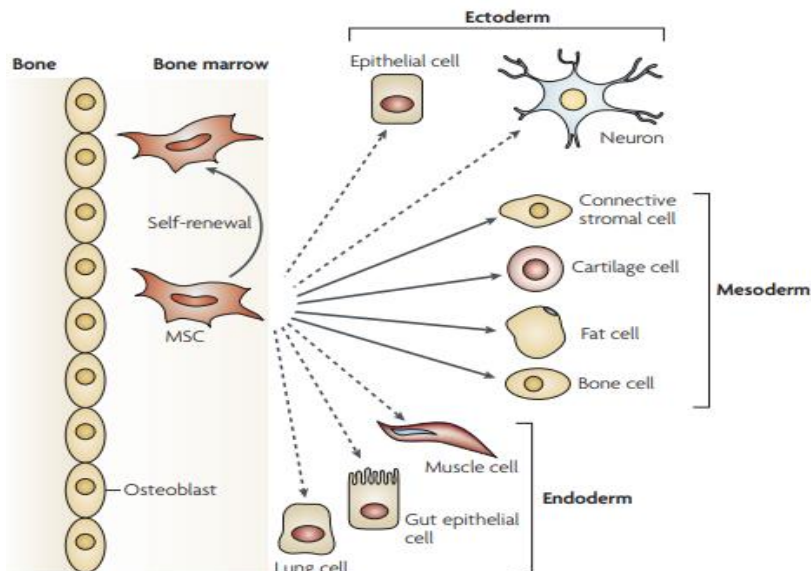
Εικόνα 27. Χαρακτηρισμός στρωματικών κυττάρων του μυελού των οστών έπειτα από μείωση της πυκνότητάς τους. Τα κύτταρα παρουσιάζονται (A) τις 48 ώρες καλλιέργειας (B) στις 10 μέρες

καλλιέργειας (C) Η κυτταρομετρία ροής δείχνει τον εμπλουτισμό των κυττάρων καθώς καλλιεργούνται. Τα αποτελέσματα που φαίνονται λήφθηκαν στις 2, 5 και 14 μέρες καλλιέργειας έπειτα από επώαση με αντισώματα SH2 and SH3, ως προς συγκεκριμένους δείκτες επιφανείας. Στις 14 μέρες, τα κύτταρα ήταν 95 έως 99% ομογενοποιημένα και αρνητικά για έκθεση σε αντιγόνα CD14, CD34 (Becton-Dickinson), ή CD45 (Pharmingen), τα οποία είναι συχνά σε κύτταρα αιμοποιητικών γενεαλογιών (Pittenger F., et al, 1999).

Τόσο in vivo όσο και in vitro έχει αποδειχθεί η διαδιαφοροποίηση των MSCs σε καρδιομυοκύτταρα. In vitro με την έκθεση τους στην DNA μεθυλ-τρανσφεράση 5-αζακυτιδίνη (5-aza) επάγει την καρδιομυογενή διαφοροποίηση που χαρακτηρίζεται από έκφραση πρωτεϊνών του μυοκαρδίου και διαμόρφωση μυοσωλήνων (Tomita S, et al,1999). Επίσης συγκαλλιέργεια των MSCs με κοιλιακά μυοκύτταρα επάγει ένα μέσο στο οποίο είναι πρόσφορη η διαφοροποίηση των μεσεγχυματικών κυττάρων σε καρδιομυοκύτταρα που ανιχνεύεται με την παρουσία α-ακτίνης, καρδιακών τροπονινών και δεσμίνης (XiaoHong Y., et al, 2007).

Τα MSCs εκδηλώνουν τόσο ανοσορυθμιστική όσο και ανοσοκατασταλτική δράση. Αντιδρώντας με τα συστήματα παθητικής και ενεργητικής ανοσίας του οργανισμού παρεμποδίζουν την έκφραση προ-φλεγμονοδών κυτταροκινών, υποστηρίζοντας μια αντιφλεγμονώδη κατάσταση (Uccelli A., et al, 2008). Έχει δειχθεί ότι σε κατάσταση MI υποβοηθούν την έκφραση της IL-10 (αντιφλεγμονώδης κυτταροκίνη) ενώ παρεμποδίζουν την έκφραση του TNF-Α και IL-6 (προ-φλεγμονοδών παραγόντων) Du Y., et al, 2008. Ακόμα η παρουσία του παράγοντα VEGF οδηγεί τα MSCs σε αύξηση του υποδοχέα του VEGFR-2 και αυτό με τη σειρά του ενεργοποιεί την έκφραση του Sox18 που οδηγεί τα μεσεγχυματικά κύτταρα σε ένα ενδοθηλιακό φαινότυπο (Ikharoh A., et al., 2015) που μπορεί να ανιχνευθεί μέσω ειδικών πρωτεϊνών δεικτών των ενδοθηλιακών κυττάρων (Oswald J., et al, 2004). Τα MSCs εκφράζουν αντιγόνα ιστοσυμβατότητα τάξης 1 αλλά όχι τάξης 2 (αντιτίθενται λοιπόν στην παρουσίαση του αντιγόνου στα T-κύτταρα από τα δενδριτικά κύτταρα, αναστέλλοντας τη λειτουργία τους) και τους λείπουν μόρια που ενεργοποιούν τα T-κύτταρα όπως τα CD40, CD80, CD86, or B7 (Majumdar K., et al, 2003). Τα MSCs δε μπορούν να γίνουν στόχος κυτταροτοξικών λεμφοκυττάρων και κυττάρων-φυσικών φονιάδων (μειώνουν τους υποδοχείς τους με τους οποίους αναγνωρίζουν κύτταρα) και όταν καλλιεργούνται στο ίδιο μέσο με λεμφοκύτταρα δεν ευνοούν τον πολλαπλασιασμό τους (Ringden O., et al, 2006). Τα MSCs έχουν την ιδιότητα να αλληλεπιδρούν και με τα ουδετερόφιλα. Τα τελευταία προστατεύουν τον οργανισμό από βακτηριακές μολύνσεις με την απελευθέρωση ενεργών ριζών οξυγόνου στις εστίες της φλεγμονής (Uccelli A., et al, 2008), αντίδραση που παρεμποδίζεται με τα μεσεγχυματικά κύτταρα τα οποία προστατεύουν τα ενεργά και τα ανενεργά ουδετερόφιλα μέσω ενός μονοπατιού της IL-6 (Raffaghello L., et al, 2008). Αυξάνουν την κατηγορία των μακροφάγων κυττάρων που κατέχει αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και προάγει την αγγειογένεση και μειώνουν την κατηγορία των

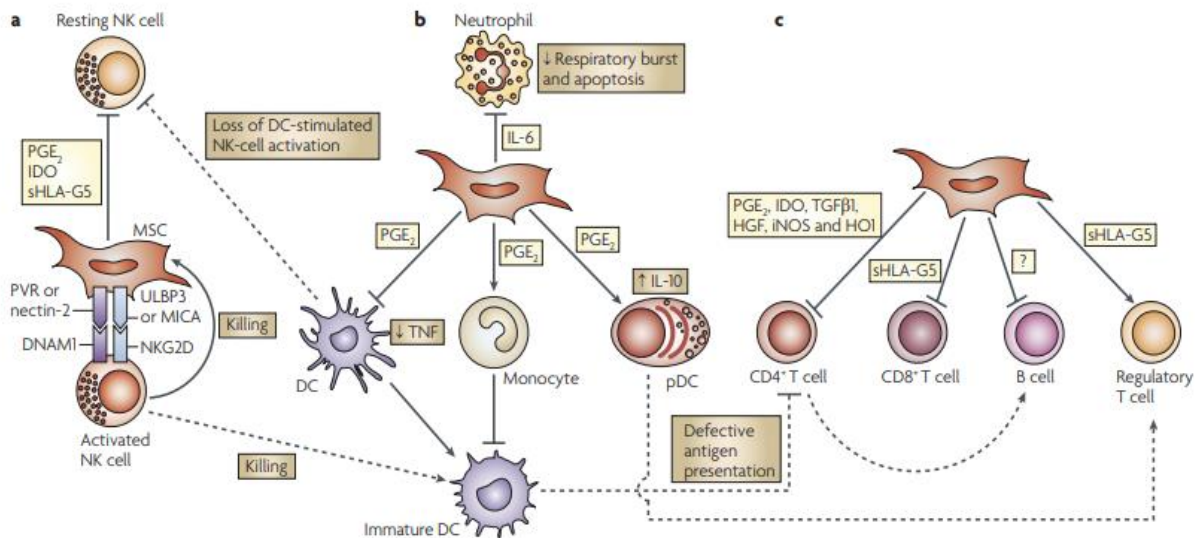
μακροφάγων που είναι προ-φλεγμονώδη και παράγουν IL-1β, TNF- α, και IFN-γ (Lambert M., et al, 2008).



Εικόνα 28. Η ικανότητα των MSCs να αυτοανανεώνονται (καμπύλο βέλος) και να διαφοροποιούνται (ίσια, συμπαγή βέλη) σε κύτταρα μεσοδερμικών γενεαλογιών. Η

αναφερόμενη ιδιότητα να διαφοροποιούνται σε κύτταρα άλλων γενεαλογιών (εξώδερμα και ενδόδερμα) φαίνεται με διακεκομένα βέλη καθώς είναι διαφορεόμενη (Uccelli A., et al, 2008).

Η υπερέφραση του γονιδίου της πρωτεΐνης Akt που συνδέεται με την επιβίωση βρέθηκε ότι σχετίζεται με την έκφραση των παραγόντων VEGF, FGF-2 (παράγοντας αύξησης των ινοβλαστών), HGF (παράγων αύξησης των ηπατοκυττάρων), και του παράγοντα αύξησης ομοιάζων της ινσουλίνης IGF-I που έχουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες. Εξ' ου και σε θρεπτικό μέσο με Akt τα MSCs βρέθηκαν να προστατεύουν από την απόπτωση που οφείλεται στην υποξία και να ενεργοποιούν την συσπαστικότητα σε καρδιομυοκύτταρα ποντικών, ενώ *in vivo* οδήγησαν σε καλύτερευση του μεγέθους του νεκρωμένου ιστού και σε μια γενικότερη βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας (Gnecchi M., et al, 2006). Τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα βρέθηκε ότι εκκρίνουν και μια πληθώρα ακόμα παραγόντων που βοηθούν στην παρακρινή τους δράση, η οποία ούτε λίγο ούτε πολύ φαίνεται να βοηθούν στην καρδιομυογένεση, την αγγειογένεση, την κυτταροπροστασία και την αντιαπόπτωση, έχουν αντιφλεγμονώδη δράση, αποκαθιστούν τη λειτουργική κατάσταση των κυττάρων και ενεργοποιούν τους ενδογενείς αναγεννητικούς παράγοντες. Η παρακρινή τους λειτουργία βέβαια φαίνεται ότι εκδηλώνεται τις πρώτες μέρες μετά τη μεταμοσχευσή τους (<72 ώρες) πράγμα που συναινεί στην πεποίθηση ότι οι βοηθητικές τους λειτουργίες δεν οφείλονται στην διαφοροποίησή τους σε καρδιομυοκύτταρα ή την ενσωμάτωσή τους στον ενδογενή ιστό (Golpanian S., et al, 2016).



Εικόνα 29. Πιθανές αλληλεπιδράσεις των MSCs και των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (ειδικό και μη). α: Τα MSCs εμποδίζουν την αναπαραγωγή και την κυτταροτοξικότητα των NK (natural killer) κυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά *in vitro*. β: Τα MSCs παρεμποδίζουν την διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε ανώριμα δένδριτικά κύτταρα (DCs), μετατρέπουν τα ώριμα DCs σε ανώριμα, παρεμποδίζουν την παραγωγή του παράγοντα νέκρωσης των όγκων (TNF) από τα DCs και αυξάνουν την παραγωγή της ιντερλευκίνης 10 (IL-10) από τα πλασματοειδή DCs (pDCs). Τα ανώριμα DCs είναι ευάλωτα στην εξαφάνιση από τα NK που ενεργοποιούνται από κυτταροκίνες. Τα αποτελέσματα των MSCs στα DCs εμποδίζουν την παρουσίαση του αντιγόνου στα T κύτταρα, τα οποία στη συνέχεια δε μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να δώσουν κλώνους. Τέλος τα MSCs μουδιάζουν την αναπνευστική έκρηξη και παρεμποδίζουν την αυθόρμητη απόπτωση των ουδετερόφιλων μέσω παραγωγής ιντερλευκίνης 6 (IL-6). γ: Η ευθεία παρεμπόδιση της λειτουργίας των CD4⁺ T-κυττάρων οφείλεται στην παραγωγή πολλών υδατοδιαλυτών μορίων από τα MSCs. Η μειωμένη ενεργοποίηση των CD4⁺ T-κυττάρων παρεμποδίζει τη βοηθητική ικανότητά τους στην αναπαραγωγή και την παραγωγή αντισωμάτων από τα B-

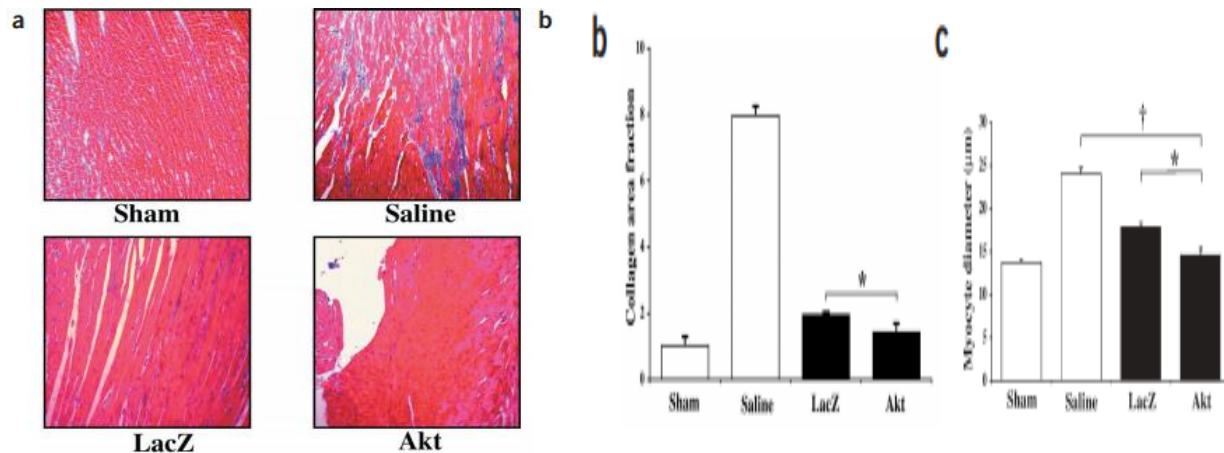
κύτταρα. Επίσης, η παραγωγή IL-10 οδηγεί στην αύξηση της παραγωγής ρυθμιστικών T-κυττάρων. Η παρεμπόδιση της λειτουργίας των B-κυττάρων από τα MSCs φαίνεται να οφείλεται σε υδατοδιαλυτούς παράγοντες και επαφές κυττάρου με κύτταρο, αλλά λίγα είναι γνωστά για τα μόρια αυτά (Uccelli A., et al, 2008).

Σε πείραμα σε μοντέλο αρουραίου με MI εισήγαγαν 7 μέρες μετά την επαγωγή MI ενδομυϊκά αυτόλογα MSCs με φθορίζουσα ουσία σε 8 αρουραίους και μελετήθηκαν έπειτα από 30 μέρες (Davani S., et al, 2003). Οι ανοσοχημικές μελέτες έδειξαν ότι κάποια κύτταρα είχαν πάρει λείο μυϊκό φαινότυπο εκφράζοντας α-ακτίνη ενώ άλλα ενδοθηλιακό φαινότυπο εκφράζοντας τον ειδικό δείκτη των ενδοθηλιακών κυττάρων CD31. Γενικότερα η αγγειακή πυκνότητα στους αρουραίους που πήραν κύτταρα ήταν σημαντικά μεγαλύτερη από αυτούς του control γκρουπ στην εμφραγματική περιοχή, ενώ δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην περιοχή γύρω από το έμφραγμα και η αριστερή τους κοιλία έδειξε σημαντική δομική και λειτουργική βελτίωση, με καλύτερες τιμές LVEF, LVESD, LVEDD και αυξημένη πάχυνση του τοιχώματος. Παρόλα αυτά τα κύτταρα δεν έδειξαν αλληλεπίδραση με τα ενδογενή μέσω έκφρασης κονεξίνης43 ή N-καδερίνης στους χασμοσυνδέσμους.

Σε άλλη μελέτη (Toma C., et al, 2002) σε ποντίκια όπου αυτή τη φορά τα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα ήταν ετερόλογης προέλευσης (ανθρώπινης) σημασμένα με β-γαλακτοζιδάση, ελάχιστα κύτταρα επιβίωσαν μετά τη μεταμόσχευση στα ποντίκια μετά τη πρώτη εβδομάδα και παρουσίασαν μυοκαρδιακά μορφολογικά χαρακτηριστικά, ενώ στις 4 μέρες τα κύτταρα δεν εξέφραζαν δείκτες καρδιομυοκυττάρων. Στην περίοδο της πρώτης εβδομάδας η ανίχνευση των κυττάρων ανοσοχρωστικά με βάση τη β-γαλακτοζιδάση δε διέφερε από την καρδιακή T τροπονίνη. Επίσης τα κύτταρα βρέθηκαν να εκφράζουν α ακτινίνη και φωσφολαμβάνη, μια φωσφοπρωτεΐνη που είναι σημαντική στα καρδιομυοκύτταρα για την διαχείριση του ασβεστίου. Καθώς φαίνεται παρακρινές φαινόμενο λειτουργεί μέσω των MSCs για την επαγωγή του ενδογενούς μυοκαρδιακού πληθυσμού.

Ακόμα μελετήθηκε η επαγωγή του γονιδίου Akt-1 (Mangi A., et al, 2003) που σχετίζεται με την επιβίωση σε ισχαιμικό μοντέλο αρουραίου. Μεσω ρετροϊκής μεταφοράς μεταμόσχευσαν αυτόλογα MSCs γενετικώς τροποποιημένα ώστε να παράγουν σε αφθονία την πρωτεΐνη Akt στο μυοκάρδιο και συνέκριναν τα αποτελέσματα με γκρουπ στο οποίο είχαν μεταφερθεί μόνο MSCs καθώς και ζώα τα οποία δεν είχαν πάρει καθόλου κύτταρα και μελετήθηκαν οι λειτουργικές παράμετροι στις 2 εβδομάδες με ηχοκαρδιογράφημα. Παρατηρήθηκε in vitro 80% μείωση απόπτωσης στα γενετικώς τροποποιημένα κύτταρα μετά από 24 ώρες σε συνθήκες υποξίας σε σχέση με απλά MSCs. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στην αριστερή κοιλία θηλυκών αρουραίων μετά από MI. Το γκρουπ κατέληξε στην διαφοροποίηση των MSCs που ήταν σημασμένα με χρωστική GFP σε καρδιομυοκύτταρα καθώς παρατηρήθηκε ότι εξέφραζαν πρωτεϊνικούς δείκτες καρδιακής τροπονίνης I, ελαφριάς και βαριάς αλυσίδας μυοσίνης των καρδιομυοκυττάρων καθώς και κονεξίνης43 και εξακριβώθηκαν ότι ήταν κύτταρα των δοτών μέσω ανάλυσης του ψ χρωμώματος ενώ παράλληλα αυτά στις 3 εβδομάδες πλέον δεν εξέφραζαν c-kit ή CD90. Το μέγεθος του νεκρωμένου ιστού περιορίστηκε μόνο κατά 3% όταν διπλασιάστηκε η ποσότητα των MSCs (από 9,8% σμίκρυνση στα $2,5 \times 10^5$ κύτταρα στα 12,9% στα 5×10^6 κύτταρα) ενώ στα κύτταρα που ήταν τροποποιημένα για έκφραση Akt ήταν 44,8% μικρότερο από τα ζώα που χρησιμοποιήθηκαν για control ενώ στη διπλάσια ποσότητα σχεδόν αναγεννήθηκε το σύνολο του νεκρωμένου ιστού. Η συστολική λειτουργία της αριστερής κοιλίας μειώθηκε κατά 58% στα ζώα του control, ενώ δεν παρουσιάστηκε βελτίωση στα απλά MSCs αλλά στο γκρουπ της Akt η LVESD παρουσίασε 37% μείωση ενώ στη διπλάσια συγκέντρωση παρομοιάστηκε με τα ζώα που δεν είχαν MI. 2 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση τα ζώα που πήραν γενετικώς τροποποιημένα κύτταρα παρουσίασαν μια τελείως διαφορετική εικόνα όσον αφορά τον ινώδη ιστό του μυοκαρδίου

συγκρινόμενη με την κατάσταση πριν το MI σε αντίθεση με τα ζώα που πήραν MSCs χωρίς Akt που δεν είχαμε την ίδια εικόνα. Ακόμα η Akt φάνηκε να παρεμποδίζει την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας (αύξηση μεγέθους).

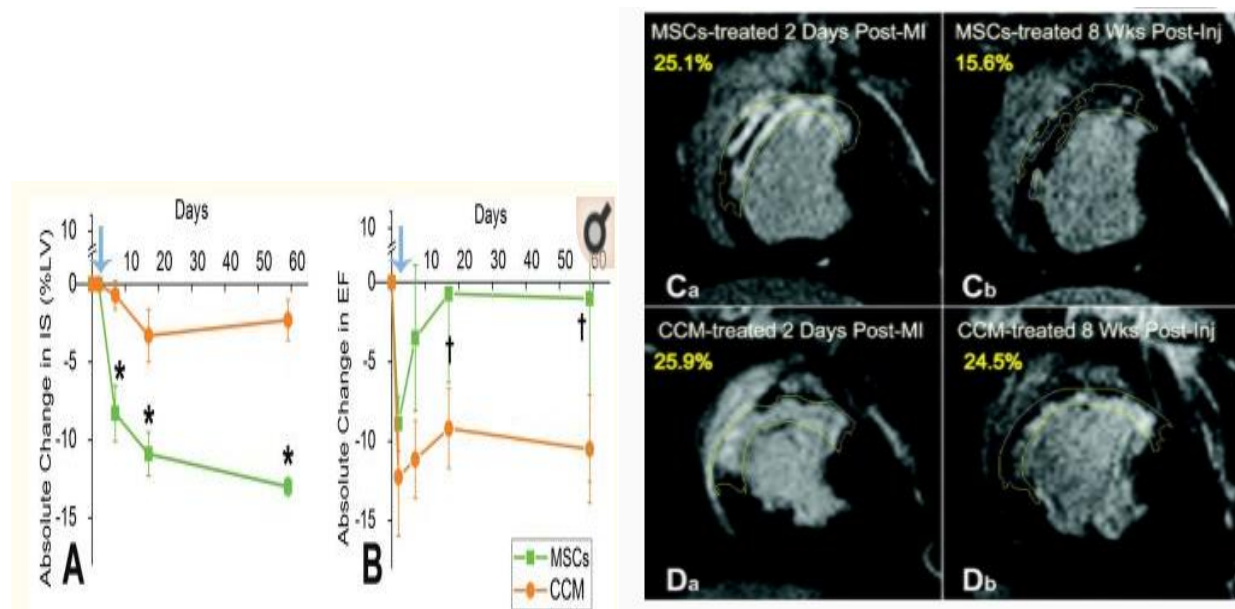


Εικόνα 30. Η μεταμόσχευση MSCs παρεμποδίζει την αναδιαμόρφωση. Α: Η εναπόθεση κολλαγόνου στην καρδιά παρεμποδίστηκε 2 εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση 5×10^6 Akt-MSCs σε σημείο που δύσκολα διαχωρίζονταν από τα φυσιολογικά ζώα. Η εναπόθεση κολλαγόνου ήταν μεγαλύτερη σε ζώα τα οποία δεν είχαν λάβει Akt σε σχέση με αυτά που την είχαν πάρει συμπληρωματικά με τα MSCs. c. Η διάμετρος των καρδιομυοκυττάρων ήταν σημαντικά μικρότερη σε τομές ζώων που είχαν λάβει 5×10^6 Akt-MSCs σε σημείο που δε διέφερε σημαντικά από τα φυσιολογικά ζώα. Η διάμετρος των καρδιομυοκυττάρων ήταν μεγαλύτερη στα LacZ-MSCs ζώα σε σύγκριση με τα Akt-MSCs (Mangi A., et al, 2003).

Τα προηγούμενα ενθαρυντικά αποτελέσματα οδήγησαν ομάδες να περάσουν σε μελέτες MSCs σε μεγαλύτερα ζώα (Hashemi S., et al, 2008). Έτσι, μεταμοσχεύθηκαν σε 32 γουρούνια μέσω της ενδομυϊκής οδού αλλογενή MSCs χωρισμένα σε 3 γκρουπ αυξανόμενων συγκεντρώσεων ($2.4 \cdot 10^7$, $2.4 \cdot 10^8$, $4.4 \cdot 10^8$ κύτταρα) μετά από επαγωγή MI και χωρίς να παρατηρηθούν θέματα ασφαλείας με τα κύτταρα, τα ζώα θυσιάστηκαν στις 12 εβδομάδες, όπου μέσω μαγνητικής τομογραφίας παρατηρήθηκε ότι αυτά που είχαν λάβει τα κύτταρα μείωσαν το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού σημαντικά, χωρίς όμως να υπάρχει δόσο-εξαρτώμενο αποτέλεσμα, ενώ αντίθετα τα ζώα του control το αύξησαν. Τα λειτουργικά αποτελέσματα από την άλλη μεριά όπως το LVEF, ο LVESV και LVEDV δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές από τα control, αν και βελτιώθηκαν στα ζώα που πήραν τα κύτταρα με μεγαλύτερη βελτίωση σε αυτά με τη μεγαλύτερη δόση. Δεν παρατηρήθηκαν κοιλιακές ή θανατηφόρες ταχυκαρδίες στα γουρούνια και η αγγειακή πυκνότητα ήταν αυξημένη στον εμφραγματικό ιστό αλλά και στα όριά του. Ιστολογική έρευνα έδειξε ότι δεν παρουσιάστηκε συγχώνευση των MSCs στον περιβάλλοντα ιστό. Δεν παρατηρήθηκαν αρνητικές παρενέργειες με τη μεταμόσχευση ή παραιτέρω ζημιά στο μυοκαρδιακό περιβάλλον, αν και υπήρχαν εστίες φλεγμονής που πιθανόν σχετίζονται με τον τρόπο μεταφοράς.

Αλλογενή MSCs μεταφέρθηκαν σε 31 γουρούνια (Hatzistergos K., et al, 2010) αλλά αυτή τη φορά ενδοκαρδιακά μετά από πρόκληση MI και 8 εβδομάδες μετά παρατηρήθηκε μια μείωση του εμφραγματικού ιστού σε σχέση με την αριστερή κοιλία κατά 8,3% τις πρώτες 4 μέρες και έφτασε στο 10,9% στις 8 εβδομάδες, ενώ αντίστοιχα τα ζώα που έλαβαν θρεπτικό μέσο διατήρησαν σταθερό το μέγεθος του εμφράγματος στις 4 μέρες και το αύξησαν ελάχιστα στις 8 εβδομάδες. Επίσης το LVEF παρουσιάστηκε σημαντικά αυξημένο στις 2 εβδομάδες (8% σε σχέση με το θρεπτικό μέσο) μετά τη

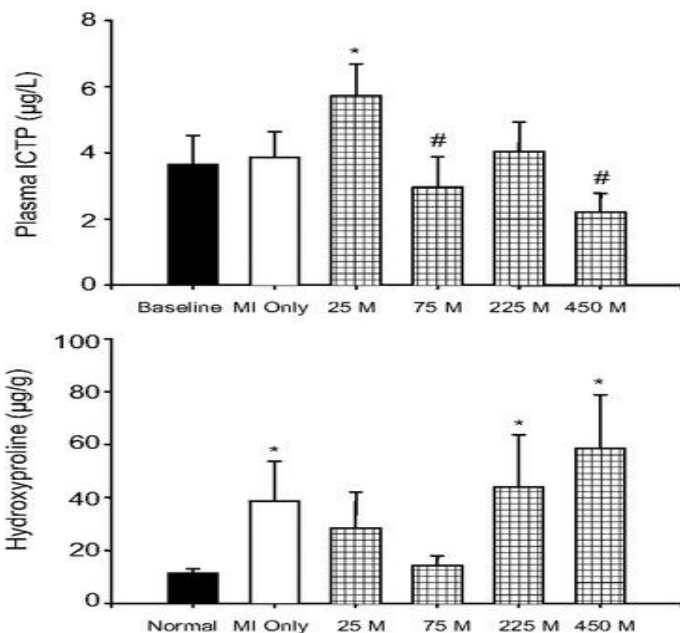
μεταμόσχευση και η αύξηση αυτή επέμεινε για 8 εβδομάδες όπου ήταν 6,2% πάνω από το επίπεδο του θρεπτικού μέσου και πλησίαζε τα επίπεδα που βρισκόταν στην αρχή του πειράματος, ο όγκος παλμού στις 8 εβδομάδες ήταν 3 mL υψηλότερος στα ζώα που πήραν τα κύτταρα και η συσπαστικότητα του τοιχώματος παρουσιάστηκε σημαντικά βελτιωμένη. Παρόλα αυτά ο LVESV και ο LVEDV παρουσίασαν μια αντίστροφη σχέση, αφού στις 2 εβδομάδες παρουσιάστηκαν 4 και 2 mL μειωμένοι στο γκρουπ που πήρε τα κύτταρα αντίστοιχα, ενώ στις 8 εβδομάδες παρουσιάστηκαν 2,2 και 6 mL αντίστοιχα υψηλότεροι στο γκρουπ των MSCs από αυτό του θρεπτικού μέσου. Αυτά δείχνουν μια δομική και λειτουργική βελτίωση της καρδιάς των ζώων που πήραν τα κύτταρα αλλά μια ανάστροφη αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας που μακροπρόθεσμα τείνει να αυξηθεί σε όγκο. Τα MSCs δείγματα σε σχέση με τα control παρουσίασαν στις 2 εβδομάδες μια αύξηση 20 φορές των ενδογενών κυττάρων c-kit⁺ καθώς και μια αύξηση 6 φορές στα GATA-4⁺ αλλά και μια αύξηση 4 φορές στα μυοκαρδιοκύτταρα που βρισκόταν σε διαδικασία μείωσης (μέσω της ανίχνευσης της φωσφο-H3 ιστόνης) σε σχέση με τα control ζώα. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση της κονεξίνης43 στα νέα καρδιομυοκύτταρα στους χασμοσυνδέσμους μόνο στην περιοχή του εμφράγματος. Έπειτα στις 8 εβδομάδες τα επίπεδα των ενδογενών CPCs επανήλθαν στο φυσιολογικό και δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των γκρουπ. Τα αποτελέσματα επαληθεύτηκαν in vitro όπου παρατηρήθηκε ότι συγκαλλιέργεια καρδιακών προγονικών κυττάρων και μεσεγχυματικών βλαστικών κυττάρων οδηγούσε σε ενεργοποίηση των πρώτων από τα δεύτερα, μετατροπή σε κύτταρα που εξέφραζαν του παράγοντες Nkx2.5, GATA-4 και τροπονίνη-I καθώς και κονεξίνη43 μεταξύ των κυττάρων της καλλιέργειας όπως έδειξαν ιστοχημικές μελέτες μέσω ανοσοφθορισμού με GFP των μεσεγχυματικών κυττάρων. Σαν συμπέρασμα δόθηκε η ενεργοποίηση προσωρινά των ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων από τα μεταμοσχευμένα MSCs, αν και κρίθηκε ότι το παρακρινές φαινόμενο από μόνο του δεν είναι τόσο ισχυρό όσο η διαρκής παρουσία και έκκριση παραγόντων με τη συγχώνευση των MSCs.



Εικόνα 31. (A, B) Μέσω μαγνητικής τομογραφίας φαίνεται ότι μέσω ενδοκαρδιακής μεταφοράς MSCs αλλά όχι και control οδηγεί τις καρδιάς των ζώων να μειώσουν μέχρι και ~50% το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού IS (A) και να αποκαταστήσουν το EF (B) προς το φυσιολογικό επίπεδο. (C, D) Αντιπροσωπευτικές εικόνες MSCs σε πολύ υψηλή ανάλυση (C a, b) και control (D a, b) 8 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση. Το μέγεθος του εμφράγματος (κίτρινη γραμμή) μειώνεται από τα MSCs αλλά όχι από το control (Hatzistergos K., et al, 2010).

Ενδοκαρδιακά μεταφέρθηκαν με καθετήρα αλλογενή MSCs σε 6 χοίρους (Quevedo H., et al, 2010) σε χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια 12 εβδομάδες μετά την πρόκληση MI, χρησιμοποιώντας άλλους 4 για control γκρουπ και τα ζώα θυσιάστηκαν 3 μήνες μετά ώστε να μελετηθούν μέσω μαγνητικής τομογραφίας τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της καρδιάς τους και μέσω ανάλυσης του ψ χρομοσώματος η μοίρα των μεταμοσχευμένων κυττάρων. Το γκρουπ απέδωσε την παρουσία κυττάρων που εξέφραζαν του παράγοντες GATA-4, Nkx.2.5, καρδιακή τροπομοσίνη και σαρκομερική ακτινίνη σε συγχώνευση των κυττάρων στον καρδιακό ιστό και διαφοροποίησή τους σε καρδιομυοκύτταρα , αντί για ενεργοποίηση των ενδογενών καρδιομυοκυττάρων μέσω παρακρινούς φαινομένου βασιζόμενο σε ανάλυση ψ χρομοσώματος, νανομόρια και φθορίζουσες ουσίες. Τα κύτταρα αυτά παρουσίασαν ακόμα κονεξίνη43 στις συνδέσεις τους με τα ενδογενή καρδιομυοκύτταρα. Το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού μειώθηκε από 19.3% σε 13.9%, και το EF αυξήθηκε από 35.0% στα 41.35% στα ζώα που πήραν τα μεσεγχυματικά κύτταρα αλλά όχι στα control. Η αναδιαμόρφωση της κοιλίας αναστάληκε, η αγγειακή δομή καλυτέρευσε με παρουσία ενδοθηλιακών παραγόντων, η συσταλτική λειτουργία της αριστερής κοιλίας βελτιώθηκε και το πάχος του τοιχώματος της καρδιάς αυξήθηκε στα ζώα που έλαβαν τα MSCs κυρίως στα όρια του εμφραγματικού ιστού.

Περίπου τα ίδια παρατηρήθηκαν και σε πρόβατα (Dixon J., et al, 2009) με ενδομυϊκή μεταφορά αλλογενών MPCs σε 46 ζώα μια ώρα αφού είχε επαχθεί MI. Τα ζώα χωρίστηκαν σε 5 γκρουπ με διαφορετικές συγκεντρώσεις μεταφερόμενων κυττάρων 25×10^6 (25 M, n=7), 75×10^6 (75 M, n=7), 225×10^6 (225 M, n=10), 450×10^6 (450 M, n=8) και control group. Οι λειτουργικές μελέτες της καρδιάς μετά από 8 εβδομάδες έδειξαν μέσω ηχοκαρδιογράμματος ότι το μήκος του εμφραγματικού ιστού μειώθηκε με δόσοεξαρτώμενο τρόπο στα ζώα, ενώ το κλάσμα εξώθησης μειώθηκε σε σχέση πριν το MI αλλά αυξήθηκε σε σχέση με τα control ζώα (με μεγαλύτερη αύξηση στις 2 μικρότερες συγκεντρώσεις) και ο LVEDV ακολούθησε μια ανάστροφη πορεία με τη μεγαλύτερη μείωση να είναι στις 2 μικρότερες συγκεντρώσεις μεταφερόμενων MPCs. Ακόμα οι αναλύσεις του ψ χρομοσώματος έδειξαν παρουσία των κυττάρων που μεταμοσχεύθηκαν στα ζώα στη μια ώρα αλλά απέτυχαν να ανιχνεύσουν κύτταρα στις 8 εβδομάδες. Η αποδόμηση του ουλώδους ιστού ήταν μεγαλύτερη στις 2 μικρότερες συγκεντρώσεις και μάλιστα στα 75×10^6 κύτταρα σε επίπεδο πολύ κοντά στα ζώα πριν το MI. Το συμπέρασμα από αυτά είναι η λειτουργική και δομική καλυτέρευση των ζώων που λαμβάνουν MPCs αλλά μέχρι κάποια συγκεκριμένη συγκέντρωση κυττάρων, παρουσιάζοντας έτσι τη έννοια του ορίου



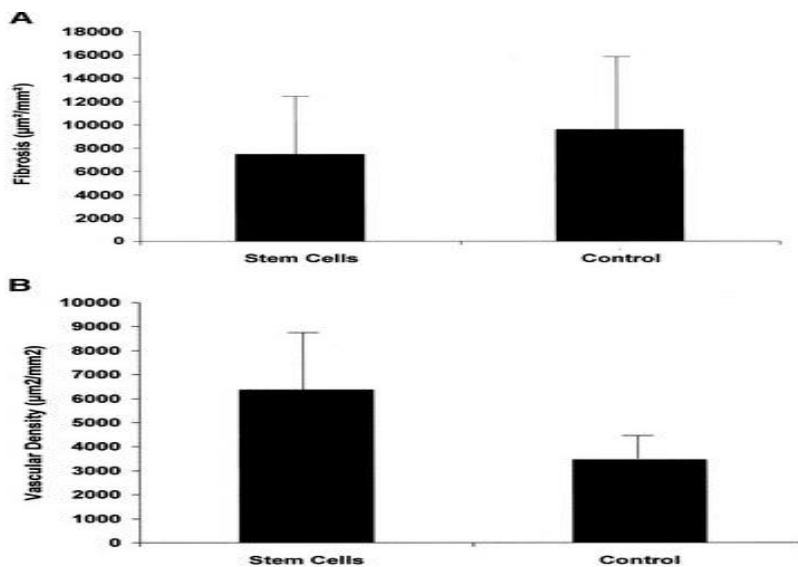
κυττάρων εως την οποία αυτά μπορούν να έχουν βοηθητικό αποτέλεσμα για τον οργανισμό. Σαν παραιτέρω συμπέρασμα η ομάδα κατέληξε ότι σε μεγάλες συγκεντρώσεις MPCs αυξάνονται οι μεταβολικές απαιτήσεις, οδηγώντας σε φλεγμονικές περιοχές και καθυστερώντας την ανάπτυξη των καρδιομυοκυττάρων του περιβάλλοντος.

Εικόνα 32. Επάνω: Αποδόμηση του κολλαγόνου μετράται από τα επίπεδα πλάσματος στις 8 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση (φαίνονται οι συγκεντρώσεις

των MPCs). Κάτω: Επίπεδα κολλαγόνου στην περιοχή του ορίου του εμφράγματος μετράται μέσω υδροξυπρολίνης στις 8 εβδομάδες στις διάφορες συγκεντρώσεις των MPCs. Οι τιμές περιλαμβάνουν μέση τιμή και τυπική απόκλιση (Dixon J., et al, 2009).

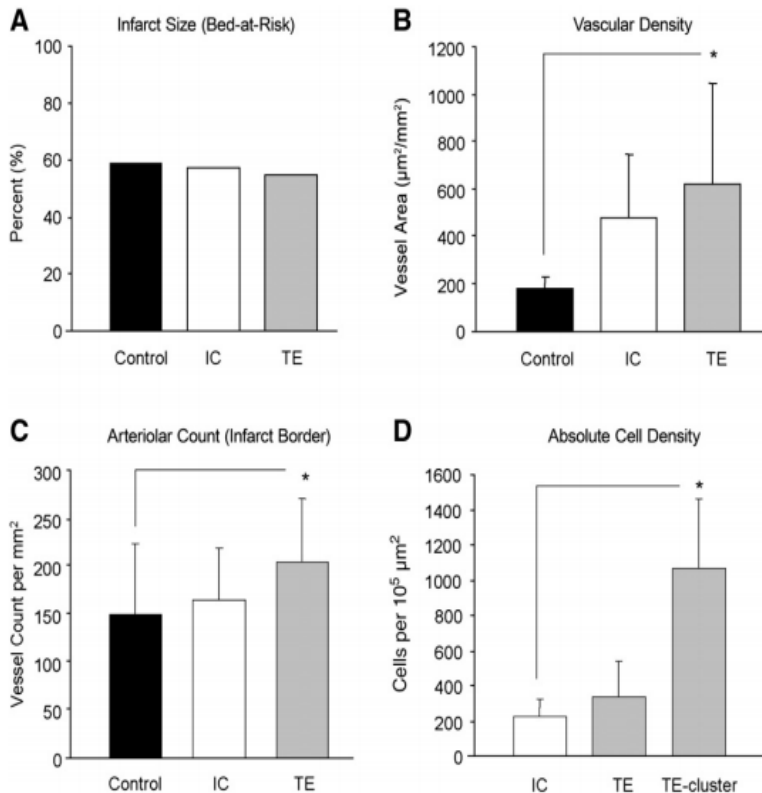
Τα αποτελέσματα επαναλήφθηκαν (Hamamoto H., et al, 2009) όπου MPCs μεταφέρθηκαν σε 46 πρόβατα 1 ώρα έπειτα από την πρόκληση MI σε γκρουπ αυξανόμενων συγκεντρώσεων 25, 75, 225, or 450×10^6 κυττάρων και με ηχοκαρδιογράφημα και ιστοχημικές αναλύσεις εκτιμήθηκαν οι λειτουργικές τιμές και η αγγειακή πυκνότητα αντίστοιχα των ζώων στις 4 και 8 εβδομάδες. Τα κύτταρα επιβίωσαν κατά κύριο λόγο και οι θάνατοι που παρατηρήθηκαν σε κάποια υποκείμενα οφειλόταν πιθανότατα σε αρρυθμίες, χωρίς να υπάρχει τελική εκτίμηση. Οι όγκοι LVEDV και LVESV μειώθηκαν στα δυο γκρουπ χαμηλότερης συγκέντρωσης κυττάρων στις 8 εβδομάδες σε σχέση με τα control έχοντας πολύ κοντινές τιμές στα δυο γκρουπ (23 και 24 mL για τον τελοδιαστολικό όγκο και 30 και 30,5 mL για τον τελοσυστολικό όγκο), ενώ στο γκρουπ των 225M ο LVESV είχε αισθητή βελτίωση σε σχέση με το control αλλά μικρότερη από τα προηγούμενα γκρουπ αλλά ο LVEDV δε παρουσίασε σημαντική διαφορά. Τέλος στο γκρουπ της μεγαλύτερης συγκέντρωσης δε παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές στις παραπάνω τιμές. Το EF βελτιώθηκε σε σχέση με τα control σε όλες τις ομάδες κυττάρων παρουσιάζοντα την καλύτερη εικόνα στο γκρουπ των 75M στις 4 εβδομάδες, ενώ στα γκρουπ των μεγαλύτερων συγκεντρώσεων η εικόνα ήταν χειρότερη, και στις 8 εβδομάδες το κλάσμα εξώθησης είχε πάλι εξασθενήσει σε όλα τα γκρουπ. Το μέγεθος του ουλώδους ιστού παρουσίασε βελτίωση στα ζώα με λιγότερο σημαντική βελτίωση στο 450 M γκρουπ με μια ανάστροφη δόσοεξαρτώμενη καλύτερευση στις 8 εβδομάδες μετά το MI. Η αγγειακή εικόνα δείχνει μια αύξηση στα 25 και 75M γκρουπ σε σχέση με τα control η οποία οφειλόταν κυρίως σε αρτηριόλια και μικρές μυώδεις αρτηρίες ενώ μέσω PCR ανάλυσης δεν ανιχνεύθηκε η παρουσία των μεταμοσχευμένων κυττάρων τόσο στις 4 όσο και στις 8 εβδομάδες αλλά η ανίχνευση ήταν επιτυχής την 1^η ώρα μετά την μεταμόσχευση.

Σε ζωικό μοντέλο σκύλου (Ober J., et al, 2005) μελετήθηκε η ενδομυϊκή μεταμόσχευση MSCs σε 12 υποκείμενα με χρόνια ισχαιμία χωρισμένα σε 2 γκρουπ των 6 το πρώτο εκ των οποίων έλαβε 100×10^6 κύτταρα και το άλλο μόνο αλατούχο διάλυμα και μέσω ηχοκαρδιογραφήματος και ιστοχημικών μελετών εκτιμήθηκαν οι λειτουργικές τιμές των ζώων και δείκτες έκφρασης αντίστοιχα στις 30 και 60 μέρες μετά την τοποθέτηση σφινγκτήρα. Δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές σχετικές με τη θεραπεία αλλά και κοιλιακές ταχυκαρδίες στα ζώα και το κλάσμα εξώθησης παρουσίασε 5% αύξηση στο γκρουπ των MSCs ενώ στο control υπήρχε μείωση κατά 9% 30 μέρες μετά τη μεταμόσχευση, που θεωρήθηκε σημαντικό. Οι ιστολογικές μελέτες που αφορούσαν την καρδιακή τροπονίνη I έδειξαν σαφή αύξηση μέχρι και τις 48 ώρες μετά τη μεταμόσχευση και έπειτα μειώθηκαν σταδιακά. Τα ζώα που έλαβαν κύτταρα παρουσίασαν επίσης μια τάση προς μείωση της ίνωσης που δεν έφτασε σε σημαντικά επίπεδα και πάχυνση του μυοκαρδίου σε περιοχές όπου παρατηρήθηκε έκφραση της α-ακτινίνης των λειών μυών μαζί με αύξηση της αγγειακής πυκνότητας ($6378 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ έναντι $3445 \pm 667 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$), που αποδώθηκε σε διαφοροποίηση των MSCs σε ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα, αλλά όχι σε καρδιομυϊκά κύτταρα.



Εικόνα 33. A: Ίνωση μετρημένη στις 2 πλευρές των τοιχωμάτων ζώων που έλαβαν MSCs και control ζώων. Υπήρξε τάση προς μείωση στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα που δεν έφτασε όμως σε σημαντικό στατιστικό επίπεδο. B: Η αγγειακή πυκνότητα ήταν σημαντικά βελτιωμένη στα τοιχώματα των ζώων που έλαβαν τα MSCs σε σχέση με τα control (Ober J., et al, 2005).

Ακόμη μια μελέτη (Perin E., et al, 2008) που επιστράτευσε τις ίδιες τεχνικές και τον ίδιο αριθμό μεταμοσχεύσιμων αλλογενών (σε AMI μοντέλο σκύλου) MSCs συνέκρινε σε 19 υποκείμενα μετά την πρόκληση MI την ενδοκαρδιακή (TE) και ενδοαρτηριακή (IC) οδό μεταφοράς κυττάρων. Την μέρα 21 παρατηρήθηκαν παρόμοια μεγέθη ουλώδους ιστού στα τρία γκρουπ. Το LVEF ήταν μεγαλύτερο στα TE ζώα και πλησίαζε στην κατάσταση πριν το MI σε σχέση με τα άλλα δυο γκρουπ που οι αλλαγές ήταν ελάχιστα μεγαλύτερες από την αρχή του πειράματος (13% αύξηση του TE σε σχέση με το control), πράγμα το οποίο ίσχυε και για τις τελοδιαστολικές και τελοσυστολικές διαστάσεις που παρουσίασαν σημαντική μείωση μόνο στο TE γκρουπ κατά 0,5 cm σε σχέση με το IC γκρουπ. Επίσης η αγγειακή πυκνότητα ήταν σημαντικά αυξημένη στα TE ζώα που όπως αποδείχθηκε οφειλόταν στην αύξηση κυρίως των αρτηριολίων στα όρια του εμφραγματικού ιστού. Ακόμα, η ενδοκαρδιακή μεταμόσχευση κυττάρων φαίνεται να οδήγησε στην αυξημένη πυκνότητα κυττάρων κυρίως στα όρια του εμφραγματικού ιστού, αλλά και στην παρουσία συμπλεγμάτων κυττάρων προς το κέντρο του εμφράγματος, καθώς και στον φυσιολογικό ιστό, κάτι που δεν ίσχυε για τα IC κύτταρα που παρέμειναν στα όρια του εμφράγματος και σταδιακά μειώθηκαν. Στα TE ζώα θεωρήθηκε ότι πιθανότατα τα συμπλέγματα κυττάρων να μην οφειλόταν σε μετανάστευση των MSCs αλλά σε ενεργοποίηση ενδογενών καρδιακών προγονικών κυττάρων καθώς τα μοτίβα των συμπλεγμάτων αυτών ομοιάζαν με μοτίβα συμπλεγμάτων που ενέθηκαν στην περιοχή του εμφράγματος και όχι του ορίου του.



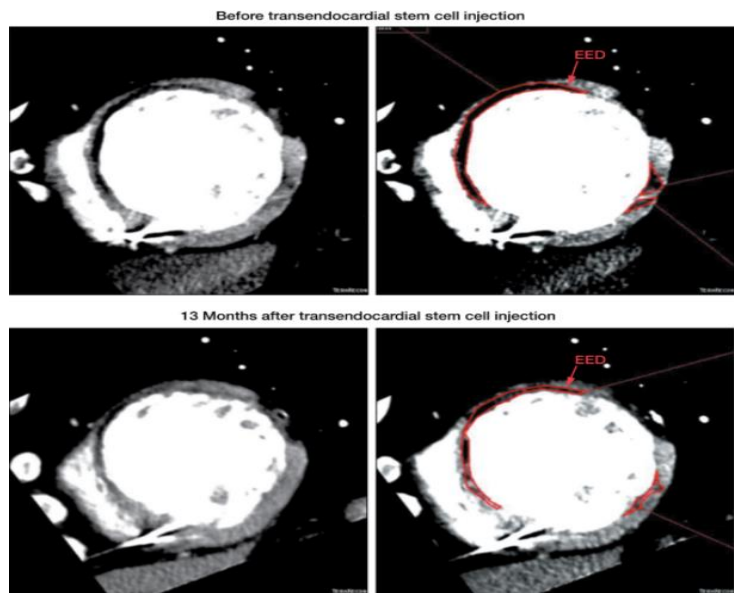
Εικόνα 34. (A) Σύγκριση του μεγέθους του εμφραγματικού ιστού. (B) Η αγγειακή πυκνότητα στα ζώα που έλαβαν MSCs μέσω της ενδοκαρδιακής οδού ήταν πιο βελτιωμένη από αυτή της ενδοστεφανιαίας μεταμόσχευσης όσο και από το control και έφτασε σημαντικά στατιστικά επίπεδα (C) ίδια και η εικόνα της μέτρησης των αρτηριολίων στα όρια του εμφραγματικού ιστού (D) Η πυκνότητα των κυττάρων στα όρια του εμφράγματος ήταν μεγαλύτερη στα ζώα που πήραν κύτταρα μέσω της ενδοκαρδιακής οδού και σε αυτήν τα κύτταρα μετανάστευσαν και στο εσωτερικό του εμφράγματος σχηματίζοντας συμπλέγματα, TE=ενδοκαρδιακή, IC=ενδοστεφανιαία (Perin E., et al, 2008).

Μεταβαίνοντας στον άνθρωπο, οι περισσότερες μελέτες που περιλαμβάνουν MSCs έχουν γίνει ενδοκαρδιακά είτε ενδομυϊκά αν και υπάρχουν και περιπτώσεις μεταμόσχευσης ενδοφλεβίως.

Αλλογενή κύτταρα μεταμοσχεύθηκαν (Hare J., et al, 2009) MSC ενδοφλεβίως σε 53 ασθενείς με οι οποίοι είχαν υποστεί MI. Η χορήγηση ήταν δόσοεξαρτώμενη χρησιμοποιώντας 0,5, 1,6, και 5 εκατομμύρια κύτταρα και το λειτουργικό αποτέλεσμα ελέγχθηκε στους 6 μήνες με ηχοκαρδιογράφημα και μαγνητική τομογραφία. Τα δυσμενή σοβαρά αποτελέσματα που προέκυψαν ήταν παρόμοια σε αριθμό στους ασθενείς που είχαν λάβει κύτταρα και στο placebo και δεν παρατηρήθηκαν έκτοποι σχηματισμοί ιστών, ενώ οι αρρυθμίες ήταν 4 φορές λιγότερες στους ασθενείς που πήραν MSCs, όπως μειωμένες ήταν και οι κοιλιακές ταχυκαρδίες. Το LVEF στους ασθενείς που έλαβαν κύτταρα παρουσίασε αύξηση 5,9% στους τρεις μήνες σε σχέση με το placebo που είχε 4,4% αλλά στους 6 μήνες τα δυο γκρουπ είχαν την ίδια αύξηση 6,7% από την αρχή του πειράματος. Παρόλα αυτά η λέπτυνση του κοιλιακού τοιχώματος και οι αφύσικες κινήσεις του τοιχώματος επέμειναν στους ασθενείς που έλαβαν MSCs. Η απόδοση των ασθενών στο εξάλεπτο τεστ περπατήματος ήταν παρόμοια στα 2 γκρουπ. Σε μια υπομελέτη 20 ατόμων που έλαβαν κύτταρα και 14 placebo με μαγνητική τομογραφία, παρατηρήθηκε αύξηση του κλάσματος εξώθησης στους 3 μήνες η οποία επένεινε στους 12 μήνες αλλά μόνο στους MSC ασθενείς. Το ίδιο και με την αναδιαμόρφωση της κοιλίας, ο LVEDV δεν αυξήθηκε στους 20 ασθενείς και ο LVESV μειώθηκε, όταν οι διαστάσεις της αριστερής κοιλίας στους 14 ασθενείς μεγάλωσαν. Καμία από τις προαναφερθείσες τιμές δεν εξαρτήθηκε ποσοτικά από τις διακυμάνσεις της δοσολογίας των MSCs στους χορηγούμενους ασθενείς.

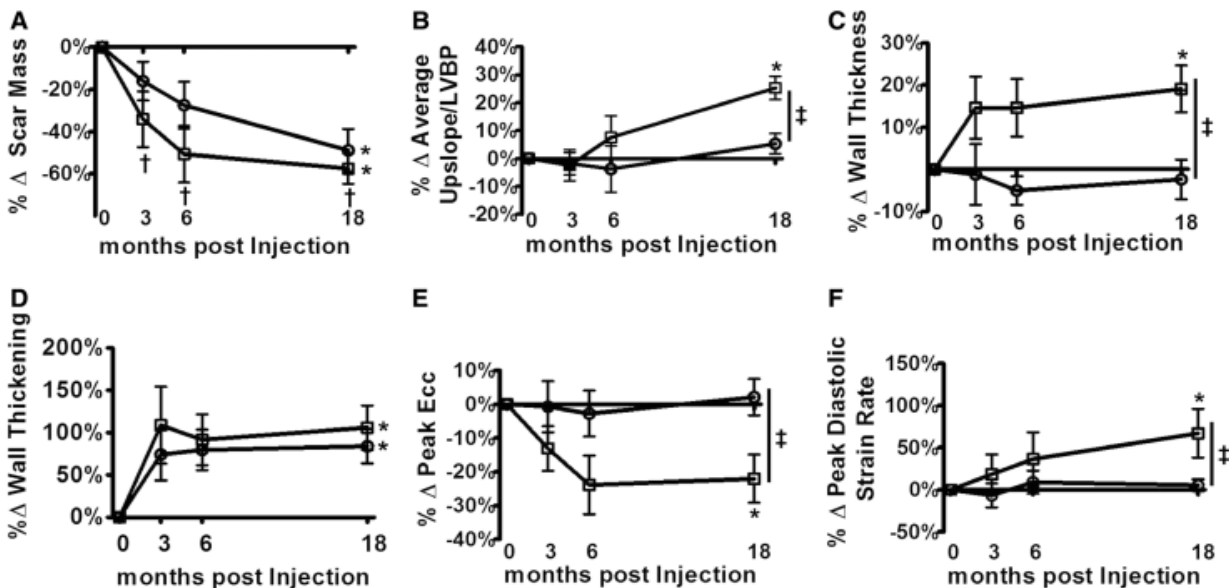
Προσπάθεια έγινε να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα των αλλογενών MSCs (POSEIDON TRIAL) (Hare M., et al, 2012) σε σχέση με τα αυτόλογα σε ασθενείς με δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και LVEF<50% λόγω προηγμένου MI, μεταμοσχεύοντας σε 30 υποκείμενα 20 εκατομμύρια, 100 εκατομμύρια και 200 εκατομμύρια κύτταρα ανά τύπο κυττάρου (5 ασθενείς σε κάθε γκρουπ), ενδοκαρδιακά σε 10 θέσεις στην αριστερή κοιλία. Τα αποτελέσματα εκτιμήθηκαν 30 ημέρες μετά τον καθετηριασμό με τις μεθόδους να περιλαμβάνουν σκανάρισμα της καρδιάς για τις λειτουργικές παραμέτρους. Το πείραμα δεν περιλάμβανε κάποιο control group εκτός από τα προαναφερθέντα. Όσον αφορά τα σοβαρά δυσμενή αποτελέσματα της μεθόδου στους ασθενείς, στις 30 μέρες 1 ασθενής από κάθε γκρουπ παρουσίασε καρδιακή ανεπάρκεια, ενώ στο 1 έτος το 33% στα αλλογενή και 53% στα αυτόλογα γκρουπ παρουσίασαν δυσμενή αποτελέσματα. Κοιλιακές ταχυκαρδίες δεν παρουσιάστηκαν στα αλλογενή γκρουπ σε αντίθεση με τα αυτόλογα που όπου 4 ασθενείς είχαν κοιλιακές ταχυκαρδίες, ενώ δεν παρατηρήθηκαν έκτοποι σχηματισμοί ιστών. Οι ασθενείς που πήραν αυτόλογα κύτταρα βελτίωσαν την απόσταση που διένυαν σε ένα βλεπτο περπάτημα για 48.0 m στους 6 μήνες και 65.8 m στους 12, ενώ η αντίστοιχες αποστάσεις για τα αλλογενή ήταν 0.7 στους 6 μήνες και 19.7 m στους 12, που δεν θεωρήθηκαν σημαντικές. Όλοι οι ασθενείς παρουσίασαν μια παρόμοια μείωση στο EED (μεταβλητή που δείχνει το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού) κατά μέσο όρο 33.21%, χωρίς να παρατηρούνται σοβαρές αποκλίσεις στα δυο είδη κυττάρων, η οποία μάλιστα ήταν μεγαλύτερη στους ασθενείς που είχαν μεγαλύτερο μέγεθος ουλώδους ιστού στην αρχή του πειράματος. Ο LVESV και ο LVEDV μειώθηκαν και στα 2 γκουπ με την δεύτερη μεταβλητή να φτάνει σημαντικότητα μόνο στα αλλογενή γκρουπ και το LVEF αυξήθηκε κατά 1,96% που δε θεωρήθηκε σημαντικό, ενώ η μάζα της αριστερής κοιλίας αυξήθηκε και όλα αυτά δε διέφεραν πολύ μεταξύ των γκρουπ. Το κλάσμα εξώθησης, οι όγκοι στο τέλος του πειράματος αλλά και η μείωση του εμφραγματικού ιστού ήταν περισσότερο έντονες στα γκρουπ των 20 εκατομμυρίων κυττάρων παρουσιάζοντας αντίστροφη δοσοεξαρτώμενη σχέση και χωρίς αυτό να μπορεί να αποδωθεί στο μέγεθος του εμφραγματικού ιστού ή του κλάσματος εξώθησης στην αρχή του πειράματος. Τέλος οι ασθενείς που έλαβαν τα αλλογενή

MSCs δεν παρουσίασαν κάποια ανοσολογική απόκριση όπως έδειξε η έλλειψη αντισωμάτων .



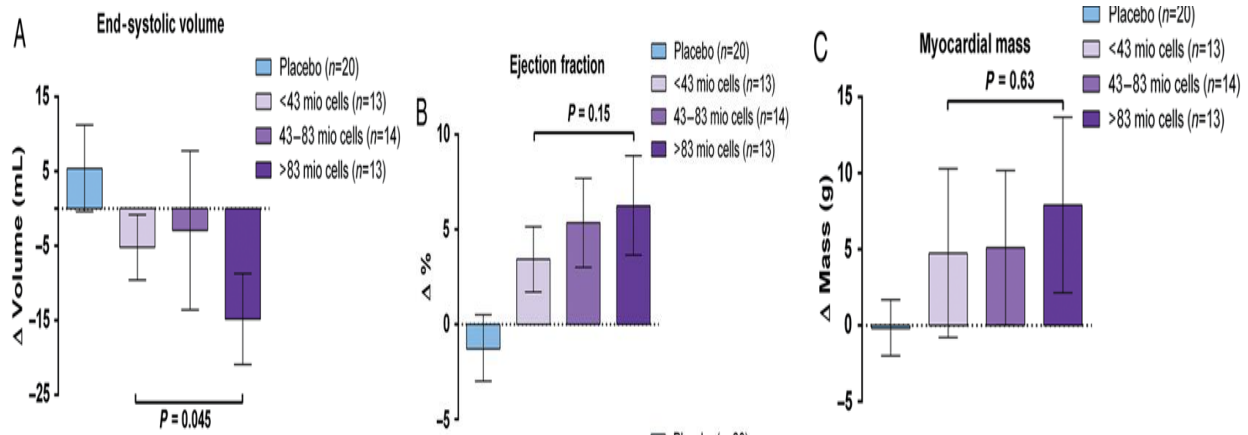
Εικόνα 35. Πάνω: Περιοχή του εμφράγματος μέσω τομογραφίας στη βάση του πειράματος για χαρακτηριστικό ασθενή με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια (EED total, 40.34 g). Κάτω:, 13 μήνες έπειτα από ενδοκαρδιακή μεταφορά αλλογενών MSCs (100 εκατομμύρια κύτταρα). Υπήρξε μια μείωση της τάξης του 34.68% στον εμφραγματικό ιστό (26.35 g). Η μείωση αυτή συνοδεύτηκε από μείωση του LVEDV από τα 433.68 mL στα 365.81 mL, μείωση του LVESV από τα 371.83 mL στα 277.38 mL και αύξηση του LVEF από το 14.26% στο 24.17% (Hare M., et al, 2012).

Έτσι, το 2014 (Karantalis V., et al, 2014) επιχειρήθηκε στην μεταμόσχευση αυτόλογων MSCs σε 6 ασθενείς με χρόνια δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας παρεπόμενη ενός MI (PROMETHEUS TRIAL). Οι ασθενείς έλαβαν ενδομυϊκά (μέσος όρος ενέσιμων δόσεων=10), είτε 1 εκατομμύρια (2 ασθενείς), είτε 20 εκατομμύρια (4 ασθενείς) κύτταρα και τα δομικά και λειτουργικά αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με μαγνητική τομογραφία στους 3, 6 και 18 μήνες μετά τη μεταμόσχευση. Στους 18 μήνες τα αποτελέσματα έδειξαν αύξηση του LVEF κατά 10% με ανάλογη μείωση της μάζας του εμφραγματικού ιστού κατά 9 g που αντιστοιχεί σε ποσοστό 47,5%, συνοδευόμενη από αύξηση της μάζας του λειτουργικού ιστού κατά 30% (33g), ενώ εκφραζόμενο ως σύνολο της μάζας της αριστερής κοιλίας το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού μειώθηκε κατά 10%. Παρόλα αυτά παρουσιάστηκε μια αύξηση στον LVEDV της τάξης των 30 ml και ο LVESV δεν παρουσίασε πολύ καλύτερη εικόνα, καθώς μειώθηκε μόνο 4 ml στους 18 μήνες συγκρινόμενος με την αρχή του πειράματος. Σε παραιτέρω πείραμα αναλύθηκαν από 6 ασθενείς 384 τμήματα μυοκαρδιακού ιστού στα οποία είχαν ενεθεί είτε MSCs (n=12, 1 γκρουπ) , είτε είχαν υποστεί επαναγγείωση (n=63, 2^ο γκρουπ), από τα οποία διαχωρίστηκαν 16 τα οποία ήταν κοντά σε τμήματα που είχαν δεχθεί κύτταρα και 47 τα οποία ήταν μακριά από αυτά, και τμήματα τα οποία δεν είχαν δεχθεί κάποια θεραπεία (n=8, 3^ο γκρουπ) . Σε αυτά στο 1^ο και 2^ο γκρουπ στους 18 μήνες παρατηρήθηκε μείωση του εμφραγματικού ιστού κατά 0,86 και 0,66 g αντίστοιχα, αλλά μόνο στο πρώτο παρατηρήθηκε επαναιμάτωση κατά 2,65%, αύξηση της τελοδιαστολικής πάχυνσης κατά 1 m, αύξηση της τελοσυστολικής πάχυνσης του τοιχώματος κατά 27%, καθώς και η συσπαστικότητα και η αιμάτωση του ιστού αυξήθηκε σε επίπεδα κοντά σε αυτά ζώων που δεν είχαν τραυματιστεί, ενώ στα άλλα δυο γκρουπ οι τιμές των μεταβλητών αυτών δεν απέκτησαν σημαντικότητα κατά τη διάρκεια των 18 μηνών. Επίσης όταν υπήρξε διαχωρισμός ανάμεσα στα δυο υπογκρουπ του 2^{ου} γκρουπ παρατηρήθηκε μείωση του εμφραγματικού ιστού κατά 55% και 48% στα επαναγγειωμένα τμήματα που βρίσκονταν κοντά στα τμήματα στα οποία είχαν ενεθεί MSCs και σε αυτά που ήταν μακριά αντίστοιχα, καθώς και αύξηση της τελοσυστολικής πάχυνσης τους τοιχώματος κατά 24% σε αυτά που ήταν κοντά στα τμήματα στα οποία είχαν ενεθεί MSCs. Ακόμα η σμίκρυνση του εμφραγματικού ιστού σε τμήματα στα οποία υπήρχαν ενεθέντα MSCs σχετιζόταν με τον αριθμό των ενέσεων καθώς και του συνόλου των ενεθέντων κυττάρων, αλλά όχι και η αιμάτωση. Όλα αυτά δείχνουν την επίδραση των μεταμοσχευθέντων MSCs στην λειτουργική αποκατάσταση του μυοκαρδίου, την σμίκρυνση του εμφράγματος, την πάχυνση του τοιχώματος και τον συνολικό θετικό αντίκτυπο στις εγγύς περιοχές προς αυτά.



Εικόνα 36. Μεταμόσχευση MSCs οδηγεί σε τοπική βελτίωση. A: Η βελτίωση της μάζας του εμφράγματος στα ζώα που πήραν κύτταρα επήλθε από την 3^ο μήνα ενώ στα control τον 18^ο μήνα. B: Εικόνα της αιμάτωσης η οποία ήταν πολύ καλύτερη στα ζώα που έλαβαν κύτταρα. C: Η βελτίωση της πάχυνσης του τοιχώματος στα ζώα που πήραν MSCs δεν συγκρίνεται με την αντίστοιχη των control. D: Η συστολική πάχυνση του τοιχώματος βελτιώθηκε και στις 2 κατηγορίες. E: Μέτρηση της συσπαστικότητας όπου χαμηλότερες τιμές σημαίνουν καλύτερη συσπαστικότητα. Αλλαγή κυρίως στα MSC ζώα. F: Μέτρηση της διαστολικής λειτουργίας με τις μεγαλύτερες τιμές να σημαίνουν καλύτερη διαστολική λειτουργία. Η αλλαγή ήταν παρόμοια με το προηγούμενο διάγραμμα. □: Ζώα που πήραν MSCs, ○: ζώα που υπέστησαν μόνο επανααιμάτωση (Karantalis V., et al, 2014).

Το 2015 διεξήχθη μια μελέτη με αυτόλογα MSCs μεταμοσχευμένα ενδομυϊκά σε 60 ασθενείς με σοβαρή ισχαιμική καρδιακή ανεπάρκεια και EF<45% χωρισμένους σε 2 γκρουπ όπου οι ασθενείς που έλαβαν κύτταρα σε σχέση με το control είχαν σχέση 2:1 (MSC-HF TRIAL) (Mathiasen, A., et al, 2015). Μετά από έξι μήνες εκτιμήθηκαν τα λειτουργικά χαρακτηριστικά της αριστερής κοιλίας με μαγνητική τομογραφία και CT τομογραφία. Στους 55 από τους 60 ασθενείς ολοκληρώθηκε επιτυχώς η αγωγή με μόνο ένα περιστατικό κοιλιακής ταχυκαρδίας. Ο LVESV είχε μια διαφορά 13% στα 2 γκρουπ, αυξήθηκε δηλαδή στο control κατά 5,4% και μειώθηκε στο γκρουπ των MSCs κατά 7,6%, το LVEF βελτιώθηκε κατά 6,2% στους ασθενείς που έλαβαν τα κύτταρα και η μυοκαρδιακή μάζα αυξήθηκε κατά 5g ενώ στο control μειώθηκε. Αντίθετα δε παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές στον LVEDV και, αν και υπήρξε σημαντική μείωση στον ουλώδη ιστό στο MSC γκρουπ, οι διαφορές μεταξύ των γκρουπ δεν ήταν σημαντικές. Η απόδοση των ασθενών στο τεστ του 6λεπτου βαδίσματος δεν παρουσίασε διαφορές μεταξύ των γκρουπ. Το γκρουπ των MSCs χωρίστηκε σε υπογκρουπ (<43 εκ. κύτταρα=13, 43-83 εκ. κύτταρα=14 και >83 εκ. κύτταρα=13 προκειμένου να ελεγχθούν πιθανά δόσοεξαρτώμενα αποτελέσματα τα οποία εν τέλει δεν υπήρχαν. Τα LEVF, LVEDV και μέση μυοκαρδιακή μάζα εμφάνισαν μεγαλύτερη βελτίωση όσο περισσότερα ήταν τα μεταμοσχευμένα MSCs, αν και μόνο στον LVEDV έφτασε σε σημαντικά επίπεδα.



Εικόνα 37. Δοσοεξαρτώμενα αποτελέσματα: (A) LVESV, (B) EF, (C) μέση μυοκαρδιακή μάζα. Οι τιμές P αντιπροσωπεύουν τις διαφορές μεταξύ των διαφόρων υπογκρούπ των μεταμοσχευμένων MSCs. Συμπεριλαμβάνονται η μέση τιμή και οι τυπικές αποκλίσεις (Mathiasen, A., et al, 2015).

Τέλος το 2016 μελετήθηκε η επίδραση αυτόλογων MSCs σε δέκα ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια με LVEF<35%, ενδομυϊκά με καθετήρα σε 10-16 περιοχές της αριστερής κοιλίας (Guijarro D., et al, 2016) (MESAMI 1 pilot trial). Στον ένα μήνα αναφέρθηκε η επιτυχία της μεταμόσχευσης καθώς και απουσία δυσμενών αποτελεσμάτων και όποια δυσμενή σοβαρά αποτελέσματα αναφέρθηκαν στα επόμενα 2 χρόνια δεν είχαν να κάνουν με την έρευνα. Κοιλιακές ταχυκαρδίες σχετιζόμενες με τα κύτταρα δε παρουσιάστηκαν. Το κλάσμα εξώθησης βελτιώθηκε στους ασθενείς που έλαβαν κύτταρα κατά 6.3% στους τρεις μήνες και διατηρήθηκε στα ίδια επίπεδα για 1 χρόνο, ο LVESV παρουσίασε πτώση 16 mL τον τρίτο μήνα και το αποτέλεσμα είχε λάβει στατιστική σημαντικότητα τον 12^ο μήνα, ενώ ο LVEDV παρέμεινε σταθερός στις 3 χρονικές στιγμές. Η σύσπαση του τοιχώματος βελτιώθηκε τον τρίτο μήνα κατά 5,2% στα υποκείμενα που έλαβαν κύτταρα και παρέμεινε σημαντική μέχρι τον 12^ο μήνα σε σχέση με τα control που δε βελτίωσαν σημαντικά τη συσπαστικότητα του τοιχώματος. Από την άλλη μεριά η απόδοση στο βλεπτο περπάτημα έδειξε βελτίωση στο γκρουπ των MSCs καθώς από 354.6m στην αρχή του πειράματος πήγε στα 360.2 m στους 3 μήνες και στα 376.1m στους 12. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι τα αυτόλογα MSCs μπορεί να έχουν θετική επίδραση στην αναδιαμόρφωση της κοιλίας, την λειτουργία της και βελτίωση της ζωής του ασθενούς σε χρόνιες καρδιακές ανεπάρκειες.

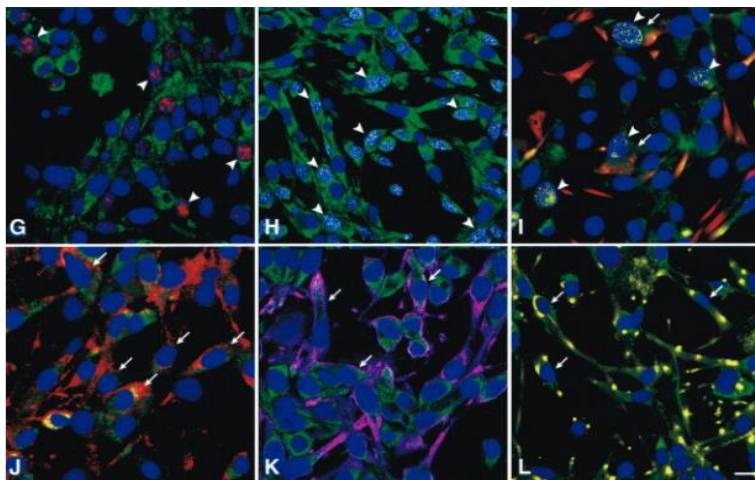
Σε μια προσπάθεια γενίκευσης, η μεταμόσχευση των MSCs συντελεί στην δομική και λειτουργική βελτίωση της καρδιάς των δεκτών. Αυξάνει το LVEF και συντελεί στην πάχυνση του πρόσθιου κυρίως τοιχώματος της αριστερής κοιλίας μέσω της αύξησης των αγγείων και των αρτηριολίων (αγγειογένεση και ωρίμανση των αγγείων) κυρίως στα όρια της εμφραγματικής περιοχής. Παρόμοιες βελτιώσεις επιδέχονται η συσπαστικότητα τμημάτων μυοκαρδιακού ιστού και η μάζα της αριστερής κοιλίας, τα οποία αυξάνονται, ενώ το μέγεθος και το μήκος του εμφραγματικού νεκρωμένου ιστού μειώνονται, πάντα σε σχέση με control ζώα. Ακόμα ο LVESV μειώνεται και παρατηρείται γενικότερη αναστολή της αναδιαμόρφωσης της καρδιάς, αν και ο LVEDV παραμένει σχετικά σταθερός, κυρίως σε μεγαλύτερα μεγέθη καρδιών με τη μεταφορά MSCs. Όλα αυτοί οι θετικοί δείκτες είναι αποτέλεσμα συγχώνευσης των μεταφερόμενων κυττάρων στο περιβάλλον του μυοκαρδίου, μερικής ενδοθηλιακής διαφοροποίησής τους και παρακρινούς φαινομένου τους, στο οποίο μέσω κυτταροκινών και αυξητικών

παραγόντων προάγουν την ενεργοποίηση του ενδογενούς μυοκαρδιακού πληθυσμού, την καρδιοπροστασία και την αγγειογένεση. Για αυτό το λόγο και οι δείκτες δομής και λειτουργικότητας των κυττάρων συνήθως φαίνεται να παρουσιάζουν μια αντίστροφη δοσοεξαρτώμενη σχέση με τα αποτελέσματά τους, δηλαδή οι δείκτες αυξάνονται (ή μειώνονται) μέχρι κάποια συγκέντρωση μεταφερόμενων κυττάρων, αλλά από εκεί και πέρα οι βελτιώσεις μετριάζονται, εισάγωντας την έννοια του ορίου των κυττάρων, ενώ μπορεί σε μεγάλες συγκεντώσεις μεταφερόμενων κυττάρων να αυξάνονται οι μεταβολικές απαιτήσεις παράλληλα με την πιθανότητα φλεγμονής, αποτελώντας ανασταλτικό παράγοντα για την ευημερία των ενδογενών κυττάρων. Σε σύγκριση αλλογενών και αυτόλογων MSCs, η μεν κατηγορία είναι προσφορότερη στην αναστολή της αναδιαμόρφωσης της καρδιάς, ενώ η δε προάγει καλύτερα τη βελτίωση της ζωής των ασθενών, αν και τα αλλογενή κύτταρα είναι ευκολότερα στην εύρεση και χρήση τους και μάλιστα στα MSCs περισσότερο λόγω των ανοσοκατασταλτικών και ανοσορυθμιστικών ιδιοτήτων τους που εμποδίζουν την παρουσίαση του αντιγόνου παρεμποδίζοντας την ενεργοποίηση και αύξηση Β και Τ κυττάρων, αλλά και εμπλέκονται και με τα συστήματα παθητικής ανοσίας. Ακόμα στην κλινική πράξη φαίνεται να επικρατούν οι ενδομυϊκή και ενδοκαρδιακή μεταφορά παρέχοντας καλύτερες δυνατότητες συγχώνευσης, εξάπλωσης και δράσης των μεταμοσχευθέντων κυττάρων όπως έγινε γνωστό και σε συγκρίσεις με άλλες μεθόδους όπως την ενδοαγγειακή, αν και υφίσταται μια πιθανότητα τραυματισμού του μυοκαρδιακού περιβάλλοντος και πρόκληση φλεγμονής με τις μεθόδους αυτές. Τέλος, οι αρρυθμίες και οι κοιλιακές ταχυκαρδίες μειώνονται με τη μεταφορά MSCs, ενώ ο καλύτερος τρόπος για την διατήρηση των κυττάρων από τον οργανισμό αλλά και των επιδράσεών τους στο μυοκαρδιακό περιβάλλον είναι η σταδιακή μεταφορά σε μικρές δόσεις στον οργανισμό σε βάθος χρόνου.

2.4 ΚΑΡΔΙΑΚΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (CSCs/ CPCs/ CDCs)

Καθώς η επιστημονική κοινότητα έβλεπε ότι το προκλινικό και κλινικό αποτέλεσμα της χρήσης των βλαστικών κυττάρων του μυελού των οστών δεν συνέπιπτε με τις ελπίδες που είχαν, οι θεραπείες δεύτερης γενιάς έκαναν την εμφάνισή τους. Αν και η καρδιά θεωρούνταν ένα τελικώς διαφοροποιημένο όργανο, συσσωρευμένες ενδείξεις των τελευταίων δεκαετιών διατείνονται ότι αυτό δεν ισχύει. Η πρώτη ένδειξη παρουσιάστηκε το 2001 (Beltrami A., et al, 2001) όταν παρατηρήθηκε σε ασθενείς με MI ένας πληθυσμός κυττάρων στην καρδιά που έφεραν χαρακτηριστικά καρδιομυοκυττάρων. Εν συνεχεία (Quaini et al., 2002) βρέθηκαν κύτταρα που έφεραν το ψ χρωμόσωμα σε θηλυκές καρδιές μετά από μεταμοσχεύσεις καρδιάς διαφορετικού φύλλου, γεγονός που προέβλεπε την ύπαρξη κινητών κυττάρων με ιδιότητες πολυδυναμίας και ικανότητα διαφοροποίησης σε καρδιομυοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα, και εδραίωσαν μαζί με την προηγούμενη ομάδα την λογική ότι στην ενήλικη καρδιά τόσο υγιών όσο και παθογενών υποκειμένων υπήρχαν πραγματικά βλαστικά κύτταρα τα οποία θα μπορούσαν να εισέλθουν σε κυτταρικό κύκλο και να συμμετέχουν στην καρδιομυογένεση του οργανισμού. Αυτά αποδείχθηκε ότι ήταν τα CPCs, τα οποία όπως έγινε γνωστό κατά τα επόμενα χρόνια υπήρχαν και στην καρδιά άλλων θηλαστικών όπως το ποντίκι, ο αρουραίος, το γουρούνι και ο σκύλος (Wu M., et al 2008) και προέρχονται από τα CSCs όταν τα τελευταία απολέσουν την πολυδυναμία και τον απόλυτα μη διαφοροποιημένο φαινότυπό τους. Τα πρώτα καρδιακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν σε μελέτες ήταν τα βλαστικά καρδιακά κύτταρα CSCs τα οποία ήταν c-kit⁺ αλλά επίσης πολλά από αυτά και Sca-1⁺ (περίπου το 60±10% των c-kit⁺), MDR-1⁺, όπως επίσης και CD105⁺, CD166⁺, PDGFRα⁺ και CD90⁺ όσον αφορά τα ενήλικα βλαστικά και προγονικά κύτταρα αλλά δεν εκφράζουν CD34, CD31, CD45, ή

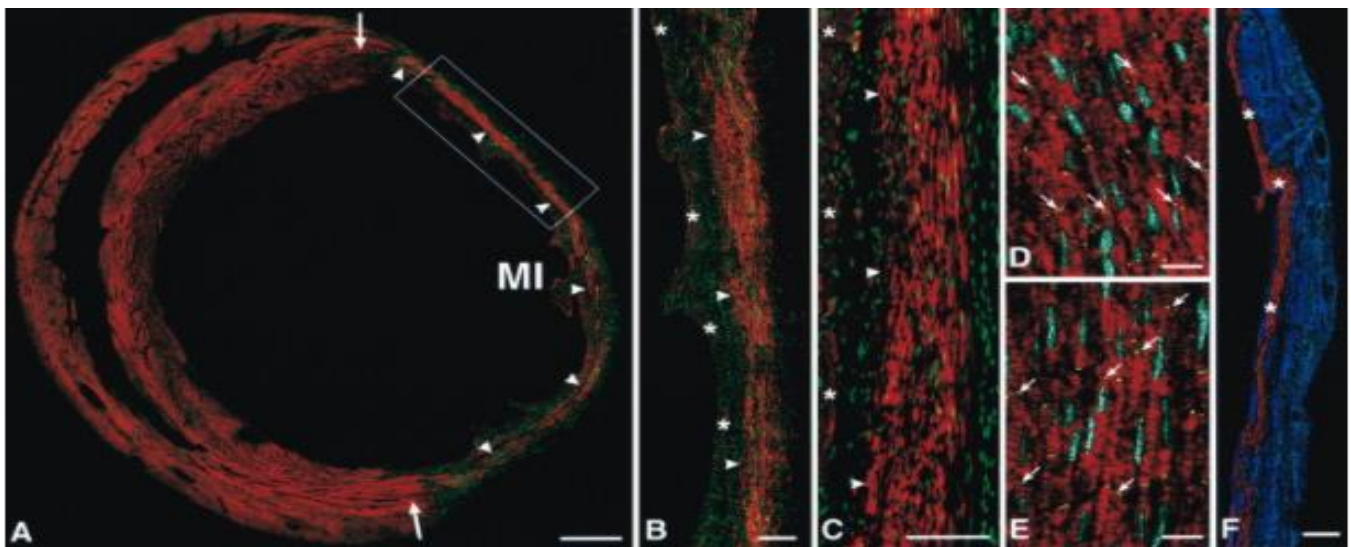
τρύπταση που τα ξεχωρίζουν από τα καρδιακά $c\text{-kit}^+$ ενδοθηλιακά προγονικά κύτταρα καθώς και από τα μαστοκύτταρα (Beltrami A., et al, 2003, Messina E., et al, 2004, Oh H., et al, 2003). Τα CSCs είναι κλωνογενή, πολυδύναμα και κατέχουν την ικανότητα αυτοανανέωσης, αλλά μπορούν ακόμα να διαφοροποιηθούν σε καρδιομυοκύτταρα, λεία μυϊκά κύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα και να δώσουν βιώσιμο μυοκάρδιο το οποίο δεν είναι αποτέλεσμα συγχώνευσης ενεθέντων κυττάρων και εγγενών κυττάρων (Beltrami A., et al, 2003, Messina E., et al, 2004). Κατοικούν κυρίως στους κόλπους και στην κορυφή των κοιλιών, αν και σε πολύ μικρή πυκνότητα σε σχέση με τα υπόλοιπα κύτταρα της καρδιάς (1/10000) (Beltrami P., et al, 2003) και φαίνεται να είναι περισσότερο άφθονα κατά την νεογνική περίοδο αλλά με το πέρασμα του χρόνου φθίνουν σε ποσότητα (Mishra R., et al, 2011). Ο παράγοντας SCF ο οποίος είναι ο συνδέτης του $c\text{-kit}$ βρέθηκε ακόμα και στο εμβρυακό στάδιο γεύροντας πιθανότητες τα CSCs να υπάρχουν ακόμα από αυτό το στάδιο (Kunisada T., et al., 1998). Η ταχύτατη επαγωγή του παράγοντα αυτού κατά τις ισχαιμικές μυοκαρδιακές παθήσεις (Frangogiannis N., et al, 1998) μπορεί να είναι ένδειξη της επαγωγής και ενεργοποίησης των βλαστικών κυττάρων της καρδιάς και τη δημιουργία νέων καρδιομυοκυττάρων μέσω του σταδίου των CPCs (Beltrami P., et al, 2001). Τα προγονικά καρδιακά κύτταρα εξακολουθούν να εκφράζουν δείκτες όπως $c\text{-Kit}$, $Sca\text{-1}$, $Isl1$ και $SSEA\text{-1}$, αλλά επίσης εκφράζουν και $Gata4$, $Gata5$, $MEF2C$ and $Nkx2.5$, που είναι δείκτες των καρδιομυοκυττάρων και κατά την καλλιέργειά τους *in vitro* εκφράζουν και α -ακτινίνη της καρδιάς, καρδιακή μυοσίνη, κονεξίνη43 και δεσμίνη, χαρακτηριστικές πρωτεΐνες των καρδιομυοκυττάρων (Beltrami A., et al., 2003, Miyamoto S., et al., 2010). Οι καρδιόσφαιρες (CDCs) είναι ακόμα ένας πληθυσμός κυρίως $c\text{-kit}^+$ βλαστικών κυττάρων προερχόμενων από την καρδιά που έχουν απομονωθεί σύμφωνα με την ικανότητά τους να σχηματίζουν σφαιροειδείς δομές σε συνθήκες εναιωρήματος που αποτελούνται από προγονικά και διαφοροποιημένα κύτταρα, με δυναμικό αναγέννησης του καρδιακού μυός (Messina E., et al, 2004).



Εικόνα 38. (G–L) $c\text{-kit}^{\text{POS}}$ κύτταρα σε θρεπτικό μέσο εκφράζουν $GATA\text{-4}$ (G-βέλη-45±10%), $Nkx2.5$ (H-άσπροι κόκκοι/βέλη-39±8%), $MEF2C$ (I-κίτρινοι κόκκοι/βέλη-36±6%) και α -σαρκομερική ακτινίνη (I-κόκκινο/βέλη-27±6%), καρδιακή μυοσίνη (J-πορτοκαλί/βέλη-27±9%), α -λεία μυϊκή ακτινίνη (K-μωβ/βελάκια-21±4%) και παράγοντα von Willebrand (L-κίτρινο-17±4%) (Beltrami P., et al., 2003).

Τα CSCs έδειξαν ικανότητα πολλαπλασιασμού σε καλλιέργειες μεγάλης διάρκειας χωρίς να χάσουν τον μη διαφοροποιημένο φαινότυπό τους ή την ικανότητα αυτοαναγέννησης, ενώ παρουσιάστηκε ο παράγοντας IGF-1 σαν συνδετικός κρίκος προαγωγής της επιβίωσης μέσω μονοπατιού της Akt και αύξησης της συσπαστικότητας των CSCs μέσω παρακρινούς μονοπατιού σε συγγκαλλιέργεια CSCs και καρδιομυοκυττάρων. (Miyamoto S., et al, 2010). Επιχειρήθηκε σε *in vivo* μεταφορά 1×10^5 CSCs ($\text{Lin}^-c\text{-kit}^+$ κύτταρα) σε 2 τοποθεσίες στα όρια του εμφραγματικού ιστού σε δυο γκρουπ αρουραίων 5 ώρες

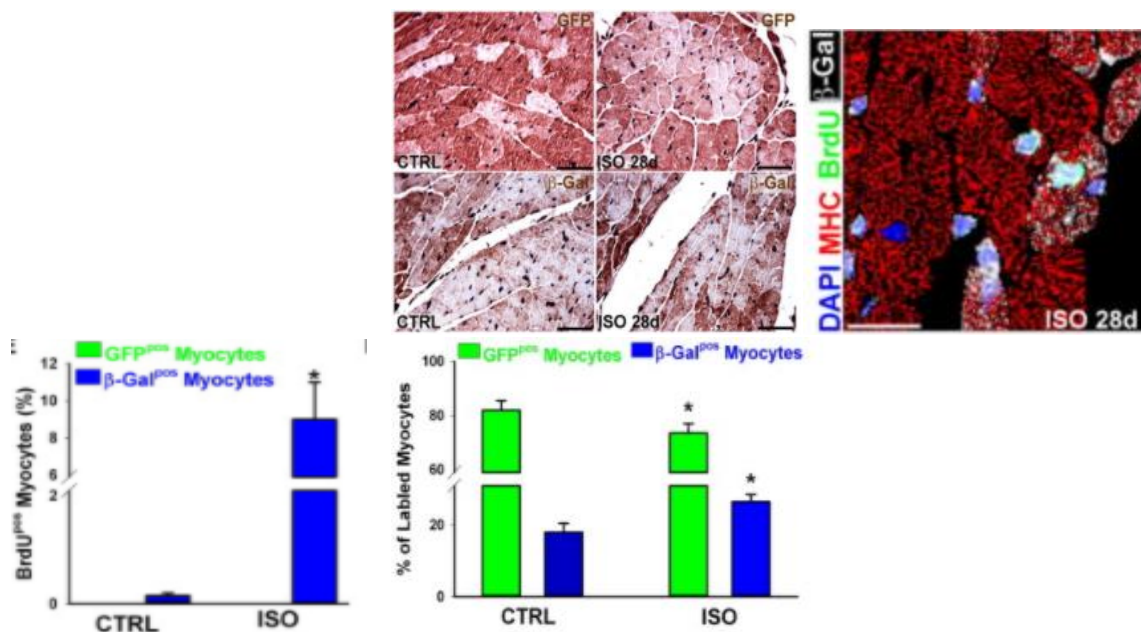
μετά την επαγωγή MI στα υποκείμενα χρησιμοποιώντας ακόμα ένα γκρουπ στο οποίο μεταμοσχεύθηκε ο ίδιος αριθμός μη καρδιακών κυττάρων ως control (Beltrami P., et al., 2003). Η εκτίμηση των γκρουπ των 10 και 20 ημερών σε σχέση με τα control έδειξε μέσω μορφομετρικής εκτίμησης μια αναγέννηση του εμφραγματικού ιστού 30 mm^3 στο γκρουπ των 10 ημερών και 48 mm^3 αντίστοιχα στο γκρουπ των 20 ημερών, ενώ στο control δεν υπήρχε βελτίωση, αν και τα κύτταρα κατά ένα μεγάλο μέρος τους χάθηκαν αμέσως μετά την μεταμόσχευση, δε παρατηρήθηκε δηλαδή συγχώνευση με τον ενδογενή ιστό. Αυτή η αναγέννηση μείωσε το μέγεθος του ουλώδους ιστού κατά 13% στο πρώτο γκρουπ και 22% στο δεύτερο. Στις δέκα μέρες τα αγγεία, τα αρτηριόλια και τα μυοκύτταρα ήταν λιγότερα από τις 20 μέρες και το κολλαγόνο περισσότερο. Το αναγεννημένο μυοκάρδιο εξέφραζε α καρδιακή ακτινίνη, βαριά αλυσίδα της μυοσίνης, α σαρκομερική ακτινίνη, κονεξίνη43 και N-καδερίνη και ενώ στις δέκα μέρες τα σαρκομερή μετά βίας διακρίνονταν στα μικρά καρδιομυοκύτταρα, στις 20 μέρες είχαν περισσότερα μικροϊνίδια με διακριτές ζωνώσεις, ενώ η κονεξίνη43 και N-καδερίνη που χαρακτηρίζουν τους ενδιάμεσους δίσκους ήταν καλά ανεπτυγμένες και στις 2 χρονικές στιγμές. Ακόμα τα αρτηριόλια και τα τριχοειδή ήταν αυξημένα κατά 45 και 450 αντίστοιχα από τις 10 στις 20 μέρες ανά τετραγωνικό χιλιοστό. Το ηχοκαρδιογράφημα έδειξε λειτουργική βελτίωση της καρδιάς με αύξηση κατά 8% του EF στις 10 μέρες και επιπλέον 4% στις 20 μέρες ενώ στο control μόνο κατά 1% και μείωση της LVESP κατά 4mmHg στις 10 μέρες και επιπλέον 4mmHg στις 20 μέρες ενώ στο control παρέμεινε σταθερή. Υπήρχε βελτίωση του πάχους του τοιχώματος κατά 10mm στις 10 μέρες και επιπλέον 8 mm στις 20 μέρες, ενώ και η διάμετρος της αριστερής κοιλίας παρουσιάστηκε κατά 1,2 mm μειωμένη στις 20 μέρες σε σχέση με τα control. Έμφαση δόθηκε στο ότι τα κύτταρα ανιχνεύτηκαν στον νεκρωμένο ιστό και όχι στο ζωντανό μυοκάρδιο. Ακόμα συγκρίνοντας την ταχύτητα και άλλες ιδιότητες της σύσπασης με τον περιβάλλοντα ιστό, η ομάδα απεφάνθη ότι υπήρξε σύγχρονη και λειτουργική σύσπαση των νέων καρδιομυοκυττάρων με τον περιβάλλοντα ιστό. Για να επιβεβαιωθεί η πολυδυναμία και η κλωνογονικότητα των μεταμοσχευμένων κυττάρων σε παραπέρα πείραμα μεταμοσχεύθηκαν



αντίστοιχα κύτταρα στο ίδιο πειραματόζωο, αυτή τη φορά σημασμένα με χρωστική EGFP και τα λεία μυικά, τα ενδοθηλιακά και τα καρδιομυοκύτταρα που προήλθαν από τα μεταμοσχευμένα κύτταρα εξέφραζαν όλα τη χρωστική. Το λιγότερο, η ομάδα απέδειξε ένα σαφή αντίκτυπο των μεταφερομένων CSCs στην λειτουργική και δομική κατάσταση, όπως και την αιμάτωση της καρδιάς με αντίστοιχη χρονική βελτίωση στις καρδιές των αρουραίων.

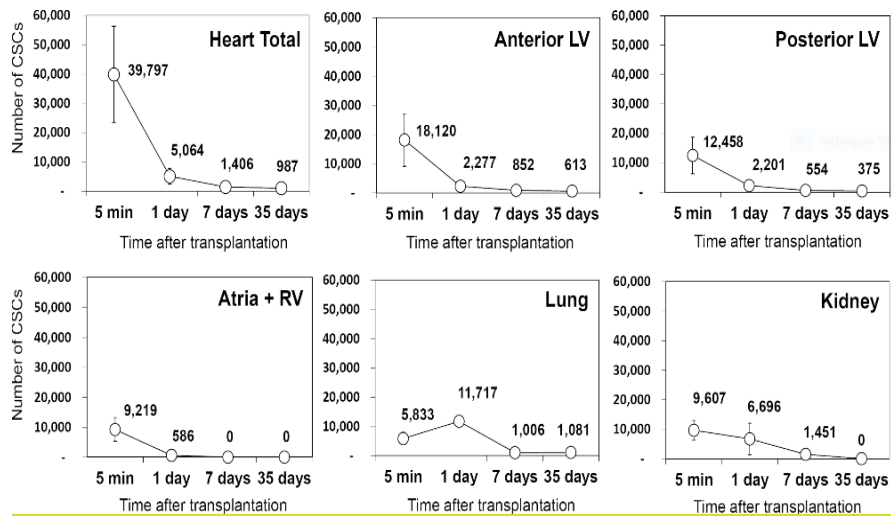
Εικόνα 39. (Α–Ε): Ζώνες μυοκαρδιακού ιστού που αναγεννιάται σε καρδιές με MI στις 20 μέρες. Α: Θέσεις μεταμόσχευσης των κυττάρων (βέλη). Α-Β: αναγεννημένο μυοκάρδιο (κεφαλές βελών). Το ορθωγώνιο στην Α φαίνεται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση στη Β. Η καρδιακή μυοσίνη φαίνεται με κόκκινο. Δ: κονεξίνη43 (κίτρινο-βέλη). Ε: Ν-καδερίνη (κίτρινο-βέλη). F: ουλώδης ιστός σε καρδιά με MI. Το μπλε είναι κολλαγόνο τύπου I-III. Ο αστερίσκος αντιπροσωπεύει εναπομείναν λειτουργικό ιστό (Beltrami P., et al., 2003).

Όταν τραυματίστηκε η καρδιά αρουραίων έτσι ώστε να προκληθεί καρδιακή ανεπάρκεια (Ellison G., et al, 2013), παρατηρήθηκε ανατομική και λειτουργική αποκατάσταση της καρδιάς μέσα σε 28 μέρες, που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ενώ η πλειοψηφία των ενδογενών καρδιακών βλαστικών κυττάρων (eCSCs) είναι ανενεργή, σε περίπτωση τραυματισμού ένας μεγάλος αριθμός κυττάρων εισέρχεται στον καρδιακό κύκλο. Έτσι παρατηρήθηκαν κύτταρα που έφεραν τους πρώιμους παράγοντες που σχετίζονται με τη διαφοροποίηση του μεσοδέρματος σε καρδιομυικό ιστό (GATA4, Nkx2.5, Tbx5 και MEF-2C), καθώς και καρδιακή τροπονίνη I, κονεξίνη43 και βαριά αλυσίδα της β-μυοσίνης, την χαρακτηριστική ισομορφή της καρδιακής μυοσίνης του εμβρυϊκού οργανισμού αντί για α-MHC. Για να απορριφθεί η πιθανότητα τα νέα καρδιομυοκύτταρα να προέρχονται από διαχωρισμό άλλων καρδιομυοκυττάρων αλλά είναι προϊόν βλαστικών κυττάρων διενεργήθηκε παραιτέρω πείραμα όπου γενετικώς τροποποιημένα MerCreMer-ZEG ποντίκια ελέγχθηκαν για δυο χρωστικές, τη β-γαλακτοζιδάση και την GFP. Μέσω χορήγησης tamoxifen η β-γαλακτοζιδάση αντικαταστάθηκε από GFP στα κύτταρα που είχαν λάβει ήδη καρδιομυικό προσανατολισμό ή μόλις είχαν διαιρεθεί, οπότε το κλάσμα GFP/β-γαλακτοζιδάσης σταθεροποιήθηκε στο 80-20. Με αυτό τον τρόπο εάν τα νέα καρδιομυοκύτταρα του πειράματός μας προερχόταν από προυπάρχοντα καρδιομυοκύτταρα το κλάσμα θα παρέμενε σταθερό ενώ αν προερχόταν από άλλη πηγή όπως από CSCs το κλάσμα θα μειωνόταν, και έτσι αποδείχθηκε το παραπάνω πόρισμα. Ακόμα απορίφθηκε η πιθανότητα τα νέα κύτταρα να προέρχονται από κύτταρα μυελού των οστών. Μέσω λεντιϊκής μόλυνσης σε ποντίκια με μια Cre-ρεκομπινάση που ελεγχόταν από τον υποκινητή του c-kit αποδείχθηκε ότι τα ενδογενή c-kit⁺ βλαστικά καρδιακά κύτταρα έχουν αναγεννητικές ιδιότητες μετά από τραυματισμό στο μυοκάρδιο. Ακόμα έδειξαν ότι τα c-kit⁺ βλαστικά κύτταρα έχουν ισχυρό τροπισμό προς το κατεστραμένο μυοκάρδιο, την τάση δηλαδή να διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα και να μεταναστεύουν στον ουλώδη ιστό αντί να μένουν στο ζωντανό ιστό. Τέλος η ομάδα απέδειξε ότι τα eCSCs είναι ικανά και απαραίτητα για την αναγέννηση του καρδιομυικού ιστού σε περίπτωση τραυματισμού όταν συνέκριναν ομάδες ζώων από τις οποίες στη μεν είχαν εξαλείψει τα ενδογενή βλαστικά κύτταρα με χημικό αντιμιτωτικό παράγοντα ενώ στη δε τα κύτταρα αυτά υφίσταντο κανονικά. Η πρώτη δεν αναγέννησε τον καρδιομυικό ιστό σε αντίθεση με τη δεύτερη μετά από τραυματισμό.



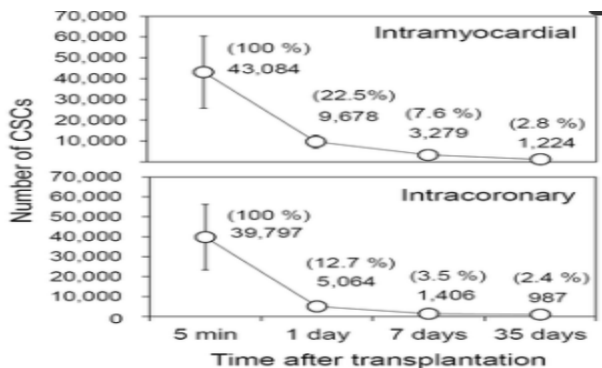
Εικόνα 40. Πάνω αριστερά: Χαρακτηριστική ανοσοσχρώση με αντισώματα για GFP και β-γαλακτοζιδάση (αμφότερα καφέ) στην υπενδοκαρδιακή περιοχή και την κορυφαία στοιβάδα σε ζώα control και ζώα που δέχονται CMs στις 28 μέρες μετά τη μεταμόσχευση. Πάνω μέση: Αναλογία των GFP και β-γαλακτοζιδάση στις 20 μέρες μετά τη μεταμόσχευση. Το κλάσμα GFP/β-γαλακτοζιδάση μικραίνει με την πάροδο του χρόνου. Πάνω δεξιά: Μικροσκοπία, κάτω:ποσοστά των νέων καρδιομυοκυττάρων β-γαλακτοζιδάσης/BrdUpos 28 μέρες μετά τη μεταμόσχευση(Ellison G., et al, 2013).

Μεταφέρθηκαν σε θηλυκά ποντίκια (Hong U., et al, 2014) ενδοστεφανιαία συγγενικά 1×10^5 Lin⁻c-kit⁺ CSCs από αρσενικούς δότες μετά από 2 μέρες αφού τα ποντίκια είχαν υποστεί απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας. Μέσω real-time ποσοτικής PCR παρατήρησαν ότι μόνο το 12,7% των κυττάρων παρέμειναν στις καρδιές των δεκτών μετά από μια μέρα σε σχέση με 5 λεπτά μετά την μεταμόσχευση (όπου πάλι βρέθηκαν <40% κυττάρων στην καρδιά) και το ποσοστό αυτό μειώθηκε ραγδαία στις επόμενες μέρες, έτσι που στις 3 μέρες μετά τη μεταμόσχευση μόνο 1000 κύτταρα εξακολουθούσαν να υπάρχουν στις καρδιές των δεκτών. Σημαντικοί αριθμοί κυττάρων βρέθηκαν και στους πνεύμονες και τα νεφρά, που σημαίνει ότι τα κύτταρα διαμοιράστηκαν μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας. Παρόλο που διατηρήθηκε τόσο μικρός αριθμός κυττάρων, τα ποντίκια που δέχθηκαν το μόσχευμα σε σχέση με τα ποντίκια του control group παρουσίασαν μειωμένη LVESP (4,81 mmHg σε σχέση με τα 9,62 mmHg του control) και αυξημένο EF (42,9% σε σχέση με το 35,8% στα control) και αυξημένη τελο-διαστολική ελαστικότητα (μια παράμετρος της απόδοσης της αριστερής κοιλίας) κατά 3,38% mmHg/μλ, όπως παρατηρήθηκε με καθετηριασμό στις 3 μέρες μετά τη μεταμόσχευση. Το αποτέλεσμα του συγκεκριμένου πειράματος δείχνει ότι η διαφοροποίηση των CSCs σε καρδιομυοκύτταρα δε μπορεί να πάρει εξ'ολοκλήρου τα εύσημα για τη λειτουργική βελτίωση των υποκειμένων, εντούτις διαμεσολαβεί κάποιο παρακρινές φαινόμενο από τα μεταμοσχευμένα κύτταρα που κατά πάσα πιθανότητα απευθύνεται στα ενδογενή CSCs.



Εικόνα 41. Κατά τη διάρκεια της παρατήρησης περισσότερα μεταμοσχευμένα κύτταρα βρισκόταν στο πρόσθιο τοίχωμα από το οπίσθιο, αν και οι διαφορές δεν ήταν σημαντικές, αλλά πολύ μικρός αριθμός βρέθηκε στους κόλπους και την δεξιά κοιλία και μέσα σε 7 μέρες τα κύτταρα αυτά δεν υπήρχαν πια. Τα μόνα όργανα εκτός της καρδιάς στα οποία βρέθηκαν

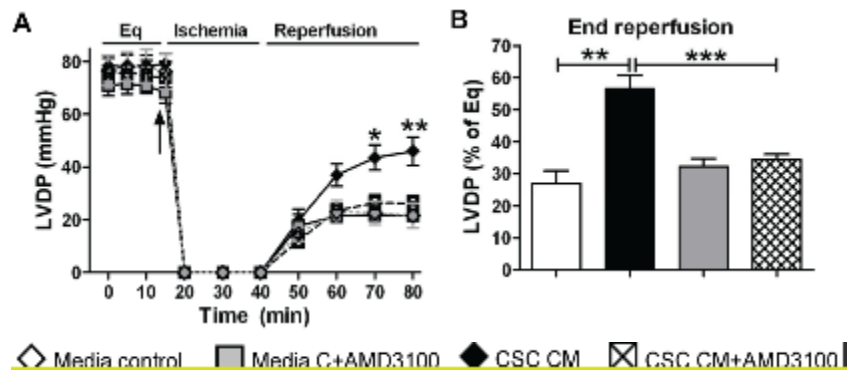
CSCs ήταν οι πνεύμονες και τα νεφρά. Αυτό δείχνει ότι τα κύτταρα που πέρασαν μέσω της στεφανιαίας οδού διανεμήθηκαν στο σώμα μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας. Ο αριθμός των CSCs που βρέθηκαν στα πνευμόνια στις 24 ώρες ήταν μεγαλύτερος από τα 5 λεπτά που δείχνει ότι πολλά κύτταρα έφυγαν από όργανα όπως η καρδιά και πέρασαν στην πνευμονιαία κυκλοφορία. Στο σπλήνα και στο συκώτι δε βρέθηκαν κύτταρα οποιαδήποτε στιγμή (Hong U., et al, 2014).



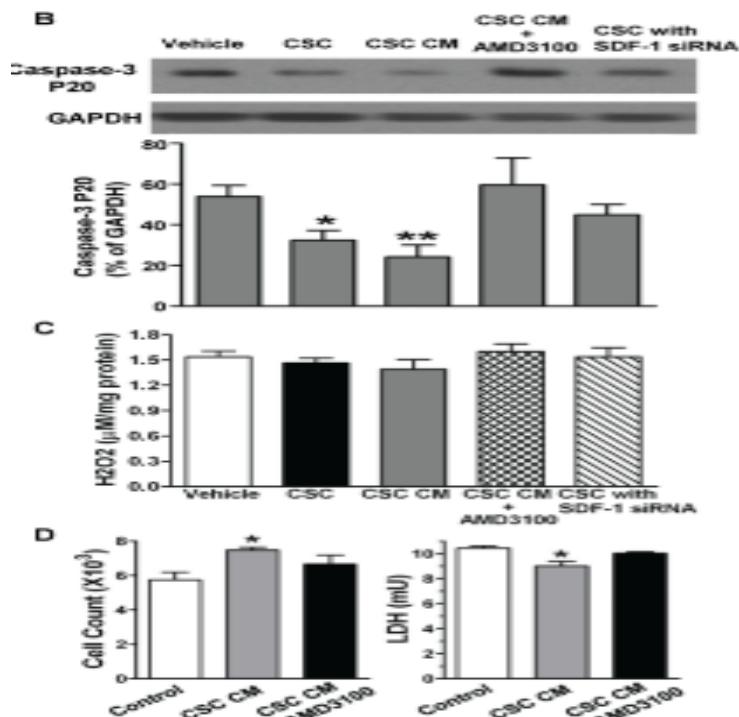
Εικόνα 42. Δόθηκαν σε θηλυκά ποντίκια 10^5 $c-kit^+/lin^-$ CSCs αρσενικής προέλευσης ενδομυϊκά (πάνω διάγραμμα) ή ενδοστεφανιαία (κάτω διάγραμμα) route. Φαίνεται ο αριθμός των κυττάρων σε ολόκληρη την καρδιά σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, καθώς και τα ποσοστά σε παρένθεση σε σχέση με τα αντίστοιχα κύτταρα στα 5 λεπτά. Τα δεδομένα είναι η μέση τιμή συμπεριλαμβανομένου της τυπικής απόκλισης (Hong U., et al, 2014).

Εν συνεχεία μελετήθηκαν τα παρακρινή αποτελέσματα των CSCs και συγκεκριμένα των Sca-1⁺ CSCs μελετήθηκαν σε εμφραγματικό μοντέλο ποντικού όπου με ενδοστεφανιαία μεταμόσχευση $0,1 \times 10^6$ κυττάρων και θρεπτικού μέσου σε control πριν την ισχαιμία και μετά το έμφραγμα εξακριβώθηκε η λειτουργική καλύτερευση των υποκειμένων (Huang C., et al, 2011). Τα κύτταρα ήταν επίσης θετικά για τους υποδοχείς CD29 και CD44 και εξέφραζαν σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από MSCs τους παράγοντες Nkx2.5, Gata4, MEF2c και Tbx5. Η LVEDP και η dP/dt ήταν αρκετά χαμηλότερες από τα control και προκειμένου να εξακριβωθεί ότι το αποτέλεσμα οφειλόταν σε παρακρινές φαινόμενο μεταφέρθηκε θρεπτικό μέσο στο οποίο είχαν καλλιεργηθεί τα CSCs σε ποντίκια και παρατηρήθηκαν παρόμοιες μειώσεις στις παραπάνω μεταβλητές. Παρατηρήθηκε ότι το μόριο που ευθυνόταν για το παρακρινές φαινόμενο δεν ήταν ο VEGF που πίστευε αρχικά η ομάδα και ότι διαφοροποιημένα CSCs μεταμοσχευμένα σε ποντίκια καθώς και το ανάλογο θρεπτικό μέσο δεν είχε την ίδια επίδραση στις καρδιές των δεκτών, παρόλο που τα κύτταρα αυτά είχαν αυξημένη έκφραση δεικτών των καρδιομυοκυττάρων και δεικτών διαφοροποίησης του ενδοδέρματος σε καρδιομυοκύτταρα. Τελικά βρέθηκε ότι ο παράγοντας SDF-1 είναι αυτός που ευθύνεται, με συγκέντρωση 30 φορές μεγαλύτερη

στα CSCs από τα καρδιομυοκύτταρα, που σημαίνει ότι η έκφρασή του μειώνεται κατά τη διαφοροποίηση. Ο SDF-1 ασκεί τη δράση του μέσω του υποδοχέα του CXCR4 στη μείωση των LVDP και dp/dt στη καρδιά γεγονός που φάνηκε από την παρεμπόδιση του CXCR4 από τον AMD3100 και από siRNA για τον παράγοντα SDF-1. Επίσης ο SDF-1 παρεμποδίζει την συσσώρευση της γαλακτικής αφυδρογονάσης (LDH) που είναι δείκτης μυοκαρδιακού τραυματισμού και μειώνει τα επίπεδα της αποπτωτικής κασπάσης 3 καθώς και προστατεύει το κύτταρο από τις ενεργές ρίζες όπως το H_2O_2 . Τέλος συμβάλει στην επιβίωση των κυττάρων και την καρδιοπροστασία μέσω του μονοπατιού STAT3 που παράγεται πριν την ισχαιμία έπειτα από μυοκαρδιακό έμφραγμα και με το να επιτρέπει την έκφραση της Akt όπως φανηκε με τη σύγκριση ποντικών που εξέφραζαν SDF-1 και ποντικών που παρεμποδίστηκε η έκφραση αυτή από τον AMD3100 ή από siRNA.



Εικόνα 43. Ο παράγων SDF-1 που εκκρίνεται από τα CSCs βοηθάει στην επανάκαμψη μετά από MI. A: Αλλαγές στην LVDP εκφραζόμενες απόλυτα ή B: ποσοστιαία σε σχέση με την εξισορρόπηση στο τέλος της επαναιμάτωσης σε ζώα που έχουν δεχθεί CSCs με ή χωρίς τον αναστολέα του υποδοχέα του SDF-1, AMD3100 (Huang C., et al, 2011).



Εικόνα 44. Ο παράγων SDF-1 βοηθάει στην επανάκαμψη του κυτταρικού τραυματισμού. B: Ανάλυση κατά Western δείχνει μειωμένα επίπεδα κασπάσης-3 μετά το MI. Το γράφημα είναι αναπαράσταση των σχετικών επιπέδων της κασπάσης-3. C: Η παραγωγή του H_2O_2 αναλύθηκε μετά το MI. Αναπαριστώνται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση. D: Τα καρδιομυοκύτταρα μετρήθηκαν μετά από 24 ώρες υποξίας σε όλα τα γκρουπ (Huang C., et al, 2011).

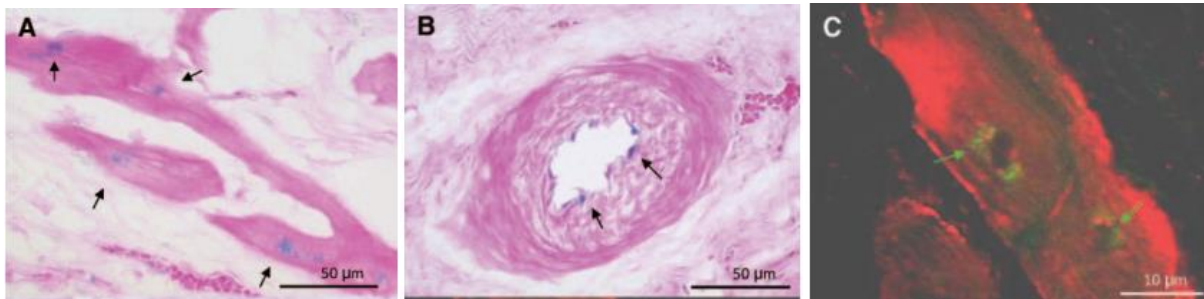
Προσπάθεια έγινε για ενδοστεφανιαία μεταμόσχευση σε θηλυκούς αρουραίους που πέρασαν από απόφραξη της στεφανιαίας αρτηρίας 1 εκατομύριο συγγενικών CPCs και μελέτησαν το αποτέλεσμα 1 χρόνο μετά τη μεταμόσχευση (Tang X., et al, 2016). Τα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα παρουσίασαν αυξημένο ποσοστό ζώντος ιστού στην εμφραγματική περιοχή, μεγαλύτερη πάχυνση στο τοίχωμα της αριστερής κοιλίας και αναστολή της επέκτασής της. Παρατηρήθηκε επίσης αυξημένο βάρος στα ζώα αυτά στους 3,6 και 12 μήνες μετά το MI και η κολλαγονική περιοχή ήταν σημαντικά μικρότερη. Η πυκνότητα των αγγείων αν και ήταν μεγαλύτερη στο γκρουπ των ζώων με CPCs δεν έφτασε σημαντικό αποτέλεσμα και οι LVESV και LVEDV δεν αυξήθηκαν σημαντικά από τις 48 ώρες ως τους 12 μήνες της εκτίμησης. Το κλάσμα εξώθησης βελτιώθηκε και παρατηρήθηκαν κύτταρα ανώριμου φαινοτύπου που εξέφραζαν καρδιομυϊκές πρωτείνες όπως α -σαρκομερική ακτίνη και τα ποντίκια που πήραν CPCs είχαν μια γενική λειτουργική βελτίωση της καρδιάς.

Το 2010 αποδείχθηκε (Chimenti I., et al, 2010) ότι ανθρώπινα CDCs και καρδιόσφαιρες παρουσιάζουν *in vitro* αντιαποπτωτικές και προαγγειογενείς ιδιότητες σε αρουραίους. *In vivo* τα CDCs εκκρίνουν τους παρακρινικούς παράγοντες VEGF, HGF και IGF-1 όταν μεταμοσχεύονται σε εμφραγματικό μοντέλο ποντικού, στο οποίο συμβάλουν στην βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και τη δημιουργία καρδιακού ιστού. Η μεταφορά τους στην ζώνη γύρω από το έμφραγμα οδηγεί στην προαγωγή της έκφρασης της Akt, στην παρεμπόδιση της έκφρασης της αποπτωτικής κασπάσης 3 και βελτιώνει την πυκνότητα των αγγείων και τη γενικότερη ανθεκτικότητα των κυττάρων. Σημαντική είναι η παρατήρηση ότι δεδομένου των μεταμοσχευμένων ανθρώπινων CDCs, η διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων σε καρδιομυοκύτταρα συνεισφέρει μόνο στο 20-50% της αγγειακής βελτίωσης και της ενίσχυσης της μυοκαρδιακής λειτουργίας.

Ακόμα, επιστημονική ομάδα (Urbanek K., et al, 2005) ασχολούμενοι με τις παρακρινείς ιδιότητες των CSCs και CPCs υποστήριξαν ότι τα προαναφερθέντα κύτταρα εκφράζουν τα c-Met και IGF-1 και συνθέτουν και εκκρίνουν επίσης και τους υποδοχείς τους HGF and IGF-1 αντίστοιχα. Εξ' αυτών ο πρώτος παράγων κινητοποιεί τα βλαστικά και προγονικά καρδιακά κύτταρα και ο δεύτερος προάγει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους. Επομένως σε εμφραγματικό μοντέλο ποντικού μεταφέρθηκαν αυτοί οι δύο παράγοντες προκειμένου να κινητοποιήσουν τα ενδογενή βλαστικά κύτταρα και να τα οδηγήσουν στον νεκρωμένο ιστό έτσι ώστε αυτά να ευδοκιμήσουν εκεί. Παρατηρήθηκε λοιπόν 15% αναγέννηση του νεκρωμένου ιστού στις 16 μέρες μετά τη μεταφορά των παραγόντων που μείωσε το μέγεθος του εμφράγματος από 67% στα 57% και 54% αναγέννηση στους 4 μήνες που μείωσε το μέγεθος από 67% στο 29%. Στις 16 μέρες το μέγεθος των νέων μυοκυττάρων κυμαινόταν από 600 ως 7200 μm^3 και στους 4 μήνες από 700 ως 20 000 μm^3 . Υπήρχαν 43 αρτηριόλια και 155 αγγεία/ mm^2 στις 16 μέρες και 31 αρτηριόλια και 390 αγγεία/ mm^2 στους 4 μήνες στον αναγεννημένο ιστό. Η συσπαστικότητα της καρδιάς επανήλθε στις 15 μέρες και βελτιώθηκε σταδιακά μέχρι τους 4 μήνες, όπως και η LVESP που ελαττώθηκε και ο όγκος της αριστερής καρδιάς μειώθηκε επίσης. Μαζί αυτές οι μεταβλητές ήταν υπεύθυνες για μια πτώση της θνησιμότητας κατά 34%. Τα νέα κύτταρα ήταν μικρότερα αλλά έφεραν πρωτείνες του μυοκαρδίου όπως δεσμίνη, α -ακτινίνη, μυοσίνη, κονεξίνη43 και N-καδερίνη. Η μυοκαρδιακή αναγέννηση έσωσε ζώα που είχαν εμφράγματα μέχρι και 86% της κοιλίας τα οποία είναι θανάσιμα. Επομένως υπάρχει ένας ενδογενής πληθυσμός βλαστικών καρδιακών κυττάρων που ενεργοποιείται από τους δύο παράγοντες (οι οποίοι μάλιστα δρουν συνεργιστικά βελτιώνοντας την καρδιακή λειτουργία).

Το 2009 εφαρμόστηκαν οι ιδιότητες των CDCs σε μοντέλο χοιριδίου (Johnston P., et al, 2009). 8 χοιρίδια που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου και είχαν σημαντική δυσλειτουργία της αριστερής

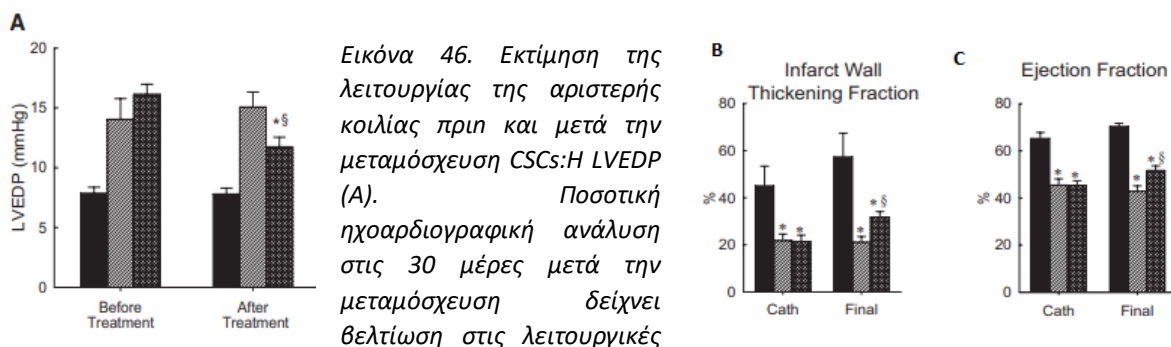
κοιλίας έλαβαν ενδοστεφανιαία 10^7 αυτόλογα CDCs και 8 placebo 4 εβδομάδες μετά την επαγωγή του MI. 7 άτομα απο την κάθε κατηγορία ολοκλήρωσαν τη θεραπεία. 24 ώρες μετά τη θεραπεία υπήρχε μια αύξηση στην καρδιακή τροπονίνη I σε όλα τα ζώα αλλά χωρίς σημαντικές διαφορές. 8 εβδομάδες αργότερα μέσω μαγνητικής τομογραφίας και αιμοδυναμικών αναλύσεων το σχετικό μέγεθος του εμφραγματικού ιστού (το ποσοστό του εμφραγματικού ιστού στην αριστερή κοιλία σε σχέση με το σύνολο της μάζας της αριστερής κοιλίας) παρουσίαζε σημαντική μείωση 5% στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα αλλά όχι στα placebo που ήταν 2,4% αν η απόλυτη μείωση του εμφραγματικού ιστού δεν ήταν σημαντική σε καμία κατηγορία που δείχνει μια ελαφριά αύξηση στη μάζα της αριστερής κοιλίας και μια σχετική μείωση στο σύνολο του εμφραγματικού ιστού στα ζώα που έλαβαν κύτταρα. Οι μειώσεις των LVESV και LVEDV των ζώων που έλαβαν τα κύτταρα σε σχέση με τα placebo δείχνει ότι η μεταμόσχευση των κυττάρων καθυστερεί την αναδιαμόρφωση της καρδιάς καθώς ο πρώτος ήταν μικρότερος κατά 9 mL και ο δεύτερος κατά 5,7 mL στις 8 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση, αν και το κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας τείνει να διατηρηθεί σε σταθερά επίπεδα και στα δυο γκρουπ ζώων. Η LVESP αυξήθηκε σε πολύ μικρότερο ποσοστό στα ζώα που έλαβαν CDCs (3mm Hg σε σχέση με τα placebo που αυξήθηκε 5 mm Hg), αλλά 4/6 ζώα σε κάθε κατηγορία παρουσίασαν ανησηχτικές κοιλιακές ταχυκαρδίες. Δε βρέθηκε νεοπλασματικός ιστός σε κανένα όργανο των χοιριδίων. Η ομάδα οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι τα μεταμοσχευμένα CDCs έφεραν εμφανή δομική και λειτουργική βελτίωση στα μεταμοσχευμένα ζώα.



Εικόνα 45. Μακρόρρονη ενσωμάτωση CDCs. A: Πολλαπλά ώριμα καρδιομυοκύτταρα με X-gal⁺ πυρήνες (βέλη) στην περιοχή του ορίου του εμφράγματος. B: X-gal⁺ κύτταρα σε αρτηριόλιο στην περιοχή του ορίου του εμφράγματος (βέλη). C: Η ανοσοιστοχημεία αποκαλύπτει ώριμα καρδιομυοκύτταρα εφραπτόμενα της περιοχής του εμφράγματος με πηρύνες β-γαλακτοζιδάση⁺ (πράσινοι) που εκφράζουν α-σαρκομερική ακτίνη (κόκκινη), ενδεικτική του ώριμου φαινότυπου (Johnston P., et al, 2009).

Πάλι σε μοντέλο χοιριδίου με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, έγινε προσπάθεια να εξακριβωθεί ο θετικός αντίκτυπος των CSCs (Bollig R., et al, 2013). Τα ζώα υπέστησαν στεφανιαία απόφραξη και επαναιμάτωση και 3 μήνες μετά αυτόλογα CSCs μεταφέρθηκαν ενδοστεφανιαία σε 11 υποψήφια ζώα, ενώ άλλα 10 χρησιμοποιήθηκαν σαν control. Η καρδιακή λειτουργία στα δυο γκρουπ των ζώων ήταν παρόμοια στην αρχή του πειράματος. Η γαλακτική αφυδρογονάση και η κρεατινική κινάση των ζώων, ένζυμα που χρησιμοποιούνται ως δείκτες μυοκαρδιακού τραυματισμού δεν διέφεραν στα δυο γκρουπ ζώων που σημαίνει ότι η μεταμόσχευση των κυττάρων δεν οδήγησε σε παραιτέρω τραυματισμό του μυοκαρδίου. Οι αιμοδυναμικές παράμετροι των ζώων μετρήθηκαν μέσω καθετηριασμού 1 μήνα αργότερα, και η καρδιακή συχνότητα αυξήθηκε και στα δυο γκρουπ κατά περίπου το ίδιο ποσοστό, ενώ οι LVESP και LVEDP παρότι σταθερές στα control, παρουσίασαν μείωση στο CSCs γκρουπ κατά 3 mmHg και 4 mmHg αντίστοιχα. Η ηχοκαρδιογραφία έδειξε αυξημένη διάμετρο της αριστερής κοιλίας και μειωμένο LVEDV κατά 11.3% και 38.7% αντίστοιχα στον ένα μήνα, ενώ τα ζώα που δεν έλαβαν CSCs

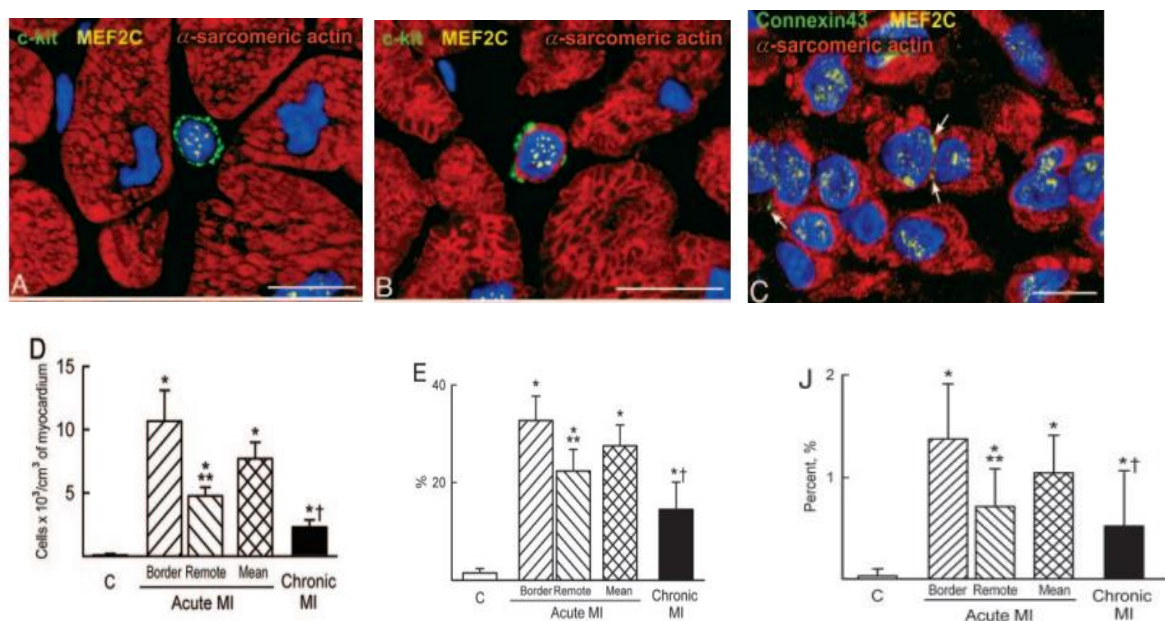
διατήρησαν τις παραμέτρους αυτές σταθερές. Το πάχος του αριστερού τοιχώματος μειώθηκε κατά 0,57 mm στο placebo ενώ αυξήθηκε κατά 1,55 mm στο CSCs γκρουπ ενώ το EF μειώθηκε κατά 3,3% στο control group αλλά αυξήθηκε κατά 6,3% στο άλλο γκρουπ. Νησίδια ζωντανού καρδιομυϊκού ιστού ανιχνεύθηκαν μέσα στο έμφραγμα στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα, τα οποία εξέφραζαν α-σαρκομερική ακτίνη, καρδιακή τροπονίνη I, βαριά αλυσίδα μυοσίνης και κονεξίνη43 (αλληλεπίδραση των καρδιομυοκυττάρων με τα ενδογενή) και μέσω χρώσης με EGFP έγινε γνωστό ότι τα νησίδια προερχόταν από τα μεταμοσχευμένα κύτταρα, τα οποία ακόμα δημιούργησαν αρτηριόλια και αγγεία στην εμφραγματική περιοχή. Επομένως τα αυτόλογα CSCs προάγουν την τοπική και γενική βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και δομής καθώς και την αγγειακή ευημερία σε ζωικά μοντέλα χρόνιας καρδιακής ανεπάρκειας, διαφοροποιούμενα σε καρδιομυοκύτταρα.



Εικόνα 46. Εκτίμηση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας πριν και μετά την μεταμόσχευση CSCs:H LVEDP (A). Ποσοτική ηχοκαρδιογραφική ανάλυση στις 30 μέρες μετά την μεταμόσχευση δείχνει βελτίωση στις λειτουργικές

παραμέτρους της πάχυνσης του τοιχώματος και του EF (E and F). Τα δεδομένα είναι οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση. Η μαύρη μπάρα αντιστοιχεί σε control που δεν πέρασαν MI, η ελαφριά γκρι σε χοίρους που πήραν placebo και η σκούρα γκρι σε χοίρους που πήραν CSCs (Bollini R., et al, 2013).

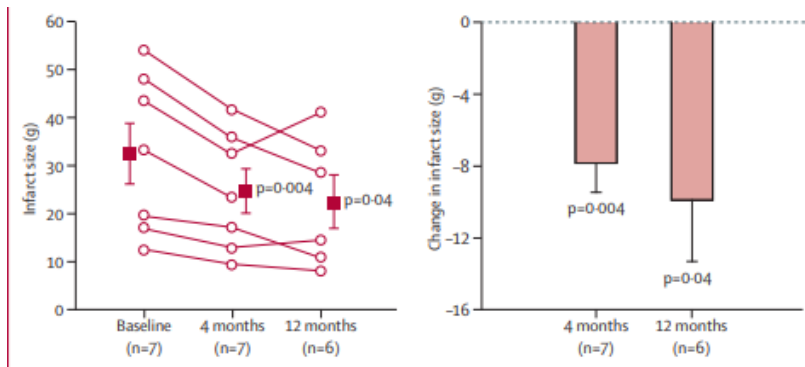
Έγινε προσπάθεια για τη συσχέτιση της λειτουργίας του ενδογενούς πληθυσμού CSCs στον άνθρωπό σε οξεία και χρόνια εμφράγματα (Torella D., et al, 2005). Γ' αυτό το σκοπό μελέτησαν 20 ασθενείς με οξεία εμφράγματα, 20 με χρόνια και 12 control group. Ο αριθμός των CSCs αυξήθηκε σημαντικά στα οξεία εμφράγματα και σε μικρότερο βαθμό στα χρόνια. Η φωσφορυλιωμένη μορφή της Akt αυξήθηκε κατά 21 φορές στα οξεία εμφράγματα και 3,8 φορές στα χρόνια και συσχετίστηκε με την αύξηση της τελομεράσης που έδειξε αύξηση 8,6 φορές στους πρώτους ασθενείς και 2,6 φορές στους δεύτερους και η οποία προστατεύει το DNA και αποτελεί δείκτη ικανότητας αύξησης για τα CSCs. Ο δείκτης p16^{INK4a} που σχετίζεται με τη γήρανση του κυττάρου αυξήθηκε 1,7 φορές στα οξεία εμφράγματα και 3,6 φορές στα χρόνια και ο δείκτης p53 που σχετίζεται με τη γήρανση βρέθηκε σε μικρότερο ποσοστό των CSCs και τα περισσότερα από τα κύτταρα αυτά συνέκφραζαν p16^{INK4a}. Ο αριθμός των αποπτωτικών κυττάρων αυξήθηκε κατά 12 φορές στους ασθενείς με οξεία και 32 φορές στους ασθενείς με χρόνια εμφράγματα με το 80% των κυττάρων αυτών να παρουσιάζει οξειδωτικό στρες και μικρά τελομερή. Τα αποπτωτικά κύτταρα ήταν θετικά για τους δυο παραπάνω δείκτες και έτσι οδήγησαν τα λειτουργικά κύτταρα CSCs στα χρόνια εμφράγματα να είναι 73% λιγότερα από τα οξεία. Ακόμα τα μιτωτικώς διαιρούμενα CSCs σύμφωνα με την φωσφορυλιωμένη H3 ιστόνη ήταν 13 φορές περισσότερα στα χρόνια εμφράγματα και 26 φορές περισσότερα στα οξεία με τελικό στόχο διαφοροποίησης τα καρδιομυοκύτταρα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Επομένως στο άνθρωπο υπάρχει ένα απόθεμα CSCs το οποίο ενεργοποιείται σε περιπτώσεις ισχαιμικής βλάβης, αλλά στις χρόνιες περιπτώσεις το απόθεμα αυτό φθίνει λειτουργικά.



Εικόνα 47. Καρδιακή ανεπάρκεια και γενεαλογική δέσμευση των CSCs. (A–C) Τα προγονικά καρδιομυοκύτταρα (A) εκφράζουν *c-kit* (πράσινο) και τον μεταγραφικό παράγοντα των μυοκυττάρων MEF2C (κίτρινες τελείες), και τα πρόδρομα μυοκύτταρα (B) εκφράζουν *c-kit* (πράσινο), MEF2C (κίτρινες τελείες) και έχουν μια λεπτή στοιβάδα κυτταροπλάσματος θετική για α -σαρκομερική ακτίνη (κόκκινο). (C) Τα μικρά αναπτυσσόμενα καρδιομυοκύτταρα (α -σαρκομερική ακτίνη, κόκκινο) εκφράζουν MEF2C (κίτρινες τελείες) και έχουν χάσει τα αντιγόνα επιφανείας των βλαστικών κυττάρων. Η κοννεξίνη43 βρίσκεται σε μερικά από αυτά τα κύτταρα (πράσινη, βέλη). (D) Προγονικά μυοκύτταρα και πρόδρομα μυοκύτταρα. *, $P < 0.05$ έναντι controls (C), **, $P < 0.05$ μεταξύ εμφραγματικού ορίου και απομονωμένης περιοχής στο οξύ MI; †, $P < 0.05$ μεταξύ οξέος και χρόνιου MI. Τα υποφαινόμενα είναι οξέα εμφράγματα (A and C) και ένα χρόνο (B). (E) Ποσοστό των CSCs με λειτουργική τελομεράση στον κυτταρικό κύκλο. (J) Μιτωτικός δείκτης των CSCs (Torella D., et al, 2005).

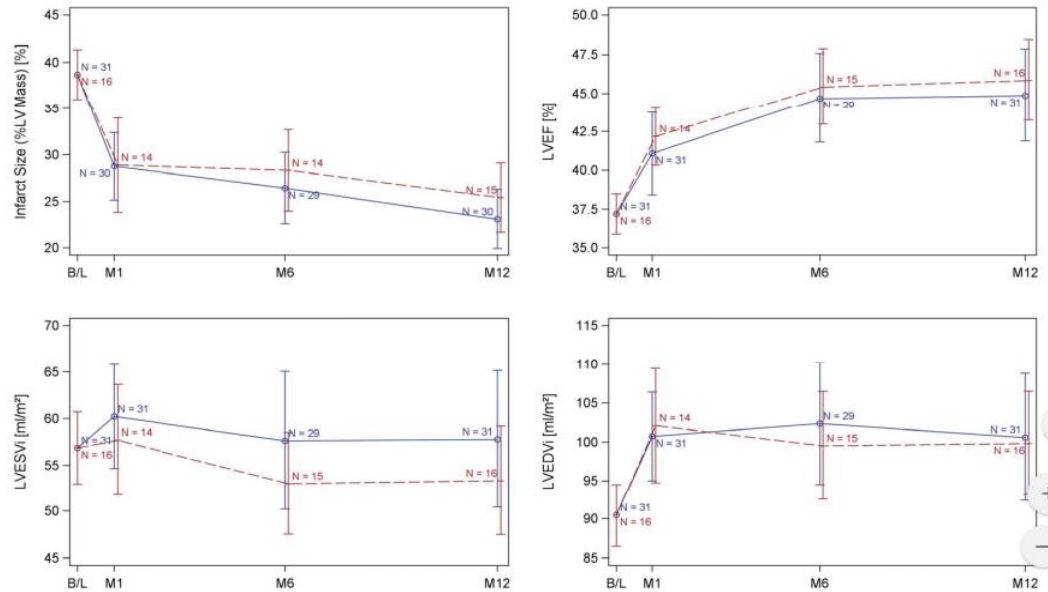
Όσον αφορά την εφαρμογή των CSCs στον άνθρωπο, μόνο 2 πληθυσμοί κυττάρων έχουν περασει στην κλινική αρένα, τα $c-kit^+$ κύτταρα και τα CDCs που σχηματίζουν καρδιόσφαιρες. Το 2011 πραγματοποιήθηκε ενδοστεφανιαία μεταμόσχευση 1 εκατομμυρίου αυτόλογων CSCs σε ασθενείς με προηγηθέν MI $n=16$ (SCIPIO TRIAL) (Bollini R., et al, 2011), δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και $EF < 40\%$ σε σχέση με control ασθενείς $n=7$ στους οποίους δε δόθηκαν κύτταρα. Μέσω ηχοκαρδιογραφήματος και μαγνητικής τομογραφίας βρέθηκε ότι το LVEF βελτιώθηκε κατά 5% σε ένα μήνα και άλλα 3% στους 4 μήνες, ενώ στους ασθενείς που έφτασαν μέχρι και ένα χρόνο θεραπείας βελτιώθηκε άλλα 3%, αν και η διαφορά μεταξύ των 4 μηνών και 1 χρόνου δεν ήταν στατιστικά σημαντική, ενώ στους ασθενείς του control παρέμεινε σταθερό. Η βελτίωση του κλάσματος εξώθησης στους 14 ασθενείς που πήραν CSCs αποδόθηκε στην βελτίωση του δείκτη κινητικότητας του

τοιχώματος που εμφάνισε παρόμοια βελτίωση στους 4 μήνες τόσο στην αριστερή κοιλία όσο και στο σύνολο της καρδιάς. Το βάρος του εμφραγματικού ιστού μειώθηκε κατά 7,8g στους 4 μήνες μετά τη μεταμόσχευση και κατά 9,8 g στον 1 χρόνο, ενώ η πάχυνση του μυοκαρδίου της αριστερής κοιλίας εμφάνισε σημαντική αύξηση στους 4 μήνες στους CSCs ασθενείς. Το πείραμα εμφάνισε απόλυτη ασφάλεια καθώς δεν εμφανίστηκαν σε κανένα ασθενή έκτοποι όγκοι, κοιλιακές ταχυκαρδίες ή κάποια άλλη σημαντική δυσλειτουργία και οδήγησε στην βελτίωση της ποιότητας ζωής των ασθενών.



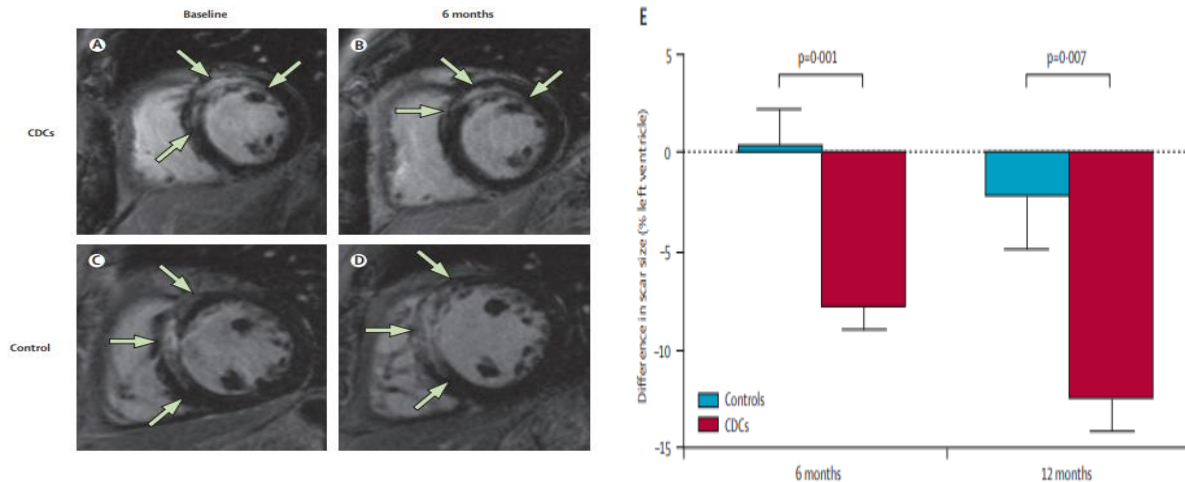
Εικόνα 48. Μεγέθη εμφραγματικού ιστού και της αλλαγής τους μεταξύ της βάσης και των μηνών 4 και 12 μετά την μεταμόσχευση CSCs, οι τιμές *p* φαίνονται για τις συγκρίσεις μεταξύ των μηνών. Φαίνονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις (Bollí R., et al, 2011).

Μια πολύ πρόσφατη ανασκόπηση της αναγεννητικής ικανότητας των αλλογενών CSCs σε ασθενείς με STEMI (CAREMI TRIAL), LVEF<45% και μέγεθος εμφράγματος >25% επιχειρήθηκε (Fernández-Avilés F., et al, 2018) τυχαιοποιώντας ασθενείς για να λάβουν 35×10^6 κύτταρα 2:1 με placebo (33 ασθενείς να λάβουν CSCs και 16 placebo) μέσω ενδοστεφανιαίας έγχυσης 3-5 μέρες μετά το εμφραγματικό επεισόδιο. Το κυτταρικό προϊόν λήφθηκε από τους δότες και επιβεβαιώθηκε η παρουσία σε αυτό καρδιακών και καρδιομυικών δεικτών όπως οι SOX17, TBX5 και GATA4. Τον πρώτο μήνα δε παρατηρήθηκαν επεισόδια στους ασθενείς όπως ισχαιμίες, κοιλιακές ταχυκαρδίες και άλλα, ενώ στην εκτίμηση του 1^{ου} χρόνου από το σύνολο των σοβαρών επεισοδίων (67% στους ασθενείς που έλαβαν κύτταρα και 52% στους placebo) μόνο 5 και 2 στους ασθενείς που πήραν CSCs και placebo αντίστοιχα σχετίστηκαν με τη θεραπεία και όλα προέκυψαν μέσα στον πρώτο μήνα, ενώ η κρεατινική κινάση μειώθηκε πιο γρήγορα στους ασθενείς που έλαβαν CSCs. Δε παρατηρήθηκαν ανοσολογικές αντιδράσεις σχετιζόμενες με τη θεραπεία. Το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού σε σχέση με το μέγεθος της αριστερής κοιλίας μειώθηκε στο CSCs γκρουπ κατά 15,6% και κατά 13,3% στο placebo γκρουπ εμφανίζοντας τη μεγαλύτερη πτώση στον πρώτο μήνα και στα δύο γκρουπ. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα στις λειτουργικές παραμέτρους και τις παραμέτρους αναδιαμόρφωσης της καρδιάς στα δυο γκρουπ, που μελετήθηκαν με ηχοκαρδιογραφήματα και μαγνητική τομογραφία. Το LVEF αυξήθηκε 7,7% και 8,6% σε CSCs και placebo γκρουπ αντίστοιχα, ο δείκτης του LVEDV αυξήθηκε 10 και 9 ml/m² και ο δείκτης του LVESV μειώθηκε 0,9 ml/m² και αυξήθηκε 3,5 ml/m² σε CSCs και placebo γκρουπ αντίστοιχα, με όλες τις αλλαγές να υποδεικνύουν υπεροχή των placebo και τις μεγαλύτερες αλλαγές να συμβαίνουν στον πρώτο μήνα. Ομοίως, ο δείκτης της κινητικότητας του τοιχώματος της καρδιάς μειώθηκε κατά 0,6 και 0,7 στο CSC γκρουπ και placebo γκρουπ αντίστοιχα, ενώ στο τεστ του 6-λεπτου περπατήματος παρατηρήθηκε αύξηση 117 μέτρων σε όλους τους ασθενείς. Επομένως, μια ασφαλής πρακτική μεταμόσχευσης που παρουσιάζει μηδαμινές διαφορές ανάμεσα σε βλαστικά καρδιακά κύτταρα και κύτταρα placebo.



Εικόνα 49. Αλλαγές στις τιμές των λειτουργικών μεταβλητών σε CSCs (n=31) και placebo (n=16) στον 1, 6 και 12 μήνες. Πάνω αριστερά: Μέγεθος εμφράγματος, πάνω δεξιά: LVEF, κάτω αριστερά: LVESVI, κάτω δεξιά: LVEDVI (Fernández-Avilés F., et al, 2018).

Έπειτα δοκιμάστηκε μια προσέγγιση με CDCs τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε καρδιόσφαιρες (CADUCEUS TRIAL) (Makkar R., et al, 2012) σε ασθενείς που είχαν περάσει το στάδιο του MI με δυσλειτουργία αριστερής κοιλίας και EF μεταξύ 25% και 45%. 31 ασθενείς σχεδιάστηκε να λάβουν τα αυτόλογα CDCs ενδοστεφανιαία, από τους οποίους τελικά 4 πήραν μια μικρή δόση (12,5 εκατομμύρια κύτταρα) 1 μεσαία δόση (13,3 εκατομμύρια κύτταρα) και 12 μεγάλη δόση (25 εκατομμύρια κύτταρα). Δεν αναφέρθηκαν επιπλοκές στις πρώτες 24 ώρες, αλλά στους 6 μήνες αναφέρθηκαν 5 ασθενείς με επιπλοκές και άλλοι 2 στους 12 μήνες. Οι κοιλιακές ταχυκαρδίες ήταν ομοιόμορφα κατανομημένες μεταξύ των γκρουπ, και περιλάμβαναν 1 ασθενή του γκρουπ με την υψηλή δόση, ένα από αυτό της χαμηλής δόσης και 2 control. Στους 6 μήνες οι ασθενείς με CDCs έδειξαν μια αύξηση 11,4 m στη δοκιμασία του βλεπου περπατήματος και 33 m στους 12 μήνες συγκρινόμενοι με την αύξηση των control 13,1 m στους 6 μήνες αλλά μείωση κατά 9,6 m στους 12 μήνες. Όσον αφορά το μέγεθος του ουλώδους ιστού, αυτός μέσω μαγνητικής τομογραφίας έδειξε βελτίωση 7,7% στους ασθενείς που πήραν κύτταρα στους 6 μήνες και 12,3% στους 8 μήνες ενώ στα control παρέμεινε αναλώσιμο στους 6 μήνες και παρουσίασε μικρή αύξηση στους 12. Αναλόγως μειώθηκε και η μάζα του εμφραγματικού ιστού κατά 28% στους 6 μήνες και 42% στους 12, και η μάζα του αναγεννημένου μυοκαρδιακού ιστού αυξήθηκε κατά 13 g στους πρώτους 6 μήνες και παρουσίασε παρόμοια βελτίωση στους 12 σε σύγκριση με τα control που δεν επέδειξαν βελτίωση. Το κλάσμα εξώθησης παρουσιάστηκε σχεδόν διπλάσιο στους 6 μήνες στους ασθενείς με CDCs, ενώ για τον LVEDV παρουσιάστηκε μείωση κατά 7,2 mL σε αντίθεση με τα control που υπήρξε αύξηση 7,3 mL και για τον LVESV είχαμε μείωση 7,8mL στο CDC γκρουπ και αύξηση 0,2 στο control. Οι μεταβλητές αυτές δε παρουσίασαν διαφορές στα διάφορα δοσοεξαρτώμενα γκρουπ. Τέλος η τοπική συσπαστικότητα του τοιχώματος και η πάχυνση κατά τη συστολή ήταν αυξημένες στους 6 μήνες στο CDC γκρουπ που δείχνει μαζί με τα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά μια τοπική όπως και γενική βελτίωση της λειτουργικότητας της καρδιάς και αναστολή της αναδιαμορφώσής της.



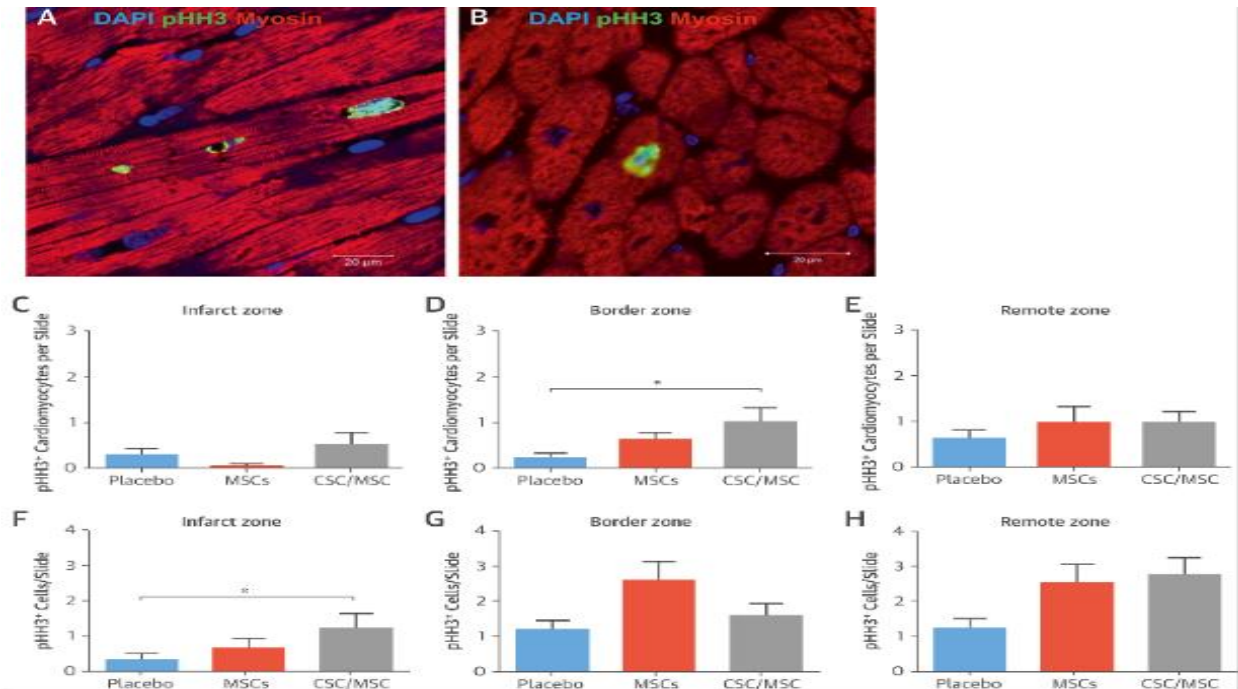
Εικόνα 50. Μαγνητική τομογραφία και αλλαγές στον εμφραγματικό ιστό στη βάση του πειράματος και στους 6 μήνες μετά το MI. Τυχαίος επιλαχών για να λάβει CDCs A) στη βάση του πειράματος, (B) 6 μήνες μετά τη μεταμόσχευση. Control ασθενής, C) στη βάση του πειράματος (D) 6 μήνες μετά. Ο εμφραγματικός ιστός (πράσινα βέλη) είναι προφανής από σημεία υπερουαισθησίας (άσπρα) και το λειτουργικό μυοκάρδιο εμφανίζεται σκούρο.. Διαφορές στο μέγεθος του εμφραγματικού ιστού (E) στους 6 (F) και τους 12 μήνες. CDC=κύτταρα προερχόμενα από καρδιόσφαιρες (Makkar R., et al, 2012).

Ομάδα προσπάθησε να αξιολογήσει τα αποτελέσματα της αλλογενούς ενδοστεφανιαίας μεταμόσχευσης CDCs τα οποία έχουν σχηματίσει καρδιόσφαιρες (ALLSTAR TRIAL) (Makkar R., et al, 2017) σε ασθενείς μεταξύ 4 εβδομάδων και 12 μηνών μετά από MI οι οποίοι είχαν ισχαιμική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας, EF μικρότερο του 45% και μέγεθος εμφραγματικού ιστού μεγαλύτερο του 15% της μάζας της αριστερής κοιλίας. Οι ασθενείς που επιστρατεύτηκαν τελικά ήταν 134 από τους οποίους 90 πήραν τα κύτταρα και 44 χρησιμοποιήθηκαν για control. Η αξιολόγηση έγινε έπειτα από 12 μήνες από τη μεταμόσχευση και περιλάμβανε μαγνητική τομογραφία. Στον ένα μήνα δε παρατηρήθηκε κάποια σοβαρή επιπλοκή όπως ξαφνικός θάνατος, οξεία μυοκαρδίτιδα, κοιλιακή ταχυκαρδία ή κάποια άλλη. Όσον αφορά τις λειτουργικές παραμέτρους, ο LVESV και ο LVEDV παρέμειναν σταθεροί στους ασθενείς που έλαβαν κύτταρα στους 6 μήνες σε σχέση με την αρχή του πειράματος αλλά αυξήθηκαν κατά 8ml και 13 ml αντίστοιχα στα placebo, ενώ το LVEF δε παρουσίασε διαφορές σε κανένα από τα δυο γκρουπ. Τόσο το σχετικό μέγεθος του ινώδους ιστού (5% στα κύτταρα και 4,1% στα control) όσο και η μάζα του εμφραγματικού ιστού (+2g στα κύτταρα και +1,5g στα placebo) δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους όσο και με την αρχή του πειράματος. Συμπερασματικά τα κύτταρα που σχηματίζουν καρδιόσφαιρες συμβάλουν σχετικά στην αναδιαμόρφωση της καρδιάς αλλά δεν έχουν καμία ουσιαστική συνεισφορά στη λειτουργική κατάσταση και το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού στην καρδιά.

Επιπλέον μελετήθηκαν προσεγγίσεις συνδυαστικού χαρακτήρα που περιελάμβαναν CSCs και βλαστικά κύτταρα του μυελού των οστών (William A., et al, 2012, Karantalis V., et al, 2015). Στην πρώτη από τις 2 έρευνες (William A., et al, 2012) μεταμοσχεύθηκαν ενδομυϊκά σε μοντέλο ανοσοκετεσταλμένου χοίρου 14 μέρες μετά από MI και θεραπεία επαναιμάτωσης αλλογενή MSCs, είτε μόνα τους, είτε σε συνδυασμό με CSCs, είτε CSC μόνο τους, είτε placebo κύτταρα. Η μεταμόσχευση περιελάμβανε 200 εκατομύρια MSCs σε όλες τις περιπτώσεις είτε 1 εκατομμύριο CSCs σε όλες τις περιπτώσεις, στα όρια

του εμφραγματικού ιστού και η φαινοτυπική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με μαγνητική τομογραφία είτε με αιμοδυναμικές αναλύσεις. Στις δυο εβδομάδες πριν την μεταμόσχευση και μετά το MI το μέγεθος του εμφράγματος ήταν παρόμοιο στα διάφορα γκρουπ και αποτελούσε περίπου το 18% του μεγέθους της αριστερής κοιλίας, ενώ στους 4 μήνες για τα CSCs και τα MSCs μόνα τους η μείωση στο μέγεθος του εμφράγματος ήταν 10.4% και 9.9% αντίστοιχα, στο συνδυαστικό γκρουπ είχαμε μια διπλάσια μείωση της τάξης του 21,1%. Ακόμα, το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού σαν ποσοστό της αριστερής κοιλίας μειώθηκε κατά 36.8% στο συνδυαστικό γκρουπ, 25,6% στα CSCs, 23,6% στα MSCs και 10,9% στα placebo. Το κλάσμα εξώθησης κατά ενδιαφέροντα τρόπο είχε φτάσει τα επίπεδα που ήταν όταν ξεκίνησε το πείραμα σε όλα τα γκρουπ που έλαβαν κύτταρα στις 4 εβδομάδες και στο συνδυαστικό γκρουπ συνέχισε να αυξάνεται ενώ στα άλλα δυο γκρουπ κυττάρων παρουσίασε μικρή μείωση μέχρι τις 6 εβδομάδες σε αντίθεση με τα placebo που αυξήθηκε λίγο στις 4 εβδομάδες χωρίς όμως να φτάσει τα αρχικά επίπεδα αλλά ξαναέπεσε στους 6 μήνες. Όσον αφορά την αναδιαμόρφωση της καρδιάς, ο LVESV στο συνδυαστικό γκρουπ έπεσε κατά 4,4 ml στις 4 εβδομάδες και συνέχισε την καθοδική πορεία κατά ακόμα 3,8 ml μέχρι τις 6 εβδομάδες, ενώ στα άλλα δυο γκρουπ των κυττάρων εμφάνισε καθοδική πορεία μέχρι τις 4 εβδομάδες αλλά ανέβηκε πάλι στους 6 μήνες, ενώ στα placebo εμφάνισε σταθερή ανοδική πορεία. Ο LVEDV από την άλλη παρουσίασε ανώμαλη πορεία αύξησης σε όλα τα γκρουπ αν και στο συνδυαστικό γκρουπ ανέστειλε σχεδόν τελείως την αύξησή του στις 6 εβδομάδες, που υποδηλώνει μια σταθεροποίηση. Τέλος μέσω ανοσοιστοχημείας έγινε γνωστό ότι ο συνδυασμός των κυττάρων επέφερε 7πλάσια συγχώνευση των κυττάρων στο περιβάλλον του εμφράγματος από κάθε άλλο γκρουπ κυττάρων. Συνολικά μια πολύ καλύτερη συμπεριφορά του συνδυασμού των CSCs και MSCs τόσο δομικά και λειτουργικά όσο και στην αναστολή της αναδιαμόρφωσης της καρδιάς.

Στη δεύτερη έρευνα (Karantalis V., et al, 2015) (μεταμόσχευσαν σε μοντέλο ανοσοκατεσταλμένου χοίρου με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια ενδοκαρδιακά αυτόλογα MSCs (n=6) είτε συνδυασμό αυτόλογων MSCs και CSCs (n=8) είτε placebo (n=6) 3 μήνες μετά από τραυματισμό ισχαιμικής φύσης και θεραπεία επαναιμάτωσης. Οι δομικές και λειτουργικές μεταβλητές της καρδιάς μελετήθηκαν μέσω μαγνητικής τομογραφίας πριν και μετά την μεταμόσχευση των κυττάρων στους 3 μήνες μετά τη μεταμόσχευση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μέγεθος του ουλώδους ιστού μειώθηκε και στα δυο γκρουπ κυττάρων (MSCs: $-44.1 \pm 6.8\%$, CSC/MSC: $-37.2 \pm 5.4\%$, placebo: $-12 \pm 4.2\%$) και ο ζωντανός ιστός αυξήθηκε (CSC/MSC: 30.9%, MSCs: 43.7%; placebo 13.5%), αλλά και η κινητικότητα του τοιχώματος βελτιώθηκε σε αμφότερα τα γκρουπ. Το κλάσμα εξώθησης έδειξε στατιστικά σημαντική βελτίωση (MSCs: +14,3%, CSC/MSC: +20,6%, placebo: +13,9%) μόνο στο συνδυαστικό γκρουπ, το οποίο συνοδεύτηκε από μια αξιοθαύμαστη αύξηση του όγκου παλμού μόνο στο συνδυαστικό γκρουπ της τάξης του 47,2%. Η συσπαστικότητα σε τοπικό επίπεδο αυξήθηκε στα γκρουπ που έλαβαν κύτταρα αλλά περισσότερο στο MSC/CSC γκρουπ και η διαστολική λειτουργία επιδέχθηκε βελτίωση μόνο στο συνδυαστικό γκρουπ το οποίο εμφάνισε και μεγαλύτερη μιτωτική δραστηριότητα στον εμφραγματικό ιστό όπως και περισσότερα καρδιομυοκύτταρα στα όρια του ουλώδους ιστού. Ακόμα όσον αφορά την αγγειακή λειτουργία, αυτή βελτιώθηκε στα γκρουπ των κυττάρων αλλά μειώθηκε στα placebo (CSC/MSC: 147.6%, MSCs: 142.5%, placebo: -102.4%). Όλα αυτά δείχνουν μια υπεροχή του συνδυασμού των δύο κατηγοριών κυττάρων στη βελτίωση της δομής, της λειτουργίας, της αιμάτωσης και της αναστολής της αναδιαμόρφωσης σε σχέση με την επίδραση μόνο των CSC.



Εικόνα 51. Η μικροσκοπία αποκαλύπτει αυξημένη δραστηριότητα των ενδογενών καρδιομυοκυττάρων (H3-θετικοί σε φωσφο-ιστόνες πυρήνες [pHH3⁺]) στο (A) όριο και (B) την απομακρυσμένη περιοχή 3 μήνες μετά την ενδοκαρδιακή μεταμόσχευση. Βασιζόμενοι στο μέσο αριθμό pHH3⁺ ενεργών καρδιομυοκυττάρων στα γκρουπ, στο (C) έμφραγμα, (D) την περιοχή του ορίου, και (E) τις απομονωμένες περιοχές, η συνδυαστική θεραπεία αποκάλυψε σημαντική αύξηση στην περιοχή του ορίου σε σχέση με τα placebo (*p = 0.05). Βασιζόμενοι στο μέσο αριθμό pHH3⁺ μιτωτικώς διαιρούμενων κυττάρων στο μυοκάρδιο ανά γκρουπ στο (F) έμφραγμα, (G) την περιοχή του ορίου, και (H) τις απομακρυσμένες περιοχές, η συνδυαστική θεραπεία παρουσίασε σημαντική διαφορά από το placebo στο έμφραγμα (*p = 0.05) (Karantalis V., et al, 2015).

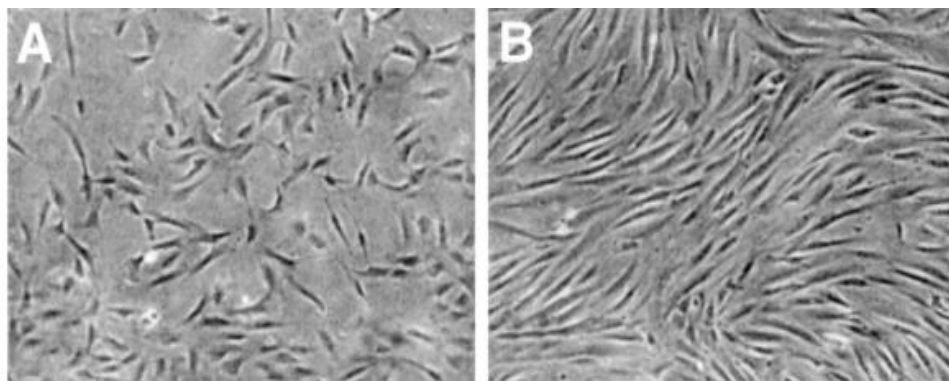
Από τις προηγούμενες μελέτες και εφόσον είναι γνωστός ο παρακρινής ρόλος των MSCs στο μυοκάρδιο θεωρήθηκε σωστό να εφαρμοστούν τεχνικές και στον άνθρωπο για την ταυτόχρονη μεταμόσχευση MSCs και CSCs για την ενίσχυση των τεχνικών της δεύτερης γενιάς κυττάρων στην αναγέννηση του μυοκαρδίου. Αυτή τη στιγμή υπάρχουν στο προσκήνιο μελέτες που αφορούν τα βλαστικά καρδιακά κύτταρα όπως η CONCERT-HF TRIAL στην οποία μελετώνται συνδυαστικά αυτόλογα MSCs και αυτόλογα CPCs για τα αποτελέσματά τους στο μυοκάρδιο. Έτσι στη μελέτη αυτή μελετάται η ενδοστεφανιαία μεταμόσχευση 1)MSCs 2)CPCs 3) συνδυασμού των δυο παραπάνω και 4)placebo σε 144 ασθενείς που τώρα κατανέμονται σε γκρουπ.

Σε παρόμοιο στυλ είναι και η TAC-HFT TRIAL που έχει ως σκοπό να συγκρίνει τα αποτελέσματα των αυτόλογων MSCs και c-kit⁺ CSCs στο μυοκάρδιο. 50 ασθενείς με προηγηθέν MI και χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια καθώς και δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας θα υποστούν ενδοστεφανιαία μεταμόσχευση των παραπάνω κατηγοριών κυττάρων και θα μοιραστούν σε κατηγορίες ως εξής: 20 ασθενείς θα λάβουν MSCs, 20 θα λάβουν c-kit⁺ CSCs και 10 placebo και θα μελετηθούν ως προς τις δομικές και λειτουργικές διαφορές στην αριστερή κοιλία και την καρδιά γενικότερα.

Σε γενικές γραμμές, τα CSCs και CDCs είναι πληθυσμοί κυττάρων που αντίθετα με τις προηγούμενες μπορούν να διαφοροποιηθούν σε καρδιομυοκύτταρα εκτός από λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα συνεισφέροντας τα οφέλη τους στο τραυματισμένο μυοκάρδιο. Κατέχουν κλωνογονικότητα, πολυδυναμία και ικανότητα αυτοανανέωσης, αλλά υπάρχουν ελάχιστα στον οργανισμό, τα οποία σε βλαστική κατάσταση εμφανίζουν δείκτες όπως c-kit, Sca-1 ή ISL-1 οι οποίοι τείνουν να μετατραπούν σε δείκτες ώριμων καρδιομυοκυττάρων με τη διαφοροποίησή τους. Τα μεταφερόμενα εξωγενή CSCs λειτουργούν τόσο διαφοροποιούμενα στον οργανισμό σε καρδιομυοκύτταρα είτε μέσω παρακρινών μονοπατιών στα οποία συμμετέχουν μόρια όπως τα HFG, IGF-1, VEGF και SDF-1, τα οποία συνεισφέρουν στη ενεργοποίηση του ενδογενούς πληθυσμού, την καρδιοπροστασία και την αναστολή της απόπτωσης μέσω akt ή απενεργοποίησης της κασπάσης-3, μείωση των ενεργών ριζών υδρογόνου, αύξηση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και την αγγειογένεση. Μεταφερόμενα στον οργανισμό τα CSCs καταλήγουν κυρίως στο εμπρόσθιο τοίχωμα της κοιλίας μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας, ενώ αποσύρονται από όργανα όπως οι πνεύμονες και τα νεφρά μέσω της πνευμονικής οδού, και έτσι τα περισσότερα οφέλη τους αφορούν της αριστερή κοιλία. Τα οφέλη αυτά αφορούν μείωση τους εμφραγματικού ιστού και αντικατάστασή του από ζωντανό, μείωση του κολλαγονικού περιεχομένου, πάχυνση του τοιχώματος και αύξηση της κινητικότητας και της συσταλτικότητάς του. Αυτά με τη σειρά τους οδηγούν σε βελτίωση της αγγειώδους και αρτηριακής δομής της καρδιάς, αύξηση του κλάσματος εξώθησης, και έπειτα αναστολή της αναδιαμόρφωσής της με περιορισμό των διαστάσεων της αριστερής κοιλίας αν και ο LVEDV αποδείχθηκε δυσκολότερος να περιοριστεί από τον LVESV. Σε σύγκριση των πρακτικών μεταφοράς των κυττάρων, η ενδομυϊκή οδός φαίνεται να υπερέχει έναντι της ενδοστεφανιαίας όσον αφορά την κατακράτηση κυττάρων, αν και η δεύτερη χρησιμοποιήθηκε συχνότερα. Ο ενδογενής πληθυσμός των CSCs ενεργοποιείται τόσο σε οξεία, όσο και σε χρόνια εμφράγματα, αλλά στα οξεία τα ενεργοποιούμενα κύτταρα είναι περισσότερα, με σαφή δράση της Akt άρα και καλύτερη επιβίωση και διατήρηση των τελομερών τους, που οδηγεί και σε μεγαλύτερη μιτωτική δραστηριότητα και λιγότερα κύτταρα που εκφράζουν παράγοντες γήρανσης. Φαίνεται δηλαδή στις χρόνιες καρδιακές ανεπάρκειες ο πληθυσμός των eCSCs να χάνει μέρος της λειτουργικότητάς του. Επίσης σε έρευνες που μεταφέρθηκαν αλλογενή CSCs ή CDCs αντί για αυτόλογα, όλες σχεδόν οι δομικές και λειτουργικές παράμετροι που αναφέρθηκαν ότι βελτιώνονται παραπάνω με τη συνεισφορά των κυττάρων παρουσιάστηκαν παρόμοιοι σε υποκείμενα που έλαβαν κύτταρα και control εκτός ίσως από τους LVESV και LVEDV, με παρακείμενες εξηγήσεις να περιλαμβάνουν τη φύση των κυττάρων αυτών, το σχετικό δείγμα, την μικρή δοσολογία ή την χρονική δομή μεταμόσχευσης των κυττάρων ως μη πρόσφορα για την αντιμετώπιση της καρδιακής ανεπάρκειας και του εμφράγματος. Ακόμα η κατηγορία των κυττάρων αυτή μείωσε της κοιλιακές ταχυκαρδίες και αρρυθμίες και παρουσίασε ισχυρό τροπισμό προς τον πάσχοντα ιστό αντί για το περιβάλλον του, προσφέροντας μια καλύτερη ποιότητα ζωής στους ασθενείς. Τέλος, σε συνδυαστικές μελέτες CSCs και MSCs, τα ζώα που έλαβαν συνδυαστικά τις δυο κατηγορίες κυττάρων φάνηκε να παρουσιάζουν ξεκάθαρο πλεονέκτημα σε σχέση με τα γκρουπ τα οποία έλαβα μια απο τις δυο κατηγορίες ή placebo σε όλες τις δομικές και λειτουργικές παραμέτρους που αναφέρθηκαν παραπάνω, εξ' ου και ο σχεδιασμός αντίστοιχων μελλοντικών μελετών στον άνθρωπο.

2.5 ΑΙΜΑΤΟΠΟΙΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΟΝΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ CD34⁺/CD133⁺

Εν συνεχεία υπήρξε προσπάθεια να εμπλουτιστούν τα κύτταρα του μυελού των οστών με αιμοποιητικά προγονικά κύτταρα τα οποία φέρανε τους δείκτες επιφανείας CD34 και CD133 για καλύτερα αποτελέσματα. Τα κύτταρα αυτά έχουν υψηλή ικανότητα συγχώνευσης στον ιστό του δέκτη καθώς και ισχυρές προαγγειογενείς και αντιαπτωτικές ιδιότητες ενεργοποιούμενες μέσω παρακρινών μονοπατιών, που τα κάνει σημαντικά στην επαναφορά καρδιακών περιοχών που έχουν υποστεί ισχαιμικές βλάβες όπως στην περίπτωση MI και καρδιακών ανεπαρκειών (Quirici N., et al, 2001). Η πρώτη αναφορά έγινε το 2003 (Stamm C., et al, 2003) όταν αναφέρθηκε αυξημένη αιμάτωση σε ασθενείς που έπασχαν από χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια μετά από εγχείρηση bypass όταν τους μεταφέρθηκαν CD133⁺ κύτταρα. Επιστημονική ομάδα επιχείρησε (Bartunek J., et al, 2005) την ενδοστεφανιαία χορήγηση $12,6 \times 10^6$ CD133⁺ κυττάρων σε 19 ασθενείς 11,6 μέρες μετά από MI αυτόλογα και ένα δεύτερο γκρουπ 16 ασθενών χρησιμοποιήθηκε σαν control. Στους 4 μήνες δεν είχαν παρατηρηθεί επεισόδια διατηρημένης κοιλιακής ταχυκαρδίας εκτός από έναν ασθενή με πολύ μειωμένη λειτουργία της δεξιάς κοιλίας και το LVEF αυξήθηκε σημαντικά στο πρώτο γκρουπ κατά 7% αλλά παρουσίασε μια τάση μόνο προς αύξηση στο 2^ο γκρουπ η οποία ήταν 4,3%. Η αναδιαμόρφωση της καρδιάς από την άλλη μεριά δεν εμφάνισε βελτίωση στους ασθενείς που έλαβαν τα CD133⁺ κύτταρα, καθώς ο δείκτης του LVEDV παρουσίασε μια μικρή μη σημαντική μείωση αλλά ο αντίστοιχος δείκτης LVESV παρουσίασε αύξηση στους 4 μήνες και υπήρξε μια σχετική βελτίωση της συσταλτικότητας της καρδιάς, ενώ αυξήθηκε και η αιμάτωση στο γκρουπ που έλαβε τα κύτταρα.



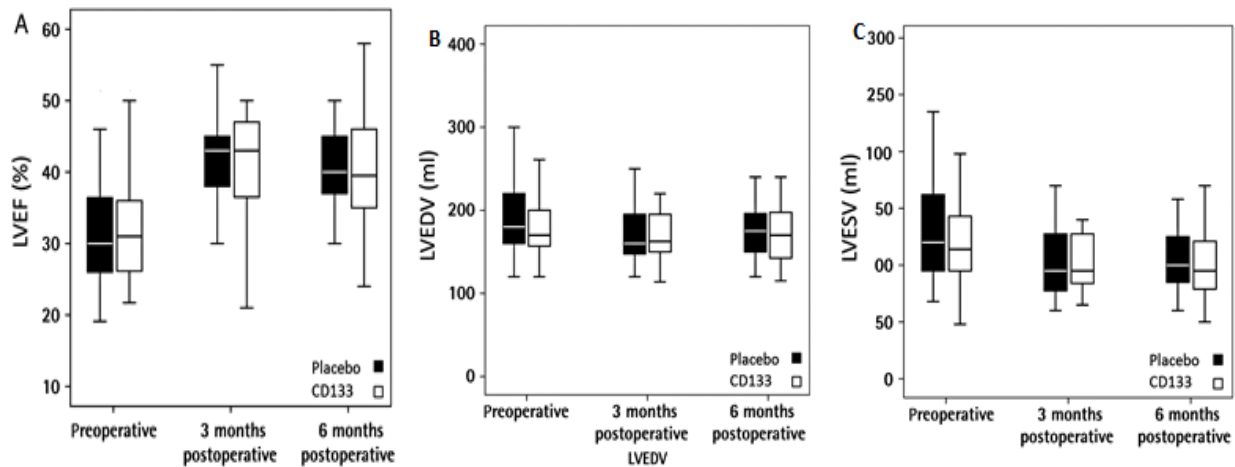
Εικόνα 52. (A) CD133⁺ επιλεγμένα κύτταρα μετά από 2 εβδομάδες καλλιέργειας. Τα κύτταρα μεγαλώνουν σε φιμπρονεκτίνη από αρχικά απομονωμένες αποικίες και έχουν ένα κεντρικό σώμα και

κοντούς κυτταροπλασματικούς δενδρίτες. (x100). (B) Τα ίδια κύτταρα μετά από 4 εβδομάδες καλλιέργειας φτάνουν σημαντικά επίπεδα και έχουν μια επιμυκυσμένη ατρακτοειδή μορφολογία (μεγέθυνση x100) (Quirici N., et al, 2001).

Στην πρώτη συστηματική έρευνα (Stamm C., et al, 2007) μεταμοσχεύθηκαν με τη μέθοδο της ενδομυκικής ενέσεως αυτόλογων CD133⁺ κυττάρων και πολύ μικρό ποσοστό CD34⁺ (η αναλογία των CD133⁺ προς τα CD34⁺ ήταν $5,8 \times 10^6$) κυττάρων σε 40 ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια μετά από MI μέσω bypass στα όρια της εμφραγματικής περιοχής. Η λειτουργία της καρδιάς και η επαναιμάτωση μελετήθηκαν μέσω ηχοκαρδιογραφίας και μαγνητικής τομογραφίας, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αρρυθμίες, θάνατοι ή άλλα σοβαρά καρδιακά προβλήματα. Σε μελέτη που έγινε για την εκτίμηση της ασφάλειας της μεθόδου σε 15 ασθενείς, το LVEF αυξήθηκε κατά 11% στους 6 μήνες μετά τη μεταμόσχευση το οποίο έπεσε στο 9% στους 18 μήνες και ο LVESV εμφάνισε τη δραματική μείωση των 26 mL στους 6 μήνες που διατηρήθηκε σχεδόν αναλώπιτη στους 18 μήνες, ενώ ο LVEDV έδειξε μια ανάλογη πτώση 23 mL στους 6 μήνες και 18 mL στους 18 μήνες, ποσοστό όμως που δε

θεωρήθηκε στατιστικά σημαντικό στο πείραμα. Η μυοκαρδιακή επαναιμάτωση βελτιώθηκε κατά 15% στους 2 μήνες μετά την εγχείρηση και διατηρήθηκε σταθερή στους 6 και 18 μήνες. Αντίστοιχα σε 40 ασθενείς το LVEF αυξήθηκε κατά 10% στους 6 μήνες αλλά μόνο 3,3% στους ασθενείς που πέρασαν μόνο από bypass, ο LVEDV μειώθηκε στο πρώτο γκρουπ κατά 11 mL στους 6 μήνες, αλλά μόνο 4,4 mL στο control, και τέλος ο LVESV μειώθηκε κατά 19 mL στο πρώτο γκρουπ αλλά μόνο 5,5 mL στο δεύτερο. Ακόμα η επαναιμάτωση ήταν πιο έντονη στο γκρουπ που έλαβε τα κύτταρα στους 6 μήνες από το control.

Παρόλες τις πρώτες θετικές επιδράσεις των CD133⁺/CD34⁺ στην καρδιακή λειτουργία και αναδιαμόρφωση, οι πρώτες έρευνες που χρησιμοποίησαν περισσότερο συστηματοποιημένο ερευνητικό σχεδιασμό (με χρήση placebo και πλήρη τυχαιοποίηση των ασθενών) δεν υποστήριξαν τη θεραπευτική ικανότητα των αιματοποιητικών προγονικών κυττάρων (Nasserí B., et al, 2014). Μεταμοσχεύθηκαν σε 60 ασθενείς με ισχαιμική καρδιομυοπάθεια μετά από MI και EF<35% ενδομυϊκά αυτόλογα 5×10^6 CD133⁺ κύτταρα μέσω εγχείρησης bypass (CARDIO133 TRIAL) δημιουργώντας 2 γκρουπ των 30 ασθενών, όπου το δεύτερο γκρουπ πήρε προϊόν placebo μέσω bypass. Τα κύτταρα μεταφέρθηκαν στα όρια της υποκινητικής εμφραγματικής περιοχής και τα χαρακτηριστικά της λειτουργίας της καρδιάς και των διαστάσεων της μετρήθηκαν με μαγνητική τομογραφία και ηχοκαρδιογράφημα. Στους έξι μήνες η τομογραφία έδειξε ότι το LVEF ήταν 31% στους ασθενείς που έλαβαν κύτταρα και 33% στους placebo ασθενείς (τα επίπεδα στην αρχή το πειράματος ήταν ίδια). Υπήρξαν 2 θάνατοι 1 μήνα μετά τη θεραπεία στο γκρουπ που έλαβε τα κύτταρα και κανένας στο placebo, ενώ η υψηλή εμφάνιση σοβαρών προβλημάτων στους ασθενείς μετά τη θεραπεία αποδώθηκε στην σοβαρότητα της εγχείρησης και της καρδιακής ανεπάρκειας των ασθενών. Ομοίως δεν υπήρξε διαφορά στο LVEDD (59 mm στο placebo έναντι 61 mm στο γκρουπ των κυττάρων) ή στο LVEDV (218 mL στο placebo έναντι 224 mL στο γκρουπ των κυττάρων) στους 6 μήνες, ενώ ίδια εικόνα εμφάνισαν και οι LVESD και LVESV, αν και η συνολική εικόνα της αναδιαμόρφωσης της καρδιάς βελτιώθηκε. Η ικανότητα της καρδιάς για σύσπαση στα όρια του εμφραγματικού ιστού βελτιώθηκε σε 39 περιοχές στο γκρουπ των κυττάρων ενώ χειροτέρεψε σε 17 περιοχές, και η αντιστοιχία στο placebo ήταν 42 και 17 περιοχές. Η μάζα του εμφραγματικού ιστού μειώθηκε ελάχιστα (2%) στο γκρουπ που έλαβε τα κύτταρα και παρέμεινε σταθερή στα placebo, αλλά η αιμάτωση στις περιοχές που έλαβαν τα κύτταρα ήταν ελαφριά καλύτερη στους ασθενείς που έλαβαν CD133⁺ αν και η βελτιωμένη εικόνα των εξεταζομένων περιοχών στο πρώτο γκρουπ δε συνέπιπτε πάντα με τις περιοχές που μεταφέρθηκαν τα κύτταρα. Τέλος το τεστ του βλεππου περπατήματος στους 6 μήνες που διενεργήθηκε σε 25 ασθενείς από κάθε γκρουπ εμφάνισε τις ίδιες μέσες τιμές, αν και το εύρος των τιμών στο γκρουπ που έλαβε τα κύτταρα ήταν πολύ μεγαλύτερο. Γενικότερα μια εικόνα που καθόλου δε συμβαδίζει με τις προηγηθείσες έρευνες, η κλινική και λειτουργική εικόνα με μεταφορά η μη CD133⁺ κυττάρων στους ασθενείς δε φάνηκε να επηρεάζει το αποτέλεσμα της εγχείρησης.

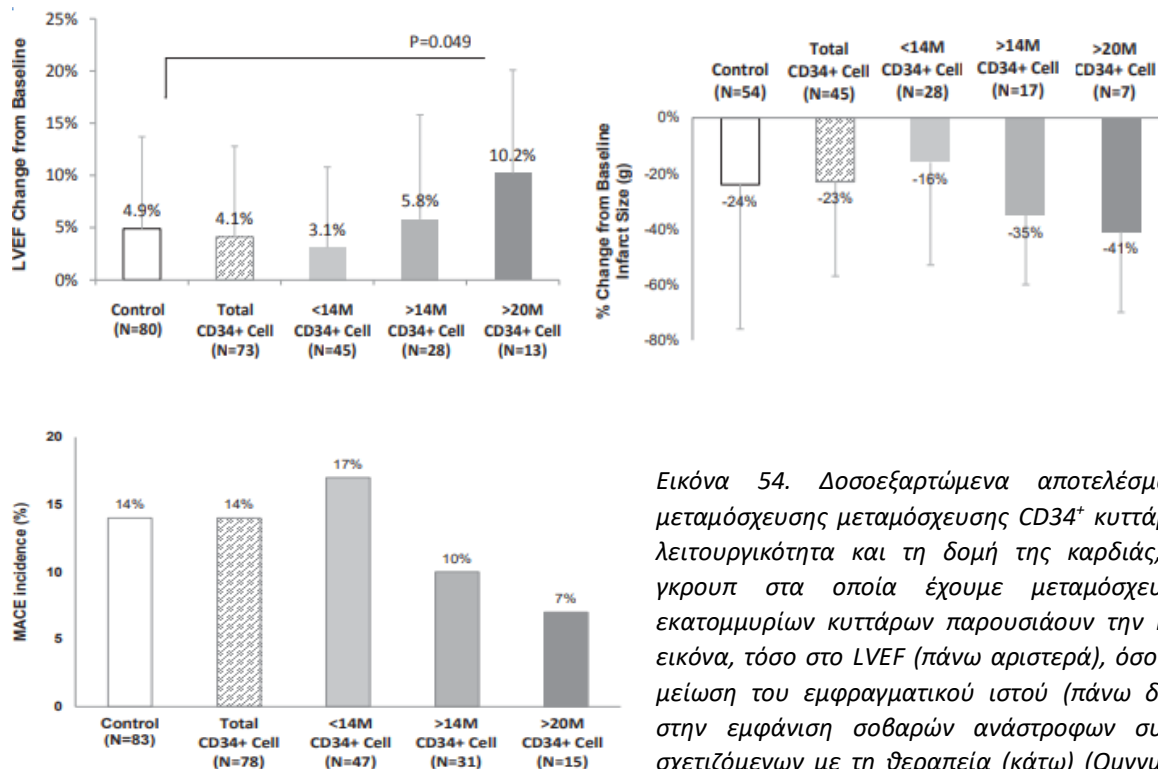


Εικόνα 53. Λειτουργία της αριστερής κοιλίας μέσω ηχοκαρδιογραφίας πριν την εγχείρηση και στους 3 και 6 μήνες έπειτα. (A) LVEF (σημαντική διαφορά αμφοτέρων των γκρουπ σε σχέση με τη βάση του πειράματος). (B) LVEDV, (C) LVESV. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις (Nasseri B. et al, 2014).

Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν (Noiseux N., et al, 2016) με τη μυοκαρδιακή μεταφορά αυτόλογων CD133⁺ σε ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια μετά από MI και LVEF<40% με τη βοήθεια bypass (IMPACT-CABG TRIAL). Οι ασθενείς χωρίστηκαν σε 2 γκρουπ από τα οποία το πρώτο (28 ασθενείς) πήρε 10 εκατομμύρια CD133⁺, CD34⁺, CD45⁺ κύτταρα και το δεύτερο (14 ασθενείς) πήρε placebo και οι λειτουργικές και δομικές διαφορές μεταξύ τους εκτιμήθηκαν με ηχοκαρδιογραφία και μαγνητική τομογραφία στους 6 μήνες μετά την εγχείρηση. Δεν παρατηρήθηκαν σοβαρά περιστατικά σχετιζόμενα με τη θεραπεία μετά τη μεταμόσχευση. Όσον αφορά το LVEF αυτό βελτιώθηκε σημαντικά 6 μήνες μετά τη μεταμόσχευση και στους ασθενείς που έλαβαν κύτταρα αυξήθηκε κατά 8% ενώ σε αυτούς που πήραν placebo κατά 12%. Αντίστοιχες σημαντικές βελτιώσεις παρατηρήθηκαν και στις διαστάσεις της καρδιάς, όπου ο LVEDVI μειώθηκε στο πρώτο γκρουπ μειώθηκε κατά 12 μονάδες, ενώ στο δεύτερο κατά 13 μονάδες, καθώς και ο LVESVI ο οποίος μειώθηκε στο πρώτο γκρουπ κατά 14 μονάδες και στο δεύτερο κατά 13 μονάδες. Η ομάδα κατέληξε ότι οι διαφορές μεταξύ των γκρουπ δεν ήταν σημαντικές και δε σχετιζόνταν με τον αριθμό των κυττάρων που έλαβε κάθε ασθενής.

Επίσης μελετήθηκε η επίδραση αυτόλογων 0,5-5 x 10⁶ CD133⁺ κυττάρων ή placebo σε 58 ασθενείς με χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια μετά από MI και LVEF 20-25% με τη βοήθεια εγχείρησης bypass και ενδομυϊκής μεταφοράς (PERFECT TRIAL) (Steinhoff, G., et al, 2017). Βρέθηκαν 2 μόνο ασθενείς με κοιλιακές ταχυκαρδίες (από ένα σε κάθε γκρουπ) και 33 ακόμα ασθενείς (15 στα placebo και 19 στους CD133⁺) εμφάνισαν μικρότερα προβλήματα κυρίως αρρυθμίες και καρδιακά προβλήματα. Η μαγνητική τομογραφία και το ηχοκαρδιογράφημα έδειξαν σημαντική βελτίωση στο κλάσμα εξώθησης μετά από 6 μήνες από το μέσο όρο 33,5% που ήταν στη βάση κατά 9,2% στους ασθενείς που έλαβαν κύτταρα και 7,3% στους ασθενείς που πήραν placebo. Ο δείκτης του LVEDV μειώθηκε 6 μονάδες στα placebo και 5,8 στους ασθενείς που πήραν κύτταρα και του LVESV αντίστοιχα μειώθηκε κατά 12,5 μονάδες στα placebo και 10 μονάδες στους ασθενείς που πήραν κύτταρα. Όλες αυτές οι διαφορές δε θεωρήθηκαν σημαντικές ανάμεσα στα γκρουπ. Αντίθετα το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού συνέχισε να αυξάνεται στα placebo και παρουσιάστηκε 3 g αυξημένο στους 6 μήνες ενώ στους ασθενείς που έλαβαν CD133⁺ μειώθηκε κατά 3,3 g, ενώ και η επαναιμάτωση που παρατηρήθηκε στο πρώτο γκρουπ δεν παρατηρήθηκε στο δεύτερο. Η μάζα της αριστερής κοιλίας μειώθηκε σημαντικά και στα 2 γκρουπ χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.

Ακόμα επιστημονική ομάδα προέβη σε ενδοστεφανιαία μεταμόσχευση 10 εκατομμυρίων αυτόλογων CD34⁺ κυττάρων σε 78 ασθενείς με προηγηθέν STEMI και LVEF<48%, ενώ χορήγησαν σε άλλους 83 ασθενείς διάλυμα άνευ κυττάρων (preSERVE AMI) (Quyyumi A., et al, 2017). Όλοι οι ασθενείς που έλαβαν κύτταρα επιβίωσαν σε εκτίμηση ενός χρόνου, ενώ είχαμε 3 θανάτους στο γκρουπ που δε πήρε κύτταρα, ενώ τα σοβαρά επακόλουθα ήταν παρόμοια σε αριθμό στα 2 γκρουπ, αν και σε παρεαίρω αναλύσεις φάνηκε να υπάρχει τάση προς μείωση σε ασθενείς που λάμβαναν CD34⁺ όσο αυξανόταν η δόση, αλλά όχι σημαντικά (σε ασθενείς που έλαβαν περισσότερα από 20 εκατομμύρια κύτταρα τα σοβαρά επακόλουθα ήταν μειωμένα κατά 7% σε σχέση με τα control αλλά και με τους ασθενείς που πήραν 10 εκατομμύρια κύτταρα). Στους 6 μήνες παρατηρήθηκε βελτίωση της αιμάτωσης και στα 2 γκρουπ χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των γκρουπ ή εξαρτώμενες από τη δόση των κυττάρων. Αναλύσεις στο LVEF έδειξαν στατιστικά σημαντική βελτίωση στους 6 μήνες και στα δυο γκρουπ παρόλο που δεν υπήρχε σημαντική διαφορά ανάμεσα στα γκρουπ των ασθενών. Παρεαίρω πειράματα που συνέκριναν ασθενείς που έλαβαν μεγαλύτερες ποσότητες κυττάρων CD34⁺ έδειξαν ότι αυτοί που έλαβαν πάνω από 20 εκατομμύρια κύτταρα παρουσίασαν σημαντικές διαφορές από τα αντίστοιχα control της τάξης του 5%. Η χορήγηση των κυττάρων δε φάνηκε να επηρεάζει τους LVESV και LVEDV. Όσον αφορά το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού υπήρξε σμίκρυνση και στα δυο γκρουπ του πειράματος, κατά 24% στο control και 23% στους ασθενείς που έλαβαν κύτταρα και οι διαφορές μεταξύ των γκρουπ ήταν αμελητέες, αλλά σε πειράματα που έγιναν με αύξηση της δόσης των κυττάρων, σε ασθενείς όπου τους χορηγήθηκαν 14 και 20 εκατομμύρια κύτταρα, υπήρξε πολύ μεγαλύτερη σμίκρυνση του εμφράγματος κατά 35 και 41% αντιστοίχως. Συνολικά οι δομικές και λειτουργικές παράμετροι του καρδιομυϊκού ιστού αλλά και της ασφάλειας της μεταμόσχευσης φαίνεται να επηρεάζονται εν μέρει από την αύξηση της δοσολογίας των CD34⁺ κυττάρων.



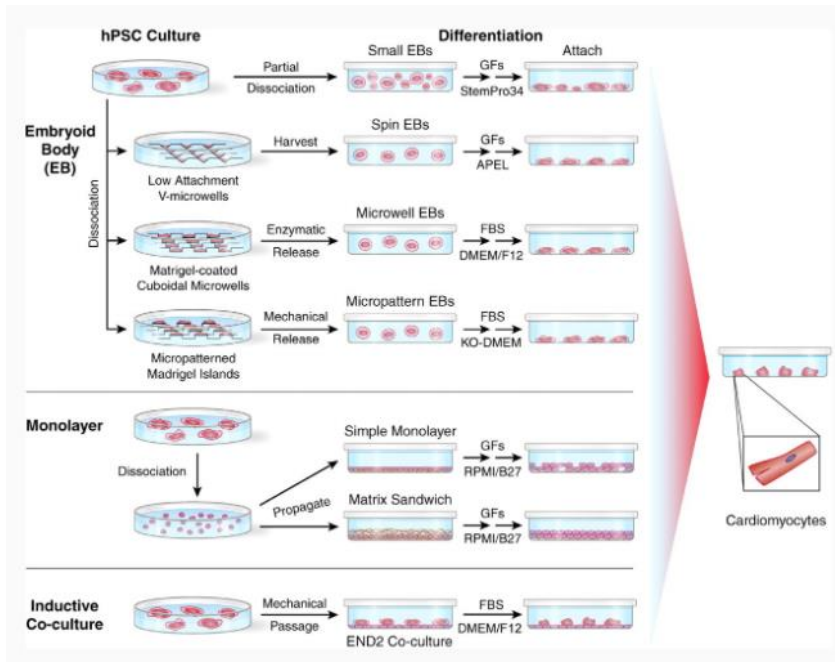
Εικόνα 54. Δοσοεξαρτώμενα αποτελέσματα της μεταμόσχευσης μεταμόσχευσης CD34⁺ κυττάρων στην λειτουργικότητα και τη δομή της καρδιάς, όπου τα γκρουπ στα οποία έχουμε μεταμόσχευση >20 εκατομμυρίων κυττάρων παρουσιάζουν την καλύτερη εικόνα, τόσο στο LVEF (πάνω αριστερά), όσο και στην μείωση του εμφραγματικού ιστού (πάνω δεξιά) και στην εμφάνιση σοβαρών αναστροφών συμβάντων σχετιζόμενων με τη θεραπεία (κάτω) (Quyyumi A., et al, 2017).

Φαίνεται λοιπόν ότι τα CD133⁺ και τα CD34⁺ κύτταρα του μυελού των οστών δεν έχουν άμεσες επδράσεις στη λειτουργικότητα και δομική ανάκαμψη μυοκαρδίων τα οποία τουλάχιστον έχουν υποστεί οξεία εμφράγματα. Τα κύτταρα προέρχονται από τον μυελό των οστών και έχουν σημαντικές προαγγειογενείς και αντιαποπρωτικές ιδιότητες, ενώ όπως φάνηκε από πρώτα πειράματα συνεισέφεραν στο κλάσμα εξώθησης, τη συσταλτικότητα και την τοπική αιμάτωση του μυοκαρδιακού περιβάλλοντος. Στις πρώτες συστηματοποιημένες μελέτες, δηλαδή με τη χρήση placebo, μεγαλύτερα δείγματα ασθενών και επιστημονικό σχεδιασμό οι ασθενείς που έλαβαν τις δύο κατηγορίες κυττάρων παρουσίασαν παρόμοια ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικά σε LVEF-LVESV-LVEDV-κινητικότητα-μέγεθος εμφραγματικού ιστού με ασθενείς που πήραν placebo αν και διατήρησαν καλύτερη κατάσταση αιμάτωσης. Αρχικά αυτό αποδόθηκε ίσως στο ότι τα μεταφερόμενα κύτταρα ήταν αυτόλογης προέλευσης και ίσως έφεραν παράγοντες επικινδυνότητας του κάθε ασθενή, είτε στο μέγεθος του δείγματος των αντίστοιχων μελετών, αν και δεν παρουσιάστηκε τάση στους ασθενείς που πήραν τα κύτταρα του μυελού των οστών να ξεχωρίσουν. Έμφαση δόθηκε και στο μέγεθος της δόσης των μεταφερόμενων κυττάρων, με την αύξηση της οποίας σε άλλο πείραμα υπήρξε μεγαλύτερη αύξηση του LVEF και μείωση του εμφραγματικού ιστού σε σχέση με τα placebo. Πιθανότατα τα κύτταρα CD133⁺ και τα CD34⁺ του μυελού των οστών να είναι περισσότερο χρήσιμα σε παθήσεις που φέρουν καθαρά αιματικές ανεπάρκειες ή ίσως σε χρόνιο επίπεδο με την βελτίωση της τοπικής αιμάτωσης και άρα της μυϊκής συσταλτικότητας και επομένως της λειτουργικής ανάκαμψης, αλλά όχι σε άμεσο επίπεδο και πιο συγκεκριμένα στην δομική και λειτουργική ανάκαμψη των οξείων εμφραγμάτων.

2.6 ΕΜΒΡΥΟΝΙΚΑ ΚΑΙ ΕΠΑΓΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ (ESCs/ iPSCs)

Ένα από τα μειονεκτήματα όλων των προηγούμενων τεχνικών είναι ότι δε δημιουργούν επαρκή αριθμό καρδιομυοκυττάρων ώστε να εποικήσουν το τραυματισμένο μυοκάρδιο. Ήταν λοιπόν απαραίτητη η de novo δημιουργία καρδιομυοκυττάρων *in vitro* έτσι ώστε αυτά να μεταφερθούν έτοιμα στον τραυματισμένο οργανισμό. Το προφανές υποψήφιο γκρουπ κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα εμβρυονικά πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (embryonic pluripotent stem cells-ESCs), προερχόμενα από την εσωτερική κυτταρική μάζα του εμβρύου, τα οποία είναι πολυδύναμα, κλωνογενή και κατέχουν την ικανότητα της αυτοανανέωσης, καθώς και την ικανότητα διαφοροποίησης στις τρεις βλαστικές στοιβάδες (ενδόδερμα-μεσόδερμα-εξώδερμα). Τα ESCs αναπτύσσονται εύκολα και δίνουν καρδιομυοκύτταρα, άρα είναι ιδανικός υποψήφιος για μεταμόσχευση (Murry E., et al, 2008). Τα ESCs μπορούν να διαφοροποιηθούν σε οποιοδήποτε κυτταρικό τύπο στο ανθρώπινο σώμα και να δώσουν κυτταρικά παράγωγα εξειδικευμένα για κάθε ασθενή, συνεισφέροντας στη βιοχημική έρευνα και τη αναγεννητική ιατρική καθώς παρακάμπτουν το ανοσοποιητικό σύστημα, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μελετηθούν οι μηχανισμοί των ασθενειών και να ανακαλυφθούν καινούργια φαρμακευτικά σκευάσματα (Park I., et al., 2008, Takahashi K., et al., 2007, Yu J., et al., 2007). Ακόμα όταν ανθρώπινα ESCs μεταφερθούν με ένεση σε ανοσοκατεσταλμένα ζώα μπορεί να οδηγήσουν σε μάζες κυττάρων, τα επονομαζόμενα τερατώματα, τα οποία έγιναν σήμα κατατεθέν της ικανότητας των ESCs να διαφοροποιηθούν (Mummary C., et al, 2012). Αν και οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν πάνω στη χρησιμότητα των ESCs, η πλαστικότητα που επιδεικνύουν τα τελευταία στη διαφοροποίηση σε εκατοντάδες κυτταρικές σειρές μπορεί ταυτόχρονα να αποτελέσει και μειονέκτημα στην ικανότητα χειρισμού τους. Ανά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν τρεις βασικές τεχνικές για να τη διαφοροποίηση των ESCs:1) μέσω σχηματισμού τρισδιάστατων συσσωματωμάτων γνωστών και ως εμβρυοειδή σωματίδια

2) καλλιέργεια σε μονοστιβάδα και 3) συγκαλλιέργεια, κάθε μια εκ των οποίων έχει τα μειονεκτήματα και τα πλεονεκτήματά της.

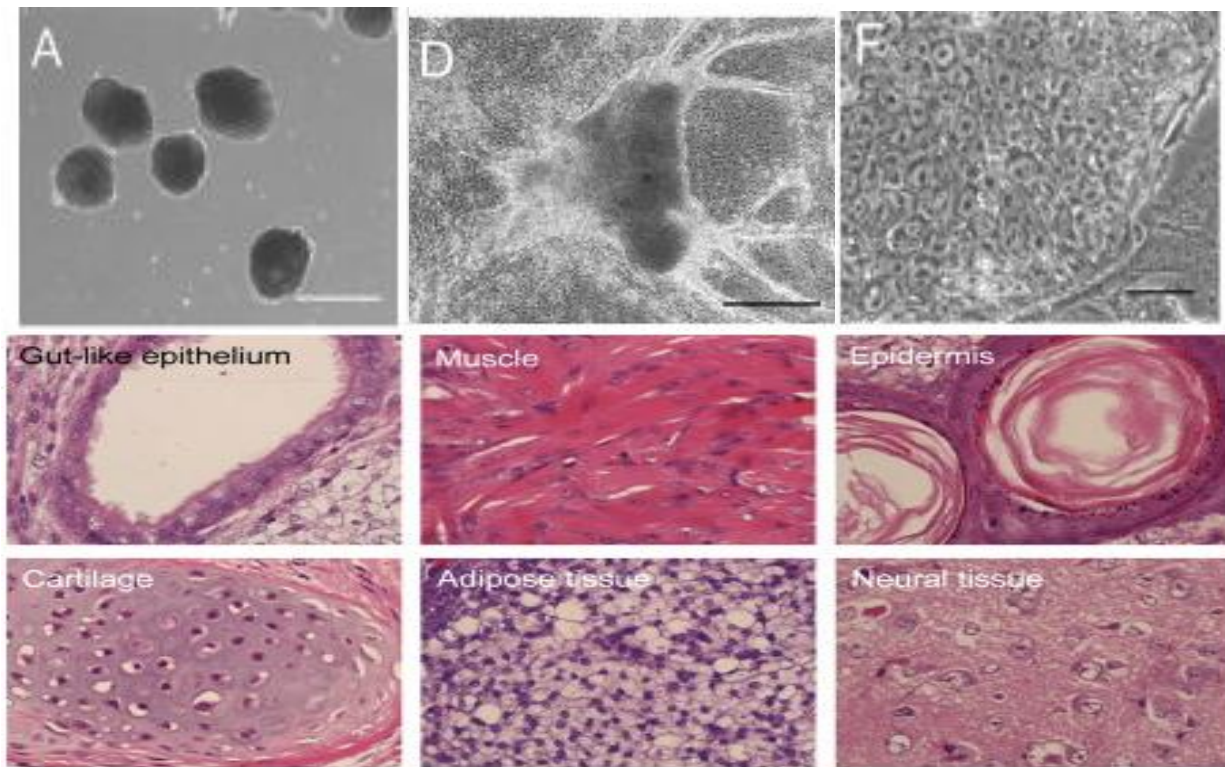


Εικόνα 55. Μέθοδοι διαφοροποίησης hPSCs σε καρδιομυοκύτταρα: Εμβρυονικά σωματίδια (EB), καλλιέργεια μονοστιβάδας, και επαγωγική συγκαλλιέργεια. Οι μέθοδοι για το σχηματισμό των EBs κυμαίνονται από μια απλή ενζυματική διάσπαση των αποικιών των hPSC Μέχρι μεθόδους για τον πιο ακριβή χειρισμό του αριθμού και του μεγέθους τους με μικροκυψελίδες μέσω εξαναγκασμένης συσσωμάτωσης (φυγοκέντρηση), μικροκυψελίδες ώστε πρώτα να επάγει κάποιος τα PSCs σε συγκεκριμένο μέγεθος, και μικροσχεδιασμένα πρότυπα για την

επαγωγή των PSCs σε συγκεκριμένο μέγεθος. Εναλλακτικά, ο πολλαπλασιασμός των hPSCs σε μονοστιβάδες πάνω σε τζελ προσχεδιασμένου θρεπτικού μέσου, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καρδιογένεση. Τόσο για την επαγωγή εμβρυοειδών σωματίων όσο και για την καλλιέργεια μονοστιβάδας, απαιτείται σε κάθε στάδιο ο προσεκτικός σχεδιασμός παραγόντων αύξησης σε καθορισμένα θρεπτικά μέσα για την βέλτιστη καρδιογένεση, αν και κάποια πρωτόκολλα χρησιμοποιούν εμβρυικό ορό βοοειδών (FBS) ή μικρά μόρια για να επάγουν την καρδιογένεση. Η συγκαλλιέργεια μηχανικά αναπαραγόμενων hPSCs με τον ενδοδερματικό παράγοντα END2 εκμεταλλεύεται τα σήματα που παράγει ο END2 για να προάγει την καρδιογένεση. APEL είναι η αλβουμίνη, πολυβινυλική αλκοόλη, απαραίτητα λιπίδια, KO: knockout (Mummery C., et al, 2012).

Η πολυδυναμία μπορεί να επαχθεί σε σωματικά κύτταρα είτε με μεταφορά του πηρύνα τους σε ωκύτταρα, είτε με συγχώνευση, είτε όσον αφορά τα κύτταρα της γενετικής σειράς μέσω καλλιέργειας (Park I., et al., 2008). 4 μεταγραφικοί παράγοντες (Oct4, Sox2, Klf4 and Myc-oskms), είναι ικανοί (Yamanaka S., et al. 2006), επαγόμενοι έκτοπα σε ινοβλάστες ποντικού είναι ικανοί να δημιουργήσουν επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells-iPSCs), κύτταρα τα οποία έχουν μεγάλη ομοιότητα με τα εμβρυονικά σε ιδιότητες όπως η επαγωγή χιμαιρικών εμβρύων (Maherali et al., 2009) (όταν μεταφέρονται στη βλαστοκύστη εμβρύων δημιουργούν χιμαιρικά ζώα) και στην προσφορά στην γενετική σειρά κυττάρων. Εμβρυικοί ινοβλάστες, ενήλικοι καθώς και MSCs μπορούν με την επαγωγική δράση των oskms να αποκτήσουν βλαστικές ιδιότητες πολυδύναμων κυττάρων σε σημείο που φαίνεται ότι οι παράγοντες αυτοί είναι ικανοί και απαραίτητοι για την μετατροπή αυτή. Το 2007 (Takahashi K., et al, 2007) επιστημονική ομάδα εισηγήθηκε την μετατροπή ανθρώπινων ινοβλαστών σε iPSCs μέσω των τεσσάρων παραγόντων Oct4, Sox2, Klf4 and Myc. Καθώς έχουν προκύψει ηθικά ζητήματα ως προς την απόκτηση των ESCs μέσω εμβρύων που καθυστερούν την κλινική εφαρμογή αλλά και δυσκολίες εξειδίκευσης των ESCs σε κάθε ασθενή, ήταν απαραίτητη μια λύση που θα οδηγούσε στο να ξεπεραστούν τα προβλήματα αυτά. Τα iPSCs είναι πολύ παρόμοια στα ESCs όσον αφορά τη μορφολογία, τον πολλαπλασιασμό, την επιγενετική ταυτότητα και τη δράση της

τελομεράσης, καθώς και τα αντιγόνα επιφανείας. Το αποτέλεσμα επαληθεύτηκε σε πειράματα σε ανθρώπινους κλώνους iPSCs (Yu J., et al. 2007). Όλοι οι κλώνοι εκτός των παραπάνω χαρακτηριστικών εμφάνισαν παρόμοια απομεθυλωμένα επιγενετικά πρότυπα με τα ανθρώπινα ESCs καθώς και φυσιολογικό (διπλοειδή) καρυότυπο που είναι σήμα κατατεθέν των ESCs. Είχαν ανεπτυγμένη λειτουργία τελομεράσης και ήταν ικανοί να δημιουργήσουν τερατώματα όταν μεταφέρονταν έκτοπα σε ιστούς καθώς και να καλλιερηθούν σε εμβρυοειδή σωματίδια και να συνεισφέρουν και στις τρεις βλαστικές στιβάδες στις 6 και τις 17 εβδομάδες καλλιέργειας in vitro.

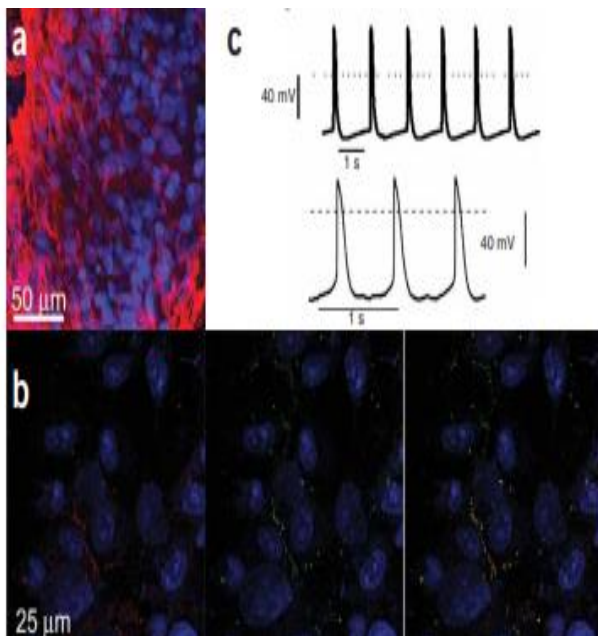


Εικόνα 56. A: Καλλιέργεια iPSCs τη μέρα 8 (εναιώρημα). D: Εικόνα αντίθεσης φάσης που δείχνει iPSCs να διαφοροποιούνται σε καρδιομυοκύτταρα. F: Εικόνα iPSCs σε υψηλή ανάλυση. Κάτω: Τερατώματα διαφορετικών ιστών προερχόμενα από έκτοπη μεταμόσχευση hiPSCs (Takahashi K., et al, 2007).

Τα αρχικά στάδια στην επαγωγή του μεσοδέρματος χαρακτηρίζονται από την άνοδο των Flk-1 και PDGFR, υποδοχέων που εκφράζονται σε μεγάλο βαθμό σε υποπληθυσμούς της γενεαλογίας αυτής (Ema M., et al., 2006). Αν και η εμφάνιση του καρδιακού μεσοδέρματος δεν έχει ερευνηθεί σε τόσο μεγάλο βαθμό με το αιματοποιητικό μεσόδερμα, δεδομένα από διάφορες έρευνες υποδεικνύουν την εμπλοκή στη σηματοδότηση του μονοπατιού Wnt/ β -κατενίνης (Naito et al., 2006). Το μονοπάτι αυτό είναι απαραίτητο για την επαγωγή του μεσοδέρματος αλλά απαγορευτικό όσον αφορά την εμφάνιση του καρδιακού μεσοδέρματος. Προχωρώντας, επισημάνθηκε ότι τα πρώιμα ανθρώπινα καρδιομυοκύτταρα πολλαπλασιάζονται σε καλλιέργειες απουσία εξωγενών αναπτυξιακών παραγόντων, πράγμα που συστήνει αυτοκρινή/παρακρινή δράση (McDevitt T., et al., 2005). Ο πολλαπλασιασμός τους μπορεί να ανασταλλεί σημαντικά με την αναστολή της PI-3 κινάσης ή της Akt κινάσης και ενισχύεται με την σηματοδότηση με IGF-1 παράγοντα, ενώ η αναστολή του ERK δε παίζει κάποιο σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη. Έχει αποδειχθεί ότι η ανάπτυξη ESCs σε ορό με την τεχνική των

εμβρυοειδών σωματίων μπορεί να δώσει καρδιομυοκύτταρα τα οποία ανιχνεύονται από την άμεση ικανότητά τους να πάλλονται

(Doetschman et al., 1985), αλλά αυτή η τεχνική δίνει πολύ φτωχά αποτελέσματα καθώς 1-3% των ESCs προερχόμενων από ποντίκια και 1% περίπου προερχόμενα από άνθρωπο δίνουν καρδιομυοκύτταρα με αυτόν το τρόπο. Επομένως έγιναν προσπάθειες για την ανάπτυξη των hESCs παρουσία της κυτταρικής σειράς του ενδοδέρματος End-2 η οποία μεταξύ των άλλων δίνει και BMP4 και Activin-A και η οποία εμπλουτίστηκε αργότερα (Graichen et al., 2008) προσθέτοντας κάποιον αναστολέα της κινάσης MAP p38 διπλασιάζοντας κατ'αυτόν τον τρόπο την παραγωγή μεσοδέρματος και επομένως τον αριθμό των καρδιομυοκυττάρων προερχόμενων από hESCs από 12% στα 25%. Μελετώντας τις ηλεκτρομηχανικές ιδιότητες των ESCs (Kehat I., et al, 2004) διαμέσου του συστήματος διαφοροποίησης hESCs σε καρδιομυοκύτταρα μέσω εμβρυοειδών σωματίων. Τα κύτταρα επέδειξαν ηλεκτρομηχανικό συγχρονισμό σε συγκαλλιέργειες με καρδιομυοκύτταρα αρουραίου μέσω της ανίχνευση κονεξίνης43. Η επίτευξη συγχρονισμού οδήγησε σε απώλεια καθυστερήσεων στους κόμβους των ιστών, τον μακροχρόνιο συγχρονισμό καθώς και τη διατήρησή του όταν άλλαξε η θέση των κυττάρων που έδιναν το ρυθμό του παλμού, αλλά και ήταν δυνατός ο ερεθισμός των κυττάρων με αδρενεργικά σήματα στην περίπτωση που υπήρχε μερική έλλειψη σύζευξης στους χασμοσυνδέσμους. Η ομάδα έδειξε μακρόχρονη ηλεκτρομηχανική αλληλεπίδραση μεταξύ δότη και δέκτη σε πολλαπλά επίπεδα και σε πείραμα όπου τα hESCs μεταμοσχεύθηκαν σε καρδιά χοίρου χωρίς εντοπισμό κάποιου τερατώματος, το οποίο βέβαια προϋποθέτει τη μεταμόσχευση κυττάρων τα οποία έχουν διαφοροποιηθεί σε καρδιομυοκύτταρα για την πλήρη ασφάλεια του πειράματος και την αποφυγή έκτοπων τερατωμάτων. Στον καρδιακό ιστό βλέπουμε επίσης την έκφραση δεικτών όπως c-Kit , Sca-1 , Isl1 και SSEA-1, αλλά επίσης και Gata4, Tbx5, MEF2C and Nkx2.5 που είναι πρώιμοι δείκτες των καρδιομυοκυττάρων. Δυο ομάδες ερευνητών ήταν από τις πρώτες που μεταμόσχευσαν ανθρώπινα καρδιομυοκύτταρα προερχόμενα από ESCs σε in vitro καλλιέργειες (Laflamme et al., 2007, Yao et al., 2006) που εκτός από πρωτόκολλα που καθιέρωσαν για την ανάπτυξη των ESCs σε καρδιομυοκύτταρα σε καλλιέργειες δημιούργησαν και ένα προαποπτωτικό κοκτέιλ παραγόντων (prosurvival cocktail) που έκανε τα μεταμοσχευμένα κύτταρα να ανταπεξέλθουν στις αντίξοες συνθήκες του εμφραγματικού ιστού στην καρδιά των δεκτών. Με αυτό τον τρόπο κατάφεραν να παραγάγουν μεγάλες ποσότητες ανθρώπινου καρδιομυοκύτταρου σε καρδιές αρουραίων. Όπως παραδόξως τα προερχόμενα από ESCs καρδιομυοκύτταρα παρουσίασαν ηλεκτρομαγνητικό συντονισμό με τα καρδιομυοκύτταρα του δέκτη, κάτι που δεν έγινε με τους σκελετικούς μυοβλάστες.

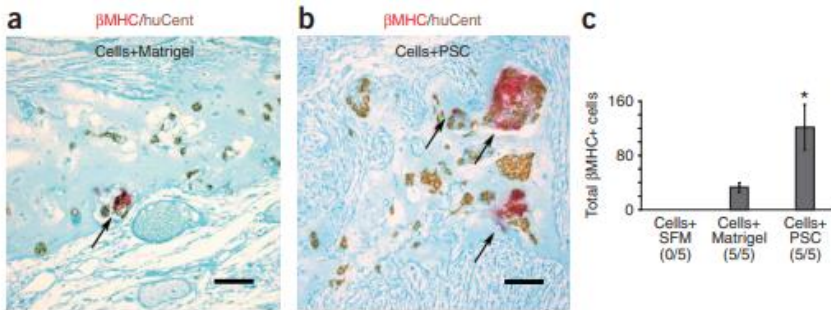


Εικόνα 57. Μορφολογικός και λειτουργικός χαρακτηρισμός hES καρδιομυοκυττάρων. (a): Ανοσόχρωση με αντισώματα για καρδιακή τροπονίνη I (κόκκινο). Σημειώστε ότι το πρότυπο της αντίθεσης στοιχειώνεται από καρδιομυοκύτταρα σε αρχικά στάδια διαμοιρασμένα με ένα ισοτροπικό σχέδιο μέσα στο εμβρυικό σώμα. Οι πυρήνες βάφτηκαν με T o Pro3 (μπλε). (b): Θετική ανοσόχρωση των εμβρυοειδών σωματίων με αντισώματα για κονεξίνη43 (κόκκινο σήμα, αριστερή εικόνα) και αντισώματα για κονεξίνη45 (πράσινο, μεσαία εικόνα). Σημειώστε την ταυτόχρονη ύπαρξη των κονεξίνη43 και κονεξίνη45 στους ίδιους χασμοσυνδέσμους (κιτρινα σήματα, δεξιά εικόνα). (c): Παράδειγμα ανίχνευσης ηχητικών σημάτων των hES cardiomyocytes (20–30 μέρες μετά την αρχή της καλλιέργειας) που δείχνει αυθόρμητη έναρξη δυναμικών από τα κύτταρα. Τα δυναμικά που ανιχνεύονται από τα κύτταρα, είναι από μικρά συμπλέγματα κυττάρων (πάνω σήμα) είτε από απομονωμένα κύτταρα (κάτω σήμα), και

χαρακτηρίστηκαν ως εμβρυικού φαινότυπου (Kehat I., et al, 2004).

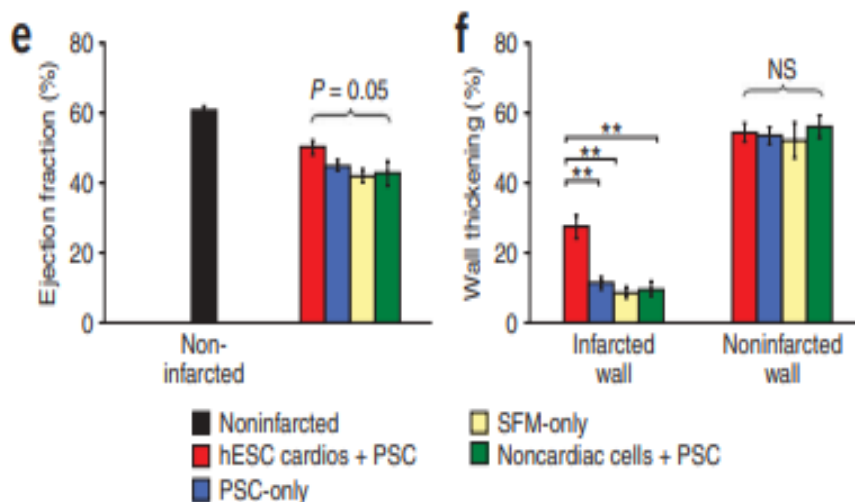
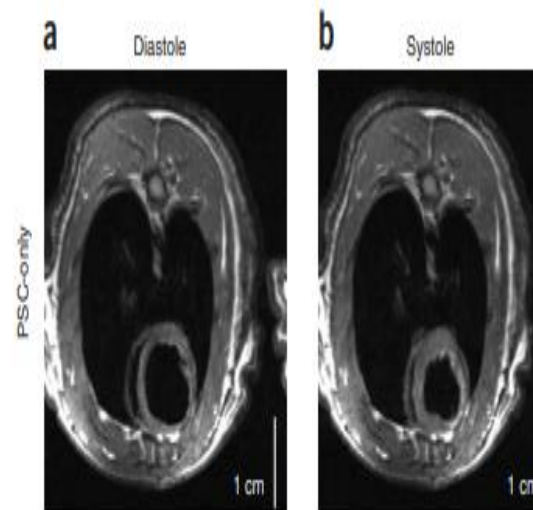
Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε μοντέλο αουραίου (Laflamme et al., 2007) στο οποίο είχαν επάγει εμφραγματικό επεισόδιο και 4 μέρες έπειτα από αυτό προχώρησαν σε μεταμόσχευση 10×10^6 hES CMs (τα οποία είχαν αναπτυχθεί με πρωτόκολλο BMP 4/activin A το οποίο δίνει >30% καρδιομυοκύτταρα σε σχέση με απλό ορό) στην εμφραγματική περιοχή παρέχοντας παράλληλα κοκτέιλ παραγόντων (PSC) που απέτρεπαν των απόπτωση, τον μιτοχονδριακό θάνατο και την ανοσοολογική απόκριση και προήγαγαν την επιβίωση των κυττάρων (Matrigel, Bcl, cyclosporine A, IGF-1, ZVAD-fmk2) και έλεγξαν τα ζώα στις 4 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση μέσω ηχοκαρδιογραφήματος και μαγνητικής τομογραφίας. Όλες οι καρδιές ανεξαιρέτως εμφάνισαν καρδιομυικά εμφυτεύματα στις εμφραγματικές περιοχές και κάποιες από αυτές είχαν αναπτύξει μυϊκό ιστό σε μεγάλο μέρος του εμφράγματος ο οποίος έγινε φανερός από την έκφραση β-μυοσίνης και ο οποίος αλληλεπιδρούσε σε τμήματά του με τον αντίστοιχο του δέκτη μέσω N-καδερίνης, ενώ ανοσοιστοχημικές μελέτες έδειξαν παρουσία καρδιακής τροπονίνης I και Nkx.2.5 στον νέο ιστό. Επίσης όλα τα νέα καρδιακά εμφυτεύματα εμφάνιζαν πλήθος αγγείων ευθυγραμμισμένων με ενδοθηλιακά κύτταρα του δέκτη. Το σύνολο σχεδόν του νέου ιστού βρέθηκε μέσα στον εμφραγματικό ιστό και όχι στα όρια του εμφράγματος. Στις 4 εβδομάδες ο LVEDV παρουσίασε τάση μείωσης στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα αλλά όχι σημαντική, ενώ ο LVESV ανέστειλε την αύξησή του στα ζώα που έλαβαν κύτταρα και PSC πάνω από 2 mm σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα και η ίδια αναστολή ήταν σαφής και στην μείωση της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας. Το κλάσμα εξώθησης ήταν τουλάχιστον 5% αυξημένο στα ζώα που έλαβαν ESCs, όπως και η πάχυνση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας που παρουσίασε 26% αύξηση στο γκρουπ που έλαβε ESCs και PSC σε σχέση με ζώα placebo, παράλληλα αυξάνοντας τη συσταλτικότητα του μυοκαρδίου που οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα σε ηλεκτρομηχανική αλληλεπίδραση των μεταφερόμενων κυττάρων και των ενδογενών καρδιομυοκυττάρων. Ακόμα η ομάδα έλαβε υπόψη της

την πιθανότητα παρουσίας παρακρινούς φαινομένου από τα μεταμοσχευμένα κύτταρα, αλλά και την πιθανότητα παρόλο που δεν ανιχνεύτηκαν αρρυθμίες να μην εμφανίζονται λόγω του γρήγορου ρυθμού της καρδιάς του αρουραίου.



Εικόνα 58. Προστασία των μοσχευμάτων προερχόμενων από hESCs με το PSC (a, b): Ιστολογική ανάλυση της επιβίωσης των μοσχευμάτων. hESCs που είχαν πληγεί μέσω θερμοκρασίας εισήχθησαν σε καρδιές αρουραίων μόνο παρουσία τζελ (Matrigel) (a,

κύτταρα+τζελ), είτε με την παρουσία PSC συμπεριλαμβανομένου τζελ (b, κύτταρα+PSC). Οι τομές βάφτηκαν με αντίσωμα της βαριάς αλυσίδας της β-μυοσίνης. Τα επιβιώσαντα καρδιομυοκύτταρα ήταν σαφώς πολλαπλάσια παρουσία PSC. (c) Ποσοτικοποίηση της επιβίωσης των μεταμοσχευθέντων μοσχευμάτων hESCs. Παρόλο που μόνο παρουσία θρεπτικού μεσου χωρίς ορό (SFM) δεν ανιχνεύεται επιβίωση μοσχευμάτων, παρουσία του τζελ όσο και του PSC και τα 5 μοσχεύματα ζουν. Παρόλα αυτά μόνο παρουσία PSC υπάρχει μια πολύ μεγαλύτερη ανίχνευση κυττάρων που αναπτύσσονται (Laflamme et al., 2007).

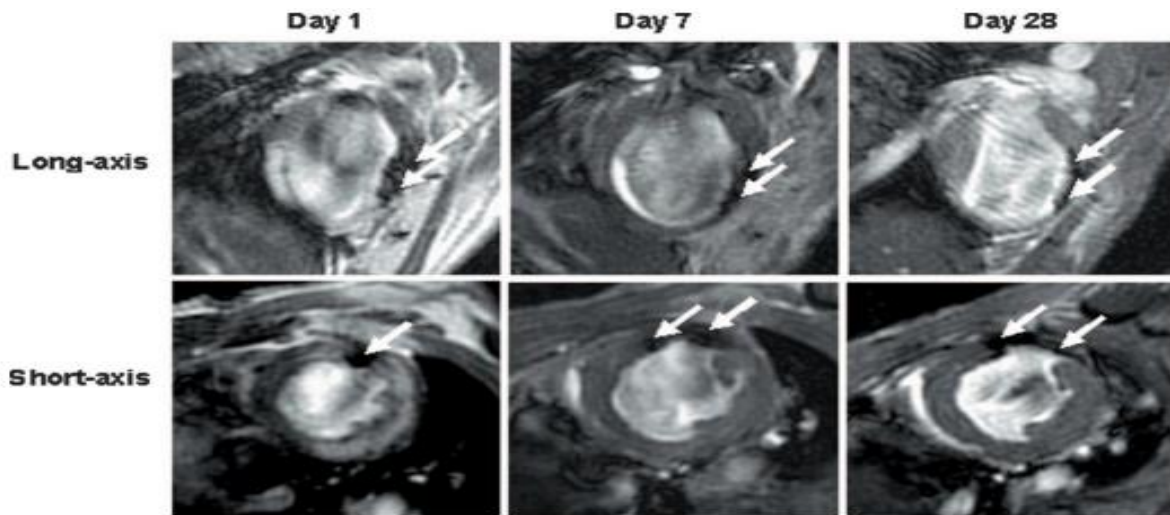


Εικόνα 59. Εκτίμηση της λειτουργίας της αριστερής κοιλίας μετά την μεταμόσχευση καρδιομυοκυττάρων προερχόμενων από hES μέσω μαγνητικής τομογραφίας. (a-d): Χαρακτηριστικές εικόνες

της καρδιάς παρουσία μόνο PSC (a-b) είτε κυττάρων-PSC (c-d) . Οι εικόνες είναι είτε από το τέλος της διαστολής (a, c) ή από το τέλος της συστολής (b, d). Είναι φανερό η μειωμένη κοιλιακή διαστολή όσο και η αυξημένη συστολική πάχυνση παρουσία και κυττάρων σε σχέση μόνο με το PSC. (e): Το EF είναι φανερά μεγαλύτερο στις 4 εβδομάδες στα ζώα που έλαβαν hESCs και PSC σε σχέση με αυτά που έλαβαν μόνο τα κύτταρα ή μη καρδιακά κύτταρα και PSC και αυτά σε σχέση με ζώα που έλαβαν μόνο θρεπτικό μέσο. (f): Τα ζώα που έλαβαν hESCs και PSC είχαν μια 2,5 φορές μεγαλύτερη πάχυνση του πρόσθιου τοιχώματος σε σχέση με τα τρία άλλα γκρουπ στον εμφραγματικό ιστό. Σε σύγκριση οι τιμές είναι ίδιες για τα διάφορα γκρουπ σε τοίχωμα που δεν έχει υποστεί MI. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των τιμών. (Lafamme et al., 2007).

Αντίθετα, μεταμοσχεύθηκαν σε αθυμικούς αρουραίους 5-10 εκατομύρια ESCs (Qiao H., et al., 2011) που είχαν διαφοροποιηθεί σε καρδιομυοκύτταρα (σε μονοστοιβάδα με σήμανση με πουρομικίνη) προερχόμενα από ποντίκια, από μέσο το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με αυξητικό παράγοντα. Τα κύτταρα τη στιγμή της μεταμόσχευσης εξέφραζαν πρώιμους καρδιομυικούς παράγοντες αλλά μόνο 6% από αυτά ήταν πολλαπλασιαζόμενα. Τα κύτταρα που μεταμοσχεύθηκαν 1 εβδομάδα μετά την πρόκληση MI δε προκάλεσαν τερατώματα οποιουδήποτε είδους αν και συνδέσεις κονεξίνης43 στους χασμοσυνδέσμους παρατηρήθηκαν κυρίως μεταξύ των μεταμοσχευμένων κυττάρων και σπανιότερα μεταξύ των μεταμοσχευμένων κυττάρων και των κυττάρων του δέκτη. 2 μήνες μετά τη μεταμόσχευση το control group παρουσίασε μείωση 5,9% στο μέγεθος του εμφραγματικού ιστού σε σχέση με την αριστερή κοιλία ενώ το γκρουπ που έλαβε τα κύτταρα 12,1% αντίστοιχα. Παρακρινείς παράγοντες όπως κυτοκίνες και αυξητικοί παράγοντες είναι πολύ πιθανόν να έπαιξαν το ρόλο τους στη μείωση της απόπτωσης και της αυτοφαγίας, την αύξηση της αγγειώδους δομής και της ελαστικότητας. Στους 1 και 2 μήνες μετά τη μεταμόσχευση το EF και ο LVESV παρουσίασαν βελτιώσεις και στα δυο γκρουπ αλλά σε αυτό των κυττάρων το μεν πρώτο αυξήθηκε κατά 7-8% περισσότερο και στο δεύτερο μειώθηκε 20mm³ παραπάνω φτάνοντας και στις δυο τιμές κοντά στα επίπεδα πριν το MI. Ακόμα το γκρουπ που έλαβε τα κύτταρα παρουσίασε σημαντικά αυξημένη συσταλτική ικανότητα του μυοκαρδίου από το control.

Εν συνεχεία, χρησιμοποιήθηκε μοντέλο ποντικού που είχε υποστεί MI για να παρακολουθήσουν για 28 μέρες ESCs προερχόμενα από το ίδιο είδος (Ebert S., et al, 2007), τα οποία είχαν διαφοροποιηθεί in

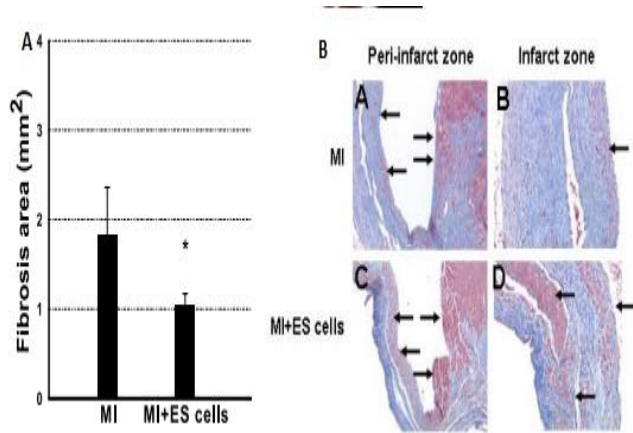


vitro σε καρδιομυοκύτταρα και μεταμοσχεύθηκαν σε 8 από τα 16 ζώα με την βοήθεια μαγνητικών φθοριζόντων σφαιριδίων ενδομυϊκά. Τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν στις 1, 7 και 28 μέρες και με τη βοήθεια μαγνητικής τομογραφίας ανιχνεύθηκαν τα σφαιρίδια στις καρδιές των δεκτών καθ'όλη τη διάρκεια των 28 ημερών. Το μέσο μέγεθος του εμφραγματικού ιστού παρέμεινε το ίδιο σε όλα τα ζώα, ακόμα και σε αυτά που έλαβαν αντιφλεγμονώδες φάρμακο. Αντίθετα, τόσο ο LVEDV όσο και ο LVESV ενώ αυξήθηκαν και στα δυο γκρουπ τις μέρες 1-7, μετά την 7^η μέρα παρουσίασαν πτώση στα ζώα που έλαβαν ESCs με τις τιμές να είναι 7,8% πτώση για τον LVEDV (η οποία θεωρήθηκε σημαντική) και 3,9% για τον LVESV αντίστοιχα. Το LVEF από την άλλη έδειξε μια μικρή πτώση και στα δύο γκρουπ την πρώτη μέρα και παρουσίασε μικρές διαφορές στην υπολοιπη διάρκεια του πειράματος. Άρα η μεταμοσχευση των ESCs αποδείχθηκε ενθαρρυντική για την αναδιαμόρφωση της αριστερής κοιλίας αλλά όχι και τόσο για τη λειτουργική και τη δομική κατάσταση της καρδιάς. Μπορεί να ευθύνεται ο καινοτόμος τρόπος μεταφοράς των κυττάρων ή η αυτόλογη προέλευσή τους για το αποτέλεσμα αυτό.

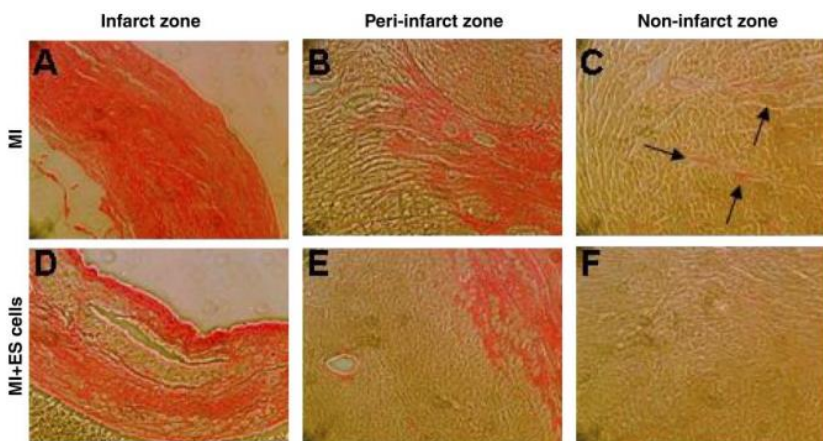
Εικόνα 60. Εικόνες μαγνητικής τομογραφίας καρδιών ποντικών στις οποίες έχουν μεταμοσχευθεί ES καρδιομυοκύτταρα προερχόμενα από ποντίκι μέσω υπερπαραμαγνητικών σφαιριδίων. Οι τομογραφίες διενεργήθηκαν στις 1,7 και 28 μέρες τόσο από τον μακρύ (πάνω) όσο και από τον βραχύ (κάτω) άξονα. Οι περιοχές που είναι πλούσιες σε σίδηρο λόγω των σφαιριδίων απεικονίζονται ως μαύρες περιοχές (βέλη) στον πρόσθιο τοιχωματικό άξονα είτε στην περιοχή του εμφράγματος (Ebert S., et al, 2007).

Το 2007 χρησιμοποιήθηκε το ίδιο μοντέλο MI ποντικού για τη μελέτη της υπερτροφίας (Singla D., et al, 2007), της ίνωσης και του καρδιομυϊκού θανάτου στην καρδιά. 3×10^4 ESCs ποντικού σημάνθηκαν με β-γαλακτοζιδάση ή με πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη και μεταμοσχεύθηκαν σε ζώα τα οποία συγκρίθηκαν με ζώα που δεν έλαβαν τα αντίστοιχα κύτταρα στις 2 εβδομάδες μετά τη μεταφορά. Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένα κατά το ήμισι αποπτωτικά κύτταρα στις καρδιές των ζώων που έλαβαν τα ESCs καθώς και το μέγεθος του εμφραγματικού ιστού στην πρώτη κατηγορία ζώων ήταν 23% του μεγέθους της δεξιάς καρδιάς σε σχέση με το 48% που καταλάμβανε στα ζώα του control group. Το κολλαγόνο φάνηκε να υποχωρεί στο γκρουπ που έλαβε τα κύτταρα τόσο στις εμφραγματικές όσο και στις περιοχές που βρίσκονται στα όρια του εμφράγματος και τις μη-εμφραγματικές περιοχές, όπως και η υπερτροφία και ο ινώδης ιστός υποχώρησε κατά 57% στα ESC ποντίκια, κατά πάσα πιθανότητα μέσω

παρακρινούς φαινομένου. Το μέγεθος των καρδιομυοκυττάρων μειώθηκε στο γκρουπ των ποντικών που έλαβαν κύτταρα στην εμφραγματική και μη περιοχή και παρουσίασε τάση μείωσης στην περιεμφραγματική περιοχή. Η ηχοκαρδιογραφία έδειξε ακόμα σημαντική αναστολή της αναδιαμόρφωσης της καρδιάς σε όλα τα υποκείμενα που έλαβαν κύτταρα στις 2 εβδομάδες με αναστολή της αύξησης του LVEDV κατά 1 mm. Όλα αυτά συνηγορούν υπέρ της δημιουργίας νέων καρδιομυοκυττάρων και ευεργετικής επίδρασης αυτών στην σύσταση της εμφραγματικής περιοχής και αναδιαμόρφωσης της καρδιάς.



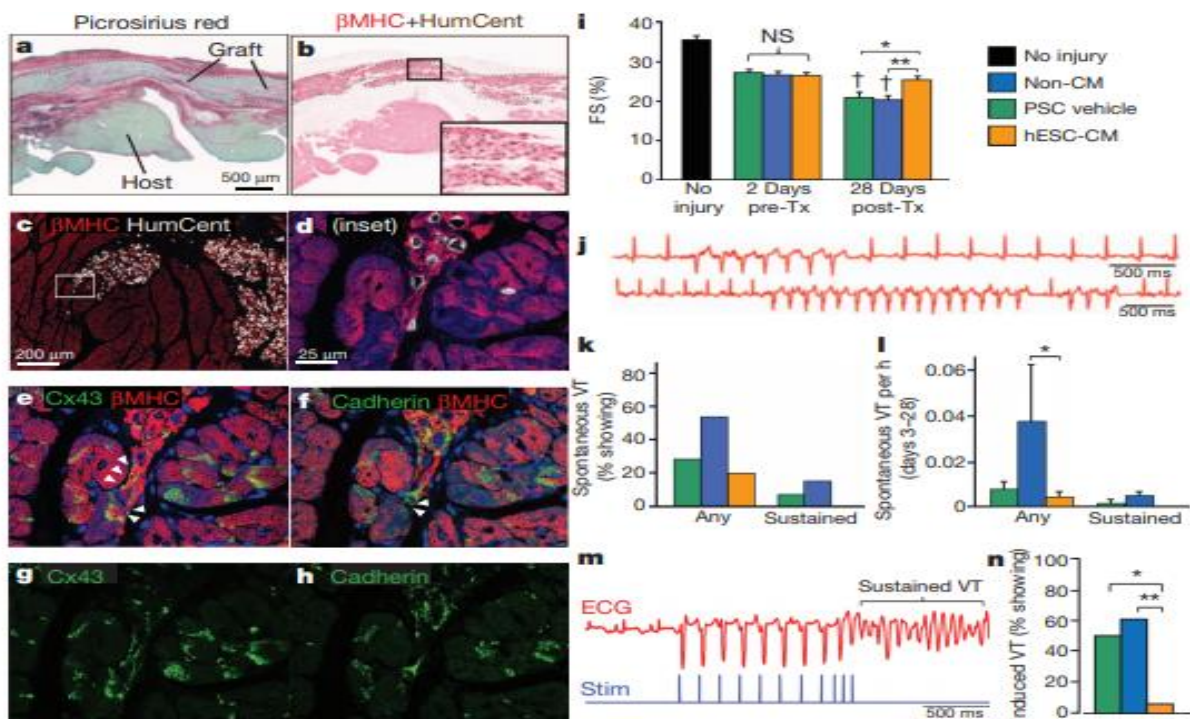
Εικόνα 61. A (αριστερά): Ποσοτικοποίηση της περιοχής της ίνωσης δείχνει σημαντικά μικρότερη την περιοχή στα ποντίκια που έλαβαν ESCs σε σχέση με τα control στις 2 εβδομάδες. B (δεξιά): Χρώση σε ζώα που έλαβαν ESCs (C-D) είτε όχι (A-B) στην περιοχή γύρω από το έμφραγμα (peri-infarct) ή την εμφραγματική (infarct) δείχνει μια μεγάλη μείωση του κολλαγόνου (μπλε) κυρίως στη δεύτερη περιοχή στα ζώα που έλαβαν κύτταρα στις 2 εβδομάδες (Singla D., et al, 2007).



Εικόνα 62. Αντιπρωσοπευτικές χρώσεις της καρδιάς για να απεικονιστεί η κολλαγονική ποσότητα. Τα ποντίκια που έλαβαν ESCs δείχνουν μικρότερη ποσότητα κολλαγόνου (κόκκινο) στην περιοχή του εμφράγματος (A), γύρω από την περιοχή του εμφράγματος (B), και σε περιοχές μακριά από αυτό (C) σε σχέση με αυτά που πήραν μόνο θρεπτικό μέσο (D-F, αντίστοιχα). Τα βέλη υποδεικνύουν ενδιάμεση ίνωση στις μη εμφραγματικές περιοχές (Singla D., et al, 2007).

Πηγαίνοντας σε μοντέλο ινδικού χοιριδίου (Shiba Y., et al., 2012), του οποίου ο καρδιακός ρυθμός δε μοιάζει με τον αντίστοιχο γρήγορο καρδιακό ρυθμό (400-600 παλμούς το δευτερόλεπτο) που παρατηρούμε στα τρωκτικά και ο οποίος μπορεί να οδηγήσει σε κοιλιακές ταχυκαρδίες και αρρυθμίες διαφόρων τύπων, όπως και έλλειψη ηλεκτρομηχανικής σύζευξης των μεταμοσχεύσιμων κυττάρων με τα κύτταρα του δότη. 10^8 hESCs μεταμοσχεύθηκαν ενδοκαρδιακά στα ινδικά χοιρίδια 10 μέρες μετά από κρουστικό τραυματισμό και ανοσοκαταστολή, τα οποία είχαν γενετικά ενσωματωμένο αισθητήρα ανίχνευσης ασβεστίου ο οποίος ανιχνεύθηκε μέσω φθορίζουσας ουσίας και ηχοκαρδιογραφήματος. Εκτός από το γκρουπ των καρδιακών κυττάρων που προερχόταν από ESCs (n=15) μαζί με PSC κοκτέιλ

μεταμοσχεύθηκαν και 10^8 μη καρδιακά καρδιακά κύτταρα προερχομενα από ESCs σε PSC (n=13) και τα υπόλοιπα χοιρίδια δόθηκε μόνο PSC (n=14). 28 μέρες μετά την μεταμόσχευση όλα τα ζώα παρουσίαζαν εγκάρσιο εμφραγματικό ιστό και λέπτυνση του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας και δεν υπήρχαν διαφορές στην αρχιτεκτονική της περιοχής του εμφραγματικού ιστού. Παρόλα αυτά τα ζώα που έλαβαν καρδιομυκύτταρα παρουσίασαν περιοχές οι οποίες εμφάνιζαν ξεκάθαρη ανάκαμψη του μυϊκού ιστού σε ποσοστό 8,4% της εμφραγματικής περιοχής, δηλαδή νησίδια μυϊκού ιστού τα οποία μέσω ανοσοιστοχημείας εξέφραζαν τη βαριά αλυσίδα της β-μυοσίνης της καρδιάς καθώς και κονεξίνη43 και N-καδερίνη και ανιχνευόταν κυρίως στην περιοχή του εμφραγματικού ιστού αλλά και στα όρια. Τα νησίδια καρδιομυϊκού ιστού συνοδευόταν από νεά αγγεία. Δεν ανιχνεύτηκαν τερατώματα στα ζώα και τα νησίδια του μυϊκού ιστού δεν εξέφραζαν μη καρδιακούς δείκτες. Στα δυο control γκρουπ οι διαστάσεις της αριστερής κοιλίας συνέχισαν να αυξάνονται μετά την μεταμόσχευση αλλά στο hESC



καρδιομυϊκό γκρουπ η διαδικασία αυτή αναστάληκε τελείως τις μέρες -2 με 28. Τα επεισόδια της κοιλιακής ταχυκαρδίας που προέκυψαν ήταν πολύ λιγότερα στα ζώα που έλαβαν καρδιομυκύτταρα (κατά 785% περισσότερα στα γκρουπ που δεν έλαβαν καρδιομυκύτταρα) και τα επεισόδια στα ζώα αυτά δεν διατηρήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ μέσω της ανίχνευσης του αισθητήρα ανίχνευσης του ασβεστίου και ηχοκαρδιογραφήματος έγινε γνωστό ότι τα κύτταρα στα νησίδια καρδιομυϊκού ιστού ήταν 1:1 συζευγμένα ηλεκτρομηχανικά με τα κύτταρα των δεκτών.

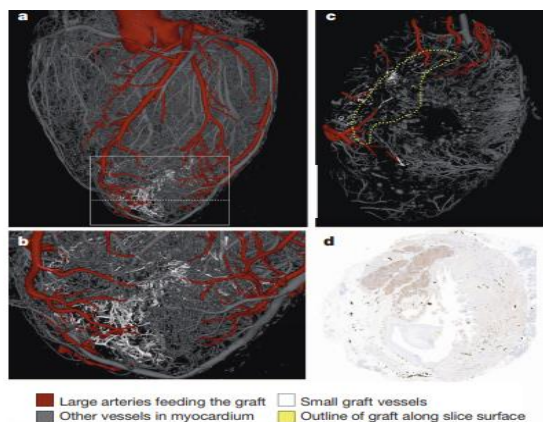
Εικόνα 63. Μεταμοσχευμένα hESC-CMs εν μέρει αποκαθιστούν το μυϊκό ιστό, διατηρούν τη μηχανική λειτουργία και ελλιώνουν την πιθανότητα αρρυθμιών σε μοντέλο ινδικού χοιριδίου. a, b: hESC-CM μοσχεύματα 28 ημερών σε κρουστραυματισμένη καρδιά βαμμένη με picosirius red (a), και αντίσωμα για βαριά αλυσίδα της β-μυοσίνης (bMHC, κόκκινο) (b). c: Επαφή μεταξύ μοσχεύματος και κυττάρων δέκτη, εικόνα με χρωστικές HumCent (άσπρο) and bMHC (κόκκινο) d: μεγαλύτερη μεγέθυνση της περιοχής σε ορθογώνιο περίγραμμα στην εικόνα c, f-e: αποχρωματισμός και χρώση με bMHC (κόκκινο) και είτε κονεξίνη43 (πράσινο, e και g) είτε καδερίνες (πράσινο, f

και η). Τα βέλη δείχνουν την κονεξίνη43 και τις καδερίνες που είναι κοινές μεταξύ δέκτη και μοσχεύματος. i: Ποσοτική ανάλυση του FS της αριστερής κοιλίας στις 2 και 28 μέρες σε ζώα δέκτες hESCs+CM (κίτρινο), μη καρδιακών κυττάρων σε θρεπτικό μέσο (μπλε) και PSC φορέων (πράσινο) σε σχέση με μη τραυματισμένα ζώα (μαύρο). j, Ηχοκαρδιογραφήματα περιλαμβάνονται μη διατηρημένες κοιλιακές ταχυκαρδίες (VT) σε ένα hESC-CM ζώο (επάνω), όπως και διατηρημένες Vt και τριπλές PVCs σε ένα μη-CM ζώο (κάτω). κ: Ποσοστά ζώων που έδειξαν συντηρημένες VT μεταξύ των ημερών 2 και 28. l: Συχνότητα αυθόρμητων VT. m: Ηχοκαρδιογράφημα (κόκκινο) και ερέθισμα (μπλε) από κρουστραυματισμένο μη-CM ζώο υποκείμενο σε συντηρημένες VT. n: Ποσοστά ζώων σε κάθε γκρουπ υποκείμενων σε VT. Τα δεδομένα περιλαμβάνουν μέση τιμή και τυπική απόκλιση (Shiba Y., et al., 2013).

Τα iPSCs είναι μια αξιόλογη πηγή βλαστικών κυττάρων τα οποία όπως προαναφέρθηκε έχουν τις περισσότερες ιδιότητές τους κοινές με τα ESCs, αν και χρειάζεται μια μακρά διαδικασία προετοιμασίας τους καθώς είναι απαραίτητο να αποκλειστούν όσα κύτταρα δεν είναι πλήρως διαφοροποιημένα για να αποφευχθούν ενδεχόμενα τερατωμάτων στον δέκτη (Yoshida Y., et al, 2011). Μεταμοσχεύθηκαν hiPSCs σε ανοσοκατεσταλμένο μοντέλο χοιριδίου 4 εβδομάδες μετά από επαγωγή MI και δημιουργία χρόνιας ισχαιμικής καρδιομυοπάθειας (Kawamura M., et al, 2012). Δημιουργήθηκαν δύο γκρουπ, αυτό που έλαβε τα κύτταρα, τα οποία είχαν επιτυχημένα διαφοροποιηθεί σε καρδιομυοκύτταρα τα οποία εξέφραζαν τους αντίστοιχους δείκτες, και ένα που χρησιμοποιήθηκε σαν control (n=6) και τα κύτταρα ενσωματώθηκαν σε φύλλα κυττάρων (cell sheets) πριν μεταμοσχευθούν στα υποκείμενα, τα οποία αντίθετα με την κλασική μέθοδο της μεταμόσχευσης με βελόνα μπορούν να μεταφέρουν μεγαλύτερες ποσότητες κυττάρων χωρίς τις απώλειες που υπάρχουν στην κλασική μέθοδο (Masuda S., et al, 2008). Τα κύτταρα είχαν πλήρως διαφοροποιηθεί σε καρδιομυοκύτταρα και εξέφραζαν α-ακτινίνη, καρδιακή τροπονίνη T και Nkx2.5 σε ποσοστά άνω των 85% καθώς υπήρχαν και μικρές ποσότητες ενδοθηλιακών κυττάρων. Δεν ανιχνεύθηκαν σοβαρές περιπτώσεις κοιλιακών ταχυκαρδιών, καθώς και θάνατοι και τερατώματα συσχετιζόμενα με τη μεταμόσχευση στις 8 εβδομάδες έπειτα. Το ηχοκαρδιογράφημα έδειξε ότι το LVEF ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα κατά 15% στις 4 εβδομάδες και 15,6% στις 8, ο LVESV σημαντικά μικρότερος στο iPSCs γκρουπ κατά 5% και 8,5% στις 4 και 8 εβδομάδες αντίστοιχα, αλλά ο LVEDV δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα γκρουπ. Ανοσοιστοχημικά δεδομένα υπέδειξαν ότι τα ποσοστά του κολλαγόνου και της ίνωσης ήταν σημαντικά μικρότερα στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα στις 8 εβδομάδες κατά 5%, αλλά και το μέγεθος των κυττάρων ήταν μικρότερο και η πυκνότητα των αγγείων στα όρια της εμφραγματικής περιοχής ήταν μεγαλύτερη στο γκρουπ των iPSCs κατά 300 αγγεία/mm². Τέλος, στην περιοχή που συγγενεύει άμεσα με την εμφραγματική βρέθηκαν αυξημένα ποσοστά των παραγόντων bFGF και VEGF, ενώ η κινητικότητα του καρδιακού τοιχώματος αυξήθηκε μόνο στην οριακή περιοχή του εμφράγματος στις 4 εβδομάδες. Τα μεταμοσχευμένα κύτταρα έδειξαν να μην επιβιώνουν μακροχρόνια καθώς στις 8 εβδομάδες ο ανοσοφθορισμός έδειξε λίγα από τα αρχικά κύτταρα που εξέφραζαν την βαριά αλυσίδα της αργής β μυοσίνης.

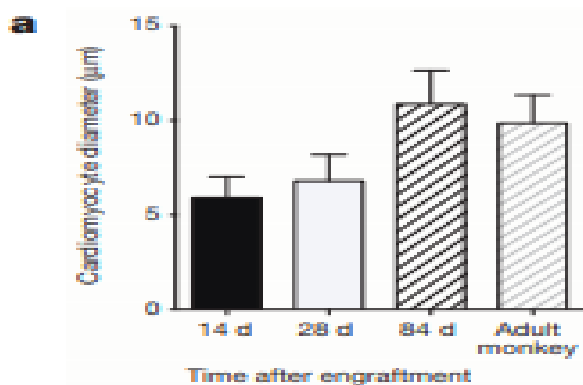
Η μετάβαση σε πρωτεύοντα πραγματοποιήθηκε το 2014 (Chong J., et al, 2014) οι οποίοι μετέφεραν hESC-CMs τα οποία είχαν καλλιεργηθεί παρουσία PSC σε εφτά μακάκους. Οι μακάκοι είχαν υποβληθεί σε ισχαιμικό τραυματισμό της καρδιάς και επαναιμάτωση 2 εβδομάδες πριν τη μεταμόσχευση και ανοσοκαταστολή 5 ημέρες πριν, και η μεταφορά των κυττάρων έγινε ενδομυϊκά με ενέσιμο τρόπο στην περιοχή του εμφράγματος αλλά και στα όριά του, ενώ άλλο ένα γκρουπ χρησιμοποιήθηκε για control και τα αποτελέσματα αξιολογήθηκαν με ηχοκαρδιογράφημα και μέσω ανοσοιστοχημείας καθώς και μέτρηση του ασβεστίου. Τερατώματα οποιουδήποτε είδους δεν εντοπίστηκαν. Το μέγεθος του εμφράγματος ήταν 7,3% και 10,4% στο control group στις μέρες 14 και 28 αντίστοιχα, ενώ κυμάνθηκε στο μέσο όρο του 5,2% στα ζώα που έλαβαν hESC-CMs, όπου και παρατηρήθηκε δημιουργία

καρδιομυϊκού ιστού που κάλυψε 40% του εμφραγματικού ιστού. Τα μοσχεύματα εξέφραζαν στην πλειοψηφία τους σαρκομερική ακτίνη α και πέρασαν από στάδιο ωρίμανσης κατά τις μέρες 14 με 84 που έγινε αντιληπτή μέσω της αύξησης της διαμέτρου τους και της αλλαγής των μυϊκών ινών φτάνοντας τη μέρα 84 σε μέγεθος στα ώριμα καρδιομυοκύτταρα και έδειξαν αλληλεπίδραση με τον καρδιομυϊκό ιστό του δέκτη μέσω έκφρασης κονεξίνης 43 και N καδερίνης στους χασμοσυνδέσμους. Υπήρξε προφανής ανάπτυξη δικτύου αγγείων ανάμεσα στον ιστό του δέκτη και τα μοσχεύματα όπως έδειξε η ανάλυση των τρισιδιάστατων δικτύων αγγείων μέσω τομογραφίας και υπήρξε 1:1 ηλεκτρομηχανική αλληλεπίδραση αμφότερων των ιστών. Παρόλα αυτά όλα τα ζώα που έλαβαν τα



κύτταρα παρουσίασαν σειρές πρώιμων και μη κοιλιακών ταχυκαρδιών αν και τα ζώα διατήρησαν τις αισθήσεις τους και μια ήρεμη κατάσταση κατά της διάρκειά τους. Το κλάσμα εξώθησης παρουσίασε πτώση στα περισσότερα control ζώα και διατήρηση ή αύξηση στα ζώα που έλαβαν τα κύτταρα, αν και δεν έγινε δυνατή η στατιστική ανάλυση λόγω μικρού αριθμού υποκειμένων. Οι αρρυθμίες αποδώθηκαν κατά πάσα πιθανότητα στο μέγεθος της καρδιάς του μακάκου που είναι πολύ μεγαλύτερη από τα προηγούμενα ζώα και άρα τα μοσχεύματα είναι αρκετά μεγαλύτερα, που υποστηρίχτηκε από το γεγονός ότι οι

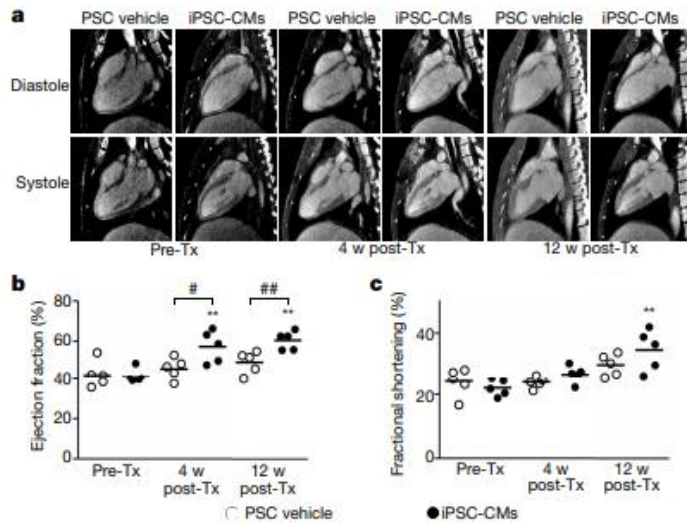
μεγαλύτερες αρρυθμίες παρατηρήθηκαν στον μεγαλύτερο μακάκο, αλλά και στο ότι ο ρυθμός της καρδιάς του μακάκου είναι πιο αργός από προαναφερθέντα είδη και αυτό εμποδίζει τη δημιουργία βρόγχων στη μεταφορά του ηλεκτρικού ερεθίσματος.



Εικόνα 64. α (δεξιά): Η διάμετρος των καρδιομυοκυττάρων προερχόμενων από hESCs σε μοντέλο πρωτεύοντος δείχνει σημαντική αύξηση μεταξύ των ημερών 14-28 και 28-84. Ενήλικες μαιμούδες $n=52$). Φαίνεται η μέση τιμή και οι τυπικές αποκλίσεις. α-γ (αριστερά). Τομές της καρδιάς που δείχνουν την εικόνα των αγγείων, με κόκκινο οι αρτηρίες, με γκρι τα άλλα αγγεία στην καρδιά και με άσπρο τα αγγεία στο μόσχευμα. δ: ιστολογική τομή της καρδιάς των α-γ χρωματισμένη με αντίσωμα anti-GFP για να δείξει το μόσχευμα hESC-CM (καφέ) (Chong J., et al, 2014).

Τα αυτόλογα iPSCs είναι μια σημαντική πηγή κυττάρων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίς ηθικά διλήμματα στην αναγέννηση των ιστών αλλά δυστυχώς παρουσιάζουν και μειονεκτήματα όπως ότι η προσπάθεια που χρειάζεται για να απαλλαγούμε από όλα τα κύτταρα που δεν είναι επαρκώς διαφοροποιημένα καθώς και η γενικότερη προετοιμασία τους είναι μια διαδικασία χρονοβόρα και

ακριβή, ειδικά σε όργανα όπως η καρδιά στην οποία χρειαζόμαστε τεράστιο αριθμό κυττάρων και υπάρχει αναλογικά μικρός αριθμός δοτών (Laflamme et al., 2011). Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν ετερόλογα iPSCs τα οποία όμως ταίριαζαν όσον αφορά τα αντιγόνα ιστοσυμβατότητας με τα αντίστοιχα των δεκτών σε μοντέλο πρωτεύοντων (Macaca fascicularis) στα οποία είχαν προηγουμένως επαχθεί MI μέσω ισχαιμίας και επανααιμάτωση (Shiba Y., et al, 2016). Τα ζώα ήταν ανοσοκατεσταλμένα για να αποφευχθεί η απόρριψη του μοσχεύματος και 2 εβδομάδες έπειτα από το MI μεταφέρθηκαν σε 5



υποκείμενα 4×10^8 ετερόλογα iPSCs που είχαν διαφοροποιηθεί σε cTnT+ καρδιομυοκύτταρα σε μέσο που περιλάμβανε PSC ενδομυϊκά με ενέσιμο τρόπο στην περιοχή του εμφράγματος και στα όριά της, ενώ άλλα 5 ζώα χρησιμοποιήθηκαν σαν control. Διενεργήθηκαν νεκροψίες ζώων στις 12 εβδομάδες μετά την μεταμόσχευση που επιβεβαίωσαν την έλλειψη οποιουδήποτε είδους τερατώματος ή απόρριψης των μοσχευμάτων. Παρατηρήθηκε αντικατάσταση εμφραγματικού ιστού από μυϊκό στο 16,3% στα iPSC-CM ζώα που τροφοδοτούνταν από αγγεία του δέκτη

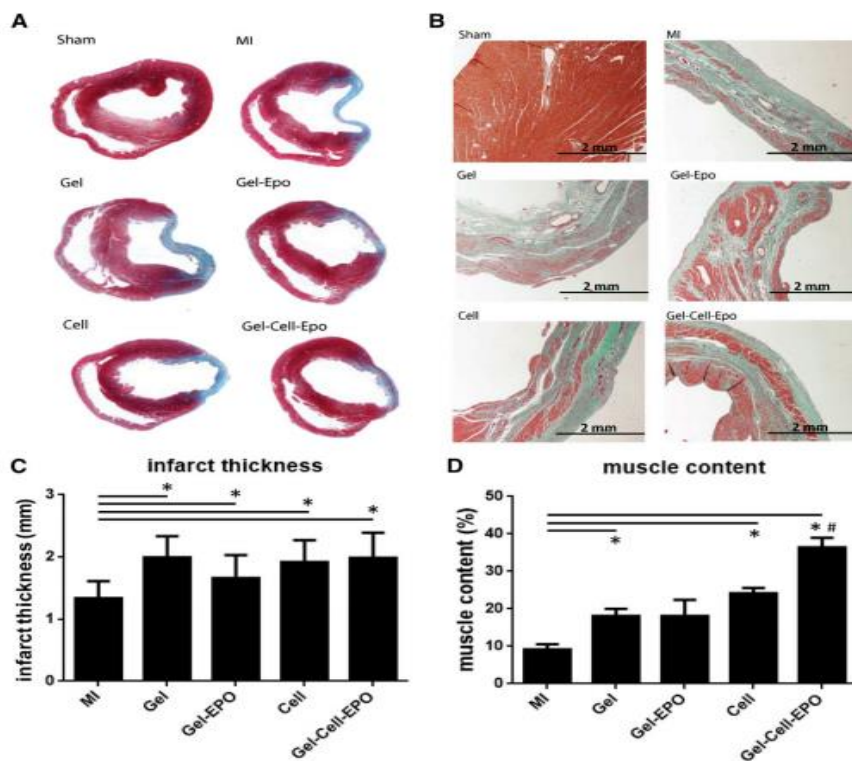
και διαπιστώθηκε η αλληλεπίδραση των μοσχευμάτων με καρδιομυοκύτταρα του δέκτη και μέσω της έκφρασης κονεξίνης43 και N-καδερίνης στους χασμοσυνδέσμους, ενώ η ηλεκτρομηχανική αλληλεπίδραση ήταν παρόμοια με των καρδιομυοκυττάρων του δέκτη. Ηχοκαρδιογραφικά δεδομένα έδειξαν σημαντική αύξηση του EF στα iPSC-CM ζώα τις μερες 28 και 84 σε σχέση με τα control, η αύξηση δε επέφερε μείωση του εμφραγματικού ιστού και δημιουργία νέου λειτουργικού καρδιομυϊκού ιστού στους δέκτες. Οι διαστάσεις της αριστερής κοιλίας τόσο στη συστολή όσο και στη διαστολή εμφάνισαν βελτίωση στα iPSC-CM ζώα 4 και 12 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση και ενώ στα control ζώα οι διαστάσεις της κοιλίας αυξανόταν μετά τη μεταμόσχευση, η αύξηση αυτή φάνηκε να αναστέλλεται ολοκληρωτικά στα ζώα που πήραν τα κύτταρα. Δυστυχώς τα πρωτεύοντα εμφάνισαν ξανά κοιλιακές ταχυκαρδίες, από τις οποίες οι ξαφνικές όπως και οι διατηρήσιμες όμως εμφάνισαν μέγιστο σημείο τη μέρα 14 σε όλα τα υποκείμενα και από εκεί και πέρα έφθιναν, ενώ δεν ήταν διακριτές τις μέρες 56 και 84. Οι ταχυκαρδίες δε συσχετίστηκαν με το μέγεθος των ζώων ή το μέγεθος του νέου καρδιομυϊκού ιστού που αναπτύχθηκε αλλά η ομάδα κατέληξε ότι ήταν προϊόν ωρίμανσης των νέων καρδιομυοκυττάρων γι' αυτό και εν καιρώ εξαφανίστηκαν.

Εικόνα 65. Μεταμόσχευση iPSC-CMs βελτιώνει την συσπαστική λειτουργία της καρδιάς. Η καρδιακή συσπαστική λειτουργία μελετήθηκε πριν τη μεταμόσχευση (Pre-Tx), στις 4 εβδομάδες μετά από αυτήν (4w post-Tx) και στις 12 εβδομάδες μετά από αυτήν (12w post-Tx) με ηχοκαρδιογραφία. a: Αντιπροσωπευτικές εικόνες στην συστολική και διαστολική εικόνας στον επιμήκη άξονα, δείχνουν την ξεκάθαρη αναστολή της αναδιαμόρφωσης. b: EF σύμφωνα με ηχοκαρδιογράφημα. c: FS σύμφωνα με ηχοκαρδιογράφημα, n=5 σε κάθε γκρουπ. Και στα δύο διαγράμματα ξεκάθαρη βελτίωση στα iPSC-CMs ζώα (μαύρος κύκλος) σε σχέση με τα PSC control ζώα (άσπρος κύκλος (Shiba Y., et al, 2016).

Πιο σύγχρονες τεχνικές πέρα από τον κλασικό ενέσιμο τρόπο με τον οποίο μεταμοσχεύονται τα iPSCs ή ακόμα και με τη δημιουργία φύλλων κυττάρων έχουν οδηγήσει σε κύτταρα με αυξημένη καθαρότητα σε μεγαλύτερους αριθμούς, έτσι ώστε να βελτιστοποιηθεί η κατακράτηση των κυττάρων από τον οργανισμό και η συγχώνευσή τους, αλλά και να οδηγήσει στην πλήρη επίλυση προβλημάτων που σχετίζονται με αδιαφοροποίητους φαινότυπους iPSCs πέρα από τον καρδιομυϊκό, όπως οι αρρυθμίες και η δημιουργία όγκων, καθώς και προβλήματα που σχετίζονται με την ενσωμάτωση κυττάρων μέσω μη βιοδιασπώμενων ικτριωμάτων όπως φλεγμονώδεις αντιδράσεις και δημιουργία ινώδους ιστού λόγω αποδόμησης των ικτριωμάτων (Masuda S., et al, 2008). Παρόλο που τα 2D ικτριώματα είναι απόλυτα ικανά για τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό των προγονικών κυττάρων, οι περισσότερες ομάδες υιοθέτησαν τη διαφοροποίηση υπο συνθήκες εναιωρήματος η οποία είναι ικανή για εύκολη ανάπτυξη των κυττάρων και εύκολη αλλαγή του θρεπτικού μέσου καθώς τα κύτταρα υιοθετούν εκ του φυσικού τους δομές εμβρυοειδών σωμάτων και δημιουργούν συσσωματώματα (Kempf H., et al, 2014). Παρόλα αυτά η ανακίνηση σε τέτοιου είδους καλλιέργειες μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ποιότητας των κυττάρων και εξαρτάται από τη κυτταρική σειρά (Zweigerdt R., et al, 2011) και η εξάλειψη όλων των αδιαφοροποίητων κυττάρων δεν είναι πάντα εφικτή πράγμα που μπορεί να οδηγήσει σε τερατώματα *in vivo* (Hemmi N., et al, 2014). Επιστημονική ομάδα (Tohyama S., et al, 2013) κατάφερε να καθαρίσει μέσω μεταβολικής επεξεργασίας τα hiPSCs σε καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας εξαλείφοντας όλα τα αδιαφοροποίητα κύτταρα, ενώ παραιτέρω (Tohyama S., et al, 2016) απέδειξε ότι οι καλλιέργειες 2D είναι ιδανικές για τη μεταμόσχευση καθαρών hiPS-CMs καθώς τα κύτταρα εκτίθενται ομοιόμορφα στο μεταβολικό μέσο. Το 2017 οι ίδιοι (Tohyama S., et al, 2017) καλλιέργησαν σε πιάτα καλλιέργειες πολλών στρώσεων με ενεργό εξαερισμό 1×10^6 hiPSCs τα οποία έδωσαν $7,2 \times 10^8$ πολυδύναμα hiPSCs στα πιάτα τεσσάρων στρώσεων και $1,7 \times 10^9$ κύτταρα στα πιάτα δέκα στρώσεων. Έπειτα τα κύτταρα διαφοροποιήθηκαν σε καρδιομυϊκά μέσω πρωτοκόλλου 2D δίνοντας $6,2-7 \times 10^8$ κύτταρα στις 4 στρώσεις και $1,5-2,8 \times 10^9$ κύτταρα στις 10 στρώσεις φτάνοντας στις 10 στρώσεις αποδοτικότητα διαφοροποίησης 66-87%. Μετά από μεταβολικό καθαρισμό με θρεπτικό μέσο που υπολειπόταν σε γλυκόζη και γλουταμίνη και με πρόσθεση λακτόζης οι καλλιέργειες έδωσαν ένα τεράστιο αριθμό κυττάρων.

Μεγάλη εφαρμογή έχουν βρει και οι υδρογέλες. Για να αναλύσουμε ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα (Chow A., et al, 2017), δοκίμασαν συνδυασμό υδρογέλης πολυαιθυλενίου γλυκόλης (PEG) σε συνδυασμό με ερυθροποιητίνη (EPO) και iPSC-CM σε μοντέλο αρουραίου. Γενικότερα τα ικτριώματα όπως τα φύλλα κυττάρων, τα επιθέματα, τα ικτριώματα που έχουν κατασκευαστεί εφ' αρχής από κύτταρα και οι υδρογέλες μπορούν να μειώσουν την απώλεια κυττάρων λόγω μηχανικών προβλημάτων, μειώνουν το μηχανικό στρες παρέχοντας στήριξη, παρέχουν ένα φιλόξενο περιβάλλον αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα του δέκτη και συντελούν στην επιβίωση των μεταφερόμενων κυττάρων (Place S., et al, 2009). Στις υδρογέλες επιπλέον μπορούν να ρυθμιστούν οι μηχανικές τους ιδιότητες και οι χρόνοι μετατροπής σε τζελ, έτσι ώστε να ταιριάζουν στη σκληρότητα και τις ιδιότητες του μυοκαρδίου σε αντίθεση με τις άλλες μεθόδους που είναι σχετικά πιο 'επιθετικές' (Frey N., et al, 2014). Επίσης βιολογικοί παράγοντες όπως ορμόνες, παράγοντες αύξησης και μικρομόρια μπορούν με ευκολία να ενσωματωθούν στη μήτρα και να υποβοηθήσουν την ενσωμάτωση, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των μεταφερόμενων κυττάρων καθώς και την αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα του δότη και την ενεργοποίηση των ενδογενών μηχανισμών αναγέννησης (Laflamme et al, 2007). Η ερυθροποιητίνη έχει βρεθεί ότι βοηθά στην μείωση του κυτταρικού θανάτου και την αναδιαμόρφωση της καρδιάς μετά από MI (Brines M., et al, 2008). Έχοντας αυτά υπόψη οι ερευνητές (Chow A., et al, 2017) δημιούργησαν 4 ομάδες αρουραίων στις οποίες μετέφεραν iPSC-CMs μετά από MI, μια στην οποία αυτά μεταφέρθηκαν σε υδρογέλη με ερυθροποιητίνη, μια στην οποία μεταφέρθηκαν σε

αλατούχο διάλυμα, μια στην οποία μεταφέρθηκε μόνο υδρογέλη και μια στην οποία μεταφέρθηκε μόνο αλατούχο διάλυμα. Στις 10 εβδομάδες μετά τη μεταμόσχευση ο LVEDV αυξήθηκε στα ζώα που δεν έλαβαν υδρογέλη σε σχέση με αυτά που έλαβαν (35 ml μικρότερος στα ζώα που πήραν gel-EPO σε σχέση με τα υπόλοιπα ζώα που πήραν gel και 50 ml ακόμα υψηλότερος σε αυτά που πήραν μόνο κύτταρα), το κλάσμα εξώθησης αυξήθηκε σημαντικά σε όλα τα ζώα εκτός από αυτά που πήραν αποκλειστικά κύτταρα (όπου πάλι παρατηρήθηκε αύξηση), και ο LVESV παρουσίασε την μεγαλύτερη αύξηση στην ομάδα των κυττάρων και τη μικρότερη στην ομάδα του gel-EPO, με παρόμοιες τελικές τιμές σε όλες τις ομάδες εκτός της gel-EPO. Το πάχος του εμφραγματικού ιστού ήταν μικρότερο σε όλα τα γκρουπ σε σχέση με τα control και το γκρουπ gel-EPO και το περιεχόμενό του σε νέο μυϊκό ιστό ήταν αρκετά μεγαλύτερο από τις υπόλοιπες κατηγορίες. Γενικότερα η ενσωμάτωση των κυττάρων σε υδρογέλη μπορεί να έχει σημαντικές βελτιωτικές επιδράσεις στην λειτουργία, το πάχος και το περιεχόμενο της καρδιάς σε μυϊκό ιστό μετά από MI με μεγαλύτερες καρδιομυϊκές βελτιώσεις στις ομάδες που λαμβάνουν κύτταρα παρουσίας ικτριώματος και EPO.

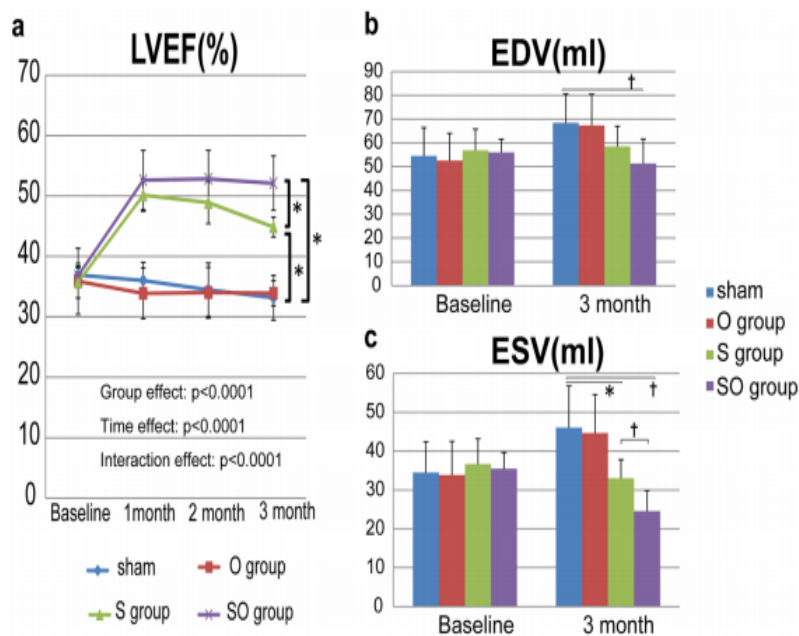


Εικόνα 66. A: Χρώση στις 10 εβδομάδες μετά το MI σε μεσοκοιλιακές τομές. Η κολλαγονική περιοχή φαίνεται μπλε και η μυϊκή κόκκινη. B: Μεγεθυσμένη εικόνα δείχνει τις μυϊκές ίνες (κόκκινες) μέσα στην κολλαγονική περιοχή (μπλε). C: Πάχος της εμφραγματικής περιοχής στις 10 εβδομάδες. Όλες οι θεραπείες αύξησαν το πάχος του πρόσθιου τοιχώματος, και περισσότερο το συνδυαστικό γκρουπ (κύτταρα-τζελ-EPO). D: Η αναλογία των μυϊκών ινών στη εμφραγματική περιοχή δείχνει ότι όλες οι θεραπείες, εκτός του τζελ-EPO, αύξησαν τον ζωντανό ιστό μέσα στο έμφραγμα. Μέσες τιμές και τυπικές αποκλίσεις (Chow A., et al,

2017).

Ένας ακόμα τρόπος μεταφοράς των hiPS-CMs δοκιμάστηκε σε μοντέλο χοιριδίου (Kawamura M., et al, 2017). Τα φύλλα κυττάρων όπως έχουμε δείξει μπορούν να μεταφέρουν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων στους δέκτες από τα ενέσιμα κύτταρα και δεν προκαλούν τραυματισμούς στον ιστό (Sekine, H., et al, 2011), όπως επίσης δεν ενέχουν και τον κίνδυνο απόπτωσης καθώς δε περιλαμβάνουν τεχνητά ικτριώματα (Zvibel I., et al, 2002). Παρόλα αυτά η ενσωμάτωση και μακρόχρονη επιβίωση των φύλλων κυττάρων στον οργανισμό πολλές φορές κινδυνεύει λόγω της μειωμένης αιμάτωσης και

παρατεταμένης ισχαιμίας, την έλλειψη αγγειώδους δομής και την επακόλουθη φλεγμονή και κάποιες φορές οξειδωτικό στρες στην περιοχή που έχει εγκατασταθεί ο μεταμοσχευμένος ιστός (Menasché P., et al, 2016). Έτσι οι Kawamura M., et al χρησιμοποίησαν τον επίπλου που είναι γνωστός για την πλούσια αγγειώδη δομή του και της αγγειογενείς και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητές του (Chandra A., et al, 2011) και κατασκεύασαν ένα επικάλυμμα το οποίο χρησιμοποίησαν και σε προηγούμενο μοντέλο χοιριδίου που δεν ήταν τραυματισμένο με αποτέλεσμα την επιβίωση κατά μάκρος των μεταμοσχευμένων κυττάρων (Kawamura M., et al, 2013). Τα hiPSCs διαφοροποιήθηκαν σε καρδιομυοκύτταρα με επιβεβαιωμένη έκφραση καρδιακής τροπονίνης T και μεταφέρθηκαν στα ζώα 4 εβδομάδες μετά την πρόκληση MI. Τα ζώα ήταν ανοσοκατεσταλμένα καθόλη τη διάρκεια του πειράματος και δημιουργήθηκαν 4 γκρουπ στα 23 διαθέσιμα ζώα όπου 1) έλαβαν τα κύτταρα σε φύλλα με επικάλυμμα επίπλου (n=7) 2) έλαβαν μόνο το επικάλυμμα (n=5) 3) έλαβαν μόνο φύλλα κυττάρων (n=6) 4) control group (n=5). Πραγματοποιήθηκε μαγνητική τομογραφία στα ζώα στους 1, 2 και 3 μήνες μετά τη μεταμόσχευση οσον αφορά τη λειτουργία της καρδιάς. Το EF της αριστερής καρδιάς παρέμεινε σταθερό στα control και τα ζώα που έλαβαν μόνο επικάλυμμα αλλά βελτιώθηκε στα ζώα που πήραν



κύτταρα μόνο και κύτταρα με επικάλυμμα κατά 14,4% 13,2% και 9,9%, και 15,8% 16% και 15,3% στους 1,2,3 μήνες αντίστοιχα, που δείχνει υπεροχή της δεύτερης κατηγορίας σε ποσοστό EF καθώς και σταθερότητα στο χρόνο. Επίσης ο LVEDV και LVESV εμφανίστηκαν στους 3 μήνες χαμηλότεροι στα ζώα που έλαβαν κύτταρα μόνο και κύτταρα με επικάλυμμα, ενώ η δεύτερη μεταβλητή παρουσίασε και σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δυο γκρουπ της τάξης του 9,5 ml (περισσότερο βελτιωμένη στο συνδυαστικό γκρουπ). Η τοπική συσταλτικότητα της καρδιάς δεν

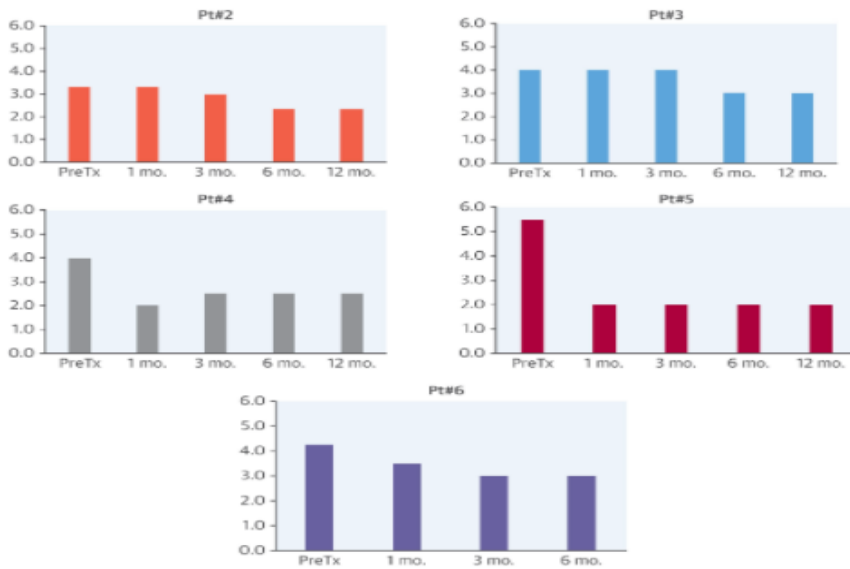
εμφάνισε βελτίωση στα control και τα χοιρίδια που έλαβαν μόνο επικάλυμμα, αλλά στα ζώα που πήραν φύλλα κυττάρων βελτιώθηκε σε 3 διακριτές περιοχές, ενώ στο συνδυαστικό γκρουπ ζώων βελτιώθηκε σε 6 διακριτές περιοχές. Ακόμα εκτιμήθηκε η επιβίωση των μεταμοσχευμένων κυττάρων και βρεθηκε οτι και στα δύο γκρουπ που πήραν κύτταρα ο αριθμός των κυττάρων μειώθηκε μεν, ο ρυθμός μείωσης ήταν κατά πολύ μικρότερος στο συνδυαστικό γκρουπ δε: (89% έναντι 61% στον 1 μήνα), (75% έναντι 42% στους 2 μήνες) και (57% έναντι 25% στους 3 μήνες). Τέλος, η αγγειακή πυκνότητα ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη στο συνδυαστικό γκρουπ από το γκρουπ που έλαβε μόνο κύτταρα (111 αγγεία/mm² έναντι 51/mm²) και η έκφραση καρδιοπροστατευτικών και αγγειογενών παραγόντων όπως οι VEGF, SDF-1, και bFGF επικρατούσε και πάλι στο συνδυαστικό γκρουπ, ενώ στους 2 μήνες μετά τη μεταμόσχευση η σαркоμερική οργάνωση των ενσωματωμένων καρδιομυοκυττάρων στο συνδυαστικό γκρουπ ήταν ξεκάθαρη, γεγονός που υποδυνάμει την επαρκή ωρίμανσή τους.

Εικόνα 67. Μαγνητική τομογραφία για την ανάλυση της λειτουργίας της καρδιάς, LVEF (α), LVEDV (b), LVESV (c). α: Το LVEF στους 3 μήνες ήταν σημαντικά μεγαλύτερο στο γκρουπ κυττάρων-επίπλου (SO) από το γκρουπ των κυττάρων (S). b: Ο LVEDV στους 3 μήνες στο συνδυαστικό γκρουπ ήταν σημαντικά μικρότερος του control. c: Ο LVESV στους 3 μήνες ήταν σημαντικά μικρότερος στα S και SO γκρουπ από το control, αλλά και μεταξύ τους παρουσίασαν σημαντική διαφορά. Παρουσιάζονται οι μέσες τιμές και οι τυπικές αποκλίσεις των τιμών (Kawamura M., et al, 2017).

Δεν υπάρχει ιδιαίτερα μεγάλη βιβλιογραφία στον άνθρωπο όσον αφορά τα εμβρυονικά βλαστικά κύτταρα και αυτό οφείλεται κυρίως στα ηθικά διλήματα που σχετίζονται με τη χρήση τους. Εφαρμογή σε άνθρωπο πραγματοποιήθηκε το 2015 (Menasché P., et al, 2015) όταν hESCs διαφοροποιήθηκαν σε καρδιομυοκύτταρα που εξέφραζαν τον καρδιακό δείκτη $Isl-1^+$ μέσω του BMP2 και αναστολέα του FGF και τοποθέτησαν 4 εκατομμύρια hESC-CMs σε επίθεμα φιμπρίνης που με χειρουργικό τρόπο μεταφέρθηκε στον εμφραγματικό ιστό 68χρονης η οποία έπασχε από σοβαρή καρδιακή ανεπάρκεια με προηγηθέν MI και EF 26% καλύπτοντας το επίθεμα που τοποθετήθηκε στο εμφραγματικό επικάρδιο με τμήμα περικαρδιακού ιστού. Η ανοσοκαταστολή της ασθενούς σταμάτησε μετά από 2 μήνες και κατά την διάρκεια των 3 μηνών μετά την μεταμόσχευση δεν παρατηρήθηκαν επιπλοκές που οφειλόταν στη θεραπεία όπως όγκοι, απόρριψη του μοσχεύματος ή κοιλιακές ταχυκαρδίες. Το κλάσμα εξώθησης βελτιώθηκε από ανεβαίνοντας στο 36% και οι όγκοι LVEDV και LVESV μειώθηκαν από τα 161 στα 134 mL για τον πρώτο και από τα 117 στα 84 mL για το δεύτερο. Στο τεστ του εξάλεπτου περπατήματος η ασθενής ανέβηκε από τα 350 στα 467 m και η περιοχή τους εμφραγματικού ιστού που ήταν ακινητική, αν και δεν εμφάνισε νέο μυικό ιστό, μετατράπηκε σε υποκινητική.

Οι Menasché P., et al, 2018 μεταμόσχευσαν 8,2 εκατομμύρια καρδιαγγειακά προγονικά κύτταρα προερχόμενα από hESCs σε 6 ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς με σοβαρή ισχαιμική δυσλειτουργία της αριστερής κοιλίας και προηγηθέν MI, όπως και EF 26%. Τα κύτταρα μεταμοσχεύθηκαν μέσω bypass με επίθεμα φιμπρίνης στο επικάρδιο στον εμφραγματικό ιστό ακολουθώντας την πρηγούμενη μελέτη όπου τα κύτταρα καλυπτόταν από τμήμα του περικαρδίου και στον 1 χρόνο μετά τη μεταμόσχευση δεν ανιχνεύθηκαν όγκοι (μέσω τομογραφίας) και αρρυθμίες (μέσω εμφυτευόμενου απινιδωτή) ή ανοσολογική αντίδραση (ανίχνευση αντισωμάτων στο δέκτη). Ένας ασθενής πέθανε σύντομα μετά τη θεραπεία για λόγους που δεν είχαν σχέση με τη θεραπεία και ένας εμφάνισε κοιλιακή ταχυκαρδία που δεν επέμεινε, ενώ ακόμα ένας πέθανε από καρδιακή ανεπάρκεια στους 22 μήνες. Οι ασθενείς στον 2 χρόνο εμφάνισαν βελτίωση στο 6λεπτο τεστ περπατήματος κατά 23,5 m και το μέσο κλάσμα εξώθησης της αριστερής κοιλίας αυξήθηκε από το 26% στη βάση του πειράματος στο 39,5% αν και η αύξηση συγκρινόμενη με το χρόνο δε θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική, ενώ το σκορ της κινητικότητας του τοιχώματος βελτιώθηκε καθώς έπεσε από το 4,2 στο 2,5 στην εκτίμηση του 1^{ος} χρόνου.

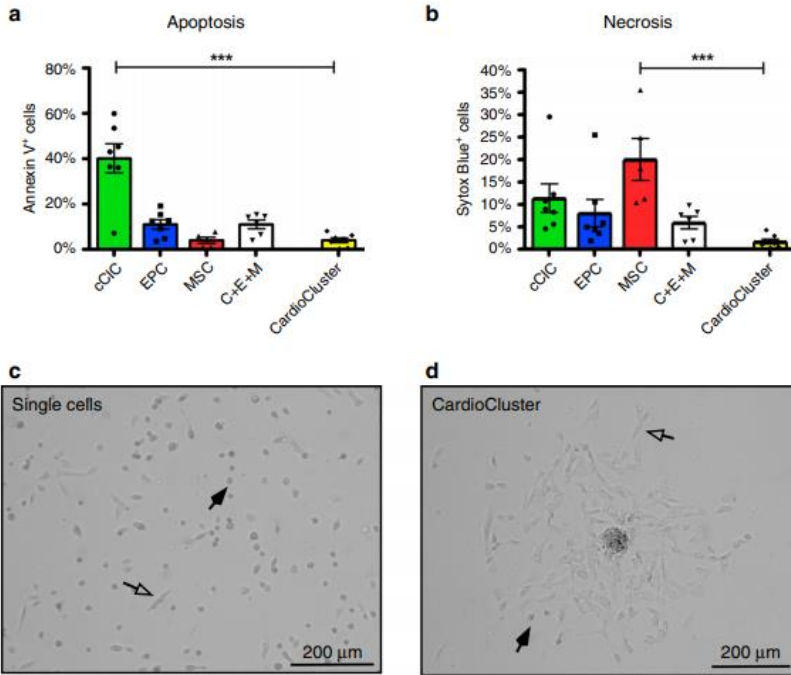
CENTRAL ILLUSTRATION: Individual Changes in the Wall Motion Score of the Cell/Patch-Treated Segments Over Time



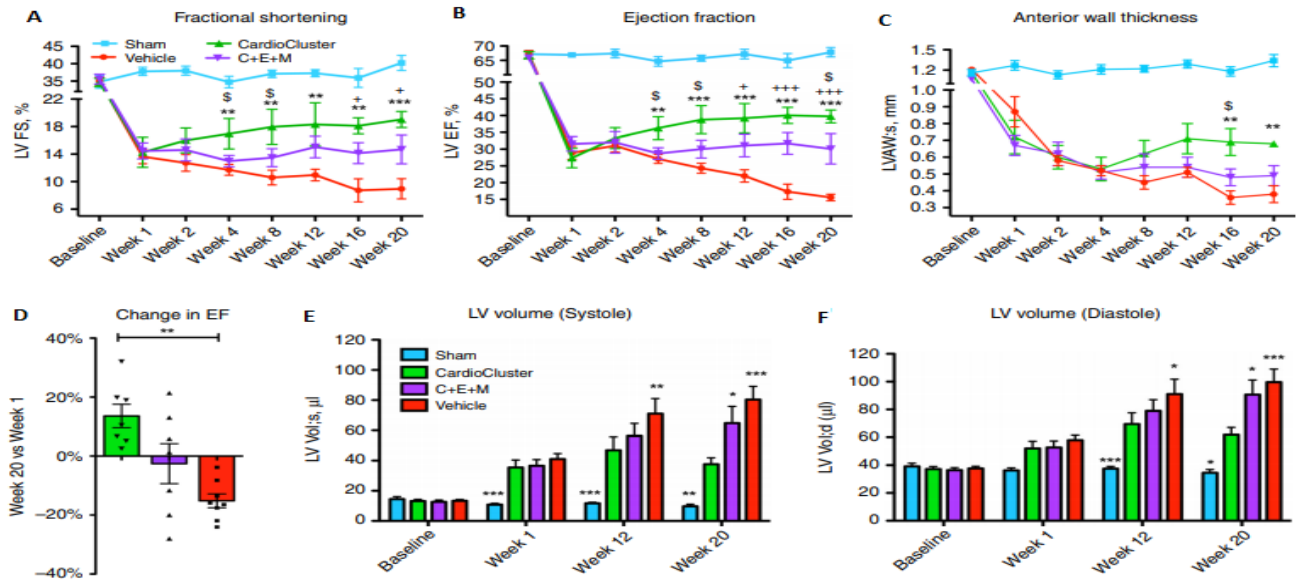
Εικόνα 67. Ο ηχοκαρδιογραφικός χάρτης των 17 τμημάτων της αριστερής κοιλίας σχετικά με την κινητικότητα του τοιχώματος προς το χρόνο. Το σκορ για κάθε ασθενή υπολογίστηκε από τις μέσες τιμές του σκορ προς τον αριθμό των τμημάτων από τα οποία προέκυψαν αυτά τα σκορ (όσο χαμηλότερο τόσο καλύτερα). Οι κάθετες μπάρες αντιπροσωπεύουν το σκορ (Menasché P., et al, 2018).

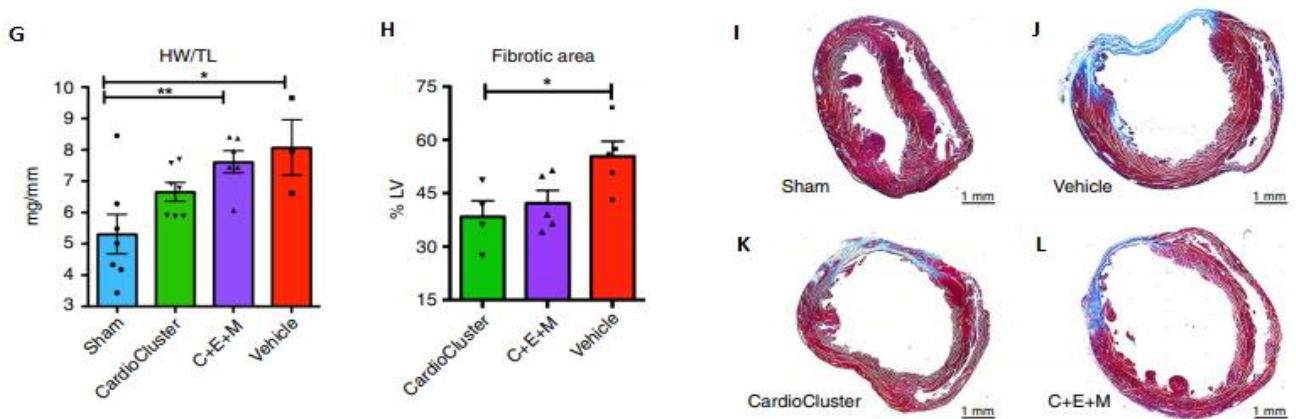
Οι πιο πρόσφατες προσεγγίσεις στην προσπάθεια για αποκατάσταση του καρδιομυϊκού ιστού περιλαμβάνουν την μεταμόσχευση συνδυασμού κυττάρων που επιδεικνύουν συνεργιστικές αλληλεπιδράσεις στην καρδιά (Monsanto M., et al, 2020). Εξερευνώντας το πεδίο αυτό της θεραπείας 'επόμενης γενιάς', καλλιεργώντας ταυτόχρονα MSCs, EPCs και c-kit⁺ CICs (καρδιακά ενδιάμεσα κύτταρα) οδηγήθηκαν σε 3D κατασκευές ελεύθερες ικριωμάτων, οι οποίες βελτιστοποιούν την αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων, μειώνουν στο ελάχιστο τις απώλειες κυττάρων καθώς και επιτρέπουν τη ρύθμιση του μεγέθους των κατασκευών που θα μεταμοσχευθούν και του ποσοστού του κάθε κυτταρικού τύπου που συμμετέχει και ονομάζονται CardioClusters. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι καλλιέργειες κυττάρων σε μονοστιοβάδες παρότι βολικές και κυρίαρχες μέχρι τώρα, μπορεί λόγω χωρικής έλλειψης να οδηγήσουν τα κύτταρα σε αλλαγή της μορφολογίας τους, θέτοντας επισφαλή τον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την ικανότητα διαφοροποίησής τους και το μεταγραφικό πρότυπό τους (Kim T., et al, 2018, Gurta N., et al, 2016). Αντίθετα η διαφοροποίηση στις 3D καλλιέργειες επιτρέπει μέσω της μίμησης του φυσικού περιβάλλοντος των κυττάρων να αναπτυχθούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους καθώς και να διατηρήσουν τα κύτταρα ένα μεταγράφημα που είναι πιο κοντά σε αυτό του ενδογενούς οργανισμού στον οποίο μεταφέρονται, κάτι που δεν είναι εφικτό στις 2D (Huh D., et al, 2011). Τα CardioClusters δρέπουν τα οφέλη τριών κυτταρικών τύπων. Τα MSCs κατέχουν κυρίως υποστηρικτικό ρόλο μέσω και της έκκρισης παρακρινών παραγόντων που ενεργοποιούν τα ενδογενή καρδιακά κύτταρα, προάγουν την αγγειογένεση, προστατεύουν τα καρδιομυοκύτταρα και μειώνουν το μέγεθος τους εμφραγματικού ιστού. Τα EPCs προάγουν με παρακρινή τρόπο την αγγειογένεση και τα βλαστικά καρδιακά κύτταρα τα οποία διεσπαρμένα μέσα στα CardioClusters υποστηρίζουν την μυϊκή ομοίωση και ευθύνονται για την απόκριση στον τραυματισμό και την αναδιαμόρφωση της καρδιάς. Δημιουργούνται σε δύο στάδια, εκ των οποίων στο πρώτο δημιουργείται ένας πυρήνας από μεσεγχυματικά και καρδιακά κύτταρα και μετά από 24 ώρες προστίθενται τα επιθηλιακά κύτταρα για να καλύψουν εξωτερικά το CardioCluster. Η εξωτερική στοιβάδα παρέχει αντίσταση στο οξειδωτικό στρες στις αντίξοες συνθήκες του περιβάλλοντος τους μυοκαρδίου. Τα CardioClusters βρέθηκε ότι εκφράζουν σε καλλιέργειες τον προστατευτικό παράγοντα SDF-1, τους

αντιαποπτωτικούς και αντιφλεγμονώδεις παράγοντες IGF και IL-6 καθώς και τον HGF που συμβάλλει στην ενεργοποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων και βέβαια στην αναγέννηση των ιστών, και μάλιστα σε μεγαλύτερο ποσοστό από τους γονεϊκούς πλυθησμούς, γεγονός που υπογραμμίζει τις παρακρινείς ιδιότητές τους στην υποβοήθηση της αναγέννησης της καρδιάς. Στο πείραμα που διενέργησε η προαναφερθείσα ομάδα (Monsanto M., et al, 2020) προσπάθησαν να συγκρίνουν ουσιαστικά τις διαφορές μεταξύ ζώων στα οποία οι τρεις προαναφερθείσες κατηγορίες κυττάρων σχημάτιζαν προηγουμένως CardioClusters και σε ζώα στα οποία τα κύτταρα μεταφέρονταν σε μορφή εναιωρήματος. Έτσι μεταμόσχευσαν με MI μοντέλο ποντικού ξενογενή κύτταρα απομονωμένα από άνθρωπο και συνέκριναν ομάδες που είτε έλαβαν MSCs, EPCs και cCICs σε μορφή εναιωρήματος (n=7), είτε σε CardioCluster (n=7), είτε που πήραν placebo (n=8) 4 εβδομάδες έπειτα από την μεταμόσχευση. Το κλάσμα εξώθησης έδειξε βελτίωση ήδη από την 4^η εβδομάδα στα CardioClusters η οποία διατηρήθηκε μέχρι και την 20^η εβδομάδα (τέλος παρατήρησης), ενώ στο γκρουπ του εναιωρήματος η πρώτη σημαντική βελτίωση εμφανίστηκε την 12^η εβδομάδα και διατηρήθηκε μέχρι την 20^η. Η συνολική εικόνα του EF έδειξε αύξηση κατά 45% στα CardioClusters, αλλά αντίστοιχη μείωση 5% και 46% στα ζώα που έλαβαν εναιώρημα και placebo. Όσον αφορά την αναδιαμόρφωση της καρδιάς, τα CardioClusters εμφάνισαν μειωμένη διάμετρο στην αριστερή κοιλία τόσο στη συστολή όσο και στη διαστολή και οι LVEDV και LVESV ήταν περισσότερο μειωμένοι σε όλες τις εβδομάδες πέραν της πρώτης με τη διαφορά να αυξάνεται έως την 20^η στα CardioClusters σε σχέση με το εναιώρημα, φτάνοντας την 20^η εβδομάδα διαφορά τουλάχιστον 30ml στον πρώτο όγκο και τουλάχιστον 25 ml στο δεύτερο. Ο καρδιακός ρυθμός ήταν παρόμοιος στα γκρουπ, η πυκνότητα του τοιχώματος ξεχώρισε ήδη από την 8^η εβδομάδα στα CardioClusters σε σχέση με το εναιώρημα που η τιμή παρέμεινε πολύ κοντά στο placebo, φτάνοντας στις 10 εβδομάδες μια διαφορά 2mm μεταξύ των πολυκυτταρικών γκρουπ και η ινώδης περιοχή ήταν σημαντικά μικρότερη στις 20 εβδομάδες στα CardioClusters (38,4%) σε σχέση με τα ζώα που έλαβαν εναιώρημα (55,3%), αν και τα τελικά μεγέθη του εμφραγματικού ιστού δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στα διάφορα γκρουπ. Τα CardioClusters ήταν εμφανώς ορατά μέσω φθορισμού στο μυοκάρδιο στις 1,4,12 και 20 εβδομάδες, ενώ τα αποτελέσματα έδειξαν αυξημένη αγγειώδη πυκνότητα στις 20 εβδομάδες όσον αφορά τα CardioClusters κατά 62% και 83% αντίστοιχα έναντι του εναιωρήματος και των placebo στην εμφραγματική περιοχή, ενώ στα όρια της τα ζώα με τα πολυκυτταρικά γκρουπ έτειναν να αυξηθούν σε σχέση με τα placebo αλλά όχι σημαντικά και στις απομακρυσμένες περιοχές δε παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Η υπερτροφική αναδιαμόρφωση των καρδιομυοκυττάρων έπειτα από τραυματισμό είναι έκδηλη από το γεγονός ότι στις 20 εβδομάδες όλα τα ζώα που πήραν πολυκυτταρικά γκρουπ διατήρησαν το μέγεθος των καρδιομυοκυττάρων τους στην εμφραγματική περιοχή σε σχέση με τα ζώα του placebo, ενώ στα όρια της και στις απομακρυσμένες περιοχές τα καρδιομυοκύτταρα των CardioClusters ήταν μικρότερα από τα αντίστοιχα του εναιωρήματος, φτάνοντας σε μέγεθος στις απομακρυσμένες περιοχές το μέγεθος καρδιομυοκυττάρων ζώων που δεν είχαν υποστεί MI. Συνολικά, μια απόλυτη υπεροχή των CardioClusters τόσο στις λειτουργικές παραμέτρους όσο και τις δομικές στην αναδιαμόρφωση της καρδιάς έπειτα από MI.



Εικόνα 68. Τα CardioClusters προστατεύουν απέναντι σε οξειδωτική ζημιά. *a, b*: Απόπτωση αποτυπωμένη με Annexin V (*a*) και νέκρωση αποτυπωμένη με Sytox Blue (*b*). Απεικονίζονται οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση. *c, d*: Εικόνες απομονωμένων κυττάρων (*c*) και CardioClusters (*d*) 4 ώρες μετά την επεξεργασία με H₂O₂. Τα διαφανή βέλη δείχνουν τα υγιή κύτταρα και τα μαύρα βέλη αντιπροσωπεύουν κύτταρα που έχουν αποκολληθεί από την επιφάνεια της καλλιέργειας, κατά πάσα πιθανότητα βιώνοντας κυτταρικό θάνατο (Monsanto M., et al, 2020).





Εικόνα 69. Λειτουργικές και δομικές μεταβολές από τη βάση του πειράματος έως 20^η εβδομάδα στα γκρουπ των κυττάρων: γκρουπ φυσιολογικών ζώων (μπλε), CardioCluster γκρουπ (πράσινο), συνδυαστικό γκρουπ όπου κάθε κατηγορία κυττάρου μεταφέρεται ξεχωριστά (μωβ), control γκρουπ (κόκκινο). A: FS και B: EF, το CardioCluster απέκτησε σημαντική στατιστική διαφορά από το συνδυαστικό γκρουπ από την ε εβδομάδα 4 ως την 20^η. C: Σχετικά με την πάχυνση του πρόσθιου τοιχώματος, το CardioCluster απέκτησε σημαντική στατιστική διαφορά από το συνδυαστικό γκρουπ από τη βδομάδα 16 ως την 20. D: Η απόλυτη διαφορά στο EF ήταν θετική μόνο στο CardioCluster. E-F: Ο LVESV και ο LVEDV αντίστοιχα, εμφανίστηκε μικρότερος στο CardioCluster από την εβδομάδα 1 ως το τέλος του πειράματος, αν και δεν έλαβε στατιστική σημαντικότητα. G: Το κλάσμα του βάρους της καρδιάς προς το οστό της κνήμης ήταν μικρότερο στο CardioCluster από το συνδυαστικό γκρουπ, όπως και το ποσοστό της ινώδους περιοχής (H) την 20^η εβδομάδα, χωρίς οι τιμές να λαμβάνουν στατιστική σημαντικότητα παρά μόνο μεταξύ φυσιολογικών ζώων και συνδυαστικού γκρουπ (G) και CardioCluster και control (H). I-L: Αναπαράσταση της εμφραγματικής περιοχής (κόκκινο για τον λειτουργικό ιστό και μπλε για το κολλαγόνο)(Monsanto M., et al, 2020).

Τελευταίες κατηγορίες κυττάρων που δοκιμάστηκαν στην αναγέννηση του μυοκαρδίου τα ESCs και τα iPSCs, κλωνογενή, πολυδύναμα και με ικανότητα αυτο-αναγέννησης, είναι ικανά να συνεισφέρουν και στις 3 βλαστικές στοιβάδες και να οδηγήσουν το μυοκάρδιο σε δομική και λειτουργική βελτίωση μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Η δράση τους διενεργείται είτε μέσω διαφοροποίησης σε καρδιομυοκύτταρα είτε μέσω παρακρινούς φαινομένου με την έκκριση κυτοκινών και αυξητικών παραγόντων. Έτσι τα ευεργετικά τους αποτελέσματα μπορεί να είναι εμφανή και σε απομακρυσμένες περιοχές από το σημείο μεταμόσχευσης. Η βελτίωση της αγγειώδους δομής και η δημιουργία ζωντανού ιστού παράλληλα με τη μείωση του εμφραγματικού οδηγεί σε αύξηση της ελαστικότητας, της συστολικής λειτουργίας και της κινητικότητας του μυοκαρδίου και σε πάχυνση του εμπρόσθιου τοιχώματος της καρδιάς. Εν συνεχεία αυξάνεται η λειτουργικότητα της καρδιάς με την αύξηση του κλάσματος εξώθησης αλλά και μειώνεται ο ινώδης ιστός και το κολλαγονικό περιεχόμενο του εμφραγματικού ιστού. Η αναδιαμόρφωση της καρδιάς αναστέλλεται με τη μείωση των διαστάσεων της (LVESV-LVDEV) και η υπερτροφία σταματά την πρόδοό της που αντικατοπτρίζεται στο μέγεθος των μυοκαρδιακών κυττάρων. Παράλληλα ανιχνεύονται στο περιβάλλον της μεταμόσχευσης παρακρινείς παράγοντες που οδηγούν στην καρδιοπροστασία, την αγγειογένεση, έχουν αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες και βοηθούν στη ενεργοποίηση του ενδογενούς πληθυσμού και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών, όπως οι VEGF, IGF-1, FGF, HGF και SDF-1. Από την άλλη μεριά ενώ φαίνεται ότι στις περισσότερες μελέτες υπάρχει ηλεκτρομηχανική αλληλεπίδραση και συζευξη 1-1 των κυττάρων του μωσχεύματος και των ενδογενών κυττάρων, ανιχνεύονται παράλληλα αρρυθμίες πρόωρες είτε και παρατεταμένες και κοιλιακές ταχυκαρδίες. Αυτές φαίνεται να αυξάνονται όσο πηγαίνουμε σε

μεγαλύτερο μέγεθος καρδιάς και μικρότερο καρδιακό ρυθμό και έχουν συνδεθεί με την ανωριμότητα των μεταμοσχευθέντων κυττάρων, η οποία μπορεί να δημιουργήσει βρόγχους ηλεκτρικής φύσης κατά την πόλωση και εκπόλωση στη μεταφορά του ερεθίσματος σε μεγάλες αποστάσεις, ενώ ένας μεγάλος καρδιακός ρυθμός μπορεί να αποτρέψει τη δημιουργία αυτών των βρόγχων. Επίσης έχουν δοκιμαστεί μέθοδοι για την μεταφορά των κυττάρων στους δέκτες άλλοι πέρα από την κλασσική μέθοδο ενέσεως. Οι τεχνικές αυτές σκοπεύουν στην κατακράτηση μεγαλύτερου αριθμού κυττάρων από το δέκτη και τον ευκολότερο πολλαπλασιασμό και απόκτηση κυττάρων προς μεταμόσχευση όπως τα φύλλα κυττάρων. Σημαντική είναι η διατήρηση της ποιότητας και της καθαρότητας των κυττάρων, ειδικά στα iPSCs στα οποία οποιοσδήποτε μη διαφοροποιημένος προς καρδιομυοκύτταρα φαινότυπος μπορεί να είναι επισφαλής, αλλιώς μπορεί να οδηγηθούμε σε αρρυθμίες είτε όγκους στον δέκτη, αλλά και η έκθεση εξίσου όλων των κυττάρων στο θρεπτικό μέσο και τα συστατικά του όπως προσπαθούν να επιτύχουν οι 2D καλλιέργειες. Ακόμα οι υδρογέλες επιτρέπουν τη ρύθμιση της σύστασής τους έτσι ώστε μηχανικά να είναι κοντά στη σύσταση του καρδιομυικού περιβάλλοντος ως προς τη σκληρότητα, ενώ ο επίπλους είναι ιδανικός για την αποφυγή φλεγμονών όσο και της ανοσολογικής απόκρισης που μπορεί να προκληθεί από την αποδόμηση τεχνητών ικριωμάτων, αλλά και τη διατήρηση της αιμάτωσης στο σημείο της μεταμόσχευσης. Τα ικριώματα στο σύνολό τους προσπαθούν να επιτύχουν ένα φιλικό προς τα μεταμοσχευμένα κύτταρα αλλά και προς το δέκτη περιβάλλον, χωρίς στρεσογόνους παράγοντες στο οποίο θα είναι εύκολη η παροχή ορμονών και αυξητικών παραγόντων και στο οποίο τα μεταμοσχευμένα κύτταρα θα μπορούν να αλληλεπιδράσουν άνετα με το περιβάλλον τους, ώστε να διευκολύνεται η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός τους. Τέλος με τις τεχνικές επόμενης γενιάς, γίνεται συνδυασμός EPCs, MSCs και CICs για την εκμετάλλευση των ιδιοτήτων και των τριών κατηγοριών κυττάρων με το σχηματισμό σφαιρικών δομών, οι οποίες φαίνεται να συνεισφέρουν στους δέκτες τους σε ακόμα πιο ακραία βελτίωση της δομικής και λειτουργικής κατάστασής τους, όπως και αποκατάσταση της ποιότητας ζωής τους.

3. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ξανακοιτώντας τις τεχνικές που περιλαμβάνουν κυτταρικούς τύπους που κατέχουμε για την αναγέννηση του μυοκαρδίου, έξι είναι οι κύριες κατηγορίες κυττάρων που φαίνονται ικανές να βελτιώσουν τη σύσταση του μυοκαρδίου (SKMS, BMNCs, MSCs, CSCs/CDCs, CD133⁺/CD34⁺, ESCs/iPSCs), καθώς και συνδυασμοί τους. Οι περισσότερες από αυτές το κατορθώνουν με μερική συγχώνευση στον καρδιομυικό ιστό του δέκτη είτε μέσω παρακρινούς φαινομένου κατά το οποίο ενεργοποιείται και ο ενδογενής βλαστικός καρδιομυικός πληθυσμός της καρδιάς, αλλά στα ESCs/ iPSCs και τα CSCs/CDCs έχουμε και διαφοροποίηση των μεταφερόμενων κυττάρων σε ώριμα καρδιομυοκύτταρα. Όλες οι κατηγορίες οδηγούν σε μείωση του εμφραγματικού, ινώδους ιστού και του κολλαγονικού περιεχομένου του με ταυτόχρονη δημιουργία νέου, λειτουργικού μυοκαρδιακού ιστού, και μέσω αγγειογένεσης σε αύξηση της τοπικής αιμάτωσης και παράλληλα την μετατροπή του ακινητικού ή υποκινητικού ιστού σε δυσκινητικό ή ακόμα και την αποκατάσταση της κινητικότητάς του. Η πάχυνση του εμπρόσθιου τοιχώματος της αριστερής κοιλίας αυξάνεται, η ελαστικότητα του μυοκαρδίου

αυξάνεται, όπως και η συστολική λειτουργία του και η υπετροφία που οδηγεί σε αύξηση του μεγέθους των κυττάρων αναστέλλεται. Στις περισσότερες περιπτώσεις οι δομικές αλλαγές αυτές μεταφράζονται σε λειτουργική βελτίωση (αύξηση του κλάσματος εξώθησης ή του μήκους της τελοδιαστολικής διαμέτρου στο τέλος της συστολής) είτε σε περιορισμό των διαστάσεων της αριστερής κοιλίας (τελοδιαστολικός όγκος, τελοσυστολικός όγκος) εκτός από την κατηγορία των CD133⁺/CD34⁺. Η απόπτωση αναστέλλεται, η καρδιοπροστασία είναι εφικτή και η ζωή των ασθενών ανακάμπτει ποιοτικά. Αυτό δυστυχώς δε σημαίνει ότι έχουμε τελειοποιήσει τις τεχνικές αυτές, ότι η προσπάθεια μέσω βλαστικών κυττάρων να αποκαταστήσουμε το μυοκάρδιο αποτελεί πανάκεια, ή ότι η κλινική πράξη έχει γίνει ρουτίνα. Μάλιστα όταν ξεκίνησαν οι μεταμοσχεύσεις των κυττάρων αυτών, ο ορίζοντας της εφαρμογής των βλαστικών κυττάρων στο καρδιακό περιβάλλον φάνταζε αρκετά πιο ρόδινος. Πολλές φορές στα αποτελέσματα των μελετών συμπεριλήφθηκε δημιουργία έκτοπων ιστών (αν και στο σύνολο η μεταφορά των κυττάρων είναι ασφαλής με τα κατάλληλα μέτρα), είτε αρνητικές επιδράσεις των κυττάρων μετά από κάποιο καιρό με διάφορες κλινικές μορφές όπως επανεμφάνιση του εμφράγματος, αρρυθμίες, κοιλιακές ταχυκαρδίες, προβλήματα στο αναπνευστικό ή το κυκλοφορικό σύστημα, ανάγκη επιστροφής στο νοσοκομείο ή ακόμα και θάνατος που πολλές φορές αποδώθηκαν στη μεταφορά των κυττάρων. Ένα από τις πιο αξιοσημείωτα και ενδιαφέροντα από αυτά τα προβλήματα, οι αρρυθμίες, σχετίστηκαν με την αύξηση του μεγέθους της καρδιάς και τη μείωση του καρδιακού ρυθμού και συναντήθηκαν κυρίως σε κυτταρικούς τύπους όπως οι SKMS και τα ESCs/iPSCs. Παράλληλα, κυρίως την τελευταία δεκαετία έγινε προσπάθεια μεταφοράς των κυττάρων ενσωματωμένα σε βιοϋλικά-ικριώματα όπως τα φύλλα κυττάρων, οι υδρογέλες, οι 2D κατασκευές ή ο επίπλους προκειμένου να αντιμετωπιστούν εγγενή προβλήματα της μεταφοράς κυττάρων όσο και των ίδιων των κυττάρων, όπως η αλληλεπίδραση με το περιβάλλον τους, το μηχανικό στρες που δέχονται, οι παράγοντες απόπτωσης και κυτταρικού θανάτου του περιβάλλοντος μεταφοράς τους, η αδυναμία ενσωμάτωσης και μακρόχρονης επιβίωσής τους, η ελλιπής αιμάτωση του μυοκαρδίου. Τα προβλήματα αυτά ήταν λογικό να προκύψουν δεδομένων των πρωτοποριακών ιδεών, της πληθώρας σηματοδοτικών μονοπατιών και μορίων που υφίστανται στον καρδιομυϊκό ιστό, και της μέχρι τώρα περιορισμένης τουλάχιστον κλινικής πράξης. Ο σκεπτικισμός και η εμπειριστατωμένη κριτική είναι ζητούμενα, ειδικά με τα ηθικά ζητήματα που έχουν διατυπωθεί για τον χειρισμό κυττάρων όπως τα ESCs, παρόλη την προσφορά τους στην κατάδειξη των μηχανισμών λειτουργίας του οργανισμού. Μελλοντικά, πολλά είναι τα ζητήματα που αναμένουν διερεύνηση ή τελειοποίηση στο πεδίο. Αρχικά ποιες είναι οι κατηγορίες κυττάρων από αυτές που θα μπορούσαν να συνδυαστούν για το καλύτερο συνεργιστικό αποτέλεσμα και ποιες είναι οι ανάλογες δοσολογίες που πρέπει να χρησιμοποιηθούν. Έπειτα, ποιος είναι ο βέλτιστος τρόπος μεταφοράς των κυττάρων στο καρδιομυϊκό περιβάλλον, ώστε να μην προκληθούν παραιτέρω τραυματισμοί στο μυοκάρδιο και να ενσωματωθούν-διαμοιραστούν τα κύτταρα, αλλά και ο χρόνος μετά το εμφραγματικό επεισόδιο για τη μεταμόσχευση (πολλαπλές μεταφορές σε βάθος χρόνου;). Εν συνεχεία, θα μπορούσαν ίσως τα μεταφερόμενα κύτταρα να συνδυαστούν με ήπια φαρμακευτικά σκευάσματα που θα τα βοηθήσουν στην ενσωμάτωση, την αλληλεπίδραση ή ίσως την παρατεταμένη επιβίωσή τους στο μυοκαρδιακό περιβάλλον. Αναγκαίως κρίνεται ο προσδιορισμός ενός παγκόσμιου μοντέλου με το κατάλληλο μυοκαρδιακό περιβάλλον που θα υποστηρίζει τις δοκιμές έτσι ώστε να μην υπάρχει πληθώρα αντιφατικών αποτελεσμάτων στο εξελικτικό φάσμα των ζωικών μοντέλων αλλά και ένα πιο αντικειμενικό στατιστικό εργαλείο που θα ανιχνεύει τις αλλαγές στο μυοκαρδιακό περιβάλλον και θα δίνει αξία στις βελτιωτικές επιδράσεις των μεταμοσχευθέντων κυττάρων. Στον αιώνα της βιοπληροφορικής έχει ξεκινήσει ήδη η κατάταξη και ο διαχωρισμός των υποψήφιων κυττάρων ανάλογα με τους μοριακούς δείκτες που φέρουν και οι οποίοι

αναμένεται να επηρεάσουν τη λειτουργική κατάσταση της καρδιάς του δέκτη, ενώ προσμετρώνται στις μεταμοσχεύσεις και οι παράγοντες επικινδυνότητας που αποδίδονται στα κύτταρα του δότη αλλά και στο δέκτη, όπως η ηλικία, το κάπνισμα και άλλοι. Τέλος τα νέα εργαλεία διαχείρισης της γενωμικής ταυτότητας όπως το CRISPR-Cas9, επιτρέπουν την καλύτερη αντιστοίχιση δότη δέκτη σε γενωμικό επίπεδο και δίνουν νέα δύναμη ειδικά στα κύτταρα αλλογενούς προελεύσεως, τα οποία συνεισφέρουν στην αποφευγή χρόνου, κόπου και επικινδυνότητας στις μεταμοσχεύσεις, προκειμένου να αποφευχθούν ανοσολογικές και φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

3. CONCLUSION

Looking back at the techniques concerning cell types that have been used for myocardial regeneration, six are the main categories of cells that appear to be able to improve the myocardial composition (SKMS, BMNCs, MSCs, CSCs/CDCs, CD133⁺/CD34⁺, ESCs/iPSCs), as well as their combination. Most of them achieve this by partial fusion into the myocardial tissue of the recipient or through paracrine effects in which the endogenous cardiac stem cell population of the heart is activate, but in ESCs / iPSCs and CSCs / CDCs we also have differentiation of transferred cells into mature cardiomyocytes. All categories lead to a reduction in infarcted tissue, fibrous tissue and its collagen content while creating new, functional myocardial tissue, and through angiogenesis to increase of local perfusion and at the same time the conversion of immobile or akinetic tissue into dyskinetic or even the restoration of its mobility. Thickening of the anterior wall of the left ventricle increases, the elasticity of the myocardium increases, as does its systolic function, and hypertrophy, leading to an increase in cell size, is inhibited. In most cases these structural changes translate into functional improvement (increase in ejection fraction or length of end-diastolic diameter at the end of contraction-fractional shortening) or reduction in left ventricular size (end-diastolic volume, end-systolic volume) other than CD133⁺/CD34⁺. Apoptosis is inhibited, cardioprotection is possible and patients' lives recover qualitatively. Unfortunately, this does not mean that we have perfected these techniques, that trying to regenerate myocardium with stem cells is a panacea at itself, or that clinical practice has become routine. In fact, when the transplants of these cells began, the expectations were much higher than the outcome proved out to be. Many times, the results of the studies included the creation of ectopic tissues (although in general the transport of cells is safe with appropriate measures), or adverse effects of cells after some time with various clinical forms such as recurrence of myocardial infarction, arrhythmias, ventricular tachycardia, respiratory or circulatory problems, need to return to hospital or even death often attributed to cell transport. One of the most notable and interesting of these problems, arrhythmias, have been associated with increased heart size and decreased heart rate and are found mainly in cell types such as SKMS and ESCs / iPSCs. At the same time, especially in the last decade, an attempt has been made to transfer cells embedded in biomaterials-scaffolds, such as cell sheets, hydrogels, 2D constructions or the omental flap in order to address inherent problems of cell transfer or the cells themselves, such as the interaction with their environment, mechanical stress, apoptosis and cell death factors of their transport environment, their inability to integrate with host tissues and their long-term survival, as well as insufficient myocardial perfusion. These problems were logical given the pioneering ideas, the multitude of signaling pathways and molecules that exist in the myocardial tissue, and the so far limited clinical practice. Skepticism and thorough criticism are in demand, especially with the ethical issues that have been raised about the handling of cells such as ESCs, despite their contribution to basic research and regenerative medicine. In

the future, there are many issues that await clarification or refinement in this field. First, what are the cell categories that could be combined for the best synergistic effect and what are the appropriate dosages to use. Next, which is the best way to transfer the cells to the myocardial environment, so as not to cause further injuries to the myocardium and to be integrated-divided, but also in what time after the infarct episode must the cells be transplanted (multiple transfers over time?). Then, the transferred cells could be combined with mild drugs to help them integrate, interact, or perhaps prolong their survival in the myocardial environment. It is necessary to identify a global model with the appropriate myocardial environment that will support the tests so that there is no multitude of contradictory results in the evolutionary range of animal models but also a more objective statistical tool that will detect changes in the myocardial environment and give value on the enhancing effects of transplanted cells. In the century of bioinformatics, the classification and differentiation of candidate cells according to the molecular markers they carry and which are expected to affect the functional state of the recipient's heart, has already begun, while during the transplants risk factors attributed to donor cells but also in the receiver, such as age, smoking and others are taken into consideration. Finally, new genomic identity management tools, such as CRISPR-Cas9, enable better donor-recipient matching at the genomic level and give new strength, especially to cells of allogeneic origin, which help to avoid time, effort and risk in transplants, in order to avoid immunological and inflammatory reactions.

4. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Sinnatamby, C., (2006). Last's anatomy: regional and applied. Last, Raymond J. (11th edition) Edinburgh: Elsevier/Churchill Livingstone.
2. Blaus B., Blausen.com staff (2014). "Medical gallery of Blausen Medical 2014". WikiJournal of Medicine 1 (2).
3. Stephens, A., Lowe, J. S., (1997). Human histology (2nd edition). London: Mosby.
4. Camm, A. J., Lüscher, T. F., Serruys, P. W., (2009) The ESC textbook of cardiovascular medicine. Serruys, P. W., European Society of Cardiology. (2nd edition). Oxford: Oxford University Press.

5. Bers, M., D. (2001). *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force* (2nd edition) Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
6. Moini J., (2011) *Anatomy and Physiology for Health Professionals*. Jones & Bartlett Publishers pp. 213- .
7. Horn, A. M., Trafford, W. A (2016). Aging and the cardiac collagen matrix: Novel mediators of fibrotic remodelling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 93: 175–185.
8. Shiel, W. C., (2011) *Medical Definition of Heart failure*. Medical Dictionary. MedicineNet.
9. McMurray, J. J., Pfeffer, M. A., (2005) Heart failure. *The Lancet*. 365: 1877–89.
10. Lippincott W., Lippincott W., (2012) *The Cardiac Care Unit Survival Guide*. p. 98.
11. Teerlink, J. R., Metra, M., (2017). Heart Failure. *The Lancet* 390: 1981–1995.
12. Roth, G. A. Johnson, J., Abajobir, A., (2017). Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases for 10 causes, 1990 to 2015. *Journal of the American College of Cardiology*. 70: 1–25.
13. Cohn, J. N., Ferrari, R., Sharpe, N. (2000) Cardiac remodeling — concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *Journal of the American College of Cardiology* 35: 569–582.
14. K Thygesen, JS Alpert, HD White, J., (2007). Universal definition of myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* 50: 2173–2195.
15. Sutton J., Sharpe N., (2000) Left ventricular remodeling after myocardial infarction pathophysiology and therapy. *American Heart Association* 101: 2981–2988.
16. Ke-Fu Z., Chaohui Y., Jinzhou Z., Ning-Fu W., (2015) National prevalence of coronary heart disease and its relationship with human development index: A systematic review. *European Journal of Preventive Cardiology* 23: 7.
17. Mehta, P. K., Wei, J., Wenger, N. K., (2015) Ischemic heart disease in women: a focus on risk factors. *Trends in Cardiovascular Medicine*. 25: 140–151.
18. Gaziano, A.T., Gaziano, J. M (2016) *Global Evolving Epidemiology, Natural History, and Treatment Trends of Myocardial Infarction*. David A. Morrow, *Myocardial Infarction: A Companion to Braunwald's Heart Disease*, Elsevier, pp. 11–21.
19. Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., Loscalzo, J., (2015). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, McGraw Hill Education. pp. 98–99.
20. Sodeman., W.A., Thomas C. (2005). “Heart Failure”. *Instructions for Geriatric Patients*, (3rd edition), Elsevier, pp. 202–203.
21. Rose, A. E., Gelijns, C. A, Moskowitz, J. A, Heitjan, D. F., Stevenson, W. L., Dembitsky, W., Long, W. J, Ascheim, D. D., Tierney, R. A., Levitan, G.R., Watson., T. J., Ronan, N., (2001). Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 345, 1435–1443.

22. Bristow, R. M, Saxon, A. L., Boehmer, J., Krueger, S., Kass, A. D, De Marco, T., Carson, P., DiCarlo, L., DeMets, D., White, G.B., DeVries, W.D., Feldman, M. A., (2004). Cardiac-resynchronization therapy with or without an implantable defibrillator in advanced chronic heart failure. *The New England Journal of Medicine*. 350: 2140–2150.
23. Yacoub, M. (2015). Cardiac donation after circulatory death: a time to reflect. *Lancet* 385, 2554–2556.
24. Sweis, R., (2020). Acute Myocardial Infarction (MI). MSD MANUAL Professional Version.
25. Colledge, R. N., Walker, R. B., Ralston, H. S., (2010). Davidson's principles and practice of medicine (21st edition), Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier, pp. 529–530.
26. Thygesen, K., Alpert, J. S, Jaffe, A. S., Simoons, M. L., Chaitman, B. R., White H. D., et al. (2012). Third universal definition of myocardial infarction. *126*: 2020–2035.
27. Poss, K. D., Wilson, L. G., Keating, M. T., (2002). Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298: 2188–2190.
28. Porrello, R. E., Olson, E. N., (2014) A neonatal blueprint for cardiac regeneration. *Stem Cell Research* 13: 556–570.
29. Porrello, R. E., Mahmoud I. A., Simpson E, Hill A. J., Richardson A. J., Olson N.E., Sadek A.H., (2011) Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart 331:1078-1080.
30. Haubner J. B., Schneider J., Schweigmann U., Schuetz T., Dichtl W., Velik-Salchner C., Stein J., Penninger M.J., (2016). Functional recovery of a human neonatal heart after severe myocardial infarction. *Circulation Research*. 118: 216–221.
31. Laflamme A. M., Murry, E. C., (2011) Heart regeneration. *Nature*. 473: 326–335.
32. Beltrami, P. A., Barlucchi L., Torella D., Baker M., Limana F., Chimenti S., Kasahara H., Rota M., Musso E., Urbanek K., Leri A., Kajstura J., Nadal-Ginard B., Anversa P., (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 114: 763–776.
33. Anversa P., Kajstura J., Leri A., P., (2006) Cardiac regeneration. *Journal of the American College of Cardiology*. 47: 1769–1776.
34. Rota M., Gonzalez A., Nurzynska D., Misao Y., Tillmanns J., Qjuaimi C., Padin-Iruegas E., Müller P., Esposito G., Bearzi C., Vitale S., Dawn B., Sanganalmath K.S., Baker M., Hintze H.T., Bolli R., Urbanek K., Hosoda T., Anversa P., Kajstura J., (2008) Activation of Cardiac Progenitor Cells Reverses the Failing Heart Senescent Phenotype and Prolongs Lifespan. *Circulation Research*. 102: 597–606.
35. Matsuura K., Honda A., Nagai T., Fukushima N., Iwanaga K., Tokunaga M., Shimizu T., Okano Y., Kasanuki H., Hagiwara N., Komuro I., (2009) Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 119: 2204–2217.
36. Marelli D., Desrosiers C., El-Alfy M., Kao L. R., Chiu C-J. R., (1992) Cell Transplantation for Myocardial Repair: An Experimental Approach. *Cell Transplantation*. 1: 383-390.

37. Behfar A., Perez-Terzic C., S. Faustino R., D. Arrell K., Hodgson M.D., Yamada S., Puceat M., Niederländer N., Alekseev E. A., Zingman V. L., Terzic A., (2007). Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *Rockefeller University Press*. 204: 405–420.
38. Atala A., Lanza R., (2012). *Handbook of Stem Cells*. Academic Press. p. 452
39. Jones M., (2006). Stem cells diagram.png. English Wikipedia.
40. Shenghui, H., Nakada, D., Morrison, J. S., (2009) Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental* 25: 377–406.
41. Cong, S. Y., Wright, E. W., Shay, W. J., (2002). Human telomerase and its regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 407–425.
42. Lopes, S. C., Leite, F. C., Almeida, R. T., da Silva, J. V., (2015) Multipotent stem cells of the heart—do they have therapeutic promise? *Frontiers in Physiology* 6:123.
43. Mitalipov, S., Wolf, D., (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Engineering of Stem Cells. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 114: 185–99.
44. Ulloa-Montoya, F., Verfaillie, M.C., Hu, S.W., (2005). Culture systems for pluripotent stem cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100: 12–27.
45. Schöler, R.H., (2007) *The Potential of Stem Cells: An Inventory*. Ashgate Publishing p. 28.
46. Koledova, Z, Krämer, A, Kafkova, L., Divoky, V., (November 2010). Cell-cycle regulation in embryonic stem cells: centrosomal decisions on self-renewal. *Stem Cells and Development* 19: 1663–1678.
47. Barta, T., Dolezalova, D., Holubcova, Z., Hampl, A. (2013). Cell cycle regulation in human embryonic stem cells: links to adaptation to cell culture. *Experimental Biology and Medicine* 238: 271–2755.
48. Zaveri, L., Dhawan, J., (2018). Cycling to Meet Fate: Connecting Pluripotency to the Cell Cycle. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6: 57.
49. Koledova, Z., Kafkova, R.L., Calabkova, L., Krystof, V., Dolezel, P., Divoky, V., (February 2010) Cdk2 inhibition prolongs G1 phase progression in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells and Development* 19: 181–94.
50. El-Badawy, A., El-Badri, N., (2016) The cell cycle as a brake for β -cell regeneration from embryonic stem cells. *Stem Cell Research & Therapy* 7: 9.
51. Moore, L. K., Persaud, N. V. T., Torchia G. A., (2013) *Before We Are Born: Essentials of Embryology and Birth Defects*.
52. Coughlin, P. R., Oldweiler, A., Mickelson, T. D., Moorman, T. C., (2017). Adipose-Derived Stem Cell Transplant Technique for Degenerative Joint Disease. *Arthroscopy Techniques* 6: 1761–1766.
53. Barrilleaux, B., Phinney, G. D., Prockop, J. D., O'Connor, C. K., (2006). Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue Engineering* 12: 3007–3019.

54. Ratajczak, Z. M., Machalinski, B., Wojakowski, W., Ratajczak, J., Kucia, M., (May 2007). A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4(+) stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia*. 21: 860–867.
55. Behfar, A., Crespo-Diaz, R., Terzic, A., Gersh, J.B., (2014) Cell therapy for cardiac repair — lessons from clinical trials. *Nature Reviews Cardiology* 11: 232–246.
56. Menasché, P., Alfieri, O, Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J., Marolleau, J., Seymour, B, Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G, Solomon, S., Desnos, M., Hagège, A. A., (2008) The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* 117: 1189–1200.
57. Meyer, P. G., Wollert, C. K., Lotz, J., Lichtenberg, R.S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Drexler, H., (2006) Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance STElevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 113: 1287–1294.
58. Hare, M.J , Fishman, E. J., Gerstenblith, G., Velazquez, D., Zambrano, P.J., Suncion, Y.V., Tracy, M., Ghersin, E., Johnston, P. V., Brinker, A. J., Breton, E., Davis-Sproul, J., Byrnes, J., George, R., Lardo, A., Schulman, H.I, Mendizabal, M. A., Lowery, H.M., Rouy, D., Altman, P., Foo, C., Ruiz, P., Amador, A., Da Silva, J., McNiece, K. I., Heldman, W. A., (2012) Comparison of allogeneic versus autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 308: 2369–2379.
59. Mummery, L. C., Zhang, J., Ng, S. E., Elliott, A. D., Elefanty G. A., and Kamp, J. T., (2012) Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes. *Circulation Research* 111: 344–358.
60. Menasche, P., (2007) Skeletal Myoblasts as a Therapeutic Agent. *Progress in Cardiovascular Diseases* 50: 7-17.
61. Haider, K. H., Tan, C. K. A., Aziz, S., Chachques, C. J., Sim, K. W. E., (2004) Myoblast Transplantation for Cardiac Repair: A Clinical Perspective. *Molecular Therapy* 9: 14-23.
62. Bischoff, R., (1975) Regeneration of single skeletal muscle fibers in vitro. *The Anatomical Record* 182: 215-235.
63. Marelli, D., Desrosiers, C., El-Alfy, M., Kao, R. L., Chiu, R. C. (1992) Cell transplantation for myocardial repair: an experimental approach. *Cell Transplantation* 1: 383–390.
64. Taylor A. D., Atkins B. Z., Hungspreugs P., Jones R. T., Reedy C. M., Hutcheson A. K., Glower D.D., Kraus E. W., (1998) Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature Medicine* 4: 929–933.
65. Al Attar, N., Carrion, C., Ghostine, S., Garcin, I., Vilquin, J., Hagège, A. A., Menasché, P., (2003) Long-term (1 year) functional and histological results of autologous skeletal muscle cells transplantation in rat. *Cardiovascular Research* 58: 142–148.

66. Durrani, S., Konoplyannikov, M., Ashraf, M., Haider, K. H. (2010) Skeletal myoblasts for cardiac repair. *Regenerative Medicine* 5: 919–932.
67. Povsic, J. T., O'Connor, M. C., Henry, T., Taussig, A., Kereiakes J. D., Fortuin, F. D. Niederman, A., Schatz, R., Spencer, R., Owens, D., Banks, M., Joseph, D., Roberts, R., Alexander, H. J., Sherman, W., (2011) A double-blind, randomized, controlled, multicenter study to assess the safety and cardiovascular effects of skeletal myoblast implantation by catheter delivery in patients with chronic heart failure after myocardial infarction. *American Heart Journal*. 162: 654–662.
68. Ye, L., Haider, K. H., Jiang, S., Ling, H. L., Ge, R., Law, K.P., Sim, K. W. E., (2005) Reversal of myocardial injury using genetically modulated human skeletal myoblasts in a rodent cryoinjured heart model. *European Journal of Heart Failure* 7: 945-952.
69. Hata, H., Matsumiya, G., Miyagawa, S., Kondoh, H., Kawaguchi, N., Matsuura, N., Shimizu, T., Okano, T., Matsuda, H., Sawa, Y., (2006) Grafted skeletal myoblast sheets attenuate myocardial remodeling in pacing-induced canine heart failure model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 4: 918-924.
70. Ye, L., Haider, K. H., Jiang, S., Ling, H. L., Ge, R., Law, K.P., Sim, K. W. E., (2007) Improved angiogenic response in pig heart following ischaemic injury using human skeletal myoblast simultaneously expressing VEGF165 and angiopoietin-1. *European Journal of Heart Failure* 9: 15-22.
71. Ghostine, S., Carrion, C., Souza, G. C. L., Richard, P., Bruneval, P., Vilquin, J., Pouzet, B., Schwartz, K., Menasché, P., Hagege, A. A., (2002) Long-Term Efficacy of Myoblast Transplantation on Regional Structure and Function After Myocardial Infarction. *Circulation* 106: 131-136.
72. Murry, E. C., Wiseman, W. R., Schwartz, S. M., Hauschka, D. S., (1996) Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis. *The Journal of Clinical Investigation* 98: 2512–2523.
73. Rubart M., Soonpaa H. M., Nakajima H., Field J. L., (2004) Spontaneous and evoked intracellular calcium transients in donor-derived myocytes following intracardiac myoblast transplantation. *The Journal of Clinical Investigation* 114: 775–783.
74. Reinecke, H., Minami E., Poppa V., Murry, E. C., (2004) Evidence for Fusion Between Cardiac and Skeletal Muscle Cells. *Circulation Research* 94: 56–60.
75. Reinecke, H., MacDonald H. G., Hauschka D. H., Murry, E. C., (2000) Electromechanical Coupling between Skeletal and Cardiac Muscle: Implications for Infarct Repair. *The Journal of Cell Biology* 149: 731–740.
76. Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, E. J., Allen, E. R., (2002) Release of Hepatocyte Growth Factor from Mechanically Stretched Skeletal Muscle Satellite Cells and Role of pH and Nitric Oxide. *Molecular Biology of the Cell* 13: 2559-2976.
77. Peterson, M. J., Pizza, X. F., (2009) Cytokines derived from cultured skeletal muscle cells after mechanical strain promote neutrophil chemotaxis in vitro. *Journal of Applied Physiology* 106: 130-137.
78. Pouzet, B., Vilquin, J., Menasché, P., Hagege, A. A., Scorsin, M., Messas, E., Fiszman, M., Schwartz, K., (2001) Factors affecting functional outcome after autologous skeletal myoblast transplantation. *The Annals of Thoracic Surgery* 71: 844-851.

79. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S., Epstein, S. E., (2004) Marrow-Derived Stromal Cells Express Genes Encoding a Broad Spectrum of Arteriogenic Cytokines and Promote In Vitro and In Vivo Arteriogenesis Through Paracrine Mechanisms. *Circulation Research* 94: 678–685.
80. Taylor, A. D., Atkins, B. Z., Hungspreugs, P., Jones, R. T., Reedy, C. M., Hutcheson, A. K., Glower, D. D., Kraus, E. W., (1998) Regenerating functional myocardium: Improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nature Medicine* 4: 929–933.
81. Miyagawa, S., Domae K., Yoshikawa, Y., Fukushima, S., Nakamura, T., Saito, A., Sakata, Y., Hamada, S., Toda, K., Pak, K., Takeuchi, M., Sawa, Y., (2017) Phase I Clinical Trial of Autologous Stem Cell–Sheet Transplantation Therapy for Treating Cardiomyopathy. *Journal of the American Heart Association* 6.
82. Sanganalath, S. K., Bolli, R., (2013) Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circulation Research* 113: 810–834.
83. Menasché, P., (2018). Cell therapy trials for heart regeneration — lessons learned and future directions. *Nature Reviews Cardiology* 15: 659–671.
84. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, M. S., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, M. D., Leri, A., Anversa, P., (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701–705.
85. Rubart, M., Murry, E. C., Reinecke, H., Soonpaa H. M., Nakajima, H., Nakajima, O. H., Pasumarthi, B. S. K., Virag, I. J., Bartelmez, H. S., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, D. J., Williams, A. D., Field, J. L., (2004) Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428: 64–668.
86. Loffredo, S. F., Steinhauser, L. M., Gannon, J., Gannon, T. R., (2011) Bone Marrow-Derived Cell Therapy Stimulates Endogenous Cardiomyocyte Progenitors and Promotes Cardiac Repair. *Cell Stem Cell* 8: 389-398.
87. Mathieu, M., Bartunek, J., El Oumeiri, B., Touhri, K., Hadad, I., Thoma, P., Metens, T., Mendes da Costa, A., Mahmoudabady, M., Egrise, D., Blocklet, D., Mazouz, N., Naeije, R., Heyndrickx, G., McEntee, K., (2009) Cell therapy with autologous bone marrow mononuclear stem cells is associated with superior cardiac recovery compared with use of nonmodified mesenchymal stem cells in a canine model of chronic myocardial infarction. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 138: 646-653.
88. Chen, C., Chang, M., Wang, S., Hsieh, C. H. P., (2014) Injection of autologous bone marrow cells in hyaluronan hydrogel improves cardiac performance after infarction in pigs. *Heart and Circulatory Physiology* 306: 1078-1086.
89. Qian, H., Ji Y. Y., Gao, R. H., Dou, K., Yang, G., Li, J., Shen, R., He, Z., Lu, M., Zhao, S., (2007) Intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells radiolabeled by ¹⁸F-fluoro-deoxy-glucose: Tissue distribution and impact on post-infarct swine hearts. *Journal of Cellular Biochemistry* 102: 64-74.
90. Tao, B., Cui, M., Wang, C., Ma, S., Wu, F., Yi, F., Qin, X., Liu, J, Wang, H., Wang, Z., Ma, X., Tian, J., Chen, Y, Wang, J, Cao, F., (2015) Percutaneous Intramyocardial Delivery of Mesenchymal Stem Cells

Induces Superior Improvement in Regional Left Ventricular Function Compared with Bone Marrow Mononuclear Cells in Porcine Myocardial Infarcted Heart. *Theranostics* 5: 196–205.

91. Hendrikx, M., Hensen, K., Clijsters, C., Jongen H., Koninckx R., Bijmens, E., Ingels, M., Jacobs A., Geukens, R., Dendale, P., Vijgen, R., Dilling, D., Steels P., Mees U., Rummens, J., (2006) Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial. *Circulation* 114, 1101–107.

92. Pätilä, T., Lehtinen, M., Vento, A., Schildt, J., Sinisalo, J., Laine, M., Hämmäinen, P., Nihtinen, A., Alitalo, R., Nikkinen, P., Ahonen, A., Holmström, M., Lauerma, K., Pöyhiä, R., Kupari M., Kankuri, E., Harjula, A., (2014) Autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in ischemic heart failure: A prospective, controlled, randomized, double-blind study of cell transplantation combined with coronary bypass. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 6: 567-574.

93. Wollert, K., Meyer, G., Lotz, J., Lichtenberg, R. S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., Arseniev, L., Hertenstein, B., Ganser, A., Drexler, H., (2004) Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *The Lancet* 364: 141-148.

94. Schächinger, V., Erbs, S., Elsässer, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Hölschermann, H., Yu, J., Corti, R., Mathey, G. D., Hamm, W. C., Süselbeck, T., M.D., Assmus, B., Tonn, T., Dimmeler, S., Zeiher, M. A., (2006) Intracoronary Bone Marrow–Derived Progenitor Cells in Acute Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine* 355:1210-1221.

95. Heldman, W. A., DiFede, L. D., Fishman, E. J., Zambrano, P. J., Trachtenberg, H. B., Karantalis, V., Mushtaq, M., Williams, R. A., Suncion, Y. V., McNiece, K. I., Gherin, E., Soto, V., Lopera, G., Miki, R., Willens, H., Hendel, R., Mitrani, R., Pattany, P., Feigenbaum, G., Oskouei, B., Byrnes, J., Lowery, H. M., Sierra, J., Pujol, V. M., Delgado, C., Gonzalez, J. P., Rodriguez, E. J., Bagnó, L. L., Rouy, D., Altman, P., Foo, C., da Silva, J., Anderson, E., Schwarz, R., Mendizabal, A., Hare, M. J., (2014) Transendocardial Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Bone Marrow Cells for Ischemic Cardiomyopathy: The TAC-HFT Randomized Trial. *JAMA* 311: 62-73.

96. Sürder, D., Manka, R., Moccetti, T., Lo Cicero, V., Emmert, Y. M., Klersy, C., Soncin, S., Turchetto, L., Radrizzani, M., Zuber, M., Windecker, S., Moschovitis, A., Bühler, I., Kozerke, S., Erne, P., Lüscher, F. T., Corti, R., (2016) Effect of Bone Marrow–Derived Mononuclear Cell Treatment, Early or Late After Acute Myocardial Infarction. *Circulation Research* 119::481-490.

97. Perin, C. E., Willerson, T. J., Pepine, J. C., Henry, T. D., Ellis, G. S., Zhao, M. X. D., Silva, V. G., Lai D., Thomas, D. J., Kronenberg, W. M., Martin, A. D., Anderson, D. R., Traverse, H. J., Penn, S. M., Anwaruddin, S., Hatzopoulos, K. A., Gee, P. A., Taylor, A. D., Cogle, R. C., Smith, D., Westbrook, L., Chen, J., Handberg, E., Olson, R. E., RN, Geither, C., Bowman, S., Francescon, J., Baraniuk, S., Piller, B. L., Simpson, M.L., Loghin, C., Aguilar, D., Richman, S., Zierold, C., Bettencourt, J., Sayre, L. C., Vojvodic, W. R., Skarlatos, I. S., Gordon, J. D., Ebert, F. R., Kwak, M., Moyé, A. L., Simari, D. R., (2012) Effect of transendocardial delivery of autologous bone marrow mononuclear cells on functional capacity, left ventricular function, and perfusion in chronic heart failure: the FOCUS-CCTRN trial. *JAMA* 307: 1717–1726.

98. Taylor, A. D., Perin, C. E., Willerson T. J., Zierold C., Resende, M., Carlson, M., Nestor, B., Wise, Aaron Orozco, E., Pepine, J. C., Henry, D. T., Ellis, G. S., Zhao, M. X. D., Traverse, H. J., Cooke, P. J., Schutt, C. R., Bhatnagar, A., C. R., Grant, B. M., Lai, D., Johnstone, H. B., Sayre, L. C., Moyé, L., Ebert, F. R., Bolli, R., Simari, R., (2016) Identification of bone marrow cell subpopulations associated with improved functional outcomes in patients with chronic left ventricular dysfunction: an embedded cohort evaluation of the FOCUS-CCTRN trial. *Cell Transplantation* 25: 1675–1687.
99. Contreras, A., Bolli, R., Traverse, H. J., Perin, C. E., Yang, C. P., Pepine, J. C., Taylor, A. D., Willerson, T. J., Moyé, L., Cooke, P. J., Cohen, L. M., Lai, D., Henry, D. T., Schutt, C. R., Resende, M., Orozco, F. A., (2017) Identification of cardiovascular risk factors associated with bone marrow cell subsets in patients with STEMI: a biorepository evaluation from the CCTRN TIME and LateTIME clinical trials. *Basic Research in Cardiology* 112: 3.
100. Raval, N A., Johnston, V. P., Duckers, J. H., Cook, D. T., Traverse, H. J., Altman, A. P., Dhingra, R., Hematti, P., Borrello, I., Anderson, D., Pepine, J. C., (2020) Point of care, bone marrow mononuclear cell therapy in ischemic heart failure patients personalized for cell potency: 12-month feasibility results from CardiAMP heart failure roll-in cohort. *International Journal of Cardiology*.
101. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Prockop, D., Horwitz, E., (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.
102. Pittenger, F. M., Mackay, M. A., Beck, C. S., Jaiswal, K. R., Douglas, R., Mosca, D. J., Moorman, A. M., Simonetti, W. D., Craig, S., Marshak, R. D., (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147.
103. Tomita, S., Li, R., Weisel, D. R., Mickle, A. G. D., Kim, E., Sakai, T., Jia, Z., (1999) Autologous Transplantation of Bone Marrow Cells Improves Damaged Heart Function. *Circulation* 100: 247–256.
104. XiaoHong, Y., XiYong, Y., QiuXiong, L., ChunYu, D., ZhiXin, S., Min, Y., ShuGuang, L., (2007) Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac microenvironment. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 42: 295-303.
105. Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V., (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *nature reviews immunology* 8: 726–736.
106. Ikhapoh, I. A., Pelham, J. C., Agrawal, K. D., (2015) Atherogenic Cytokines Regulate VEGF-A-Induced Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Endothelial Cells. *Stem cells international* 2015: 498328.
107. Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M., Werner, C., (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells Journal* 22: 377-384.
108. Majumdar, M.K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R., Mosca, J.D., (2003) Characterization and Functionality of Cell Surface Molecules on Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biomedical Science* 10: 228–241.

109. Le Blanc, K., Ringdén, O., (2006) Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Current Opinion in Immunology* 18: 586-591.
110. Raffaghello, L., Ph.D. Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello L., Pistoia, V., (2009) Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis: A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *Stem Cells Journal* 26: 151-162.
111. Lambert, J. M., Lopez, E. F., Lindsey, M. L., (2008) Macrophage roles following myocardial infarction. *International Journal of Cardiology* 130: 147–158.
112. Gneccchi, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O. D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L. G., Pratt, R. E., Ingwall, J. S., Dzau, V. J., (2006) Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB Journal* 20: 661–669.
113. Golpanian, S., Wolf, A., Hatzistergos, E. K., Hare, M. J., (2016) Rebuilding the Damaged Heart: Mesenchymal Stem Cells, Cell-Based Therapy, and Engineered Heart Tissue. *Physiological Reviews* 96: 1127-1168.
114. Davani, S., Marandin, A., Mersin, N., Royer, B., Kantelip, B., Herve, P., Etievent, J. P., Kantelip, J.P., (2003) Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model. *Circulation* 108: 253–258.
115. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., Kessler, P. D., (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105: 93–98.
116. Mangi, A.A., Noiseux, N., Kong, D., He, H., Rezvani, M., Ingwall, J. S., Dzau, V. J., (2003) Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nature Medicine* 9: 1195–1201.
117. Hashemi, S. M., Ghods, S., Kolodgie, F. D., Parcham-Azad, K., Keane, M., Hamamdzcic, D., Young, R., Rippey, M. K., Virmani, R., Litt, H., Wilensky, R. L., (2008) A placebo controlled, dose-ranging, safety study of allogenic mesenchymal stem cells injected by endomyocardial delivery after an acute myocardial infarction. *European Heart Journal* 29: 251–259.
118. Hatzistergos, K. E., Quevedo, H., Oskouei, B. N., Hu, Q., Feigenbaum, G. S., Margitich, I. S., Mazhari, R., Boyle, A. J., Zambrano, J. P., Rodriguez, J. E., Dulce, R., Pattany, P. M., Valdes, D., Revilla, C., Heldman, A. W., McNiece, I., Hare, J. M., (2010) Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circulation Research* 107: 913–922.
119. Quevedo, H., Hatzistergos, K. E., Oskouei, B. N., Feigenbaum, G. S., Rodriguez, J. E., David Valdes, Pattany, M. P., Zambrano, J. P., Hu, Q., McNiece, I., Heldman, A. W., Hare, J. M., (2009) Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 14022-14027.
120. Dixon, J. A., Gorman, R. C., Stroud, R. E., Bouges, S., Hirotsugu, H., Gorman, J. H., Martens, T. P., Itescu, S., Schuster, M. D., Plappert, T., St John-Sutton, M. G., Spinale, F. G., (2009) Mesenchymal cell transplantation and myocardial remodeling after myocardial infarction. *Circulation* 120: 220–229.

121. Hamamoto, H., Gorman, J. H., Ryan, L. P., Hinmon, R., Martens, T. P., Schuster, M. D., Plappert, T., Kiupel, M., St John-Sutton, M. G., Itescu S, Gorman, R. C., (2009) Allogeneic mesenchymal precursor cell therapy to limit remodeling after myocardial infarction: the effect of cell dosage. *Annual Thoracic Surgery* 87: 794–801.
122. Silva, V. G., Litovsky, S., Assad, A. R. J, Sousa, L. S. B, Martin, J. B., Vela, D., Coulter, C. S., Lin, J., Ober, J., Vaughn, K. W., Branco, V. C. R., Oliveira, M. E., He, R., Geng, Y., Willerson, T. J., Perin, C. E., (2005) Mesenchymal Stem Cells Differentiate into an Endothelial Phenotype, Enhance Vascular Density, and Improve Heart Function in a Canine Chronic Ischemia Model. *Circulation* 111: 150–156.
123. Perin, C. E., Silva, V. G., Assad, A. J., Vela D., Buja M. L., Sousa, L. A., Litovsky, S., Lin J., Vaughn, K. W., Coulter, S., Fernandes, R. M., Willerson, T. J., (2008) Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44: 486–495.
124. Hare, M. J., Traverse, M. J., Henry, D. B., Dib N., Strumpf, K. R., Schulman, P. S., Gerstenblith G., DeMaria, N. A., Denktas, E. A., Gammon, S. R., Hermille, B. J., Reisman, A. M., Schaer, GL, Sherman W., (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of American College Cardiology* 54: 2277–2286.
125. Hare, J. M, Fishman, J. E, Gerstenblith, G., DiFede, Velazquez D. L, Zambrano J. P., Suncion, V. Y., Tracy, M., Ghersin, E., Johnston, P. V., Brinker, J. A., Breton, E., Davis-Sproul, J., Schulman, I. H., Byrnes, J., Mendizabal, A. M., Lowery, M. H., Rouy, D., Altman, P., Wong, C., Ruiz, P., Amador, A., Da Silva, J., McNiece, I. K., Heldman, A. W., George, R., Lardo, A., (2012) Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA* 308: 2369–2379.
126. Karantalis, V., DiFede, D. L., Gerstenblith, G., Pham, S., Symes, J., Zambrano, J. .P, Fishman, J., Pattany, P., McNiece, I., Conte, J., Schulman, S., Wu, K., Shah, A., Breton, E., Davis-Sproul, J., Schwarz, R., Feigenbaum, G., Mushtaq, M., Suncion, V. Y., Lardo, A. C., Borrello, I., Mendizabal, A., Karas, T. Z., Byrnes, J., Lowery, M., Heldman, A. W., Hare, J. M., (2014) Autologous mesenchymal stem cells produce concordant improvements in regional function, tissue perfusion, and fibrotic burden when administered to patients undergoing coronary artery bypass grafting: The Prospective Randomized Study of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Patients Undergoing Cardiac Surgery (PROMETHEUS) trial. *Circulatory Research* 114: 1302–1310.
127. Mathiasen, A. B., Qayyum, A. A., Jørgensen, E., Helqvist, S., Nielsen, A., Kofoed, F. K., Haack-Sørensen, M., Ekblond, A., Kastrupal, J., (2015) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment in patients with severe ischaemic heart failure: a randomized placebo-controlled trial (MSC-HF trial). *European Heart Journal* 36: 1744–1753.
128. Guijarro, J., Lebrin, M., Lairez, O., Bourin, P., Piriou, N., Pozzo, J., Lande, L., Berry, M., Le Tourneau, T., Cussac, T., Sensebe, L., Gross, F., Lamirault, G., Huynh, A., Manrique, A., Ruidavet, J. B., Elbaz, M., Trochu, J. N., Roncalli, J., (2016) Intramyocardial transplantation of mesenchymal stromal cells for chronic myocardial ischemia and impaired left ventricular function: Results of the MESAMI 1 pilot trial. *International Journal of Cardiology* 209: 258-265.

129. Beltrami, P. A., Urbanek, K., Kajstura, J., Yan, S., Finato, N., Bussani, R., Nadal-Ginard, B., M.D., Silvestri, F., Leri, A., Anversa, P., Beltrami, C. A., (2001) Evidence That Human Cardiac Myocytes Divide after Myocardial Infarction. *The New England Journal of Medicine* 344: 1750-1757.
130. Quaini F., M.D., Urbanek, K., Beltrami, P. A., Finato, N., M.D., Beltrami, C. A., M.D., Nadal-Ginard, B., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., (2002) Chimerism of the Transplanted Heart. *The New England Journal of Medicine* 346: 5-15.
131. Wu, S. M, Chien, K. R, Mummery, C., (2008) Origins and fates of cardiovascular progenitor cells. *Cell* 132: 537-543.
132. Messina, E., De Angelis, L., Frati, F., Morrone, S., Chimenti, C., Fiordaliso, F., Salio, M., Battaglia, M., Latronico, V. G. M., Coletta, M., Vivarelli, E., Cossu, G., Giacomello, A., (2004) Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells from Human and Murine Heart. *Circulation Research* 95 :911–921.
133. Oh, H., Bradfute, B. S., Gallardo, D. T., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, H. L., Behringer, R. R., Garry, J. D., Entman, L. M., Schneider, D. M., (2003) Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 12313-12318.
134. Mishra, R., Vijayan, K., Colletti, J. E., Harrington, A. D., Matthiesen, S. T., Simpson, D., Goh, S. K., Walker, L. B., Almeida-Porada, G., Wang, D., Backer, L. C., Dudley Jr, C. S., Wold, E. L., Kaushal. S., (2011) Characterization and Functionality of Cardiac Progenitor Cells in Congenital Heart Patients. *Circulation* 123: 364–373.
135. Kunisada, T., Lu, S., Yoshida, H., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Mizoguchi, M., Hayashi, S., Tyrrell, L., Williams, A. D., Wang, X., Longley, B. J., (1998) Murine Cutaneous Mastocytosis and Epidermal Melanocytosis Induced by Keratinocyte Expression of Transgenic Stem Cell Factor. *Journal of Experimental Medicine* 187: 1565–1573.
136. Frangogiannis, G. N., Perrard, L. J., Mendoza, H. L, Burns, B. A., Lindsey, L. M., Ballantyne, M. C., Michael, H. L., Smith, C. W., Entman, L. M., (1998) Stem Cell Factor Induction Is Associated with Mast Cell Accumulation After Canine Myocardial Ischemia and Reperfusion. *Circulation* 98: 687–698.
137. Kawaguchi, N., Smith, J. A., Waring, D. C., Hasan, K., Miyamoto, S., Matsuoka, R., Ellison, M. J., (2010) C-kit^{pos} GATA-4 High Rat Cardiac Stem Cells Foster Adult Cardiomyocyte Survival through IGF-1 Paracrine Signalling. *PLoS one* 5, e14297.
138. Ellison, M. G., Vicinanza, C., Smith, J. A., Aquila, I., Leone, A., Waring, D. C., Henning, J. B., Stirparo, G. G., Papait, R., Scarfò, M., Agosti, V., Viglietto, G., Condorelli, C., Indolfi, C., Ottolenghi, S., Torella, D., Nadal-Ginard, B., (2013) Adult c-kit^{pos} Cardiac Stem Cells Are Necessary and Sufficient for Functional Cardiac Regeneration and Repair. *Cell* 154: 827-842.
139. Hong, U. K., Guo, Y., Li, Q., Cao, P., Al-Maqtari, Vajravelu, N. B., Du, J., Book, J. M., Zhu, X., Nong, Y., Bhatnagar, A., Bolli, R., c-kit⁺ (2014) Cardiac Stem Cells Alleviate Post-Myocardial Infarction Left Ventricular Dysfunction Despite Poor Engraftment and Negligible Retention in the Recipient Heart. *PLoS one* 9: e96725.

140. Huang, C., Gu, H., Yu, Q., Manukyan, M. C., Poynter, J. A., Wang, M., (2011) Sca-1+ cardiac stem cells mediate acute cardioprotection via paracrine factor SDF-1 following myocardial ischemia/reperfusion. *PLOS One* 6: e29246.
141. Tang, X. L., Li, Q., Rokosh, G., Sanganalmath, S., Chen, N., Ou, Q., Stowers, H., Hunt, G., Bolli, R., (2016) Long-term outcome of administration of c-kit^{POS} cardiac progenitor cells after acute myocardial infarction: transplanted cells do not become cardiomyocytes, but structural and functional improvement and proliferation of endogenous cells persist for at least one year. *Circulation Research* 118: 1091–1095.
142. Chimenti, I., Smith, R. R., Li, T. S., Gerstenblith, G., Messina, E., Giacomello, A., Marbán, E., (2010) Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circulation Research* 106: 971-980.
143. Urbanek, K., Rota, M., Cascapera, S., Bearzi, C., Nascimbene, A., De Angelis, A., Hosoda, T., Chimenti, S., Baker, M., Limana, F., Nurzynska, D., Torella, D., Rotatori, F., Rastaldo, R., Musso, E., Quaini, F., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., (2005) Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circulation Research* 97: 663-673.
144. Johnston, P. V., Sasano, T., Mills, K., Evers, R., Lee, S. T., Smith, R. R., Lardo, A. C., Lai, S., Steenbergen, C., Gerstenblith, G., Lange, R., Marban, E., (2009) Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 2009 120: 1075–1083.
145. Bolli, R., Tang, X. L., Sanganalmath, S. K., Rimoldi, O., Mosna, F., Abdel-Latif, A., Jneid, H., Rota, M., Leri, A., Kajstura, J., (2013) Intracoronary delivery of autologous cardiac stem cells improves cardiac function in a porcine model of chronic ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 128: 122–131.
146. Torella, D., Urbanek, K., Sheikh, F., De Angelis, A., Nurzynska, D., Silvestri, F., Beltrami, P. A., Beltrami, C. A., Bussani, R., Quaini F., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., Bolli, R., (2005) Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8692-8697.
147. Bolli, R., Chugh, A. R., D'Amario, D., Loughran, J. H., Stoddard, F. M., Ikram, S., Beache, M. J., Wagner, G. S., Leri, A., Kajstura, J., Anversa, P., Hosoda, T., Sanada, F., Elmore, J. B., Goichberg, P., Slaughter, S. M., (2011) *Lancet* 378: 1847-1857.
148. Fernández-Avilés, F., Sanz-Ruiz, R., Plasencia, J., Gilaberte, I., Belmans, A., Santos, M., Charron, D., Mulet, M., Yotti, R., Palacios, I., Luque, M., Sádaba, R., J. San Román, A., Larman, M., L. Sánchez, P., Sanchís, J., Jiménez, M., Claus, P., Al-Daccak, R., Lombardo, E., Abad, J., DelaRosa, O., Corcóstegui, L., Bermejo, J., Janssens, S., (2018) Safety and Efficacy of Intracoronary Infusion of Allogeneic Human Cardiac Stem Cells in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction and Left Ventricular Dysfunction. *Circulation Research* 123: 579–589.
149. Makkar, R. R. Smith, S., Cheng, K., Malliaras, K., Thomson, L., Berman, D., Czer, L., Marbán, L., Mendizabal, A., Johnston, P. V., Russell, S., Schuleri, K., Lardo, A., Gerstenblith, G., Marbán, E., (2012) Intracoronary cardiosphere derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *Lancet* 379: 895–904.

150. Makkar, R., Kereiakes, J. D., Aguirre, F., Kowalchuk, G., Chakravarty, T., Malliaras, K., Francis, G. S., Povsic, J. T., Schatz, R., Traverse, J. H., Pogoda, M. J., Smith, R. R., Marbán, L., Ascheim, D. D., Ostovaneh, M. R., Lima, J., DeMaria, A., Marbán, E., Henry, D. T., (2017) Intracoronary ALLogeneic heart STem cells to Achieve myocardial Regeneration (ALLSTAR): a randomized, placebo-controlled, double-blinded trial. *European Heart Journal* 41: 3451–3458.
151. Williams, A. R., Hatzistergos, K. E., Addicott, B., McCall, F., Carvalho, D., Suncion, V., Morales, A. R., Da Silva, J., Sussman, M. A., Heldman, A. W., Hare, A. J. (2013) 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* 127: 213–223.
152. Karantalis, V., Suncion-Loescher, V. Y., Bagno, L., Golpanian, S., Wolf, A., Sanina, C., Premer, C., Kanelidis, J. A., McCall, F., Wang, B., Balkan, W., Rodriguez, J., Rosado, M., Morales, A., Hatzistergos, K., Natsumeda, M., Margitich, I., Hernandez Schulman, I., Gomes, A. S., Mushtaq, M., DiFede, L. D., Fishman, E. J., Pattany, P., Zambrano, J. P., Heldman, A. W., Hare, J. M., (2015) Synergistic effects of combined cell therapy for chronic ischemic cardiomyopathy. *Journal of American College Cardiology* 66: 1990–1999.
153. Quirici, N., Soligo, D., Caneva, L., Servida, F., Bossolasco, P., Deliliers, G. L., (2001) Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133+ cells. *British Journal of Haematology* 115: 186-194.
154. Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H., Petzsch, M., Kittner, K., Klinge, H., Schümichen, C., Nienaber, C. A., Freund, M., Steinhoff, G., (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361: 45-46.
155. Bartunek, J., Vanderheyden, M., Vandekerckhove, B., Mansour, S., De Bruyne, B., De Bondt, P., Van Haute, I., Lootens, N., Heyndrickx, G., Wijns, W., (2005) Intracoronary Injection of CD133-Positive Enriched Bone Marrow Progenitor Cells Promotes Cardiac Recovery After Recent Myocardial Infarction. *Circulation* 112: 178–183.
156. Stamm, C., Kleine, H., Choi, Y., Dunkelmann, S., Lauffs, A., Lorenzen, B., David, A., Liebold, A., Nienaber, C., Zurakowski, D., Freund, M., Steinhoff, G., (2007) Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 133: 717–725.
157. Nasser, B. A., Ebell, W., Dandel, M., Kukucka, M., Gebker, R., Doltra, A., Knosalla, C., Choi, Y., Stamm, C., Hetzer, R., (2014) Autologous CD133+ bone marrow cells and bypass grafting for regeneration of ischaemic myocardium: the Cardio133 trial. *European Heart Journal* 35: 1263–1274.
158. Noiseux, N., Mansour, S., Weisel, R., Stevens, L., Sarkissian, S., Tsang, K., Crean, A., Larose, E., Li, S., Wintersperger, B., Vu, M. Q., Prieto, I., Li, R., Roy, C. D., Yau, M. T., (2016) The IMPACT-CABG trial: A multicenter, randomized clinical trial of CD133+ stem cell therapy during coronary artery bypass grafting for ischemic cardiomyopathy. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 152: 1582-1588.
159. Steinhoff, G., Nesteruk, J., Wolfien, M., Kundt, K., The PERFECT Trial Investigators Group: Börgermann, J., David, R., Garbade, J., Große, J., Haverich, A., Hennig, H., Kaminski, A., Lotz, J., Mohr, F., Müller, P., Oostendorp, R., Ruch, U., Sarikouch, S., Wolkenhauer, O., (2017) Cardiac Function

Improvement and Bone Marrow Response —: Outcome Analysis of the Randomized PERFECT Phase III Clinical Trial of Intramyocardial CD133+ Application After Myocardial Infarction. *EBioMedicine* 22: 208-224.

160. Quyyumi, A. A., Vasquez, A., Kereiakes, J. D., Klapholz, M., Schaer, L. G., Abdel-Latif, A., Frohwein, S., Henry, D. T., Schatz, R. A., Dib, N., Toma, C., Davidson, J. C., Barsness, W. J., Shavelle, D. M., Cohen, M., Poole, J., Moss, T., Hyde, P., Kanakaraj, A. M., Druker, V., Chung, A., Junge, C., Preti, R. A., Smith, R. L., Mazzo, D. J., Pecora, A., Losordo, W.D., 2017 A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial of Intracoronary Administration of Autologous CD34+ Cells in Patients With Left Ventricular Dysfunction Post STEMI. *Circulation Research* 120: 324–331.

161. Murry, C. E., Keller, G. (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132: 661–680.

162. Park, I., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, W. M., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, Q. G., (2008) Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 134: 877-886.

163. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861–872.

164. Yu, J., Vodyanik, A. M., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, A. G., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., Thomson, A. G., (2007) Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* 318: 1917-1920.

165. Mummery, L. C., Zhang, J., Ng, S. E., Elliott, A. D., Elefanty, G. A., Kamp, J. T., (2012) Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells to Cardiomyocytes. *Circulation Research* 111: 344–358.

166. Park, I., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, H. P., Lensch, M. J., Daley, Q. G., (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451: 141–146.

167. Takahashi, K., Yamanaka, S., (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126: 663-676.

167. Maherali, N., Hochedlinger, K., (2009) Tgf β signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Current Biology* 19: 1718-1723.

168. Ema, M., Takahashi, S., and Rossant, J. (2006). Deletion of the selection cassette, but not cis-acting elements, in targeted Flk1-lacZ allele reveals Flk1 expression in multipotent mesodermal progenitors. *Blood* 107 111–117.

169. Naito, A. T., Shiojima, I., Akazawa, H., Hidaka, K., Morisaki, T., Kikuchi, A., and Komuro, I., (2006) Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 19812–19817.

170. McDevitt, T. C., Laflamme, M. A., Murry, C. E. (2005). Proliferation of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells is mediated via the IGF/PI 3-kinase/Akt signaling pathway. *Journal of Molecular Cellular Cardiology* 39: 865–873.

171. Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., Kemler, R., (1985). The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 87: 27–45.
172. Graichen, R., Xu, X., Braam, S.R., Balakrishnan, T., Norfiza, S., Sieh, S., Soo, S. Y., Tham, S. C., Mummery, C., Colman, A., et al. (2008). Enhanced cardiomyogenesis of human embryonic stem cells by a small molecular inhibitor of p38 MAPK. *Differentiation* 76: 357-370.
173. Kehat, I., Khimovich, L., Caspi, O., Gepstein, A., Shofti, R., Arbel, G., Huber, I., Satin, J., Itskovitz-Eldor, J., Gepstein, L., (2004). Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 22: 1282–1289.
174. Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., et al. (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature Biotechnology* 25: 1015–1024.
175. Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., and Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 6907–6912.
176. Qiao, H., Zhang, H., Yamanaka, S., Patel, V. V., Petrenko, N. B., Huang, B., Muenz, L. R., Ferrari, V. F., Boheler, R. K., Zhou, R., (2011) Long-Term Improvement in Postinfarct Left Ventricular Global and Regional Contractile Function Is Mediated by Embryonic Stem Cell–Derived Cardiomyocytes. *Circulation: Cardiovascular Imaging* 4: 33–41.
177. Ebert, S. N., Taylor, D. G., Nguyen, H. L., Kodack, D. P., Beyers, R. J., Xu, Y., Yang, Z., and French, B. A. (2007). Noninvasive tracking of cardiac embryonic stem cells in vivo using magnetic resonance imaging techniques. *Stem Cells* 25: 2936–2944.
178. Singla, D. K., Lyons, G. E., Kamp, T. J. (2007). Transplanted embryonic stem cells following mouse myocardial infarction inhibit apoptosis and cardiac remodeling. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 293: 1308–1314.
180. Shiba, Y., Fernandes, S., Zhu, W., Filice, D., Muskheli, V., Kim, J., Palpant, N. J., Gantz, J., Moyes, K. W., Reinecke, H., Van Biber, B., Dardas, D., Mignone, J. L., Izawa, A., Hanna, R., Viswanathan, R., Gold, J. D., Kotlikoff, M. I., Sarvazyan, N., (2012) Human ES-cell-derived cardiomyocytes electrically couple and suppress arrhythmias in injured hearts. *Nature* 489: 322–325.
181. Yoshida Y., Yamanaka, S., (2011) iPS cells: A source of cardiac regeneration. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50: 327-332
182. Kawamura, M., Miyagawa, S., Miki, K., Saito, A., Fukushima, S., Higuchi, T., Kawamura, T., Kuratani, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Sawa, Y. (2012) Feasibility, safety, and therapeutic efficacy of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte sheets in a porcine ischemic cardiomyopathy model. *Circulation* 126: 29–37.
183. Chong, J. J. James Chong, J., Yang, X., Don, C., Minami, E., Liu, W., Weyers, J. J., Mahoney, M. W., Biber, V. B., Cook, M. S., Palpant, N., Gantz, J. A., Fugate, J. A., Muskheli, V., Gough, M., Vogel, W. K.,

- Astley, A. C., Hotchkiss, C., Baldessari, A., Pabon, L., Reinecke, H., Gill, A. E., Nelson, V., Kiem, H., Laflamme, M. A. Murry, C. E., (2014) Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510: 273–277.
184. Laflamme, M. A., Murry, C. E., (2011) Heart regeneration. *Nature* 473: 326–335.
185. Shiba, Y., Gomibuchi, T., Seto, T., Wada, Y., Ichimura, H., Tanaka, Y., Ogasawara, Y., Okada, K., Shiba, N., Sakamoto, K., Ido, D., Shiina, T., Ohkura, M., Nakai, J., Uno, N., Kazuki, Y., Oshimura, M., Minami, I., Ikeda, U., (2016) Allogeneic transplantation of iPSC cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538: 388–391.
186. Masuda, S., Shimizu, T., Yamato, M., Okano, T., (2008) Cell sheet engineering for heart tissue repair. *Advanced Drug Delivery Reviews* 60: 277-285.
187. Kempf, H., Olmer, O., Kropp, K., Rückert, M., Jara-Avaca, M., Robles-Diaz, D., Franke, A., Elliott, D. A., Wojciechowski, D., Fischer, M., Lara, A. R., Kensah, G., Gruh, I., Haverich, A., Martin, U., Zweigerdt, R., (2014) Controlling Expansion and Cardiomyogenic Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Scalable Suspension Culture. *Stem Cell Reports* 3: 1132-1146.
188. Zweigerdt, R., Martin, U., Olmer, R., Haverich, A., Singh, H., (2011) Scalable expansion of human pluripotent stem cells in suspension culture. *Nature Protocols* 6: 689–700.
189. Tohyama, S., Tohyama, F., Sano, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., Yamashita, H., Satoh, Y., Egashira, T., Seki, T., Muraoka, N., Yamakawa, H., Ohgino, H., Tanaka, T., Yoichi, M., Yuasa, S., Fukuda, K., (2013) Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12: 127-137.
190. Tohyama, S., Fujita, F., Hishiki, T., Matsuura, T., Hattori, F., Ohno, R., Kanazawa, H., Seki, T., Nakajima, K., Kishino, Y., Okada, M., Hirano, A., Kuroda, T., Yasuda, S., Sato, Y., Yuasa, S., Sano, S., Suematsu, M., Fukuda, K., (2016) Glutamine Oxidation Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metabolism* 23: 663-674.
191. Tohyama, S., Ohno, R., Kanaami, S., Yamaguchi, M., Fujita, C., Fujita, J., Kodama, M., Kurokawa, J., Kanazawa, H., Seki, T., Kishino, Y., Okada, M., Nakajima, K., Tanosaki, S., Someya, S., Hirano, A., Kawaguchi, S., Fukuda, K., (2017) Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes *Stem Cell Reports* 9: 1406-1414.
192. Chow, A., Stuckey, D. J., Kidher, E., Rocco, M., Jabbour, J. R., Mansfield, C. A., Darzi, A., Harding, E. S., Stevens, M. M., Athanasiou, T., (2017) Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Encapsulating Bioactive Hydrogels Improve Rat Heart Function Post Myocardial Infarction. *Stem Cell Reports* 9: 1415-1422.
193. Place, E. S., Evans, N. D., Stevens, M. M., (2009) Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature materials* 8: 457–470.
194. Frey, N., Linke, A., Suselbeck, T., Muller-Ehmsen, J., Vermeersch, P., Schoors, D., Rosenberg, M., Bea, F., Tuvia, S., Leor, J., (2014) Intracoronary delivery of injectable bioabsorbable scaffold (IK-5001) to treat left ventricular remodeling after ST-elevation myocardial infarction: a first-in-man study. *Circulation: Cardiovascular Interventions* 7: 806-812.

195. Brines, M., Cerami, A., (2008) Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *Journal of Internal Medicine* 264: 405-432.
196. Kawamura, M., Miyagawa, S., Fukushima, S., Saito, F., Miki, K., Funakoshi, S., Yoshida, Y., Yamanaka, S., Shimizu, T., Okano, T., Daimon, T., Toda, K., Sawa, Y., (2017) Enhanced Therapeutic Effects of Human iPS Cell Derived-Cardiomyocyte by Combined Cell-Sheets with Omental Flap Technique in Porcine Ischemic Cardiomyopathy Model. *Scientific Reports* 7: Article number: 8824.
197. Sekine, H., Shimizu, T., Dobashi, I., Matsuura, K., Hagiwara, N., Takahashi, M., Kobayashi, E., Yamato, M., Okano, T., (2011) Cardiac cell sheet transplantation improves damaged heart function via superior cell survival in comparison with dissociated cell injection. *Tissue Engineering Part A*. 17: 2973–2980.
198. Zvibel, I., Smets, F., Soriano, H., (2002) Anoikis: roadblock to cell transplantation? *Cell Transplantation* 11, 621–630.
199. Chandra, A., Srivastava, K. R., Kashyap, M. P., Kumar, R., Srivastava, R. N., Pant, A. B., (2011) The anti-inflammatory and antibacterial basis of human omental defense: selective expression of cytokines and antimicrobial peptides. *PLoS One*. 6: e20446
200. Kawamura, M. Miyagawa, S., Fukushima, S., Saito, A., Miki, K., Ito, E., Sougawa, N., Kawamura, T., Daimon, T., Shimizu, T., Okano, T., Toda, K., Sawa, Y., (2013) Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart. *Circulation* 128: 87–94.
201. Menasché, P., Vanneaux, V., Hagege, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Bel, A., Parouchev, A., Benhamouda, N., Trouvin, J., Fabreguettes, J., Tartour, E., Desnos, M., Larghero, J., Tachdjian, G., Tosca, L., Bellamy, V., (2015) Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *European Heart Journal* 36: 2011–2017.
202. Menasché, P., Vanneaux, V., Hagege, A., Bel, A., Cholley, B., Parouchev, A., Cacciapuoti, I., Al-Daccak, R., Benhamouda, N., Blons, H., Agbulut, O., Tosca, L., Trouvin, J., Fabreguettes, J., Bellamy, V., Charron, D., Tartour, E., Tachdjian, G., Desnos, M., Larghero, J., (2018) Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 71: 429–438.
203. Monsanto, M. M., Wang, J. B., Ehrenberg, Z. R., Echeagaray, O., White, S. K., Alvarez Jr, R., Fisher, K., Sengphanith, S., Muliono, A., Gude, N. A. Sussman, M. A., Enhancing myocardial repair with CardioClusters. *Nature Communications* 11: 1-20.
204. Kim, T. Echeagaray, O. H., Wang, B. J., Casillas, A., Broughton, M. K., Kim, B. H., Sussman, M. A., (2018) In situ transcriptome characteristics are lost following culture adaptation of adult cardiac stem cells. *Scientific Reports* 8: 12060.
205. Gupta, N. Liu, J. R., Patel, B., Solomon, D. E., Vaidya, B., Gupta, V., (2016) Microfluidics-based 3D cell culture models: utility in novel drug discovery and delivery research. *Bioengineering and Translational Medicine* 1: 63–81.

206. Huh, D., Hamilton, G. A., Ingber, D. E. (2011) From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology* 21: 745–754.

207. Chen, C. H., Wang, S. S., Wei, E. I., Chu, T. Y., Hsieh, P.C., (2013) Hyaluronan enhances bone marrow cell therapy for myocardial repair after infarction. *Molecular Therapy* 21: 670–679.