

***UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA” BUCUREȘTI
FACULTATEA DE MEDICINĂ***



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**TERAPIA REGENERATIVĂ ÎN INFARCTUL
MIOCARDIC EXPERIMENTAL EVALUATĂ
MORFOLOGIC ȘI PRIN METODE NOI
ECOCARDIOGRAFICE**

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. DRAGOȘ VINEREANU

Doctorand:

RUXANDRA DRĂGOI ANTUNES GUERRA GALRINHO

București

- 2017-

CUPRINS

PARTEA GENERALĂ: CONSIDERAȚII TEORETICE

CAPITOLUL 1. INFARCTUL MIOCARDIC - 4

1.1. Introducere și epidemiologie - 4

1.2. Morfopatologia în infarctul miocardic: aspecte macro- și microscopice - 4

1.3. Fiziopatologia în infarctul miocardic - 4

1.4. Modelul experimental de infarct miocardic - 5

1.4.1. Anatomia cordului și a arterelor coronare la șobolanii de laborator - 5

1.4.2. Modele iatrogene de infarct miocardic la animalele de laborator - 5

1.4.3. Efectele cardiovasculare ale anesteziei și analgezicelor folosite periprocedural - 5

CAPITOLUL 2. EVALUAREA MORFOLOGICĂ ȘI FUNCȚIONALĂ A CORDULUI - 6

2.1. Metode de identificare celulară - 6

2.2. Ecocardiografia - 6

2.2.1. Date generale de ecocardiografie - 6

2.2.2. Evaluarea ecocardiografică în infarctul miocardic - 6

2.2.3. Evaluarea ecocardiografică la șobolanul de laborator - 7

2.2.3.1 Achiziția imaginilor ecocardiografice - 7

2.2.3.2. Analiza imaginilor ecocardiografice - 7

CAPITOLUL 3. TERAPIA REGENERATIVĂ

3.1. Terapia regenerativă în infarctul miocardic - 7

3.2. Celulele stem - 8

3.3. Telocitele - 9

PARTEA SPECIALĂ: CERCETĂRI ȘTIINȚIFICE PERSONALE

CAPITOLUL 4. VALORILE ECOCARDIOGRAFICE NORMALE LA SPECIILE DE ȘOBOLANI WISTAR ȘI SPRAGUE-DAWLEY - 10

CAPITOLUL 5. PROTOCOLUL ECOCARDIOGRAFIC DE EVALUARE A INFARCTULUI MIOCARDIC EXPERIMENTAL LA ȘOBOLAN - 12

CAPITOLUL 6. TRANSPLANTUL DE CELULE INTERSTIȚIALE CONȚINÂND TELOCITE, SINGURE SAU ÎMPREUNĂ CU CELULE STEM CARDIACE, ÎN INFARCTUL MIOCARDIC EXPERIMENTAL LA ȘOBOLAN - 15

CAPITOLUL 7. ORIGINALITATEA, CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ȘI PERSPECTIVELE DE CERCETARE - 34

BIBLIOGRAFIE - 36

CAPITOLUL 1. INFARCTUL MIOCARDIC

1.1. Introducere și epidemiologie

Bolile cardiovasculare continuă să reprezinte o problemă majoră de sănătate publică la nivel global. Prevalența totală în Europa a pacienților care au raportat în Registrul Social European o patologie cardiacă sau vasculară în ultimele 12 luni este de 9,2%, procentul fiind egal pentru femei și bărbați (1). În Statele Unite ale Americii datele statistice arată că aproximativ 33% dintre adulți au cel puțin o patologie cardiovasculară, infarctul miocardic fiind întâlnit la 7,6 milioane dintre aceștia, iar angina pectorală la 8,2 milioane (2). În România a fost creat un registru numit RO-STEMI ce a inclus între anii 1997-2009 un număr de 19510 pacienți cu STEMI, cu vârsta medie de 63,39 +/- 12 ani. Mortalitatea globală a fost de 11,79%, scăzând progresiv de la 15,54% în 2003 până la 8,39% în 2009 (3). Așadar se observă că odată cu apariția terapiei intervenționale, respectiv a angioplastiei coronariene percutane, rata de mortalitate a scăzut semnificativ, însă România, din nefericire, se află tot în fruntea clasamentului printre celelalte țări europene (1).

1.2. Morfopatologia în infarctul miocardic: aspecte macro- și microscopice

Infarctul miocardic este definit ca moartea cardiomiocitelor din cauza ischemiei prelungite apărute în urma obstrucției unei artere coronare sau atunci când există un dezechilibru între necesarul și/sau aportul de oxigen (4). Dintre toate mecanismele de producere a infarctului miocardic, în urma unui studiu efectuat pe 298 de pacienți care au prezentat deces intra-spitalicesc, a rezultat că cel mai frecvent mecanism, respectiv în 98% din cazuri, este tromboza acută intra-coronariană, în 74% din cazuri producându-se prin eroziunea plăcii de aterom (5).

Din punct de vedere cronologic s-au descris modificări tipice ce pot fi evidențiate cu ochiul liber, cu microscopul optic, folosind diverse colorații histochemice, și cu cel electronic. Există trei stadii principale în evoluția leziunii din infarctul miocardic: inflamația, formarea cicatricii și remodelarea matricei extracelulare.

1.3. Fiziopatologia din infarctul miocardic

Remodelarea ventriculară. Termenul de remodelare ventriculară definește totalitatea modificărilor de mărime, formă, structură și funcție care au loc la nivel cardiac, acest concept fiind pentru prima dată introdus în legătură cu ischemia în anul 1982 de către Hockman și Bulkley (6). Din punct de vedere fiziopatologic, distingem două mecanisme ale acesteia: dilatația ventriculară și hipertrofia excentrică.

Funcția sistolică a ventriculului stâng. Tulburările de contractilitate ale miocardului infarctat, au fost descrise încă din 1967 de către Herman *et al.* și sunt reprezentate de: hipokinezi, akinezie, diskinezie și anevrism (7).

Funcția diastolică a ventriculului stâng. Infarctul miocardic poate să fie însoțit de disfuncție diastolică, indiferent dacă funcția sistolică a fost afectată sau nu (8). Atât funcția de relaxare activă, cât și complianța ventriculară sunt afectate în infarctul miocardic, prin diferite mecanisme.

1.4. Modelul experimental de infarct miocardic

1.4.1. Anatomia cordului și a arterelor coronare la șobolanii de laborator

Efectuarea experimentelor folosind animale de laborator este necesară pentru studierea diferitelor mecanisme fiziopatologice și pentru cercetarea noilor metode terapeutice cu potențial benefic pentru om. Hebel R. a scris în anul 1986 primul atlas despre anatomia cordului și sistemul circulator la șobolan (9). Acestea sunt relativ similare cu ale omului, totuși la șobolani arterele coronare sunt localizate intramiocardic. Teritoriul de vascularizație al arterei coronare stângi este reprezentat de peretele liber al ventriculului stâng, cel al arterei coronare drepte de peretele liber al ventriculului drept, iar cel al arterei septale este reprezentat de sept (10).

1.4.2. Modele iatrogene de infarct miocardic la animalele de laborator

Ligaturarea arterelor coronare a fost efectuată pentru prima dată la câini cu scopul studierii insuficienței cardiace (11). Johns și Olson au studiat producerea infarctului miocardic, prin ocluzia arterei coronare, la diverse specii de animale mici de laborator, iar rata de succes a fost cea mai mare la șobolani, respectiv de 83% , comparativ cu alte specii, cum ar fi șoareci de 64%, hamsteri de 31% și porci de guinea doar de 25%. De asemenea au arătat că spre deosebire de câini, șobolanii și șoarecii supraviețuiesc într-un procent mai mare în urma ocluziei arterei coronare stângi, deoarece la aceste specii nu apare fibrilația ventriculară (12). Așadar în prezent la șobolani cea mai folosită tehnică de inducere a infarctului miocardic este ligaturarea arterei coronare stângi, folosind un fir de sutură, prin toracotomie laterală stângă, aceasta fiind metoda pe care am folosit-o și noi. Deoarece localizarea arterelor coronare la șobolani și șoareci este subepicardic, identificarea lor este destul de dificilă. Astfel ocluzia arterei coronare se produce prin trecerea unui fir de sutură prin miocard, imediat sub varful auriculii stâng, la locul unde se presupune că este artera coronară stângă și se efectuează ligaturarea strânsă a întregii zone de miocard cu vasul cuprins în ea.

1.4.3. Efectele cardiovasculare ale anestezicelor și analgezicelor folosite periprocedural

În general pentru efectuarea anumitor experimente, animalelor de laborator li se induce anestezia generală, cu scopul de a obține analgezie, scăderea percepției stimulilor externi, supresia activității reflexe și pierderea tonusului musculo-scheletal. Majoritatea anestezicelor au un efect depresor asupra sistemului cardiovascular, scăzând atât frecvența cardiacă, cât și contractilitatea miocardică, iar supradoza de anestezic este probabil cea mai frecventă cauză de insuficiență cardiacă (13). Pentru intervențiile chirurgicale, după ce efectul anesteziei a trecut, este necesară administrarea medicamentelor analgezice. De obicei se folosesc opioide, ce pot varia între ele ca potență, durată de acțiune și efecte secundare și care se clasifică în funcție de specificitatea pentru receptorii μ sau κ (k). Când sunt administrate în doze adecvate post-operator, analgezicele au efecte minime asupra sistemului cardiovascular, însă dozele mai mari pot cauza bradicardie și pot stimula eliberarea histaminei, astfel producând vasodilatație periferică, cu hipotensiune arterială secundară (14).

CAPITOLUL 2. EVALUAREA MORFOLOGICĂ ȘI FUNCȚIONALĂ A CORDULUI

2.1. Metode de identificare celulară

Microscopul optic a fost inventat în anul 1590 de către Hans Jansen folosind o singură lentilă convexă și abia după 75 de ani a fost folosit pentru prima dată în scop biologic de către Robert Hooke, fiind descris în cartea sa intitulată „Micrographia”. Probabil că în prezent este cel mai des întrebuințat tip de microscop. **Microscopul cu fluorescență** este similar cu cel optic, doar că lumina provine de la o sursă foarte puternică și trece prin două filtre-unul care filtrează lumina înainte să ajungă la specimen și unul care filtrează lumina obținută de la specimen. **Microscopul electronic** a apărut în anul 1931 și funcționează după aceleași principii fundamentale ca și cel optic, dar spre deosebire de acesta folosește electronii ca sursă de lumină și deoarece aceștia sunt absorbiți de către atomii din aer, tubul dintre sursă de electroni și ecran este vidat. Poate fi de mai multe feluri, cele mai des utilizate fiind cel de transmisie și cel de scanare. **Citometria în flux** a fost dezvoltată plecând de la microscopie și este o tehnică ce permite numărarea și sortarea unei anumite celule sau a unei anumite populații celulare, pe baza diferitelor lor proprietăți, cu o rată de mii de celule pe secundă, prin suspensia acestor celule într-un lichid special și trecerea lor printr-un sistem complex de lasere (15).

2.2. Ecocardiografia

2.2.1. Date generale de ecocardiografie

Ecocardiografia este una dintre cele mai folosite tehnici de imagistică a cordului, deoarece este neinvazivă, lipsită de riscuri, repetabilă ori de câte ori este necesar, larg disponibilă și poate oferi informații precise în timp real despre structura și funcția inimii (16-20). Astfel se pot obține date relevante despre grosimea pereților ventriculari, dimensiunea cavităților cordului, morfologia valvelor, despre pericard, precum și despre funcțiile sistolică și diastolică ale cordului.

Ecocardiografia standard are trei modalități complementare de a evalua structura și funcția inimii: modul M, modul 2D și modul Doppler. Ecocardiografia în modul M (uni-dimensional) se folosește în principal pentru măsurarea dimensiunilor cardiace, modul 2D (bi-dimensional) permite aprecierea anatomiei și funcției cardiace, iar modul Doppler interogheza fluxurile sangvine și astfel oferă informații hemodinamice valoroase. **Ecocardiografia Doppler tisular** (TDI) este considerată în prezent o tehnică precisă și sensibilă pentru cuantificarea funcției cardiace (16, 21). **Ecocardiografia speckle tracking** (STE) este o metodă ecocardiografică nouă, cu ajutorul căreia se poate cuantifica deformarea miocardică segmentară și globală, fiind astfel posibilă diferențierea între mișcarea activă și cea pasivă a unui anumit segment miocardic.

2.2.2. Evaluarea ecocardiografică în infarctul miocardic

Ecocardiografia are un rol extrem de important atât în diagnosticul, cât și în managementul infarctului miocardic. Ea furnizează informații despre tulburările de cinetică regionale, funcția sistolică și diastolică a ventriculului stâng și mai ales detectează eventualele complicații mecanice, astfel ajutând la stabilirea atitudinii terapeutice optime.

Evaluarea ecocardiografică standard

Funcția sistolică globală se cuantifică prin determinarea următorilor parametri: fracția de ejeție a VS (FEVS), MAPSE (excursia sistolică a planului inelului mitral), integrala vitează timp (IVT) a fluxului din tractul de ejeție al VS (TEVS), fracția de schimbare a ariei VS. **Funcția**

sistolă regională este evaluată prin ecocardiografie prin examinarea tulburărilor de cinetică, urmărind mișcarea endocardului, respectiv îngroșarea parietală în sistolă. **Funcția diastolică** se cuantifică prin evaluarea fluxului transmitral, cu ajutorul Doppler-ului pulsat. Aceasta reprezintă punctul de plecare în stabilirea tipului de disfuncție diastolică a VS, aducând informații utile în aprecierea presiunilor de umplere a VS. Analiza fluxului pulmonar aduce informații complementare în aprecierea disfuncției diastolice (22). Măsurarea vitezei de propagare a fluxului mitral (Vp), folosind modul M și color, poate de asemenea aduce informații despre presiunile de umplere din VS. Pe lângă parametrii ecocardiografici standard de evaluare a disfuncției diastolice, un rol extrem de important îl au și cei derivați din TDI. **Funcția cardiacă globală** este evaluată prin: indicele de performanță miocardică și indicele cardiac. **Complicațiile cardiace** sunt cel mai bine evaluate prin ecocardiografie și sunt reprezentate de: ruptura peretelui VS sau a septului interventricular, pericardita lichidiană și tamponada cardiacă, regurgitarea mitrală, anevrismul VS, pseudoanevrismul VS.

Evaluarea prin TDI nu poate furniza informații referitoare la cinetica regională, ci oferă informații despre mișcarea sistolică longitudinală a VS și despre funcția diastolică a acestuia.

Evaluarea prin STE are un rol deosebit în evaluarea bolii coronariene aterosclerotice, dat fiind faptul că poate aprecia separat deformarea miocardică longitudinală, care este prima afectată în cazul ischemiei miocardice. S-a demonstrat că prin evaluarea deformării miocardice și a ratei deformării miocardice longitudinale, se poate aprecia prezența, localizarea și extinderea transmurală a infarctului miocardic (23).

2.2.3. Evaluarea ecocardiografică la șobolanul de laborator

Ecocardiografia este o metodă non-invazivă, ce s-a dovedit a fi fiabilă la șobolan, și care poate fi efectuată ori de ori este necesar, având riscuri minime, date doar de folosirea anesteziei (24, 25, 26). Pe tot parcursul examinării, șobolanul este monitorizat electrocardiografic și termometrizat. Se vor achiziționa un număr de minim cinci cicluri cardiace. Fiecare cercetător concepe și devine familiar cu propriul său protocol ecocardiografic, elaborat în principal în funcție de aparatul și transductorul folosite.

2.2.3.1. Achiziția imaginilor ecocardiografice

Imaginile se achiziționează folosind o adâncime de 1,5-2 cm și un sector cât mai îngust, pentru obținerea unui număr de cadre pe secundă cât mai mare și cu o rezoluție cât mai bună. Se achiziționează următoarele secțiuni: parasternal ax lung, parasternal ax scurt la nivelul marilor vase, parasternal ax scurt la nivelul mușchilor papilari, apical 4 camere și apical 5 camere (25).

2.2.3.2. Analiza imaginilor ecocardiografice

Se efectuează „off-line”, folosind un soft special pentru animalele mici de laborator. Se măsoară parametrii ecocardiografici standard, precum și cei derivați din TDI și STE.

CAPITOLUL 3. TERAPIA REGENERATIVĂ

3.1. Terapia regenerativă în infarctul miocardic

Terapia regenerativă este în principal axată pe terapia celulară, dar mai cuprinde și dezvoltarea de diverse bio-materiale, tehnici de livrare celulară sau de augmentare a răspunsului țesutului unde urmează să se efectueze transplantul celular, tehnici de pre-condiționare a celulelor stem (CS) prin diverse metode, precum și folosirea de factori de creștere sau terapie genică.

3.2. Celulele stem

Celula stem este definită ca o celulă ce are capacitatea de a se reînnoi, prin crearea unor copii ale ei, sau de a se diferenția într-un alt tip celular (27). Așa cum este specificat de către Madonna *et al.*, denumirea de „celulă stem” a fost folosită excesiv în studiile efectuate până în prezent, ținând cont de faptul că doar o parte dintre aceste celule se încadrează definiției de mai sus (28). Așa cum se remarcă din cele două tabele de mai jos, în ciuda rezultatelor încurajatoare privind diferitele tipuri de CS în repararea cardiacă după infarctul miocardic experimental, studiile clinice au avut rezultate modeste și discordanțe în ceea ce privește ameliorarea funcției cardiace sau din punct de vedere clinic.

Tabelul 3.1 Studii preclinice cu diferite tipuri de celule stem în infarctul miocardic experimental

Tipul celular	Tipul de animal	Rezultate	Referință
CMMO	șoarece	crește FEVS	(29)
CMMO	maimuță	crește FS	(30)
CSM	șobolan	crește FS	(31)
CSM	porc	crește FS	(32)
CSM	câine	crește FEVS	(33)
CS - cs	șoarece	crește FEVS	(34)
CS embrionare	șobolan	crește FS	(35)
CSPi	șobolan	cresc FEVS, FS	(36)

CMMO, celule mononucleare din măduva osoasă; FEVS, fracția de ejeție a VS; FS, fracția de scurtare; CSM, celule stem mezenchimale; CS-cs, celule stem cardiace derivate din cardio-sfere; CSPi, celule stem pluripotente induse

Tabelul 3.2 Studii clinice cu diferite tipuri de celule stem în infarctul miocardic

Studiu	Tipul celular	Metoda de transplant	Perioada de urmărire	FEVS	Referință
TOPCARE- AMI	CMMO	IC	4 luni	crește	(37)
			5 ani	crește	(38)
REPAIR – AMI	CMMO	IC	4 luni	crește	(39)
BOOST	CMMO	IC	6 luni	crește	(40)
			18 luni	fără modificare	(41)
FINCELL	CMMO	IC	6 luni	crește	(42)
ASTAMI	CMMO	IC	6 luni	fără modificare	(43)
BONAMI	CMMO	IC	3 luni	fără modificare	(44)
Leuven-AMI	CMMO	IC	4 luni	fără modificare	(45)
HEBE	CMMO	IC	4 luni	fără modificare	(46)

TIME	CMMO	IC	6 luni	fără modificare	(47)
LATE-TIME	CMMO	IC	6 luni	fără modificare	(48)
APOLLO	CSM	IC	6 luni	crește	(49)
CADUCENS	CS-cs	IC	12 luni	fără modificare	(50)
SCIPIO	CS c-kit ⁺	IC	12 luni	crește	(51)

FEVS, fracția de ejeție a VS; CMMO, celule mononucleare din măduva osoasă; IC, intracoronarian; CSM, celule stem mezenchimale; CS-cs, celule stem cardiace derivate din cardio-sfere

Tipul celular optim folosit pentru terapia regenerativă trebuie să nu fie suspus criticile legate de etică, să fie disponibil imediat, să fie sigur din punct de vedere teratogen, să fie tolerat din punct de vedere imun, să poată supraviețui și să se poată integra în miocardul unde este transplatat, să determine angiogeneza și regenerare cardiacă și astfel să amelioreze funcția cardiacă și să aducă beneficii și din punct de vedere clinic. Până în prezent nu s-a descoperit această celulă, astfel încât continuă cercetările în acest domeniu.

3.3. Telocitele

Aspecte generale. Telocitele (TC), descrise recent de către Popescu LM și echipa sa, sunt un tip relativ nou de celule interstițiale, ce pot avea un rol important în terapia regenerativă (52). Cea mai importantă caracteristică a TC este dată de prelungirile deosebit de lungi și subțiri, denumite „telopode”. Astfel cea mai scurtă definiție a TC este „celule cu telopode” (53). În ultimii ani s-au efectuat numeroase studii, iar aceste celule au fost identificate în majoritatea organelor și sistemelor (54-59). În inimă, TC nu sunt distribuite uniform, numărul lor fiind diferit în endocard, miocard și epicard, precum și în atri și ventriculi, găsindu-se într-un procent mai mare la nivelul bazei cordului (52, 55-57, 60, 61). Mai mult, s-a dovedit că distribuția TC variază în funcție de anumite condiții fiziologice sau patologice (62-68).

Ultrastructura și fenotipul TC cardiace. TC au un corp celular mic și ovalar, ce conține un nucleu, înconjurat de o cantitate mică de citoplasmă (57). Membrana celulară prezintă frecvent caveolae (56). Cu ajutorul unei tehnici de imagistică avansată, s-a arătat că aceste telopode sunt organizate într-o rețea tridimensională, ce formează un sistem asemănător unui labirint (69). Prin imagistica confocală și imunohistochimie, s-a arătat că TC cardiace sunt pozitive pentru diferiți markeri precum: CD34, CD117/c-kit, vimentina, PDGFR-β, CD34/PDGFR-α, dar până în prezent nu s-a găsit niciun marker specific (57, 61, 70-72). Toate aceste caracteristici indică faptul că TC reprezintă un tip distinct de celule interstițiale, diferit de toate celelalte tipuri de celule cardiace stromale.

Rolurile TC în inimă. Sistemul în formă de labirint format din telopode realizează o structură dinamică ce poate asigura suportul mecanic pentru alte tipuri celulare și poate asista migrarea și diferențierea celulelor cardiace progenitoare (69, 73). În plus, TC stabilesc conexiuni între ele, precum și cu alte tipuri celulare, prin contact homocelulare, respectiv heterocelulare (74). Mai mult decât atât, TC au fost identificate ca fiind membri activi în nișele CS cardiace de la nivelul epicardului, împreună cu celulele progenitoare cardiace. Aceasta sugerează că ele ghidează

celulele progenitoare cardiace să devină cardiomiocite mature, aceasta făcând parte din procesul de regenerare cardiacă (52). Prin capacitatea lor de a secreta cito- și chemokine (IL-6, MIP-1 α , MIP-2, MCP-1 and VEGF), TC pot avea un potențial rol de reglare a celorlalte celule, precum CS cardiace rezidente (75). TC transferă vezicule extracelulare pline cu microARN către CS, astfel TC pot influența transcripția și pot contribui la diviziunea și diferențierea CS (76).

TC în infarctul miocardic. Două studii independente au arătat că în infarctul miocardic experimental la șobolan, numărul de TC variază la locul leziunii, găsindu-se un număr diferit în cele două zone, centrală, respectiv zona de graniță, precum și în funcție de cele trei etape ce urmează obstrucției arterei coronare (67, 68). În plus, folosind diferite metode, precum imunocitochimia, microscopia electronică și analiza micro ARN, s-a arătat că TC sunt implicate în neo-angiogeneza după infarctul miocardic (68). Recent, s-a demonstrat că transplantul intramiocardic de TC în zona centrală de necroză și în zona de graniță, a scăzut zona de infarct și a ameliorat funcția cardiacă, evaluată ecocardiografic prin FEVS, atât la 14 zile, cât și la 14 săptămâni după ocluzia arterei coronare (67, 77). Un alt fapt interesant este acela că transplantul intramiocardic de CSPi în infarctul miocardic experimental, pe lângă ameliorarea remodelării ventriculare, a fost asociată cu creșterea numărului de TC, comparativ cu lotul control (78, 79).

Numărul imens de dovezi privind potențialele roluri ale TC în repararea și regenerarea cardiacă, le propun ca nouă țintă a strategiilor terapeutice din infarctul miocardic (80).

CAPITOLUL 4. VALORILE ECOCARDIOGRAFICE NORMALE LA SPECIILE DE ȘOBOLANI WISTAR ȘI SPRAGUE-DAWLEY

Obiective

Obiectivele studiului nostru au fost de a defini valorile normale ale parametrilor ecocardiografici la cele mai folosite două specii de șobolan de laborator și de a compara structura și funcția cardiacă a acestor două specii, folosind atât tehnici ecocardiografice standard, cât și noi.

Metode

Standarde etice. Protocolul de studiu a respectat Ghidul de îngrijire și folosire a animalelor de laborator publicat de Institutul Național de Sănătate din America, revizuit în 1996, și a fost aprobat de către Comisia de Etică a Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babes” din București.

Animalele. Șobolanii au fost găzduiți în cuști individuale într-un mediu controlat la o temperatură de 22°C și un ciclu lumină/întuneric de 12 ore. Au fost hrăniți cu mâncare standard și apă *ad libitum*.

Protocolul anestezic. Treizeci de șobolani masculi (15 Sprague-Dawley-SD și 15 Wistar-W), cu vârste similare (vârstă medie 24 $\pm$ 4 săptămâni), au fost anesteziați intramuscular folosind o doză de 2mg/kg de acepromazină maleat (Neurotranq; Alfasan, Woerden, Holland) și 100mg/kg ketamină hidroclohid (Ketamine HCL; Kepro, Deventer, Holland).

Protocolul ecocardiografic. După ce șobolanii au fost anesteziați, blana de la nivelul toracelui anterior a fost rasă și au fost poziționați în decubit lateral stâng pe o masă specială încălzită (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), iar temperatura a fost monitorizată continuu, folosind un termomentru rectal, și menținută la 37°C. Traseul electric a fost monitorizat pe toată durata experimentului, având grijă să se obțină un semnal ECG optim cu definirea clară a complexului QRS. Examinarea ecocardiografică a fost efectuată sub respirație spontană în aerul

atmosferic, de către mine, folosind un aparat Vivid i (General Electric, Milwaukee, Wisconsin) și o sondă sectorială de 11 Mhz (12S-RS). Analiza imaginilor ecocardiografice înregistrate am efectuat-o „off-line”, folosind un program special pentru animale mici de laborator (EchoPAC BT12, General Electric), iar măsurătorile au fost obținute din media a trei determinări. Structura și funcția ventriculului stâng (VS) și a celui drept (VD) au fost evaluate din secțiunea parasternal ax lung și scurt la nivelul mușchilor papilari și din secțiunile apical patru și cinci camere. Din înregistrările Doppler la nivelul fluxurilor mitral și aortic au fost măsurate unda E, TRIV, TCIV și Tej. Din modul M din secțiunea parasternal ax scurt au fost determinate diametrele VS, grosimea pereților anterior (PAVS) și posterior (PPVS) ai VS și a FS, conform convenției „leading edge-to-leading edge”. Toate dimensiunile au fost raportate la greutate. Din secțiunea apical patru camere a fost, de asemenea, folosit modul M pentru a măsura excursia sistolică apicală a planului inelelor mitral (MAPSE) și tricuspidian (TAPSE). Frația de ejeție a VS (FEVS) a fost calculată folosind formula lui Teicholz și masa VS folosind formulă cubului. Indicele cardiac a fost calculat măsurând IVT la nivelul fluxului aortic din înregistrările Doppler pulsat din secțiunea apical cinci camere și diametrul inelului aortic măsurat în secțiunea parasternal ax lung. Indicele de performanță miocardică a fost cuantificat folosind formula lui Tei. Cu ajutorul TDI au fost măsurate vitezele tisulare miocardice sistolice (S'VS) și diastolice (E') de la nivelul inelului mitral septal, cât și cele sistolice de la nivelul inelului tricuspidian (S'VD). Pentru evaluarea funcției diastolice, a fost calculat raportul E/E'. Au fost calculate deformarea miocardică (DMCG, DMRG) și rata deformării miocardice (RDMCG, RDMRG) sistolice globale circumferențiale și radiale.

Pentru a calcula variabilitatea intraobservator, am repetat măsurătorile parametrilor ecocardiografici peste o săptămână și am efectuat analiza Bland Altman (81).

Analiza statistică. A fost efectuată folosind programul SPSS versiunea 17 (SPSS, Inc, Chicago, IL). Distribuția normală a fost verificată cu testul Shapiro-Wilk. Pentru a compara cele două specii de șobolani de laborator s-a folosit testul t pentru eșantioane neperechi. Calculul puterii a fost efectuat și exprimat ca cea mai mică diferență procentuală (delta) între valorile medii, ce ar fi putut fi detectată cu un nivel de semnificație de 0,05 și o putere de 80%. Rezultatele sunt exprimate ca medie ± deviație standard. Semnificația statistică a fost atinsă atunci când valoarea p (two-tailed) a fost mai mică decât 0,05. Graficele au fost realizate folosind programul Graph Pad Prism 5 pentru Windows.

Rezultate

Variabilitatea intraobservator pentru măsurarea parametrilor ecocardiografici a fost foarte bună. Șobolanii de laborator SD au avut o frecvență cardiacă mai scăzută, dar greutate mai mare comparativ cu W. Cu toate că dimensiunile VS și ale VD, precum și masa VS nu au prezentat diferențe semnificative între cele două specii, șobolanii SD au avut pereți ventriculari mai subțiri după raportarea la greutate. În ceea ce privește funcția sistolică longitudinală a celor doi ventriculi, evaluată prin modul M, respectiv MAPSE septal și TAPSE nu au fost observate diferențe. De asemenea nu s-au înregistrat diferențe privind funcția sistolică globală, evaluată prin FS, FE și indicele cardiac. Indicele de performanță miocardică a fost similar la cele două specii. În urma analizei parametrilor derivați din TDI, se remarcă faptul că atât S'VS, cât și S'VD, nu au diferit semnificativ între cele două specii, confirmând astfel faptul că funcția sistolică longitudinală a ambilor ventriculi este similară la cele două specii. Raportul E/E' nu a prezentat diferențe semnificative între SD și W, arătând astfel că și funcția diastolică a VS este similară la cele două

specii. De asemenea, parametrii ecocardiografici derivați din STE, care spre deosebire de TDI, au avantajul independenței de unghi, nu au prezentat diferențe semnificative. Calculul puterii a prezis o diferență procentuală minimă detectabilă a rezultatelor ecocardiografice variind de la 27% pentru indicele de performanță miocardică și până la 7% pentru fracția de ejeție.

Discuții

Rezultatele noastre pot fi folosite ca valori normale de referință pentru masculii tineri din speciile SD și W. Aceste rezultate demonstrează că cele două specii „*outbred*” de șobolani de laborator prezintă doar diferențe minore în ceea ce privește structura VS, însă au funcție cardiacă sistolică și diastolică similară, evaluată atât prin metodele ecocardiografice standard, precum și prin cele noi, respectiv TDI și STE. Menționăm că au existat câteva limitări tehnice în protocolul nostru ecocardiografic, fie din cauza frecvenței cardiace înalte, fie din cauza dificultății obținerii unor imagini corecte. În consecință funcția diastolică a VS nu a putut fi evaluată prin raportul E/A, deoarece undele E și A erau de cele mai multe ori fuzionate, din cauza frecvenței cardiace înalte. Totuși a fost calculat raportul E/E', un parametru ecocardiografic mai sensibil pentru cuantificarea presiunilor de umplere a VS, ce este independent de frecvența cardiacă (82, 83). Pentru majoritatea șobolanilor de laborator, a fost dificil de obținut o secțiune apical patru camere corectă, cu vizualizarea adecvată a endocardului, necesară pentru cuantificarea deformării miocardice longitudinale prin STE. Totuși funcția sistolică longitudinală a ambilor ventriculi a fost evaluată cu ajutorul parametrilor derivați din ecocardiografia modul M și TDI.

În concluzie, rezultatele noastre sugerează că speciile de șobolani de laborator SD și W pot fi folosite împreună în cadrul aceluiași protocol privind evaluarea funcției cardiace. Datele obținute de la o specie pot fi comparate direct cu cele obținute de la cealaltă specie, iar discrepanțele privind funcția cardiacă, observate în studiile ce folosesc aceste două specii, nu ar trebui atribuite diferențelor dintre specii.

CAPITOLUL 5. PROTOCOLUL ECOCARDIOGRAFIC DE EVALUARE A INFARCTULUI MIOCARDIC EXPERIMENTAL LA ȘOBOLAN

Obiective

Obiectivul studiului nostru a fost acela de a valida un protocol ce utilizează atât tehnici ecocardiografice standard, cât și noi (TDI și STE), cu scopul evaluării complete a remodelării și funcției cardiace după infarctul miocardic experimental la speciile de șobolani SD și W.

Metode

Standarde etice. Datele pentru această analiză au fost colectate din studiul ce evaluează terapia regenerativă în infarctul miocardic experimental, al cărui protocol a respectat Ghidul de îngrijire și folosire a animalelor de laborator publicat de Institutul Național de Sănătate din America, revizuit în 1996, și a fost aprobat de către Comisă de Etică a Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babes” din București.

Animalele. Au fost găzduite în cuști individuale într-un mediu controlat, la o temperatură de 22°C și un ciclu lumină/întuneric de 12 ore, și au fost hrănite cu mâncare standard și apă *ad libitum*. S-a realizat analgezie adecvată în timpul și după intervenția chirurgicală. Am evaluat o populație mixtă alcătuită din 15 șobolani masculi (10 W și 5 SD), cu vârstă medie 21±2 săptămâni și greutate medie 355±43g.

Anestezia și protocolul de inducere a infarctului miocardic. Anestezia intraperitoneală s-a efectuat înainte de evaluarea ecocardiografică și de inducerea infarctului miocardic, cu 2mg/kg de acepromazină maleat (Neurotranq; Alfasan, Woerden, Holland) și 100mg/kg ketamină hidroclohid (Ketamine HCL; Kepro, Deventer, Holland). Producerea infarctului miocardic s-a efectuat prin ligaturarea arterei coronare stângi, iar protocolul chirurgical a fost adaptat după cel al lui Odorfer *et al.* (84). După realizarea anesteziei, blana de la nivelul toracelui anterior a fost rasă, apoi animalul a fost intubat folosind un cateter de teflon cu diametrul de 16 G (Suru International Pvt. Ltd., Mumbai, India), ce a fost ulterior conectat la un ventilator mecanic (CWE SAR-830/P Ardmere, PA, USA). Animalul a fost așezat în decubit lateral drept pe o masă specială încălzită (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), cu monitorizarea permanentă a temperaturii rectale și menținerea acesteia la 37°C. Traseul electric a fost monitorizat pe tot parcursul intervenției chirurgicale, folosind un monitor veterinar special (VET-420F, Goldway US Inc., NY, USA). S-a efectuat toracotomie stânga între a treia și a patra coastă, au fost secționați mușchii intercostali, a fost deschis apoi pericardul, și fără a exterioriza inima, artera coronară stângă a fost ligaturată printr-un nod chirurgical, folosind un fir de sutură Vicryl 5-0 (SMI, Hünningen, Belgium), imediat sub marginea inferioară a auriculului stâng. Ocluzia arterei coronare stângi a fost verificată prin apariția supradenivelării segmentului ST pe traseul electric și prin paloarea miocardului. În plus când artera coronară stângă a fost ligaturată cu succes s-a evidențiat apariția aritmiilor maligne, precum tahicardia ventriculară, așa cum se observă în figura de mai jos. După ligaturarea arterei coronare stângi, s-a efectuat sutura coastelor cu un fir de sutură Vicryl 4-0 (SMI, Hünningen, Belgium), iar plămânul a fost expansionat înainte de efectuarea ultimului nod chirurgical, pentru a preveni pneumotoraxul. S-a realizat ulterior tot cu fir Vicryl 4-0 (SMI, Hünningen, Belgium) sutura fiecărui strat muscular, iar la sfârșit sutura țesutului subcutanat și a tegumentului. După închiderea plăgii operatorii, animalul a fost deconectat de la ventilator, iar cateterul de teflon endotraheal a fost îndepărtat cu blândete, după reluarea triggerului respirator. Plaga a fost acoperită cu oxitetraciclină (Oxyvet, Veterin, Attiki, Greece), această fiind un lichid bacteriostatic. Animalul a fost supravegheat pe masă specială încălzită până la reaparitia reflexelor motorii și ulterior a fost mutat într-o cușcă individuală, fiind așezat pe un strat gros de rumeguș steril, în decubit lateral drept, cu toracele ridicat la 30°. Analgezia postoperatorie s-a efectuat cu metamizol sodic (Algocalmin, Zentiva, București, România), iar antibioterapia cu enrofloxacină.

Protocolul ecocardiografic. Ecocardiografia a fost efectuată sub anestezie, dar sub respirație spontană, înainte și la 24 de ore după inducerea infarctului miocardic. În acest scop blana de la nivelul toracelui anterior a fost rasă, șobolanul a fost poziționat în decubit lateral stâng pe o masă specială încălzită, cu menținerea temperaturii constante la 37°C și monitorizarea continuă a traseului electric cu ajutorul modulului ECG al ecocardiografului. Examinarea a fost efectuată de către mine, folosind un ecograf Vivid i (General Electric, Milwaukee, Wisconsin) și o sondă sectorială de 11 Mhz (12S-RS).

Parametrii ecocardiografici standard. Structura și funcția VS au fost evaluate din secțiunile parasternal ax lung și ax scurt la nivelul mușchilor papilari, precum și din apical patru și cinci camere. Analiza am efectuat-o off-line, folosind un soft special pentru animale mici de laborator (EchoPAC BT12, General Electric), prin măsurarea valorilor din trei cicluri cardiace și raportarea mediei lor. Diametrul VS, grosimea pereților VS și FS au fost măsurate folosind modul M din secțiunea parasternal ax lung, conform convenției “*leading edge to leading edge*”. FEVS a fost

calculată cu ajutorul formulei arie-lungime din secțiunea apical patru camere. Debitul cardiac a fost calculat conform recomandărilor lui Slama *et al.*, folosind diametrul inelului aortic măsurat în imaginea 2D din secțiunea parasternal ax lung și IVT măsurată cu ajutorul Doppler pulsat în TEVS din secțiunea apical cinci camere. MAPSE a fost măsurat din secțiunea apical patru camere folosind modul M. Indicele de performanță miocardică a fost calculat conform formulei lui Tei *et al.* (85).

Parametrii ecocardiografici noi. Viteza miocardică sistolică a VS a fost obținută prin TDI pulsat „on-line” la nivelul miocardului septal adiacent inelului mitral. STE a fost efectuată pe imaginile 2D obținute din secțiunea parasternal ax scurt la nivelul mușchilor papilari, înregistrate la 116 cadre/secundă. Astfel s-a trasat manual, la începutul sistolei, endocardul și s-a selectat regiunea de interes adecvată, astfel încât să fie cuprins întregul miocard. S-a verificat ulterior să fie corect urmărite endocardul, miocardul și epicardul și s-au efectuat ajustări, atunci când a fost necesar. S-au măsurat deformarea miocardică sistolică globală circumferențială (DMCG) și radială (DMRG), precum și rata deformării miocardice sistolice globale circumferențiale (RDMCG) și radiale (RDMRG).

Analiza statistică. Analiza statistică s-a efectuat folosind programul SPSS versiunea 19 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Rezultatele au fost exprimate ca medie $\pm$ deviația standard. Comparațiile au fost făcute folosind testul t pentru eșantioane perechi. A fost considerată semnificativă statistic valoarea p (two-tailed) mai mică de 0,05. Graficele au fost realizate folosind programul Graph Pad Prism 5 pentru Windows.

Rezultate

Fezabilitatea măsurării parametrilor ecocardiografici standard, precum și a celor derivați din TDI și STE a fost de 100%. Frecvența cardiacă a fost semnificativ mai mică la 24 de ore de la producerea infarctului miocardic. Peretele anterior al VS a fost mai subțire, iar diametrele și volumele, atât sistolice, cât și diastolice ale VS, au crescut. Funcția cardiacă, evaluată prin ecocardiografia standard, respectiv prin FS, FEVS, MAPSE, debitul cardiac și indicii de performanță miocardică, a scăzut semnificativ. Funcția sistolică a VS evaluată prin TDI a prezentat o scădere semnificativă statistic la 24 ore de la ligaturarea arterei coronare stângi. De asemenea deformarea miocardică și rata deformării miocardice sistolice circumferențiale și radiale au scăzut semnificativ.

Discuții

Am inclus în modelul nostru parametrii ecocardiografici standard și noi, cu scopul validării unui protocol comprehensiv de evaluare a remodelării și funcției cardiace, în faza acută a infarctului miocardic. Ecocardiografia convențională în modurile M și 2D a fost folosită pentru aprecierea structurii și funcției VS. TDI și STE au fost utilizate pentru cuantificarea funcției longitudinale (prin S'VS), circumferențiale și radiale (prin parametrii de deformare miocardică). Am demonstrat că evaluarea acestor parametri este fezabilă și că toți acești parametri sunt modificați semnificativ la 24 de ore de la ligaturarea arterei coronare stângi. TDI și STE pot detecta modificări mai subtile ale funcției cardiace în infarctul miocardic decât ecocardiografia standard, și de aceea pot fi mai utile în evaluarea efectului noilor terapii regenerative asupra ameliorării remodelării și funcției VS. Limitele acestui studiu sunt aceleași cu cele prezentate în capitolul anterior, respectiv dificultățile tehnice legate de examinarea ecocardiografică la animalele mici de laborator, a căror inimă cântărește aproximativ 1g, precum și cele legate de frecvența cardiacă crescută.

În concluzie, impactul infarctului miocardic la șobolanii de laborator poate fi mai extensiv evaluat folosind un protocol ecocardiografic complet, care să cuprindă atât parametrii standard, cât și pe cei derivați din TDI și STE, cu scopul cuantificării atât a remodelării VS, cât și a funcției globale și regionale (longitudinale, circumferențiale și radiale).

CAPITOLUL 6. TRANSPLANTUL DE CELULE INTERSTIȚIALE, CONȚINÂND TELOCITE, SINGURE SAU ÎMPREUNĂ CU CELULE STEM CARDIACE, ÎN INFARCTUL MIOCARDIC EXPERIMENTAL LA ȘOBOLAN

Obiective

Obiectivul nostru principal a fost acela de a demonstra rolul morfologic și funcțional al TC în repararea și regenerarea cardiacă din infarctul miocardic experimental la șobolan, indus prin ligaturarea arterei coronare stângi. Pentru aceasta ne-am propus evaluarea gradului de reținere și „grefare” al celulelor transplantate și evaluarea remodelării și funcției cardiace, prin ecocardiografie standard și tehnici noi, respectiv TDI și STE, în urma terapiei regenerative celulare în infarctul miocardic experimental la șobolan.

Metode

Standarde etice. Protocolul de studiu a respectat Ghidul de îngrijire și folosire a animalelor de laborator publicat de Institutul Național de Sănătate din America, revizuit în 1996, și a fost aprobat de către Comisia de Etică a Institutului Național de Cercetare și Dezvoltare în Domeniul Patologiei și Științelor Biomedicale „Victor Babes” din București.

Animalele și design-ul studiului. Animalele au fost găzduite în cuști individuale într-un mediu controlat, la o temperatură de 22°C și un ciclu lumină/întuneric de 12 ore, și au fost hrănite cu mâncare standard și apă *ad libitum*. Lotul de studiu a fost compus din **20 de șobolani** de laborator masculi din specia **Wistar** cu vârstă de 21±2 săptămâni, cu infarct miocardic produs prin ligaturarea arterei coronare stângi. Aceștia au fost împărțiți în mod egal, aleator, în 4 loturi, după cum urmează:

1. **Lotul control**, la care s-a introdus doar soluție salină tamponată cu fosfat (PBS) fără celule
2. **Lotul TC**, la care s-a efectuat transplant de celule interstițiale, conținând TC,
3. **Lotul TCCS**, la care s-a efectuat transplant de celule interstițiale, conținând TC împreună cu CS,
4. **Lotul CS**, la care s-a efectuat transplant de CS.

Menționăm că design-ul inițial al studiului implica efectuarea transplantului celular la 24 de ore de la inducerea infarctului miocardic, însă aând în vedere rata de mortalitate de 100% din timpul transplantului celular la 24 de la inducerea infarctului miocardic experimental, indiferent de specia folosită, am considerat că stresul anestezic și operator la care sunt supuși șobolanii de laborator într-un interval de 24 ore nu este compatibil cu supraviețuirea și astfel s-a renunțat la efectuarea transplantului celular la 24 ore de la ligaturarea arterei coronare stângi. Așadar transplantul celular s-a realizat cu succes la 48 de ore de la inducerea infarctului miocardic experimental. Șobolanii au fost evaluați ecocardiografic la 24 de ore de la ligaturarea arterei coronare stângi, acesta reprezentând momentul 1, și la 72 de ore de la transplant, respectiv momentul 2. Sacrificarea pentru a se efectua analiza celulară, s-a produs prin dislocație cervicală, imediat după a doua evaluare ecocardiografică, deoarece marker-ul folosit pentru colorarea suspensiilor celulare dispăre, fiind

metabolizat, după maxim 96 ore, și astfel nemaiputând fi vizualizat prin metodele de microscopie cu fluorescență și citometrie în flux.

Obținerea culturilor celulare.

Culturile de celule interstițiale, conținând telocite au fost obținute folosind un protocol complex standardizat, iar pentru obținerea **culturilor de celule stem cardiace** au fost folosite celule stem cardiace, ce au fost furnizate prin amabilitatea Anversa P. *et al.* (86).

Marcarea celulară.

Culturile de celulele interstițiale, conținând telocite au fost incubate cu 0,5 microg/ ml Calceina AM (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) timp de 30 de minute, într-un mediu fără ser. Apoi celulele au fost detașate și spălate extensiv cu 1% PBS, suplimentat cu fosfat. **Culturile de celulele stem cardiace** au fost incubate cu 1,5 microg/ml Vybrant Dil (Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, USA) timp de 30 de minute, într-un mediu fără ser, apoi spălate și suspendate într-o soluție tampon pentru transplant.

Anestezia și protocolul de inducere a infarctului miocardic au fost aceleași cu cele descrise în studiul anterior (capitolul 5).

Transplantul celular s-a efectuat intramiocardic la 48 de ore de la ligaturarea arterei coronare stângi. În vederea intervenției chirurgicale, șobolanul, anesteziat în prealabil, a fost intubat cu un cateter de teflon cu diametrul de 16 G (Suru International Pvt. Ltd., Mumbai, India) și conectat la un ventilator mecanic (CWE SAR-830/P Ardmore, PA, USA). A fost apoi așezat în decubit lateral drept pe o masă specială încălzită (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA), cu monitorizarea permanentă a temperaturii rectale și menținerea acesteia la 37°C și a traseul electric cu ajutorul unui monitor veterinar special (VET-420F, Goldway US Inc., NY, USA). S-a efectuat toracotomie stânga între coastele 3 și 4, la nivelul inciziei realizate la prima intervenție chirurgicală, și după ce s-a inspectat cu atenție cicatricea de infarct, cu delimitarea clară a zonei centrale de necroză și a zonei de graniță, suspensiile de celule marcate au fost injectate intramiocardic, cu ajutorul unei seringi HELMJECT (Helm Pharmaceuticals GmbH, Hamburg, Germany), folosind un ac de 27 G, în zona de graniță în 3 locuri diferite, folosind aceleași repere anatomice de fiecare dată. În vederea transplantului s-au folosit două seringi diferite pentru fiecare tip celular în parte. Fiecare seringă a conținut un număr de 10^6 celule distribuite într-un volum de 0,1ml, ce a fost injectat intramiocardic în 3 părți egale în cele 3 locuri stabilite anterior. Pentru terapia regenerativă mixtă, primele inecate au fost suspensiile de celule interstițiale conținând TC și ulterior suspensiile de CS. S-a încercat, pe cât cu putință, ca locul injectării să fie același pentru cele două tipuri celulare. După efectuarea transplantului, pașii ulteriori au fost aceeași conform protocolului descris pentru intervenția chirurgicală de inducere a infarctului miocardic. Pe scurt, toracele a fost închis, plaga acoperită cu lichid bacteriostatic, animalul a fost detubat și așezat într-o cușcă individuală și s-au realizat analgezia și antibioterapia corespunzătoare, pe o perioadă de trei zile, până în momentul sacrificării.

Microscopia optică și electronică de transmisie. Pentru evaluarea histologică, examinarea fragmentelor de țesut miocardic a fost efectuată cu microscopul optic pe secțiuni semifine de 1 micron grosime. Colorarea secțiunilor semifine a fost făcută cu albastru de toluidină 1%. Au fost achiziționate imagini cu o cameră digitală specială CCD Axiocam HRc Zeiss, atașată unui microscop Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments, Inc., Tokyo, Japan), fiind folosite obiective Nikon Plan 40X și Nikon Plan Fluor 100X. Cameră era conectată la un computer, pe care era

instalat un program special Axio Vison (Carl Zeiss Imaging Solution GmbH, Oberkochen, Germany). Pentru analiza celulară prin microscopia electronică de transmisie, au fost recoltate imediat după sacrificarea animalului, fragmente de țesut cardiac, din zona unde s-a efectuat transplantul celular, ținând cont de reperele anatomice stabilite anterior. Aceste fragmente au fost apoi prelucrate, după un procedeu standard. Examinarea a fost efectuată la un microscop electronic cu transmisie Morgagni 268 la 80kV (FEI Company, Eindhoven, Netherlands). Imaginile relevante au fost achiziționate folosind o cameră digitală specială CCD MegaView III și un program special (Olympus, Soft Imaging System GmbH, Germany).

Microscopia cu fluorescență. Pentru evaluarea la microscopul cu fluorescență, fragmentele de țesut cardiac recoltate din zona unde s-a efectuat transplantul celular, au fost înghețate la -24°C timp de două ore. Au fost ulterior tăiate în secțiuni de 4 micrometri grosime, folosind un ultramicrotom Leica CM1510S (Leica Microsystems Wetzlar, Germany). Examinarea a fost efectuată folosind un microscop Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan), iar imaginile relevante au fost achiziționate folosind cameră digitală CCD AxioCam HRC Zeiss și programul AxioVision (Carl Zeiss Imaging solution GmbH, Oberkochen, Germany). Au fost alese filtre UV pentru verde (Calceina) și roșu (Vybrant Dil). Pentru a atesta prezența semnalului de fluorescență ca aparținând celulelor, s-a folosit contramarcare cu DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride), care a marcat nucleii în culoarea albastră. Semnalele pozitive au fost considerate cele din vecinătatea nucleilor colorați cu DAPI.

Citometria în flux. Pentru examinarea celulară prin citometria în flux a fost recoltată o probă din țesutul cardiac din zona unde s-a efectuat transplantul celular și o probă control din țesutul cardiac aflat la distanță de zona de infarct, respectiv de la nivelul ventriculului drept. Celulele transplantate marcate fluorescent (celulele interstițiale conținând TC cu Calceina AM, respectiv CS cu Vybrant Dil), au fost examinate folosind aparatul de citometrie în flux (FACSCanto II; Becton, Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA).

Protocolul ecocardiografic. Protocolul ecocardiografic folosit a fost cel elaborat pentru evaluarea infarctului miocardic experimental la șobolanii de laborator. Totuși, în plus față de acesta au fost analizați următorii parametri: fracția de modificare a ariei VS, raportul E/E' septal, deformarea miocardică sistolică circumferențială (DMCS) și radială (DMRS) segmentară la nivelul septului anterior, peretelui anterior și peretelui lateral. Remodelarea VS a fost cuantificată prin grosimea PAVS, aria VS și volumul VS, măsurate atât în sistolă, cât și în diastolă. Funcția cardiacă globală a VS a fost estimată prin indicele de performanță miocardică, în timp ce funcția sistolică globală a VS prin FS, fracția de modificare a ariei VS, FEVS și indicele cardiac. Funcția sistolică longitudinală a fost evaluată prin MAPSE septal și S' VS septal, iar funcția sistolică radială și circumferențială, prin parametri derivați din STE. Funcția diastolică a VS a fost estimată prin raportul E/E' septal.

Analiza statistică. Analiza statistică s-a efectuat folosind programul SPSS versiunea 19 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Pentru variabilele utilizate au fost prezentate valorile extreme, media și deviația standard, și a fost verificată ipoteza normalității, atât prin aprecierea existenței unei simetrii cu ajutorul medianei și a cuartilelor, cât și prin utilizarea mai multor teste de normalitate, precum testul Shapiro-Wilk. Momentul 1 a fost definit la 24 de ore după inducerea infarctului miocardic și momentul 2, la 72 de ore de la efectuarea transplantului intramiocardic. S-a analizat inițial, prin testele Levene și Bonferroni, dacă cele patru loturi au fost omogene la momentul 1, respectiv

înainte de transplantul celular. În urma aplicării testului t pentru eşantioane perechi separat pe loturi, s-a efectuat analiza comparativă între cele două momente, în cadrul aceluiaşi lot. Pentru analiza comparativă a evoluţiei unui anumit parametru între cele patru loturi după transplantul celular, s-a construit o nouă variabilă, reprezentată de diferenţa dintre momentul 2 şi momentul 1. Pentru a determina perechile ce prezintă diferenţe semnificative s-au aplicat testele Levene pentru analiza omogenităţii varianţelor şi Bonferroni pentru comparaţii multiple. Rezultatele au fost exprimate ca medie $\pm$ deviaţia standard. A fost considerată semnificativă statistic valoarea p (two-tailed) mai mică de 0,05. Reprezentarea grafică a fost realizată cu ajutorul programul GraphPad Prism 5 pentru Windows.

Rezultate

Caracteristicile generale ale loturilor. Suprafaţa corporală medie a întregului lot de şobolani de laborator a fost $431 \pm 29 \text{ g/cm}^2$. Se observă că lotul control şi cel cu CS nu diferă între ele, însă şobolanii din loturile TCCS şi TC au avut o suprafaţă corporală mai mare comparativ cu lotul control ($p < 0,05$). Menţionăm că alegerea şobolanilor de laborator ce au fost incluşi în studiu s-a făcut în funcţie de vârstă, aceasta fiind între 21 ± 2 săptămâni. În ceea ce priveşte frecvenţa cardiacă, nu s-au observat modificări semnificative între loturi la 24 ore după inducerea infarctului miocardic, însă s-a remarcat creşterea frecvenţei cardiace la 72 ore după transplant celular în loturile TC şi TCCS.

Microscopie optică şi electronică de transmisie. La 5 zile de la inducerea infarctului miocardic pe secţiunile histologice, colorate cu albastru de toluidină şi examinate la microscopul optic s-a observat leziunea tipică de infarct miocardic. Cu ajutorul microscopului electronic de transmisie, la lotul control s-a observat un număr mai mare de celule mononucleare (posibil precursori de macrofage), comparativ cu loturile la care s-au transplantat celule interstiţiale, conţinând TC. La animalul cu transplant de celule interstiţiale, conţinând TC se pot observa, în periferia zonei de necroză, celule cu prelungiri citoplasmatiche lungi care îndeplinesc criteriile ultrastructurale pentru a fi denumite TC (Figura 6.4), precum şi celule mononucleare. În anumite regiuni, TC par a fi aglomerate în imediata vecinătate a cardiomiocitelor restante. Dacă la lotul control, celulele mononucleare erau la distanţă de cardiomiocite, la şobolanii de laborator la care s-au transplantat celule interstiţiale conţinând TC, celulele mononucleare au fost observate în strânsă vecinătate cu cardiomiocitele.

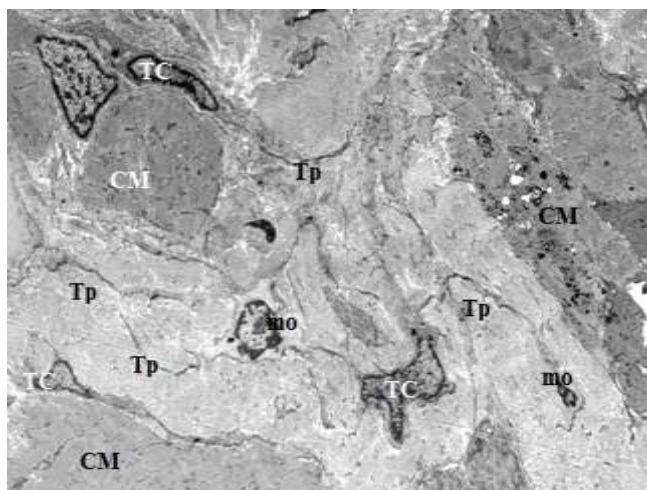


Figura 6.4 Microscopie electronică de transmisie în zona periferică de infarct miocardic la 5 zile la animal la care s-au transplantat celule interstiţiale, conţinând TC; se observă celule cu numeroase prelungiri citoplasmatiche (Tp) cu aspect de telocite (TC) şi rare celule mononucleare (mo); CM, cardiomiocite (imagine reprodusă prin amabilitatea Dr. Mihaela Gherghiceanu)

Microscopia cu fluorescență. În fragmentele din lotul TC au fost identificate la 72 de ore de la transplant, TC marcate cu Calceina, demonstrându-se astfel viabilitatea lor. TC sunt vizualizate în verde, iar nucleii celulelor, fiind colorați cu DAPI sunt de culoare albastră, așa cum se poate observa în imaginea de mai jos.

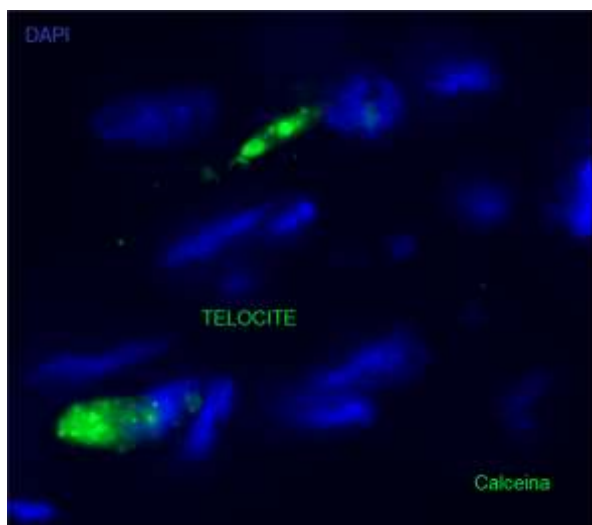


Figura 6.8 Microscopia cu fluorescență (mărire: 630X)- fragment de țesut cardiac de la animal din lotul TC, recoltat la 72 de ore de la transplant; se observă în zona periferică a leziunii de infarct celulele marcate cu Calceina (culoare verde); DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole (imagine reprodusă prin amabilitatea Dr. C.G. Manole)

În lotul TCCS au fost identificate prin microscopia cu fluorescență, la 72 de ore de la transplant, ambele categorii de celule, TC, de culoare verde, marcate cu Calceina și CS, de culoare roșie, marcate cu Vybrant Dil. Imaginea de mai jos indică prezența celulelor transplantate cu semnal pozitiv pentru marker-ul cu care au fost etichetate. Se observă o vecinătate strânsă, din punct de vedere al microscopiei optice, între cele două categorii celulare ce au fost transplantate succesiv.

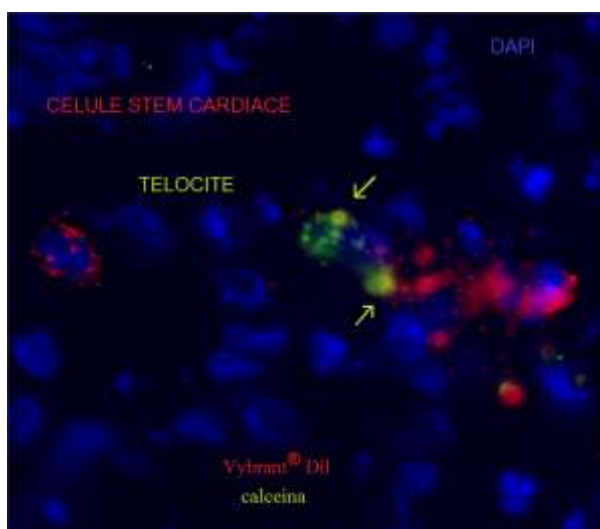


Figura 6.9 Microscopia cu fluorescență (mărire: 630X)- fragment de țesut cardiac de la animal din lotul TCCS, recoltat la 72 de ore de la transplant; se observă în zona periferică a leziunii de infarct celulele marcate cu Calceina (culoare verde) și celulele marcate cu Vybrant Dil (culoare roșie); se remarcă distanța mică dintre cele două categorii de celule transplantate (săgeți); DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole (imagine reprodusă prin amabilitatea Dr. C.G. Manole)

De asemenea și în lotul CS au fost identificate celulele marcate cu Vybrant Dil, de culoare roșie, prin microscopia cu fluorescență, la 72 de ore după ce au fost transplantate, așa cum se vizualizează în imaginea de mai jos. Faptul că ele au putut fi identificate în zona unde s-a efectuat transplantul, înseamnă că sunt viabile și că nu au migrat.

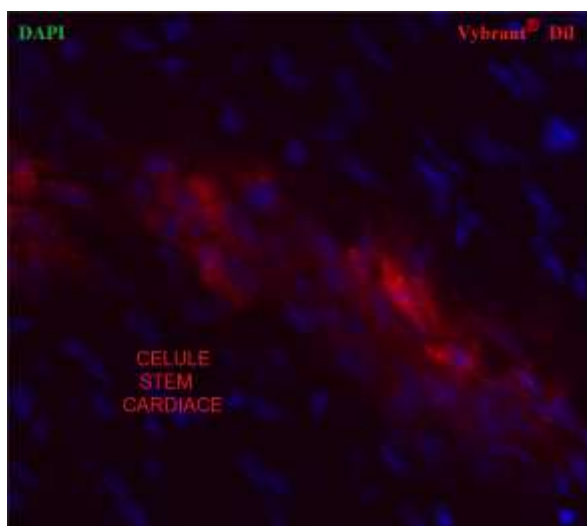


Figura 6.10 Microscopia cu fluorescență (mărire: 630X)- fragment de țesut cardiac de la animal din lotul CS, recoltat la 72 de ore de la transplant; se observă în zona periferică a leziunii de infarct celulele marcate cu Vybrant Dil (culoare roșie); DAPI, 4',6-diamidino-2-fenylindole (imagine reprodusă prin amabilitatea Dr. C.G Manole)

Citometrie în flux. În lotul TC, cu ajutorul citometriei în flux au fost identificate la 72 de ore de la transplant, un procent semnificativ de celulele marcate cu Calceina în proba obținută din țesutul cardiac cu infarct miocardic, recoltată din locul unde s-a efectuat transplantul, comparativ cu proba control, reprezentată de un fragment din aceeași inimă, dar recoltat dintr-o zonă fără infarct, respectiv de la nivelul ventriculului drept. Acest rezultat este exemplificat în figura de mai jos.

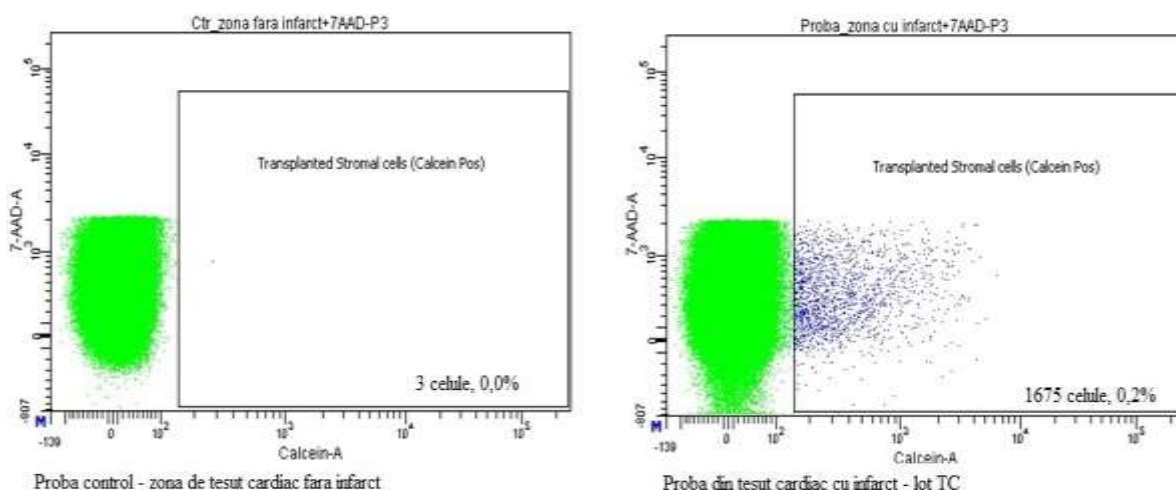


Figura 6.11 Citometrie în flux – analiza lotului TC; axa PE vertical indică celule vii/moarte (vii = negative pentru 7AAD), iar axa orizontală este pentru Calceina care marchează celule interstițiale, inclusiv TC; la proba din țesut cardiac cu infarct se observă un procent semnificativ de celule transplantate (imagine reprodusă prin amabilitatea lui V. Cismasiu)

În lotul TCCS, s-a observat la analiza prin citometrie în flux realizată la 72 de ore de la transplant, un număr mai mare de celulele marcate cu Calceina, respectiv celule interstițiale conținând TC și celule marcate cu Vybrant Dil, respectiv CS, în proba obținută din testul cardiac cu infarct miocardic, recoltată din locul unde s-a efectuat transplantul, comparativ cu proba control (Figura 6.12).

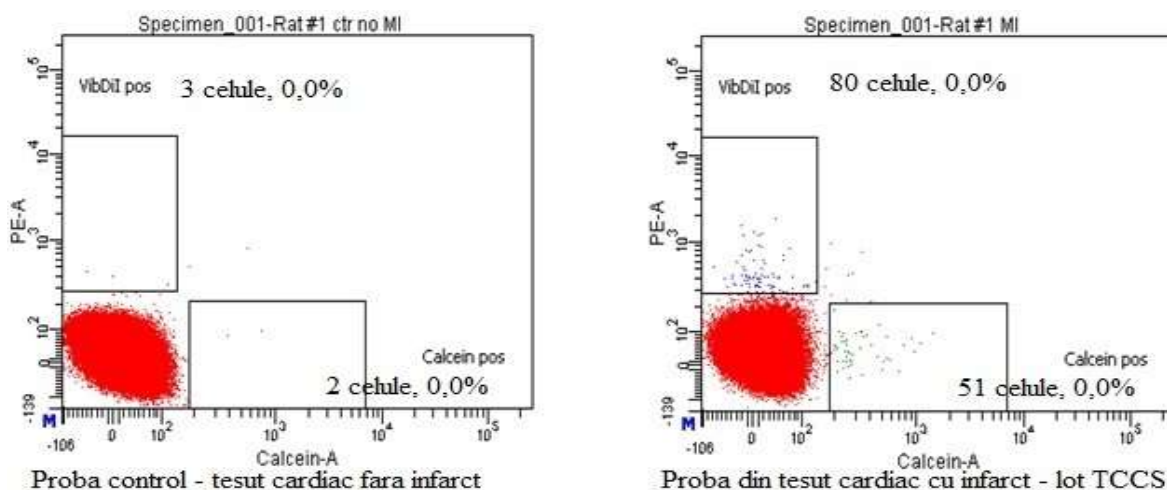


Figura 6.12 Citometrie în flux – analiza lotului TCCS; axa PE vertical indică celule stem cardiace marcate cu Vybrant DiI; axa orizontală este pentru calceina care marchează celule interstițiale, inclusiv TC; s-au detectat celule transplantate din ambele categorii (imagine reprodusă prin amabilitatea lui V. Cismasiu)

În lotul CS s-au detectat la 72 de ore de la transplant, câteva celulele marcate cu Vybrant DiI în proba obținută din țesutul cardiac cu infarct miocardic, recoltată din locul unde s-a efectuat transplantul, comparativ cu proba control, așa cum se remarcă din figura de mai jos.

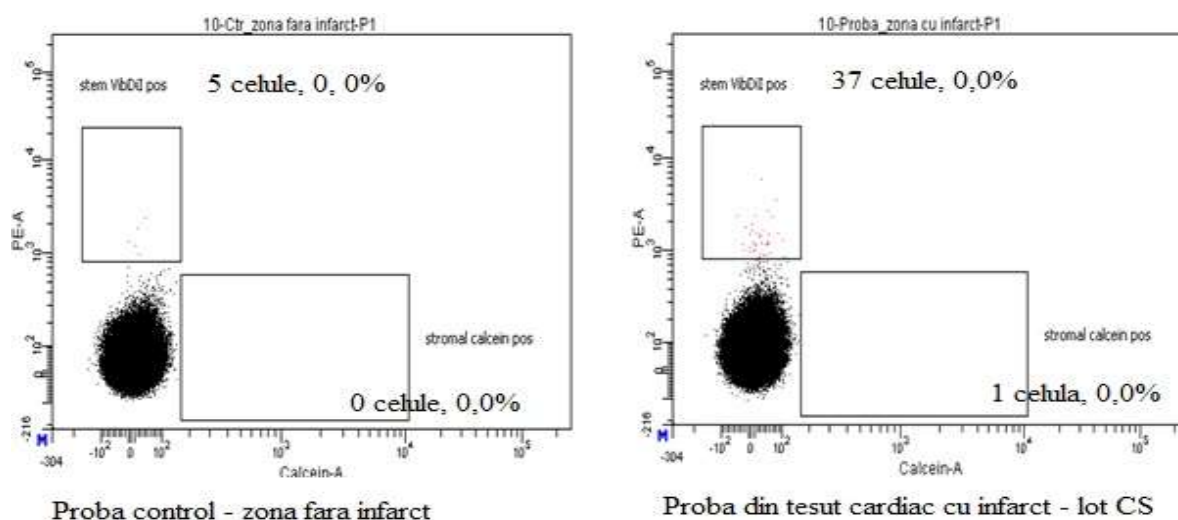


Figura 6.13 Citometrie în flux – analiza lotului CS; axa PE vertical indică celule stem cardiace marcate cu Vybrant DiI; s-au detectat câteva celule pozitive; axa orizontală este pentru Calceina- nu s-au detectat celule interstițiale marcate cu Calceina (imagine reprodusă prin amabilitatea lui V. Cismasiu)

Parametrii ecocardiografici.

Remodelarea VS, apreciată prin grosimea peretelui anterior al VS, atât în sistolă, cât și în diastolă, nu diferă semnificativ între loturi, nici la momentul 1 și nici între două momente de timp.

S-a observat însă o creștere semnificativă statistic a ariei VS măsurată în sistolă la 72 ore după transplant celular comparativ cu cea de la 24 ore după infarct miocardic, în cadrul lotului TCCS ($p<0,01$).

Tabelul 5.5 Aria VS măsurată în sistolă înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	25,02±2,48*	28,41±3,37	0,09
TC	19,66±2,01	24,21±8,02	0,2
TCCS	19,93±2,32	25,77±4,77	0,01
CS	18,15±3,67	24,15±8,41	0,1

* $p<0,05$ in lotul control vs. celelate 3 loturi la momentul 1

Analizând comparativ cele 4 loturi la momentul inițial, s-a remarcat că lotul control diferă semnificativ de celelate loturi, prezentând o arie sistolică a VS mai mare ($p<0,05$). Totuși ele au prezentat aceeași evoluție a creșterii ariei sistolice a VS, așa cum se remarcă din tabelul de mai jos.

Tabelul 5.6 Evoluția ariei VS măsurată în sistolă între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_AVS_sistolă*
control	-,04	9,14	3,39±3,46
TC	-0,28	16,58	4,55±6,82
TCCS	1,92	9,83	5,84±3,23
CS	-,35	14,94	5,89±6,51

*toate $p>0,05$

În schimb, în ceea ce privește aria VS măsurată în diastolă, s-a remarcat o creștere semnificativă statistic pentru toate cele 4 loturi, la 72 ore după transplantul celular față de valoarea acestuia la 24 ore după ligaturarea arterei coronare stângi.

Tabelul 5.7 Aria VS măsurată în diastolă înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	40,47±2,03	46,50±4,26	0,03
TC	38,68±3,15	48,82±6,76	0,01
TCCS	38,19±3,39	50,17±6,94	<0,01
CS	35,40±5,30*	46,69±7,04	<0,01

* $p>0,04$ pentru lotul CS vs. lotul control la momentul 1

Comparând valorile medii la momentul inițial, s-a observat că aria VS măsurată în diastolă a fost mai mare în lotul CS, comparativ cu lotul control ($p=0,04$), însă fără diferențe între celelalte loturi. Totuși s-a demonstrat, în urma asumării egalității varianțelor prin testul Levene ($p=0,9$), prin analiza comparativă a distribuției variabilei dif_AVS_diastolă, că cele patru loturi au prezentat aceeași evoluție a creșterii ariei VS diastolice (toate $p>0,05$).

Tabelul 5.8 Evoluția ariei ventriculului stâng în diastolă între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_AVS_diastolă*
control	-,63	9,69	6,03±4,42
TC	4,62	17,41	10,13±4,90
TCCS	2,98	18,09	11,99±5,61
CS	7,21	17,51	11,28±4,40

*toate $p>0,05$

Nu s-a observat nicio diferență semnificativă statistic în cadrul fiecărui lot între *volumul VS* măsurat în sistolă la 72 ore după transplantul celular, comparativ cu cel de la 24 ore după infarctul miocardic (toate $p > 0,05$), așa cum se remarcă în tabelul de mai jos.

Tabelul 5.9 Volumul VS în sistolă înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	0,17±0,02	0,21±0,05	0,2
TC	0,13±0,04	0,14±0,02	0,8
TCCS	0,13±0,01	0,15±0,07	0,1
CS	0,23±0,04*	0,27±0,06	0,06

* $p < 0,05$ pentru lotul CS vs. celelalte 3 loturi la momentul 1

La momentul inițial, s-a observat că lotul CS diferă semnificativ de celelalte loturi printr-un volum sistolic al VS mai mare ($p < 0,05$), însă loturile control, TC și TCCS nu au prezentat diferențe semnificative statistic între ele. În ceea ce privește variabila dif_volVS_sistolă, nu s-a observat o diferență semnificativă statistic între cele patru loturi, așa cum se remarcă din tabelul de mai jos.

Tabelul 5.10 Evoluția volumului ventriculului stâng în sistolă între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_volVS_sistolă*
control	-0,04	0,15	0,04±0,06
TC	-0,10	0,07	0,01±0,07
TCCS	-0,01	0,18	0,05±0,07
CS	0,01	0,10	0,04±0,03

*toate $p > 0,05$

S-a observat că volumul VS măsurat la sfârșitul diastolei, la 72 ore după transplantul celular, crește semnificativ statistic în loturile în care s-au transplatat CS, respectiv loturile TCCS și CS, comparativ cu cel de la 24 ore după infarctul miocardic ($p < 0,05$).

Tabelul 5.11 Volumul VS măsurat în diastolă înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	0,29±0,01	0,35±0,06	0,1
TC	0,28±0,10	0,32±0,06	0,5
TCCS	0,24±0,02*	0,39±0,09	0,02
CS	0,35±0,06	0,43±0,09	0,04

* $p < 0,05$ pentru lotul TCCS vs. loturile control și CS la momentul 1

La momentul inițial, s-a remarcat faptul că lotul TCCS are volumul diastolic al VS semnificativ mai mic comparativ cu loturile control și CS ($p < 0,05$), însă fără alte diferențe între celelalte loturi. Chiar dacă loturile nu au fost omogene la momentul 1, nu s-a observat o diferență semnificativă statistic în ceea ce privește evoluția volumului VS în diastolă între cele patru loturi.

Tabelul 5.12 Evoluția volumului VS măsurat în diastolă între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_volVS_diastolă*
control	0,00	0,15	0,06±0,06
TC	-0,16	0,17	0,04±0,13
TCCS	0,10	0,30	0,15±0,08
CS	0,00	0,13	0,08±0,06

*toate $p > 0,05$

Funcția sistolică a VS evaluată prin parametrii ecocardiografici standard.

MAPSE septal.

La 72 ore după transplantul de celule interstițiale, ce conțin TC și CS, se observa o îmbunătățire a funcției sistolice longitudinale a ventriculului stâng, evaluată prin MAPSE septal, așa cum se remarcă din tabelul de mai jos.

Tabelul 5.13 MAPSE septal înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	1,28 ±0,24	1,50±0,19	0,05
TC	1,60±0,11	1,79±0,17	0,1
TCCS	1,42±0,20	1,79±0,24	0,04
CS	1,31±0,05	1,30±0,09	0,7

* $p < 0,05$ pentru lotul TC vs. loturile control și CS la momentul 1

Din analiza comparativă a loturilor la 24 ore după inducerea infarctului miocardic, se observă că lotul TC prezintă o funcție sistolică longitudinală a VS, evaluată prin MAPSE septal, mai bună comparativ cu loturile control și CS, $p < 0,01$, respectiv $p = 0,01$. Menționăm că lotul cu TCCS nu diferă semnificativ la momentul 1 comparativ cu celelalte trei loturi. În urma comparării loturilor prin prisma noii variabile construite dif_MAPSE septal, se observă că lotul TCCS prezintă o creștere semnificativă a funcției longitudinale a ventriculului stâng, comparativ cu lotul CS, $p < 0,01$.

Tabel 5.14 Evoluția MAPSE septal între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_MAPSE septal
control	0,03	0,52	0,22±0,18
TC	-0,07	0,51	0,20±0,21
TCCS	-0,11	0,63	0,38±0,30*
CS	-0,10	0,07	-0,01±0,06

* $p = 0,01$ pentru lotul TCCS vs. lotul CS

Fracția de scurtare a VS.

Nu se observă o ameliorare semnificativă a FS în cadrul niciunuia dintre loturi, la momentul 2 comparativ cu momentul 1.

Tabelul 5.15 Fracția de scurtare a VS înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	25±5	26±7	0,8
TC	32±7	31±11	0,7
TCCS	38±9*	39±13	0,5
CS	29±7	33±11	0,1

* $p = 0,02$ pentru lotul TC vs. lotul control la momentul 1

Se remarcă, la momentul inițial, că lotul TCCS are FS semnificativ mai crescută comparativ cu lotul control, $p = 0,02$. După asumarea omogenității variantelor prin testul Levene ($p = 0,5$), în urma analizei comparative, între cele patru loturi prin noua variabilă construită, respectiv dif_FS, nu s-a obținut nicio diferență semnificativă statistic în evoluția FS între cele patru loturi în urma transplantului (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.16 Evoluția fracției de scurtare între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_FS*
control	-0,14	0,09	0,9±9
TC	-0,11	0,06	-0,9±6
TCCS	-0,04	0,09	1,4±5
CS	-0,02	0,09	3,5±4

* toate $p > 0,05$

Fracția de modificare a ariei VS.

Niciunul dintre cele patru loturi nu a prezentat o îmbunătățire semnificativă statistic a FAC după transplant. S-a observat că lotul de control diferă semnificativ la 24 ore după infarct de celelalte loturi printr-o fracție de modificare a ariei VS mai mică ($p < 0,01$).

Tabelul 5.17 Frația de modificare a ariei VS înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	38±7*	39±2	0,7
TC	49±3	51±9	0,6
TCCS	48±3	49±4	0,8
CS	49±3	49±12	0,9

* $p < 0,05$ pentru lotul control vs. celelalte 3 loturi la momentul 1

Comparând loturile între ele prin intermediul variabilei dif_FAC, nu se remarcă o diferență semnificativă statistic (toate $p > 0,5$).

Tabelul 5.18 Evoluția fracției de modificare a ariei între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_FAC*
control	-0,09	0,07	1±7
TC	-0,13	0,08	2±9
TCCS	-0,06	0,08	0,8±7
CS	-0,14	0,10	0,5±12

* toate $p > 0,05$

Fracția de ejeție a VS.

Nu există o creștere semnificativă a FEVS între cele două momente în niciunul dintre cele patru loturi, așa cum se remarcă din tabelul de mai jos.

Tabelul 5.19 Frația de ejeție a VS înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	41±7	40±4	0,7
TC	52±3*	57±7	0,2
TCCS	43±8	52±9	0,1
CS	35±4	37±8	0,4

* $p < 0,05$ pentru lotul TC vs. loturile control si CS

Se remarcă, la 24 de ore după inducerea infarctului miocardic, că lotul TC, a prezentat FEVS semnificativ mai mare comparativ cu loturile control și CS, $p = 0,01$, respectiv $p < 0,01$.

În urma comparării loturilor prin variabila dif_FEVS, după asumarea egalității variantelor ($p = 0,3$), prin aplicarea testului pentru comparații multiple, se observă că niciunul dintre cele patru loturi nu diferă semnificativ față de celelalte (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.20 Evoluția fracției de ejeție a VS între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_FEVS*
control	-0,16	0,12	1±12
TC	-0,08	0,14	6±8
TCCS	-0,04	0,26	9±11
CS	-0,03	0,11	2±6

* toate $p > 0,05$

Indicele cardiac.

Nu s-a obținut nicio creștere semnificativă statistic a indicelui cardiac în cadrul aceleiași lot la 72 ore post transplant celular, așa cum se remarcă în tabelul de mai jos.

Tabel 5.21 Indicele cardiac (ml/min/cm²) înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1*	MOMENTUL 2	p
control	118 ±35	160±50	0,1
TC	107±17	143±25	0,06
TCCS	105±31	157±28	0,06
CS	125±36	130±30	0,5

*toate $> 0,05$

Nu s-au observat diferențe semnificative între loturi la momentul inițial (toate $p > 0,05$) și nu s-au înregistrat diferențe semnificative în urma comparării loturilor prin variabila nou construită dif_indice cardiac, evoluția acestui parametru fiind similară între cele patru loturi (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.22 Evoluția indicelui cardiac între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_indice cardiac*
control	-20	90	42±48
TC	0	80	35±30
TCCS	10	110	53±46
CS	-10	30	6±18

*toate $p > 0,05$

S-au analizat, de asemenea, separat volumul bătaie și debitul cardiac, fără să se înregistreze diferențe între loturi la momentul 1 sau evoluție diferită a acestor parametrii între cele două momente.

Indicele de performanță miocardică.

Nu s-au observat diferențe semnificative ale indicelui de performanță miocardică în cadrul aceleiași lot la 72 ore post transplant, față de cel de la 24 ore după infarctul miocardic, așa cum se remarcă din tabelul de mai jos.

Tabelul 5.27 Indicele de performanță miocardică înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1*	MOMENTUL 2	p
control	0,42±0,11	0,38±0,19	0,6
TC	0,43±0,13	0,36±0,21	0,6
TCCS	0,43±0,24	0,44±0,11	0,9
CS	0,52±0,10	0,53±0,12	0,9

*toate $> 0,05$

De asemenea nu s-au remarcat diferențe între loturi la momentul inițial (toate $p > 0,05$). Nu s-au înregistrat diferențe semnificative nici în urmă comparării celor patru loturi prin variabila nou construită dif_indice de performanță miocardică (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.28 Evoluția indicelui de performanță miocardică între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_indice de performanță miocardică *
control	-0,17	0,20	-0,04±0,14
TC	-0,52	0,20	-0,07±0,28
TCCS	-0,43	0,24	0,01±0,26
CS	-0,21	0,15	0,01±0,14

* toate $p > 0,05$

Funcția sistolică a VS evaluată prin parametrii ecocardiografici noi:

Parametrii TDI - S' VS septal.

La 72 ore după transplant funcția sistolică longitudinală a VS, evaluată prin S' VS septal nu prezintă o ameliorare semnificativă statistic în cadrul aceluiași lot (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.29 S'VS septal înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1	MOMENTUL 2	p
control	4,40±0,55	5,20±0,45	0,09
TC	5,40±1,14	5,40±0,89	1,0
TCCS	5,00±0,70*	5,40±0,89	0,4
CS	4,00±0,71*	4,40±0,55	0,3

* $p = 0,01$ pentru TCCS vs. lotul CS la momentul 1

Din analiza comparativă a loturilor la 24 ore după inducerea infarctului miocardic, s-a observat că lotul TCCS prezintă o funcție sistolică longitudinală a ventriculului stâng, evaluată prin S' VS septal, mai mare comparativ cu lotul CS, $p = 0,01$. Menționăm că celelalte trei loturi nu diferă semnificativ între ele în momentul 1. În urma comparării loturilor prin variabila dif_S'septal, nu se observă nicio creștere semnificativă statistic a funcției longitudinale a VS (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.30 Evoluția S'VS septal între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_S' VS septal*
control	0	2,0	0,8±0,8
TC	-1,0	1,0	0±0,7
TCCS	-1,0	2,0	0,4±1,1
CS	-1,0	1,0	0,4±0,9

* toate $p > 0,05$

Parametrii de deformare miocardică și rata deformării miocardice.

Deformarea miocardică sistolică circumferențială globală.

Așa cum se poate observa din graficul de mai jos nu s-a obținut o ameliorare semnificativă statistic a DMCG la 72 ore de la transplantul celular.

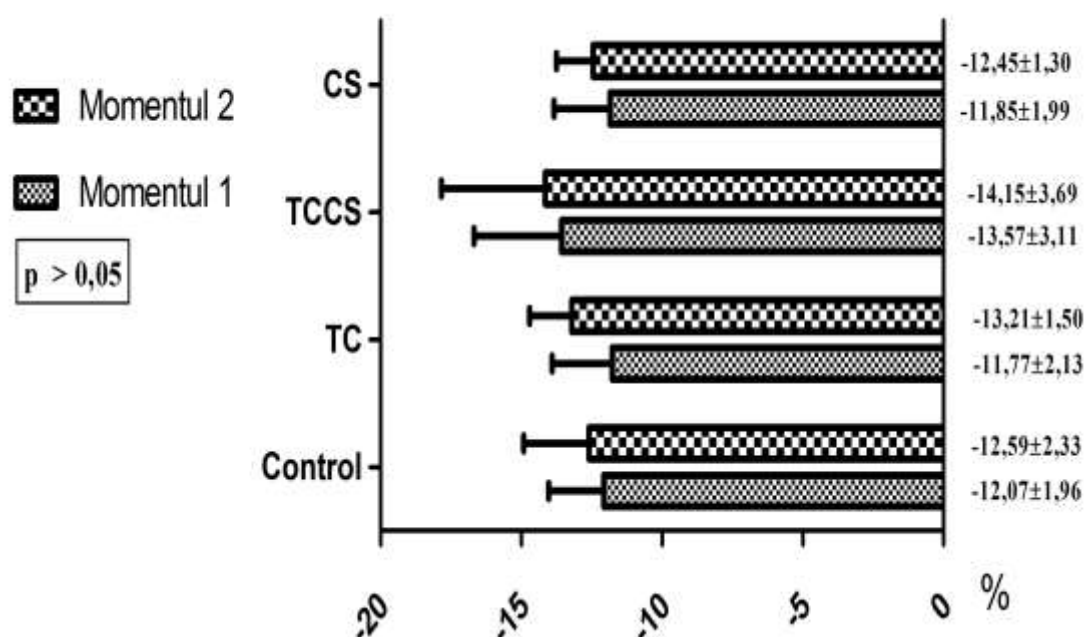


Figura 6.14 Deformarea miocardică sistolică circumferențială globală înainte și după transplantul celular

De asemenea nu există diferențe semnificative privind DMCG la momentul inițial între cele patru loturi (toate $p > 0,05$). Nu s-au obținut diferențe semnificative între cele patru loturi, nici când au fost comparate prin analiza variabilei nou construite, respectiv dif_DMCG (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.31 Evoluția deformării miocardice sistolice circumferențiale globale între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_DMCG*
control	-1,03	2,64	0,52±1,46
TC	-0,60	3,20	1,44 ±1,49
TCCS	-5,81	6,42	0,59±5,55
CS	-0,60	1,82	0,60±1,03

* toate $p > 0,05$

Deformarea miocardică sistolică circumferențială segmentară.

S-a analizat DMCS la nivelul pereților VS vascularizați de către artera coronară stângă, respectiv septul anterior, peretele anterior și peretele lateral. Nu există diferențe între cele două momente în cadrul niciunuia dintre loturi. De asemenea nu s-au obținut diferențe semnificative ale acestor parametri între loturi la momentul inițial (toate $p > 0,05$). S-au analizat, comparativ loturile între ele prin prisma noilor variabile construite, respectiv Dif_DMCS_sept_anterior, Dif_DMCS_perete_anterior, Dif_DMCS_perete_lateral. S-a remarcat o diferență semnificativă strict la nivelul peretelui lateral, privind îmbunătățirea deformării miocardice sistolice la acest nivel în lotul CS, comparativ cu lotul TCCS. Totuși chiar dacă nu s-a atins pragul semnificației statistice, se observă o îmbunătățire a DMCS la nivelul septului anterior și al peretelui anterior, în loturile în care au fost transplantate și celule interstițiale, conținând TC, spre deosebire de lotul control unde s-a obținut o scădere a DMCS la nivelul septului anterior și peretelui lateral.

Rata deformării miocardice sistolice circumferențiale globale.

Nu s-a observat o ameliorare semnificativă statistic privind RDMCG la 72 de ore după transplantul celular în niciunul dintre cele patru loturi.

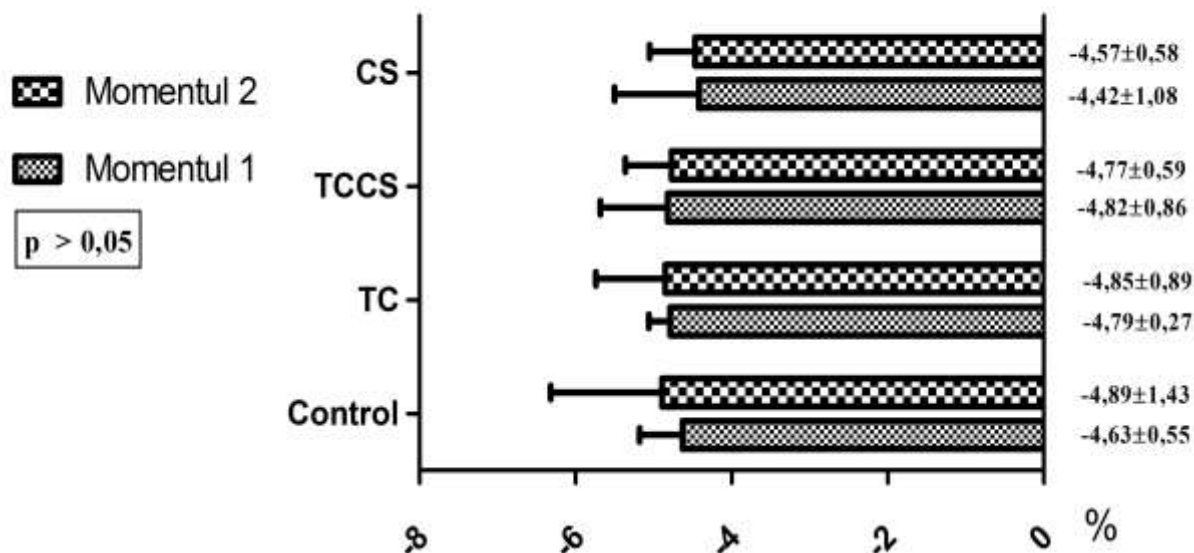


Figura 6.15 Rata deformării miocardice sistolice circumferențiale globale înainte și după transplantul celular

De asemenea nu s-au evidențiat diferențe semnificative între loturi privind acest parametru la momentul inițial (toate $p > 0,05$). Așa cum se evidențiază în tabelul de mai jos, nu au existat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește evoluția variabilei noi construite, dif_RDMCG, între cele patru loturi (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.37 Evoluția ratei deformării miocardice sistolice circumferențiale globale între cele două momente

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_RDMCG*
control	-1,73	1,98	0,27±1,42
TC	-0,94	0,87	0,05±0,69
TCCS	-1,56	1,69	-0,06±1,24
CS	-0,66	1,09	0,15±0,75

* toate $p > 0,05$

Deformarea miocardică sistolică radială globală.

Așa cum se observă din graficul de mai jos, nu s-a obținut o ameliorare semnificativă statistic a DMRG în cadrul aceluiași lot la 72 de ore de la transplantul celular.

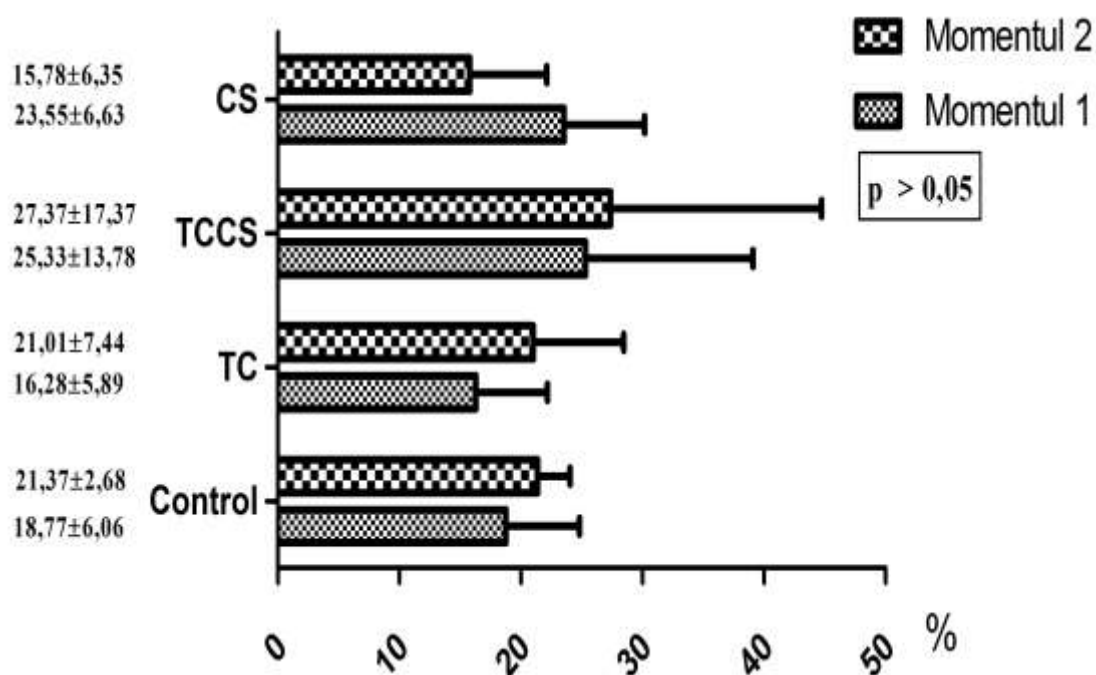


Figura 6.16 Deformarea miocardică sistolică radială globală înainte și după transplantul celular

De asemenea nu au existat diferențe semnificative statistic între cele patru loturi la momentul inițial (toate $p > 0,05$). În urma analizei variabilei noi, dif_DMRG, se remarcă în lotul CS o scădere semnificativă a DMRG, comparativ cu loturile control, TC, TCCS ($p < 0,05$), însă nu s-au obținut diferențe între loturile TC și TCCS comparativ cu lotul control, după cum se observă în tabelul de mai jos

Tabelul 5.38 Evoluția deformării miocardice sistolice radiale globale între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_DMRG
control	-2,58	13,49	2,59±6,32
TC	0,56	13,90	4,73±5,28
TCCS	-10,94	12,58	2,04±8,47
CS	-20,71	-1,48	-7,76±8,08*

* p pentru lotul CS = 0,03 vs. lotul control; 0,01 vs. lotul TC; 0,04 vs. lotul TCCS

Deformarea miocardică sistolică radială segmentară.

S-a analizat, de asemenea, DMRS la nivelul pereților vascularizați de către artera coronară stângă, respectiv septul anterior, peretele anterior și peretele lateral. Nu există diferențe între cele două momente în cadrul niciunuia dintre loturi. Nu s-au obținut diferențe semnificative ale acestor parametri între loturi la momentul inițial (toate $p > 0,05$). De asemenea, s-au analizat comparativ loturile între ele prin prisma noilor variabile construite, respectiv Dif_DMRS_sept_anterior, Dif_DMRS_perete_anterior, Dif_DMRS_perete_lateral. Nu se remarcă nicio diferență semnificativă statistic între cele patru loturi. Chiar dacă nu a atins pragul semnificației statistice, se observă totuși o îmbunătățire a DMRS la nivelul tuturor pereților afectați în urmă ligaturii arterei coronare stângi, în loturile în care au fost transplantate și celule interstițiale, conținând TC.

Rata deformării miocardice sistolice radiale globale.

În ceea ce privește RDMRG nu s-a observat o ameliorare semnificativă statistic între cele două momente, în cadrul aceluiași lot, după cum se remarcă și din graficul de mai jos.

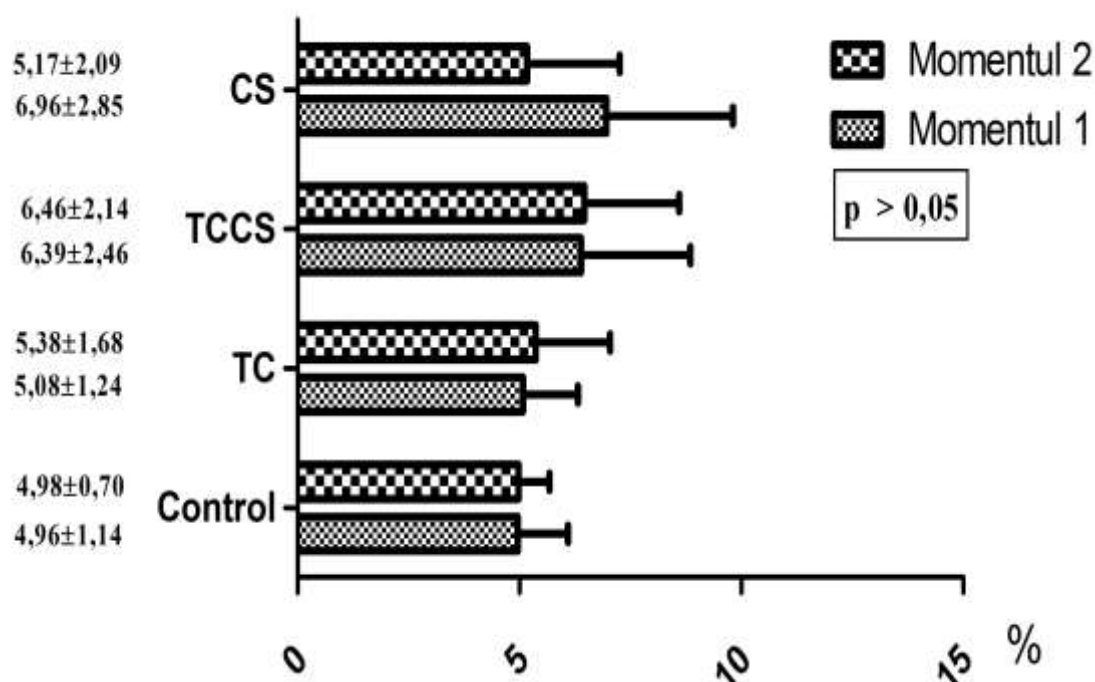


Figura 6.17 Rata deformării miocardice sistolice radiale globale înainte și după transplantul celular

De asemenea nu s-au evidențiat diferențe semnificative între loturi privind acest paramentru la momentul inițial (toate $p > 0,05$). Așa cum se evidențiază în tabelul de mai jos, nu au existat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește evoluția variabilei noi construite, dif_RDMRG, între cele patru loturi (toate $p > 0,05$).

Tabelul 5.44 Evoluția ratei deformării miocardice sistolice radiale globale între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_RDMCG*
control	-1,56	1,79	0,23±1,36
TC	-0,82	1,67	0,29±1,07
TCCS	-1,22	1,05	-0,07±1,06
CS	-4,34	1,90	-1,80±2,40

* toate $p > 0,05$

Funcția diastolică a VS.

Toate valorile raportului E/E' s-au încadrat între 8 și 13, respectiv în zonă gri. Nu s-a obținut o modificare semnificativă statistic a raportului E/E' în cadrul aceluiași lot la 72 ore post transplant celular, așa cum se observă din Tabelul 5.45.

Tabelul 5.45 Raportul E/E' înainte și după transplantul celular.

LOT	MOMENTUL 1*	MOMENTUL 2	p
control	10,36±3,32	11,40±3,1	0,7
TC	8,66±2,60	9,11±1,38	0,7
TCCS	9,63±1,94	9,69±1,49	0,9
CS	12,52±5,29	10,17±2,66	0,2

* toate $p > 0,05$

Nu s-au observat diferențe semnificative între loturi la momentul inițial (toate $p > 0,05$).

De asemenea nu s-au înregistrat diferențe semnificative în urmă comparării loturilor prin variabila nou construită dif_E/E', evoluția acestui parametru fiind similară între cele patru loturi (toate $p > 0,05$), așa cum se observă în tabelul de mai jos.

Tabelul 5.46 Evoluția raportului E/E' între cele două momente.

LOT	Diferența minimă	Diferența maximă	dif_E/E' *
control	-6,13	8,03	1,04±5,42
TC	-3,04	4,46	0,45±2,73
TCCS	-5,42	2,38	0,06±3,17
CS	-6,95	3,53	-2,35±3,92

* toate $p > 0,05$

Discuții

Rezultatele noastre au demonstrat, în primul rând, că celulele interstițiale, conținând TC, precum și CS, ce au fost transplantate, singure sau împreună, la 48 de ore de la ligaturarea arterei coronare stângi la șobolani, au supraviețuit și nu au migrat de la locul unde au fost injectate la 72 de ore de la momentul efectuării transplantului intramiocardic. Aceste rezultate au fost concordante prin toate tehnicile folosite, respectiv microscopie electronica de transmisie, microscopie cu fluorescență și citometrie în flux.

Mai mult, prin microscopia electronică de transmisie s-a arătat că în anumite regiuni, în loturile la care au fost transplantate celule interstițiale, conținând TC, acestea par a fi aglomerate în imediata vecinătate a cardiomiocitelor restante. Este astfel posibil ca TC transplantate să formeze contacte heterocelulare cu cardiomiocitele existente, făcând astfel posibilă menținerea structurii și ameliorarea funcției cardiace.

O altă descoperire extrem de interesantă, este aceea că la microscopia cu fluorescență se remarcă o distanță mică între celulele interstițiale, conținând TC și CS transplantate, această sugerând o posibilă „colaborare” între cele două categorii celulare la nivelul miocardului unde au fost injectate.

În urma analizei ecocardiografice, nu s-a putut evidenția un impact favorabil pe termen scurt al transplantului celular asupra remodelării VS și funcției cardiace sistolice globale și diastolice, evaluate separat, cât și împreună prin indicii de performanță miocardică, în niciunul dintre loturile studiate. Astfel s-a observat în lotul TCCS creșterea ariei sistolice și diastolice a VS și a volumului diastolic a VS, la 72 de ore de la transplant, comparativ cu momentul inițial, dar nu s-au evidențiat diferențe ale evoluției acestor parametrii, comparativ între loturi.

S-a remarcat însă o ameliorare a funcției sistolice longitudinale, evaluată prin MAPSE lateral și a celei radiale, evaluată prin DMRG în lotul TCCS comparativ cu lotul CS. De asemenea s-a obținut o ameliorare a funcției sistolice longitudinale, evaluată prin MAPSE septal, în cadrul lotului TCCS la 72 de ore după transplant, comparativ cu momentul inițial. Nu s-au evidențiat modificări semnificative privind funcția cardiacă sistolică longitudinală, radială sau circumferențială între celelalte loturi.

Rezultatele studiului nostru, privind remodelarea și funcția cardiacă sistolică globală a VS, sunt discordante comparativ cu celelalte două studii publicate de un grup de cercetători din China, privind transplantul celular de TC în infarctul miocardic experimental la șobolanul de laborator. Aceștia au demonstrat ca, în lotul în care s-au transplantat TC, diametrul VS, măsurat atât în sistolă, cât și în diastolă, scade, iar FEVS, cuantificată prin formulă-arie lungime, crește (67, 77).

Există însă câteva diferențe în ceea ce privește protocolul folosit de Zhao *et al.* față de cel folosit de noi, dintre care cele mai relevante sunt următoarele: transplantul celular a fost efectuat în aceeași intervenție chirurgicală, respectiv la 30 minute după ligaturarea arterei coronare stângi, suspensiile celulare au fost injectate în 5 locuri diferite, dintre care două în zona centrală de necroză și trei în zona de graniță, suspensiile celulare de TC nu au fost marcate inițial, ci TC au fost identificate ulterior prin obținerea semnalului pozitiv pentru 2 dintre markerii pentru care se știe ca acestea sunt pozitive, respectiv c-kit și CD34, și poate cel mai important, evaluarea ecocardiografică s-a efectuat la 14 zile, respectiv 14 săptămâni după efectuarea transplantului celular. Astfel spre deosebire de studiul nostru, în care evaluarea ecocardiografică s-a efectuat pe termen scurt, acestea două au demonstrat ameliorarea remodelării și funcției cardiace sistolice a VS, pe termen mediu (14 zile) și lung (14 săptămâni). De asemenea, spre deosebire de noi, care am identificat la 72 de ore după transplant, celulele pe care le-am marcat în prealabil cu Calceina, respectiv Vybrant Dil, în celelalte două studii s-au folosit doi markeri pentru identificarea TC care nu sunt specifici pentru acestea și, de asemenea, nu se știe cu siguranță dacă s-au identificat TC care au fost transplantate sau cele rezidente.

Termenul scurt pentru urmărirea funcțională, respectiv evaluarea ecocardiografică efectuată la 72 de ore de la transplant, poate reprezenta un factor important pentru lipsa rezultatelor pozitive privind prevenirea remodelării cardiace și a ameliorării funcției cardiace globale, atât sistolice, cât și diastolice. Acest termen de 72 de ore provine însă din faptul că marker-ul folosit pentru colorarea suspensiilor celulare de celule interstițiale, conținând TC este metabolizat, scăzându-i astfel treptat intensitatea, iar după maxim 96 de ore, aceasta dispare complet. De aceea celulele nu ar mai fi putut fi identificate la locul transplantului peste această perioadă de timp, prin microscopia cu fluorescență și citometria în flux. Din aceste considerente ecocardiografia a fost necesar să fie efectuată în primele 72 ore post transplant, deoarece imediat după, șobolanii a trebuit să fie sacrificați pentru a se putea evalua prezența și viabilitatea celulelor la locul de transplant.

În ceea ce privește limitele studiului de față, pe lângă cele tehnice legate de efectuarea ecocardiografiei și cele determinate de frecvența cardiacă crescută, menționate în capitolele anterioare, cât și cea legată de termenul scurt de urmărire a efectului transplantului celular asupra structurii și funcției cardiace, trebuie să menționăm și lipsa omogenității loturilor la momentul inițial. Deoarece șobolanii de laborator s-au ales astfel încât să aibă vârstă similară între loturi, și nu în funcție de greutate, au existat diferențe între aceștia privind suprafața corporală. De asemenea, din păcate, există și la șobolanul de laborator, diferențe, chiar dacă mici, în ceea ce privește

anatomia arterelor coronare. Astfel chiar dacă artera coronară stânga a fost ligaturată de fiecare dată la același nivel, respectiv imediat sub marginea inferioară a auriculului stâng, au existat câteva diferențe privind unii dintre parametrii ecocardiografici între loturi la momentul inițial. De aceea pentru a înlătura aceste diferențe dintre loturi la momentul 1, s-a creat o nouă variabilă cu ajutorul căreia s-au comparat loturile între ele, reprezentată de diferența dintre momentul 2 și momentul 1.

În concluzie, rezultatele studiului de față, sunt pozitive în sensul că atât celulele interstițiale, conținând TC, cât și CS au fost evidențiate la 72 de ore de la transplantul intramiocardic, în zonă de graniță a infarctului la șobolanul de laborator, ele nemigrând și supraviețuind condițiilor mediului ostil în care au fost introduse. În plus s-a demonstrat un efect pozitiv al transplantului de celule interstițiale, conținând TC împreună cu CS asupra funcției sistolice longitudinale și radiale, comparativ cu transplantul de CS singure.

CAPITOLUL 7. ORIGINALITATEA, CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ȘI PERSPECTIVELE DE CERCETARE

În prima etapă a elaborării acestei lucrări am stabilit fezabilitatea cuantificării și valorile normale ale parametrilor ecocardiografici standard și noi, derivați din TDI și STE, folosiți pentru evaluarea structurii și funcției cardiace la șobolanii de laborator. Aceste valori pot fi folosite drept valori de referință pentru masculii tineri din speciile Sprague-Dawley și Wistar. De asemenea am demonstrat, în urma evaluării prin tehnici ecocardiografice standard și noi, faptul că aceste două specii "*outbred*" de șobolani de laborator nu au decât diferențe minore privind structura VS, în timp ce funcția cardiacă este similară.

În cea de-a doua etapă am elaborat un protocol ecocardiografic complet, care cuprinde atât parametrii convenționali, cât și parametrii specifici funcției miocardice, derivați din TDI și STE, folosit pentru a evalua impactul infarctului miocardic la șobolanii de laborator, în vederea cuantificării remodelării VS și a funcției cardiace globale și regionale (longitudinale, circumferențiale și radiale). Deoarece acest protocol ecocardiografic, cuprinde și parametrii derivați din TDI și STE, considerăm că se pot detecta, cu ajutorul lui, modificări mai subtile ale funcției cardiace decât ecocardiografia standard.

Până în prezent, rezultatele terapiei regenerative asupra funcției cardiace, atât la animalele mici de laborator, cât și la oameni, au fost în principal evaluate, doar prin măsurarea fracției de scurtare sau de ejeție a ventriculului stâng, putând astfel să se omită posibilele modificări subtile, precum și cele specifice fiecărei funcții regionale în parte, respectiv longitudinale, circumferențiale sau radiale. Propunem astfel ca evaluarea remodelării și funcției cardiace a VS, atât din studiile preclinice, cât mai ales din cele clinice, ce evaluează rolul terapiei regenerative în infarctul miocardic, să se realizeze folosind acest protocol complex elaborat în lucrarea de față.

În cea de-a treia etapă a fost evaluat efectul terapiei regenerative în infarctul miocardic experimental la șobolan, pe termen scurt, respectiv la 72 de ore de la efectuarea transplantului de celule interstițiale, conținând TC, singure sau împreună cu CS cardiace. Acest protocol a implicat colaborarea într-o echipă multidisciplinară de cercetători, din mai multe domenii, precum cardiologia, fiziologia, chirurgia cardiotoracică, histologia, biologia celulară și moleculară. Astfel evaluarea rolului morfologic și funcțional al TC în repararea și regenerarea cardiacă din infarctul

miocardic experimental la șobolanul de laborator, a presupus analiza celulară prin diferite metode de microscopie (optică, electronică, fluorescență) și prin citometrie în flux, precum și analiza impactului funcțional prin tehnici ecocardiografice standard și noi.

Așadar studiul de față este primul de acest fel din România și al treilea la nivel internațional.

Prin metodele folosite am reușit să demonstrăm că celulele transplantate, fie celule interstițiale, conținând TC singure, fie împreună cu CS cardiace, sau CS cardiace singure, au supraviețuit după 72 de ore de la efectuarea transplantului la locul unde au fost injectate și nu au migrat, demonstrând astfel proprietățile de retenție și de „grefare”. În plus prin microscopia optică de transmisie și prin cea cu fluorescență, s-a observat un contact apropiat între TC și cardiomiocite, respectiv între TC și CS, sugerând astfel o posibilă „colaborare” celulară.

Rezultatele studiului nostru nu au evidențiat un efect favorabil pe termen scurt, respectiv la 72 de ore după transplantul celular intramiocardic, privind remodelarea și funcția cardiacă globală, atât sistolică, precum și diastolică, însă s-au obținut rezultate pozitive în ceea ce privește funcția sistolică longitudinală și radială în urma transplantului de celule interstițiale, conținând TC împreună cu CS, comparativ cu transplantul de CS singure.

Datele din studiul de față sunt discordante față de cele publicate în literatură, privind ameliorarea remodelării și îmbunătățirea fracției de ejeție a VS după transplantul de TC (67, 77). Totuși spre deosebire de aceste două studii, în care funcția cardiacă a fost evaluată pe termen mediu (14 zile) și pe termen lung (14 săptămâni) de la efectuarea transplantului celular, în protocolul nostru, evaluarea ecocardiografică s-a efectuat la doar 72 de ore de la transplantul intramiocardic.

Deoarece am fost limitați în acest sens de dispariția completă a markerului folosit pentru colorarea suspensiilor de celule interstițiale, conținând telocite la maxim 96 de ore, de aici rezultând necesitatea sacrificării animalului la 72 de ore de la transplant, vom continua acest studiu prin folosirea unei alte metode de identificare a celulelor implantate. Ne propunem astfel folosirea pentru obținerea culturilor celulare de TC, a șobolanilor de laborator transgenici ale căror celule exprimă pentru toată viața o proteină verde fluorescent (87). Pentru colorarea suspensiilor de CS vom folosi un marker special Vybrant Dio (Thermo Fisher Scientific, Leiden, Netherlands), pentru care am testat deja în vitro persistența fluorescenței până la maxim 4 săptămâni. Astfel evaluarea ecocardiografică va fi posibil să se efectueze în dinamică, săptămânal, iar impactul transplantului celular asupra structurii și funcției cardiace va putea fi evaluat pe termen mai lung.

BIBLIOGRAFIE

1. Townsend N, Wilson L, Bhatnagar P, Wickramasinghe K, Rayner M, Nichols M. Cardiovascular disease in Europe: epidemiological update 2016. *Eur Heart J*. 2016;37(42):3232-45.
2. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*. 2015;133(4):e38-e360.
3. Tatu-Chițoiu G. RO-STEMI - Primul registru roman pentru infarctul miocardic acut cu supradenivelare de segment ST (1997-2009). Raport final. București: Editura Medicală Amaltea; 2010.
4. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, Simoons ML, Chaitman BR, White HD. Third Universal Definition of Myocardial Infarction. *Circulation*. 2012;126(16):2020-35.
5. Arbustini E, Dal Bello B, Morbini P, Burke AP, Bocciarelli M, Specchia G, et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart (British Cardiac Society)*. 1999;82(3):269-72.
6. Hochman JS, Bulkley BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation*. 1982;65(7):1446-50.
7. Herman MV, Heinle RA, Klein MD, Gorlin R. Localized disorders in myocardial contraction. Asynergy and its role in congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1967;277(5):222-32.
8. Hole T, Vegsundvag JA, Morstol TH, Skaerpe T. Early changes in left ventricular volume and function are predictors for long-term remodeling in patients with acute transmural myocardial infarction and preserved systolic function. *J Am Soc Echocardiogr*. 2003;16(6):630-7.
9. Hebel R., Stromberg MW. *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. Germany: BioMed Verlag; 1986.
10. Taira Y KH, Nakamura M. The distribution of ischaemia in perfused Wistar rat hearts following coronary artery occlusion. *Br J Exp Pathol*. 1985;66(5):613-21.
11. Hood WB, Jr., McCarthy B, Lown B. Myocardial infarction following coronary ligation in dogs. Hemodynamic effects of isoproterenol and acetylcholine. *Circ Res*. 1967;21(2):191-9.
12. Johns TN, Olson BJ. Experimental myocardial infarction. I. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann Surg*. 1954;140(5):675-82.
13. Redfors B, Shao Y, Omerovic E. Influence of anesthetic agent, depth of anesthesia and body temperature on cardiovascular functional parameters in the rat. *Lab Anim*. 2014;48(1):6-14.
14. Popio KA, Jackson DH, Ross AM, Schreiner BF, Yu PN. Hemodynamic and respiratory effects of morphine and butorphanol. *Clin Pharmacol Ther*. 1978;23(3):281-7.
15. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2016;1-14..
16. Vinereanu D, Khokhar A, Fraser AG. Reproducibility of pulsed wave tissue Doppler echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 1999;12(6):492-9.
17. Vinereanu D, Gherghinescu C, Ciobanu A, Magda S, Niculescu N, Dulgheru R, et al. Reversal of subclinical left ventricular dysfunction by antihypertensive treatment: a prospective trial of nebivolol against metoprolol. *J Hypertens*. 2011;29(4):809-17.
18. Vinereanu D, Dulgheru R, Magda S, Dragoi Galrinho R, Florescu M, Cinteza M, et al. The effect of indapamide versus hydrochlorothiazide on ventricular and arterial function in patients with hypertension and diabetes: results of a randomized trial. *Am Heart J*. 2014;168(4):446-56.
19. Margulescu AD, Rimbas RC, Florescu M, Dulgheru RE, Cinteza M, Vinereanu D. Cardiac adaptation in acute hypertensive pulmonary edema. *Am J Cardiol*. 2012;109(10):1472-81.
20. Florescu M, Benea DC, Rimbas RC, Cerin G, Diena M, Lanzillo G, et al. Myocardial systolic velocities and deformation assessed by speckle tracking for early detection of left ventricular dysfunction in asymptomatic patients with severe primary mitral regurgitation. *Echocardiography*. 2012;29(3):326-33.

21. Yu CM, Sanderson JE, Marwick TH, Oh JK. Tissue Doppler imaging a new prognosticator for cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49(19):1903-14.
22. Jensen JL, Williams FE, Beilby BJ, Johnson BL, Miller LK, Ginter TL, et al. Feasibility of obtaining pulmonary venous flow velocity in cardiac patients using transthoracic pulsed wave Doppler technique. *J Am Soc Echocardiogr.* 1997;10(1):60-6.
23. Jurcut R, Pappas CJ, Masci PG, Herbots L, Szulik M, Bogaert J, et al. Detection of regional myocardial dysfunction in patients with acute myocardial infarction using velocity vector imaging. *J Am Soc Echocardiogr.* 2008;21(8):879-86.
24. Drăgoi Galrinho R, Ciobanu A, Rimbaș R, Manole C, Marinescu B, Vinereanu D. New echocardiographic protocol for the assessment of experimental myocardial infarction in rats. *Maedica - a Journal of Clinical Medicine.* 2015;10(2):85-90.
25. Drăgoi Galrinho R, Rimbaș R, Ciobanu A, Marinescu B, Cintează M, Vinereanu D. Gender differences in left ventricular structure and function by conventional and speckle tracking echocardiography in Sprague Dawley rats. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2014;15((suppl 2)):ii196-ii223.
26. Drăgoi Galrinho R, Ciobanu A, Rimbaș R, Marinescu B, Cintează M, Vinereanu D. Similar Left and Right Ventricular function in Sprague-Dawley and Wistar rat strains - implications for experimental cardiology. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2014;15 (suppl 2): ii196-ii223.
27. Baker M. Stem cells by any other name. *Nature.* 2007;449(7161):389.
28. Madonna R, Van Laake LW, Davidson SM, Engel FB, Hausenloy DJ, Lecour S, et al. Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group Cellular Biology of the Heart: cell-based therapies for myocardial repair and regeneration in ischemic heart disease and heart failure. *Eur Heart J.* 2016;37(23):1789-98.
29. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410(6829):701-5.
30. Yoshioka T, Ageyama N, Shibata H, Yasu T, Misawa Y, Takeuchi K, et al. Repair of infarcted myocardium mediated by transplanted bone marrow-derived CD34+ stem cells in a nonhuman primate model. *Stem Cells.* 2005;23(3):355-64.
31. Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, Landa N, Miller L, Daniels D, et al. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation.* 2007;116(11 Suppl):I38-45.
32. Feygin J, Mansoor A, Eckman P, Swingen C, Zhang J. Functional and bioenergetic modulations in the infarct border zone following autologous mesenchymal stem cell transplantation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(3):H1772-80.
33. Perin EC, Silva GV, Assad JA, Vela D, Buja LM, Sousa AL, et al. Comparison of intracoronary and transendocardial delivery of allogeneic mesenchymal cells in a canine model of acute myocardial infarction. *J Moll Cell Cardiol.* 2008;44(3):486-95.
34. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation.* 2007;115(7):896-908.
35. Caspi O, Huber I, Kehat I, Habib M, Arbel G, Gepstein A, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2007;50(19):1884-93.
36. Miki K, Uenaka H, Saito A, Miyagawa S, Sakaguchi T, Higuchi T, et al. Bioengineered myocardium derived from induced pluripotent stem cells improves cardiac function and attenuates cardiac remodeling following chronic myocardial infarction in rats. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(5):430-7.

37. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Dobert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation*. 2002;106(24):3009-17.
38. Leistner DM, Fischer-Rasokat U, Honold J, Seeger FH, Schachinger V, Lehmann R, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): final 5-year results suggest long-term safety and efficacy. *Clin Res Cardiol*. 2011;100(10):925-34.
39. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1210-21.
40. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet*. 2004;364(9429):141-8.
41. Meyer GP, Wollert KC, Lotz J, Steffens J, Lippolt P, Fichtner S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOW transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation*. 2006;113(10):1287-94.
42. Huikuri HV, Kervinen K, Niemela M, Ylitalo K, Saily M, Koistinen P, et al. Effects of intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells on left ventricular function, arrhythmia risk profile, and restenosis after thrombolytic therapy of acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008;29(22):2723-32.
43. Lunde K, Solheim S, Aakhus S, Arnesen H, Abdelnoor M, Egeland T, et al. Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355(12):1199-209.
44. Roncalli J, Mouquet F, Piot C, Trochu JN, Le Corvoisier P, Neuder Y, et al. Intracoronary autologous mononucleated bone marrow cell infusion for acute myocardial infarction: results of the randomized multicenter BONAMI trial. *Eur heart J*. 2011;32(14):1748-57.
45. Janssens S, Dubois C, Bogaert J, Theunissen K, Deroose C, Desmet W, et al. Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2006;367(9505):113-21.
46. Hirsch A, Nijveldt R, van der Vleuten PA, Tijssen JG, van der Giessen WJ, Tio RA, et al. Intracoronary infusion of mononuclear cells from bone marrow or peripheral blood compared with standard therapy in patients after acute myocardial infarction treated by primary percutaneous coronary intervention: results of the randomized controlled HEBE trial. *Eur Heart J*. 2011;32(14):1736-47.
47. Traverse JH, Henry TD, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, Ellis SG, et al. Effect of the use and timing of bone marrow mononuclear cell delivery on left ventricular function after acute myocardial infarction: the TIME randomized trial. *Jama*. 2012;308(22):2380-9.
48. Traverse JH, Henry TD, Ellis SG, Pepine CJ, Willerson JT, Zhao DX, et al. Effect of intracoronary delivery of autologous bone marrow mononuclear cells 2 to 3 weeks following acute myocardial infarction on left ventricular function: the LateTIME randomized trial. *Jama*. 2011;306(19):2110-9.
49. Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, Springeling T, de Jong R, van Geuns RJ, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(5):539-40.
50. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived aUtologous stem CELls to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol*. 2014;63(2):110-22.

51. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, et al. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012;126(11 Suppl 1):S54-64.
52. Popescu LM, Gherghiceanu M, Manole CG, Fausone-Pellegrini MS. Cardiac renewing: interstitial Cajal-like cells nurse cardiomyocyte progenitors in epicardial stem cell niches. *J Cell Mol Med*. 2009;13(5):866-86.
53. Popescu LM, Fausone-Pellegrini M-S. TELOCYTES – a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med*. 2010;14(4):729-40.
54. Popescu BO, Gherghiceanu M, Kostin S, Ceafalan L, Popescu LM. Telocytes in meninges and choroid plexus. *Neurosci Lett*. 2012;516(2):265-9.
55. Gherghiceanu M, Manole CG, Popescu LM. Telocytes in endocardium: electron microscope evidence. *J Cell Mol Med*. 2010;14(9):2330-4.
56. Kostin S. Myocardial telocytes: a specific new cellular entity. *J Cell Mol Med*. 2010;14(7):1917-21.
57. Popescu LM, Manole CG, Gherghiceanu M, Ardelean A, Nicolescu MI, Hinescu ME, et al. Telocytes in human epicardium. *J Cell Mol Med*. 2010;14(8):2085-93.
58. Cantarero I, Luesma MJ, Junquera C. The primary cilium of telocytes in the vasculature: electron microscope imaging. *J Cell Mol Med*. 2011;15(12):2594-600.
59. Li H, Zhang H, Yang L, Lu S, Ge J. Telocytes in mice bone marrow: electron microscope evidence. *J Cell Mol Med*. 2014;18(6):975-8.
60. Hinescu ME, Gherghiceanu M, Mandache E, Ciontea SM, Popescu LM. Interstitial Cajal-like cells (ICLC) in atrial myocardium: ultrastructural and immunohistochemical characterization. *J Cell Mol Med*. 2006;10(1):243-57.
61. Popescu LM, Gherghiceanu M, Hinescu ME, Cretoiu D, Ceafalan L, Regalia T, et al. Insights into the interstitium of ventricular myocardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC). *J Cell Mol Med*. 2006;10(2):429-58.
62. Popescu LM, Curici A, Wang E, Zhang H, Hu S, Gherghiceanu M. Telocytes and putative stem cells in ageing human heart. *J Cell Mol Med*. 2015;19(1):31-45.
63. Xiao J, Chen P, Qu Y, Yu P, Yao J, Wang H, et al. Telocytes in exercise-induced cardiac growth. *J Cell Mol Med*. 2016;20(5):973-9.
64. Richter M, Kostin S. The failing human heart is characterized by decreased numbers of telocytes as result of apoptosis and altered extracellular matrix composition. *J Cell Mol Med*. 2015;19(11):2597-606.
65. Mandache E, Gherghiceanu M, Macarie C, Kostin S, Popescu LM. Telocytes in human isolated atrial amyloidosis: ultrastructural remodelling. *J Cell Mol Med*. 2010;14(12):2739-47.
67. Zhao B, Chen S, Liu J, Yuan Z, Qi X, Qin J, et al. Cardiac telocytes were decreased during myocardial infarction and their therapeutic effects for ischaemic heart in rat. *J Cell Mol Med*. 2013;17(1):123-33.
68. Manole CG, Cismasiu V, Gherghiceanu M, Popescu LM. Experimental acute myocardial infarction: telocytes involvement in neo-angiogenesis. *J Cell Mol Med*. 2011;15(11):2284-96.
69. Cretoiu D, Hummel E, Zimmermann H, Gherghiceanu M, Popescu LM. Human cardiac telocytes: 3D imaging by FIB-SEM tomography. *J Cell Mol Med*. 2014;18(11):2157-64.
70. Suciu L, Popescu LM, Regalia T, Ardelean A, Manole CG. Epicardium: interstitial Cajal-like cells (ICLC) highlighted by immunofluorescence. *J Cell Mol Med*. 2009;13(4):771-7.
71. Rusu MC, Pop F, Hostiuc S, Curca GC, Jianu AM, Paduraru D. Telocytes form networks in normal cardiac tissues. *Histol Histopathol*. 2012;27(6):807-16.

72. Yang Y, Sun W, Wu SM, Xiao J, Kong X. Telocytes in human heart valves. *J Cell Mol Med.* 2014;18(5):759-65.
73. Suciu L, Nicolescu MI, Popescu LM. Cardiac telocytes: serial dynamic images in cell culture. *J Cell Mol Med.* 2010;14(11):2687-92.
74. Gherghiceanu M, Popescu LM. Cardiac telocytes - their junctions and functional implications. *Cell Tissue Res.* 2012;348(2):265-79.
75. Albulescu R, Tanase C, Codrici E, Popescu DI, Cretoiu SM, Popescu LM. The secretome of myocardial telocytes modulates the activity of cardiac stem cells. *J Cell Mol Med.* 2015;19(8):1783-94.
76. Cismasiu VB, Popescu LM. Telocytes transfer extracellular vesicles loaded with microRNAs to stem cells. *J Cell Mol Med.* 2015;19(2):351-8.
77. Zhao B, Liao Z, Chen S, Yuan Z, Yilin C, Lee KKH, et al. Intramyocardial transplantation of cardiac telocytes decreases myocardial infarction and improves post-infarcted cardiac function in rats. *J Cell Mol Med.* 2014;18(5):780-9.
78. Miao Q, Shim W, Tee N, Lim SY, Chung YY, Ja KPMM, et al. iPSC-derived human mesenchymal stem cells improve myocardial strain of infarcted myocardium. *J Cell Mol Med.* 2014;18(8):1644-54.
79. Ja KPMM, Miao Q, Zhen Tee NG, Lim SY, Nandihalli M, J.A. Ramachandra C, et al. iPSC-derived human cardiac progenitor cells improve ventricular remodelling via angiogenesis and interstitial networking of infarcted myocardium. *J Cell Mol Med.* 2016;20(2):323-32.
80. Drăgoi Galrinho R, Manole C, Vinereanu D. Telocytes - a hope for cardiac repair after myocardial infarction. *Maedica - a Journal of Clinical Medicine* 2016;11(4):325-9.
81. Martin Bland J, Altman D. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986;327(8476):307-10.
82. Kim YJ, Sohn DW. Mitral annulus velocity in the estimation of left ventricular filling pressure: prospective study in 200 patients. *J Am Soc Echocardiogr.* 2000;13(11):980-5.
83. Ommen SR, Nishimura RA, Appleton CP, Miller FA, Oh JK, Redfield MM, et al. Clinical utility of Doppler echocardiography and tissue Doppler imaging in the estimation of left ventricular filling pressures: A comparative simultaneous Doppler-catheterization study. *Circulation.* 2000;102(15):1788-94.
84. Odorfer KI, Walter I, Kleiter M, Sandgren EP, Erben RG. Role of endogenous bone marrow cells in long-term repair mechanisms after myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2008;12(6b):2867-74.
85. Tei C, Ling LH, Hodge DO, Bailey KR, Oh JK, Rodeheffer RJ, et al. New index of combined systolic and diastolic myocardial performance: a simple and reproducible measure of cardiac function--a study in normals and dilated cardiomyopathy. *J Cardiol.* 1995;26(6):357-66.
86. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114(6):763-76.
87. Takeuchi K, Sereemasun A, Inagaki T, Hakamata Y, Kaneko T, Murakami T, et al. Morphologic characterization of green fluorescent protein in embryonic, neonatal, and adult transgenic rats. *Anat Rec A Discov Moll Cell Evol Biol.* 2003;274(2):883-6.